574.19243
ก6491
ร.3

# การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคจากผลไม้เน่าและอาหารหมักดอง

12 พ.ค. 2540

ปริญญานิพนธ์
ของ
จุรีย์ ปานกำเหนิด

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มีนาคม 2540

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
13939

# การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคจากผลไม้เน่าและอาหารหมักดอง

บทคัดย่อ

ของ

จุรีย์ ปานกำเหนิด

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2540

จากการนำแบคทีเรียทั้งหมด 126 ไอโซเลทที่แยกจากผลไม้เน่าและอาหารหมักดองจำนวน 50ชนิด มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคในอาหาร production medium ของ Kinoshita ซึ่งมีส่วนประกอบคิดเป็นร้อยละดังนี้คือ กลูโคส 5 ยูเรีย 0.8 meat extract 0.2 peptone 0.2 $K_2HPO_4$ 0.05 และ $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.007 โดยการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน แล้ววิเคราะห์หากรดกลูตามิคโดยวิธี โครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 8 ไอโซเลทสามารถผลิตกรดกลูตามิคในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.04-0.12 และเชื้อที่ผลิตกรดกลูตามิคสูงสุด คือเชื้อที่แยกได้จากผักกาดดอง (รหัส 27003) จากอำเภอกำแพงแสน จ. นครปฐม สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้เข้มข้นร้อยละ 0.12 เมื่อนำเชื้อนี้มาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis*

การชักนำเชื้อที่แยกได้จากผักกาดดอง (รหัส 27003) ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสง UV เป็นเวลา 3 นาที จะทำให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.1 และนำมาแยกได้ออกโซโทรปทั้งหมด 49 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคในอาหาร production medium พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 19 ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดร้อยละ 0.22 หลังจากนั้นนำเชื้อไอโซเลทที่ 19 ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งโดยใช้ NTG ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 25 นาทีพบว่าแยกได้โฮโมซีรีนออกโซโทรปทั้งหมด 100 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบความสามารถ ในการผลิตกรดกลูตามิคในอาหาร production medium พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 73 ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.26

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 พบว่าการใส่วิตามินบี 1 และไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดกลูตามิค ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิค คือแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารอินทรีย์ และอุณหภูมิ และเชื้อไอโซเลท ที่ 73 จะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ในอาหารที่มีส่วนประกอบคิดเป็นร้อยละดังนี้ คือ กลูโคส 2 ยูเรีย 0.5 meat extract 0.2 peptone 0.2 $K_2HPO_4$ 0.05 และ $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.007

# THE ISOLATION AND SELECTION OF GLUTAMIC ACID PRODUCING BACTERIA FROM SPOILED FRUITS AND FERMENTED FOODS

AN ABSTRACT

BY

CHUREE PANKUMNOED

Presented in partial fulfillment of the requirements for the

Master of Science degree in Biological Chemistry

at Srinakharinwirot University

March 1997

The 126 isolates of bacteria were isolated from 50 samples of spoiled fruits and fermented foods. These bacterial samples were screened for the glutamic acid production in Kinoshita's production medium containing 5 % glucose, 0.8% urea, 0.2 % meat extract, 0.2 % peptone, 0.05 % $K_2HPO_4$ and 0.007 % $MgSO_4$. $7H_2O$ by cultivated on reciprocal shaker with 140 rpm at room temperature (28 $^{o}$C) for 3 days. The glutamic acid production of these bacteria samples was analysed by paper chromatography. The result showed that 8 isolates can produce glutamic acid ranged from 0.04 % to 0.12 % of medium volume. The bacteria sample producing highest amount of glutamic acid (0.12%) was isolated from fermented chinese mustard (No. 27003) collected from Khamphangsaen Nakhorn Pathom. The studies on morphological and biological characteristics of the best producer (No. 27003) revealed that it should be *Bacillus subtilis*. This bacteria was induced mutagenesis by using UV and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) respectively. The servival rate of 0.1 % was obtained when treated with UV for 3 minutes. There were 49 isolates of auxotrophs isolated after UV treatment. The sample No. 19 can produce the highest amount of glutamic acid of 0.22 %. The auxotroph No. 19 was further treated with 0.25 mg/ml NTG for 25 minutes. After NTG treatment, 100 isolates of homoserine auxotrophs were obtained. Among these 100 isolates, the isolates No. 73 was found to produce glutamic acid in the highest amount of 0.26 %

The investigation of factors affecting the glutamic acid production of the isolate No. 73 revealed that the addition of vitamin B1 and biotin into the medium has no effect on the production of glutamic acid. The factors which have effect on the production of glutamic acid were carbon source, nitrogen source, organic substance and temperature. The production of glutamic acid of the isolation No. 73 can be increased up to 0.38 % in Kinoshita' production medium containing 2 % glucose , 0.5% urea, and 0.2 % meat extract and 0.2 % peptone and incubated at room temperature

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

( อ. ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ )

.....กรรมการ

( ผศ. สมใจ ศิริโภค )

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

( อ. ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ )

.....กรรมการ

( ผศ. สมใจ ศิริโภค )

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อ. ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

( ดร. ศิริยุภา พูลสุวรรณ )

วันที่ 13 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2540

# ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และแนะนำอย่างดียิ่งจากอ.ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และ ผศ. สมใจ ศิริโภค รวมทั้ง อ. ดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ และศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม รวมทั้งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร เป็นอย่างสูงที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องคอมพิวเตอร์ อุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณ คุณอรรถพร และคุณจตุรงค์ ขำดำรงเกียรติ และครอบครัว ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ใช้ เครื่องคอมพิวเตอร์ ตลอดจนช่วยพิมพ์และแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดามารดาและขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ที่ให้กำลังใจให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่น ๆ ที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

จุรีย์ ปานกำเหนิด

# สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | บทนำ | 1 |
| | ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า | 1 |
| | ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| | ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า | 2 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 3 | วิธีดำเนินการวิจัย | 11 |
| | อุปกรณ์และสารเคมี | 11 |
| | วิธีดำเนินการทดลอง | 11 |
| | การเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย | 11 |
| | การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิค | 11 |
| | การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคที่แยกได้จากธรรมชาติ | 12 |
| | การชักนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้ให้เกิดการกลายพันธุ์ | 12 |
| | การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิค | 14 |
| 4 | ผลการวิจัย | 15 |
| 5 | สรุปและอภิปรายผล | 34 |
| | ข้อเสนอแนะ | 36 |
| บรรณานุกรม | | 37 |
| ภาคผนวก | | 40 |
| ประวัติย่อของผู้วิจัย | | 47 |

# บัญชีตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | จำนวน และลักษณะของแบคทีเรียที่พบในอาหารต่าง ๆ ..... | 16 |
| 2 | ค่า Rf x 100 ของกรดอะมิโนที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกรดกลูตามิคมาตรฐาน ..... | 19 |
| 3 | ปริมาณการผลิตของกรดกลูตามิคมาตรฐานในตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ..... | 20 |
| 4 | ผลของแสง UV ต่อจำนวน และอัตราการอยู่รอดของเชื้อ ..... | 22 |
| 5 | ปริมาณการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงUV ..... | 23 |
| 6 | ความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... | 25 |
| 7 | ผลของชนิด และปริมาณคาร์บอนที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 27 |
| 8 | ผลของชนิด และปริมาณไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 28 |
| 9 | ผลของการใช้สารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆต่อการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 29 |
| 10 | ผลของการใช้ meat extract และ peptone ปริมาณต่าง ๆ ต่อการเจริญ และการผลิตของกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 30 |
| 11 | ผลของการใช้ไบโอตินปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 31 |
| 12 | ผลของวิตามินบี 1ที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ..... | 32 |
| 13 | ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิค ..... | 33 |
| 14 | ค่า $OD_{500}$ และความเข้มข้นของกรดกลูตามิคมาตรฐาน ..... | 45 |

# บัญชีภาพประกอบ


| ภาพประกอบ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงการผลิตกรดกลูตามิคจากกลูโคส..... | 7 |
| 2 | กราฟแสดงค่า $OD_{500}$ และความเข้มข้นของสารละลายกรดกลูตามิคมาตรฐาน | 46 |

# บทที่ 1
# บทนำ

กรดกลูตามิดเป็นกรดอะมิโนที่ใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ปรุงแต่งรสอาหารทั้งประเภทเนื้อสัตว์และผักต่าง ๆ ตลอดจนอาหารสำเร็จรูปและอาหารกึ่งสำเร็จรูป ทั้งยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมีอื่นได้อีกด้วย เช่น poly-γ-methyl glutamine การผลิตกรดกลูตามิดทำได้ทั้งการสังเคราะห์ทางเคมีและการหมัก แต่การสังเคราะห์ทางเคมีจะได้กรดกลูตามิดอยู่ในรูป L- form และ D-form ต้องใช้เอนไซม์เปลี่ยนให้อยู่ในรูป L- form อีก ปัจจุบันจึงนิยมใช้การผลิตโดยวิธีการหมัก ในปี ค.ศ. 1985 มีการผลิตทั่วโลกรวมกันประมาณ 4.6 แสนตัน และมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 ต่อปี (Cruger and Cruger. 1990) สำหรับในประเทศไทยมีการผลิตมากกว่า 50,000 ตันต่อปี (ข้อมูลของ บ. อายิโนะโมะโต๊ะ. 2539) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ และเทคโนโลยีที่ใช้ในกระบวนการผลิตนั้น ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศปีละเป็นจำนวนมาก

ดังนั้นหากมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียจากธรรมชาติ ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิดได้แล้วนำมาปรับปรุงสายพันธุ์โดยทำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet , UV) การใช้สารเคมี แล้วทดสอบหาออกโซโทรป (auxotroph) หรือ regulatory mutant ที่ผลิตกรดกลูตามิดได้มากขึ้น รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป อันจะทำให้เราสามารถพึ่งพาตนเองได้ในด้านเทคโนโลยีการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ของเราเอง และเป็นการลดการขาดดุลการค้าทำให้เศรษฐกิจของไทยดีขึ้น

## ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อแยกแบคทีเรีย และรวบรวมสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนได้จากผลไม้เน่าและอาหารหมักดองบางชนิด
2. เพื่อชักนำแบคทีเรียที่แยกได้ ให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถผลิตกรดกลูตามิดได้มากขึ้นโดยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสารเคมี
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูตามิดของแบคทีเรีย ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้มากจากธรรมชาติ
2. ได้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่กลายพันธุ์และผลิตกรดกลูตามิคได้สูงขึ้น ซึ่งอาจนำไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไปจนให้ผลผลิตสูงพอที่จะใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. แยกและเก็บแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้ จากตัวอย่างอาหารหมัก และผลไม้เน่า จำนวน 50 ตัวอย่าง
2. ชักนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูง ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV และ N-methyl-N′-nitro-N-nitrsoguanidine (NTG)
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียที่กลายพันธุ์แล้ว

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดอะมิโนมีความสำคัญต่อมนุษย์และสัตว์ต่างๆ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น แอล-ไลซีน ( L-lysine ) และ เมทไธโอนีน (L-methionine) เป็นกรดอะมิโนจำเป็นที่ใช้เติมลงในเมล็ดธัญญพืชเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น เช่น กรดกลูตามิคใช้เป็นสารปรุงรสอาหาร ทำให้อาหารมีรสอร่อยขึ้น จึงเป็นที่ต้องการอย่างมากในอุตสาหกรรมทุกประเภท นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอะมิโนในทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น แอล-กลูตามีน ( L-glutamine ) และแอล-ฮิสติดีน (L-histidine) ใช้รักษากระเพาะอาหารเป็นแผล เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ. 2530)

การผลิตกรดอะมิโนเป็นการค้าทำได้ 3 วิธีใหญ่ๆ คือ (Yamada and others. 1972)

1. วิธีการไฮโดรไลส์โปรตีนด้วยกรด การผลิตในระยะแรกๆ จะใช้วิธีนี้ เช่น การผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมท ( monosodium glutamate )

2. วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี กรดอะมิโนที่ผลิตได้จะอยู่ในรูป racemic (D,L-form) ดังนั้นจะต้องเปลี่ยนกรดอะมิโนที่อยู่ในรูป D-form เป็น L-form ซึ่งยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง

3. วิธีการสังเคราะห์โดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งมีวิธีการย่อยๆ 3 วิธี (Yamada. 1972) คือ

3.1 หมักโดยตรงจากแหล่งคาร์บอน ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้จะมาจากกระบวนการสังเคราะห์ของเชื้อแล้วปลดปล่อยออกมา เช่น การผลิตกรดกลูตามิค และ แอล-ไลซีน จากกลูโคส

3.2 หมักโดยเริ่มจากสารเริ่มต้นหรือ intermediate metabolite เช่น การผลิต แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) จากกรดแอนทรานิลิค (anthranilic acid)

3.3 ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ โดยการเลือกสับสเตรทของเอนไซม์ เช่น การผลิตกรดแอล-แอสพาร์ติค (L-aspartic acid) จากกรดฟูมาริค (fumaric acid)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนแบ่งได้เป็น 3 จำพวกคือ

1. จุลินทรีย์ตามธรรมชาติ (wild strains) ใช้ในการผลิตกรดกลูตามิค และแอล-กลูตามีน ส่วนการผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ จะผลิตได้ต่ำ ไม่สามารถทำเป็นระดับอุตสาหกรรมได้ (ดวงพร คันธโชติ. 2530)

2. จุลินทรีย์ที่กลายพันธุ์ที่เป็นออกโซโทรป (auxotrophic mutants) คือ จุลินทรีย์ ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ และมีความต้องการสารบางชนิดเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตสารที่ต้องการได้ ออกโซโทรปส่วนใหญ่จะได้จาก *Brevibacterium flavum* และ *Corynebacterium glutamicum* กรดอะมิโนที่ได้จากแบคที่เรียเหล่านี้ ได้แก่ แอล-ซิทรูลีน

(L-citrullin) แอล-โพรลีน (L-proline) แอล-ทรีโอนีน (L-threonine) และ แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)

3. จุลินทรีย์กลายพันธุ์พวกรกกุลาโทรี มิวแตนท์(Regulatory mutants) ใช้สารที่คล้ายคลึงกับกรดอะมิโนมาใช้เลือกสายพันธุ์ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เรียกว่าอนาลอค รีซีสแตนท์ มิวแตนท์ (analog-resistant mutants) ซึ่งผลิตกรดอะมิโนได้มาก ใช้ผลิต แอล-อาร์จินิน (L-arginine) แอล-ฮิสติดีน แอล-ไอโซลูซีน (L-isoleucine) แอล-ไลซีน แอล-เมทไธโอนีน แอล-เฟนิลอะลานีน (L-phenylalanine) แอล-ทรีโอนีน แอล-ทริปโตเฟน แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และ แอล-วาลีน (L-valine) (ดวงพร คันธโชติ. 2530 ; Chancharoensin. 1982)

กรดกลูตามิค เป็นผลผลิตปฐมภูมิจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ของสารประกอบไนโตรเจนในสิ่งมีชีวิต และกลูตามิค ดีไฮโดรจิเนส ซิสเต็ม(glutamic dehydrogenase system) ก็มีความสำคัญในการเชื่อมโยงระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรต ตามปกติแล้วจุลินทรีย์จะผลิตกรดกลูตามิค ปริมาณไม่มากนักแต่เพียงพอสำหรับการดำรงชีวิต นอกจากนี้กรดกลูตามิคที่เกิดขึ้นยังเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น และโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นโดยทั่วไปจุลินทรีย์ในธรรมชาติจึงมักไม่สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้มากพอที่จะใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้โดยตรง

ในปี ค.ศ. 1908 ชาวญี่ปุ่นได้ค้นพบว่ากรดกลูตามิคมีคุณสมบัติในการเ พิ่มรสชาติของอาหาร ซึ่งการผลิตกรดกลูตามิคในขณะนั้นมีกรรมวิธีการผลิต 2 วิธีคือ

1. การสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งต้องการเอนไซม์ในการเปลี่ยนจาก D,L-form เป็น L -form

2. การเปลี่ยนจากกรดแอลฟา-คีโตกลูตาริค (ketoglutaric acid) หรือกรดซิตริก (citric acid) โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์

แต่การผลิตทั้ง 2 วิธียังไม่เหมาะที่จะทำในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ โดยครั้งแรก คิตะ (Kita) ผลิตจากของเหลือใช้ทางการเกษตร ได้กรดกลูตามิค 3.5 กรัมต่อลิตร ต่อมาทาดะและนากะยามะ(Tada and Nakayama) สามารถผลิตได้ 14.5 กรัมต่อลิตร แต่ยังไม่ได้ใช้การหมักโดยตรงจากคาร์บอน (Yamada and others. 1972)

ในปี ค.ศ. 1957 คิโนะชิตะและคนอื่นๆ (Kinoshita and others. 1957) ได้ศึกษาการผลิตกรดกลูตามิคของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย สเตรปโตมัยสีส ยีสต์ และรา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรท และแอมโมเนียซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก การตรวจหากรดกลูตามิคหรือกรดอะมิโนอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ (paper-chromatography) พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคสูงสุด คือแบคทีเรียในกลุ่ม

corynebacterium. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก(Gram-positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) รูปร่างไม่แน่นอนมีตั้งแต่กลมรีจนถึงเป็นท่อน ต้องการไบโอตินในการเจริญและสร้างกรดกลูตามิค และสายพันธุ์ที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูง มักจะขาดหรือมีกิจกรรมแอลฟา-คีโตกลูตาเรท ดีไฮโดรจิเนส (α - ketoglutarate dehydrogenase) น้อย และมีกิจกรรม กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส ( glutamate dehydrogenase) เพิ่มมากขึ้น (Kinoshita and others. 1957; Yamada and others. 1972 ; Chancharoensin. 1982)

นอกจากนี้คิโนะชิตะและคนอื่นๆ ยังพบว่าปริมาณไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคของ *Corynebacterium glutamicum* ถ้าใช้ไบโอตินความเข้มข้น 10-20 ไมโครกรัมต่อลิตร แบคทีเรียจะเจริญได้ดี แต่ผลิตกรดกลูตามิคได้น้อย ความเข้มข้นของ ไบโอติน ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูตามิคจะมีค่าน้อยกว่า 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการผลิตและปลดปล่อยกรดกลูตามิคของเชื้อชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งถูกชักนำโดยการจำกัดปริมาณไบโอติน (Kinoshita and others. 1957)

โอทานิและคนอื่นๆ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไบโอตินเพิ่มขึ้น จะทำให้ผนังเซลล์มีไขมันมากขึ้นการผลิตกรดอะมิโนจะลดลง(Otani and others. 1965) อย่างไรก็ตามสามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ในอาหารที่มีไบโอตินสูง ในกรณีที่เติมเพนนิซิลินลงไปในช่วง growth phase ซึ่งจะทำให้เซลล์บวมหรือยืดออก กรดกลูตามิคจะถูกปลดปล่อยจากเซลล์มาสะสมในอาหาร (Chancharoensin. 1982 ; Hong and others. 1984)

การผลิตกรดกลูตามิคโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ ทำได้ทั้งแบบ

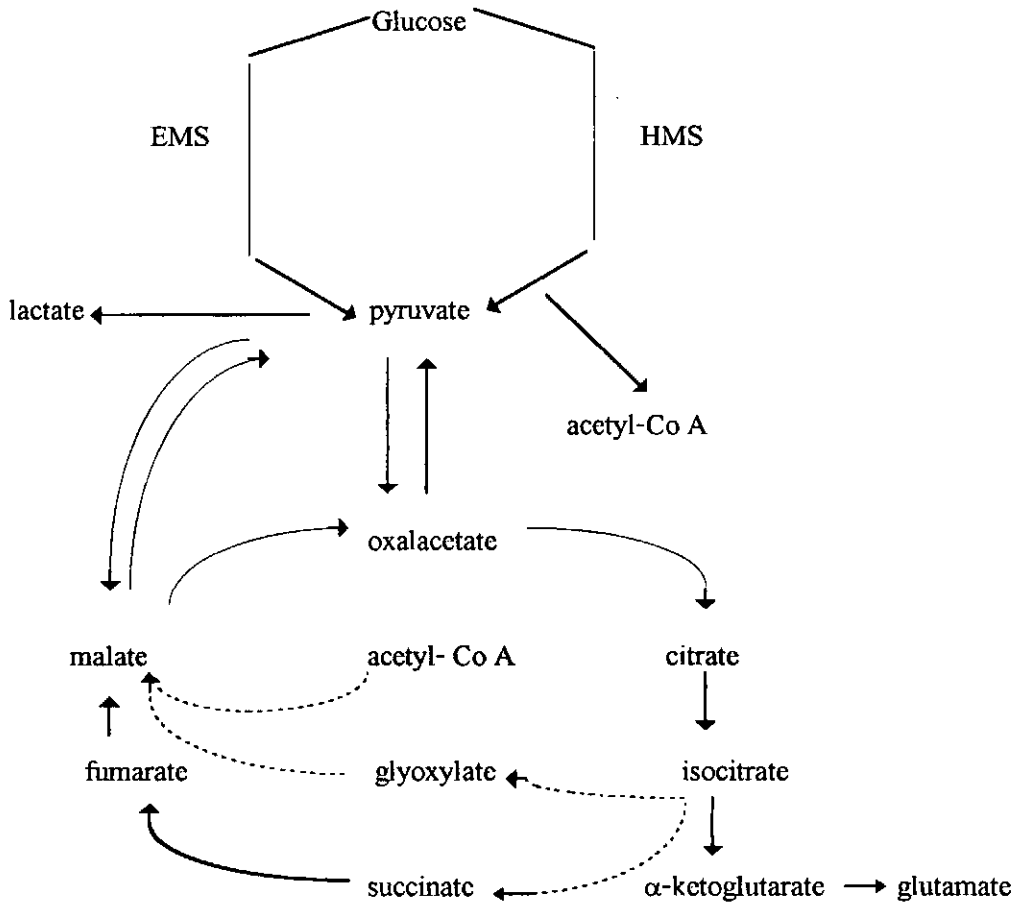
โซลิดสเตท เฟอร์เมนเตชัน (solid state fermentation) โดยหมักบนอาหารแข็ง ซึ่งมีการเติมน้ำเล็กน้อย เพียงเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น เช่นการใช้เชื้อ *Brevibacterium* sp. หมักบนชานอ้อยที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 10 ร่วมกับยูเรีย แร่ธาตุ และวิตามินในการผลิตกรดกลูตามิค ซึ่งให้ผลผลิตกรดกลูตามิค 80 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของชานอ้อย เมื่อมีความชื้นร้อยละ 85 - 90 (Nampoothiri and Pandey. 1996) การผลิตกรดแกมมา -โพลีกลูตามิค โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* (natto) (Yamaguchi and others. 1996)

และแบบซับเมอร์จเฟอร์เมนเตชั่น (submerged fermentation) โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว เช่น การผลิตกรดกลูตามิค โดยใช้เชื้อ *Brevibacterium* sp. โดยเอไซและคนอื่นๆ (Asai and others. 1978) ใช้กากน้ำตาลที่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 50-58 ซดาโนวาและคนอื่นๆ (Zhdanova and others. 1977) ได้เลี้ยงเชื้อในอาหาร ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเชื้อโดยการเขย่าที่

700-1,300 รอบต่อนาที ได้ผลผลิตกรดกลูตามิคสูงถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (คิดเป็นร้อยละ 10) ซึชิดะและคนอื่นๆ (Tsuchida and others. 1984) ใช้เทคนิคการตัดต่อ DNA และเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคส วิตามินบี 1 และไบโอติน สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ 1,000 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร(คิดเป็นร้อยละ 10)

กลไกและการควบคุมการสังเคราะห์กรดกลูตามิค

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเมแทบอไลซ์กลูโคสโดยผ่านทางเอมเดน-เมเยอร์ฮอฟ-พาร์นาส พาธเวย์ (Embden-Meyerhof-Parnas ; EMP pathway) หรือ เฮกโซส โมโนฟอสเฟต ชั้น (Hexose Monophosephate Shunt ; HMS) ได้เป็นไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรกรดตรัยคาร์บอกซิลิก(Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle) ทำให้เกิดกรดแอลฟา-คีโตกลูตาริค และในที่สุดก็จะทำให้เกิดกรดกลูตามิคได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 1 ในแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูง เช่น *C. glutamicum* นั้นพบว่าไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ แอลฟา-คีโตกลูตาเรท ดีไฮโดรจิเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง แอลฟา-คีโตกลูตาเรทไปเป็นซัคซิเนท (Succinate) ใน TCA cycle จึงทำให้มี แอลฟา-คีโตกลูตาเรท เหลือสะสมอยู่ในปริมาณมาก แบคทีเรียจึงเปลี่ยนแอลฟา-คีโตกลูตาเรทไปเป็นกลูตาเมท และแบคทีเรียพวกนี้จะได้ออกซาโลอะซีเตท (Oxaloacetate) มาจากกลัยออกซิเลท พาธเวย์ (glyoxylate pathway) ดังแสดงในภาพประกอบ 1




ภาพประกอบ 1 การผลิตกรดกลูตามิคจากกลูโคส (Yamada. 1972)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดกลูตามิดของแบคทีเรีย (Yamada and others. 1972)

1. แหล่งธาตุคาร์บอน วัตถุดิบที่แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูตามิดได้มีหลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส มอลโตส ไรโบส และไซโลส แต่โดยทั่วไปจะนิยมใช้กลูโคสและซูโครส โดยการผลิตในระดับอุตสาหกรรม มักจะใช้วัตถุดิบเริ่มต้นในรูปของแป้ง แล้วนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์ หรือ อาจใช้ในรูปของกากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท อย่างไรก็ตามการใช้แหล่งคาร์บอนอย่างเช่น กากน้ำตาลจากอ้อยนั้นจะต้องใช้เทคนิคพิเศษในการหมัก เนื่องจากกากน้ำตาลจากอ้อยมีไบโอตินอยู่สูง ซึ่งจะมีผลทำให้ผลิตกรด กลูตามิดได้น้อย

2. แหล่งไนโตรเจน วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดกลูตามิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียเหลว แก๊ซแอมโมเนีย และยูเรีย ในการผลิตกรดกลูตามิดนั้นแม้ว่า จะต้องการ $NH_4^+$ ปริมาณมาก แต่การใส่ $NH_4^+$ ความเข้มข้นสูง ๆ ลงในอาหารจะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิดได้เช่นกัน ดังนั้นโดยทั่วไปในระยะแรกจึงมักใส่ $NH_4^+$ ความเข้มข้นน้อยๆ ก่อน และค่อยๆ เติมเพิ่มลงไปทีละน้อยในระหว่างการหมัก โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำแอมโมเนีย หรือแก๊ซแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน

3. เกลือแร่ โดยทั่วไปจะใช้เกลือแร่ในรูปสารประกอบความเข้มข้นคิดเป็นร้อยละต่างๆ กันดังนี้คือ $KH_2PO_4$ 0.05-0.2 $K_2HPO_4$ 0.05-0.2 Mg $SO_4$ .$7H_2O$ 0.025-0.1 $FeSO_4$ . $7H_2O$ 0.0005-0.01 $MnSO_4$ . $4H_2O$ 0.0005-0.005 $K_2SO_4$ 0.01-0.3 $FeCl_3$ . $6H_2O$ 0.0005-0.01 และ $CaCO_3$ 0.5 - 4

แร่ธาตุมีความสำคัญและมีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิด ได้แก่ $Fe^{2+}$ , $K^+$ และ $Mn^{2+}$ ปริมาณของ $K^+$ ที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดกลูตามิดจะมากกว่าที่ต้องการสำหรับการเจริญ แบคทีเรียต้องการ $K^+$ ประมาณร้อยละ 0.01 สำหรับการเจริญในขณะที่ต้องการ $K_2SO_4$ สำหรับการผลิตกรดกลูตามิดประมาณร้อยละ 0.02-0.1 ซึ่งในช่วงความความเข้มข้นนี้ ปริมาณการผลิตกรดกลูตามิดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ $K_2SO_4$ ที่ใส่ลงไปในอาหาร

สำหรับเชื้อ *Microbacterium ammoniaphilum* มีรายงานว่าถ้าเติม $Zn^{2+}$ 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อผลิตกรดกลูตามิดได้เพิ่มขึ้น

4. อาหารเสริม ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตกรดกลูตามิด ได้แก่ ไบโอติน ซึ่งเป็นวิตามินที่จำเป็นสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย ที่ผลิตกรดกลูตามิด ในการหมักกรดกลูตามิดจะต้อง

ใช้ ไบโอตินความเข้มข้นต่ำกว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เนื่องจากไบโอติน เป็นวิตามินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ การสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ถ้ามีไบโอตินปริมาณน้อยการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจะไม่สมบูรณ์ กรดกลูตามิคที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านออกนอกเซลล์ได้ง่ายขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ลดการเกิดการควบคุมแบบย้อนกลับ (feed back control) ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตและปลดปล่อยกรดกลูตามิคออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไบโอตินต่อการผลิตกรดกลูตามิคของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ จะแตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปจะต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังต้องการ ไทอะมีน หรือ ซิสทีนอีกด้วย

5. pH โดยทั่วไปแบคทีเรียจะผลิตกรดกลูตามิคได้ดีในช่วง pH 7.0-8.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ควรมีการปรับ pH ในระหว่างการหมักด้วย เนื่องจากกรดกลูตามิคและกรดอินทรีย์อื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจะทำให้อาหารมี pH เป็นกรดได้ ในกระบวนการหมักที่มีการเติม $NH_4^+$ อย่างต่อเนื่อง นอกจากจะเป็นการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนลงไปแล้วยังช่วยรักษา pH ให้อยู่ในช่วงที่เป็นด่าง อ่อน ๆ ด้วย

6. การให้อากาศ การผลิตกรดกลูตามิคจะเกิดขึ้นได้ดี ในสภาพที่มีการให้อากาศปริมาณที่เหมาะสม การให้ออกซิเจนน้อยหรือมากเกินไป จะทำให้ผลผลิตกรดกลูตามิคลดลง ในกรณีที่มีออกซิเจนน้อยจะผลิตกรดแลคติค และซัคซินิคแทน และในกรณีที่มีการให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ปริมาณกรดแอลฟา-คีโตกลูตาริค เพิ่มมากขึ้น

7. อุณหภูมิ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดกลูตามิคจะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ถ้าบ่มเชื้อ sub-culture และ main culture ที่อุณหภูมิเดียวกัน เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้ประมาณร้อยละ 45 ของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป แต่ถ้าบ่มเชื้อ sub-culture ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่บ่มเชื้อ main culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้เพียงร้อยละ 15 แต่จะผลิตกรดแลคติคได้สูงถึงร้อยละ 25

นอกจากนี้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่างกันยังมีผลต่อความต้องการธาตุอาหารของจุลินทรีย์อีกด้วย ตัวอย่างเช่น ถ้าบ่มเชื้อ sub culture ของ *B. divaricateum* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่บ่มเชื้อ main culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือบ่มเชื้อทั้ง sub culture และ main culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะต้องการซิสทีนหรือซิสเทอีนในการเจริญด้วย

8. อื่น ๆ เช่นเพนนิซิลิน การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไบโอตินปริมาณสูงตามปกติแล้วจะทำให้ได้ผลผลิตกรดกลูตามิคลดลง แต่ถ้ามีการเติมเพนนิซิลินลงไปในอาหารในเวลาที่เหมาะสมในระยะ log phase จะทำให้แบคทีเรียผลิตและปลดปล่อยกรดกลูตามิคออกในอาหาร

เลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นในอาหารที่มีไบโอตินสูง เนื่องจากเพนนิซิลินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ จึงช่วยให้กรดกลูตามิคถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น และยังช่วยป้องกันการเกิดการควบคุมแบบย้อนกลับอีกด้วย จึงทำให้ได้ผลผลิตกรดกลูตามิคสูงขึ้น (Yamada and others. 1972)

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องเขย่า (shaker, CENTREX Model CT-1VS)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow, ISSCO)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง ( centrifuge, ALC Model 4214 )
4. เครื่องวัดการดูดแสง (spectrophotometer, Milton Roy Model Spectronic Genesys 5)
5. โหลแก้วขนาด 170x170x320 ลูกบาศก์มิลลิเมตรพร้อมฝาปิด
6. ขวดพ่นสเปรย์
7. กระดาษโครมาโตรกราฟฟี Whatman No.1
8. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานจุลชีววิทยาทั่วไป

## วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย

เพาะแยกแบคทีเรียจากผลไม้เน่าและอาหารหมัก ถ้าเป็นอาหารหมัก ใช้ส่วนน้ำและชิ้นอาหารเพาะบน modified nutrient agar (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ส่วนผลไม้จะเช็ดผิวนอกตัวอย่างด้วย แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 แล้วใช้กรรไกรจุ่มแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 เผาไฟ รอจนหมดเปลวจึงนำมาตัดตัวอย่างทางด้านในให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แล้วนำมาเพาะบนอาหาร modified nutrient agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วัน แล้วเพาะแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อในอาหาร modified nutrient agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปเก็บในตู้เย็นไว้เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิค

นำเชื้อจากข้อ 1 มาเลี้ยงบน growth medium (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญดีแล้วใส่ในอาหาร production medium (ภาคผนวก ก ข้อ 3) โดยใช้เชื้อ 1-2 ลูป ต่ออาหาร 25 มิลลิลิตรในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักครบ 3 วันไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ( 8,325x g) เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวใสมา

วิเคราะห์หากรดกลูตามิคโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ (ภาคผนวก ข ) (Smith. 1969; Gerhart. 1981; Bhushan. 1990)

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคที่แยกได้จากธรรมชาติ

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุด ที่แยกได้จากธรรมชาติทำโดยการย้อมสีแกรม (Gram's staining) (Cowan and Steel.1970 ; Manafi andKneifel. 1990)

การทดสอบการเจริญของเชื้อเมื่อต้มให้อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก ข้อ 5) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วศึกษาการเจริญของเชื้อนั้น

การย้อมสปอร์ เพื่อศึกษาลักษณะ และตำแหน่งของสปอร์

การทดสอบหาเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ทดสอบด้วยการเขี่ยเชื้อลงในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าให้ผลบวกจะเกิดฟองกาซ

การทดสอบทางชีวเคมี ตามวิธีของ โคแวนและสทีล (Cowan and Steel . 1970) โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อ เช่น Motility Citrate Gelatin Glucose(Acid) Arabinose(Acid) Manitol(Acid) Indole VP Nitrate และ Urease แล้วศึกษาการเจริญของเชื้อเมื่อบ่มไว้ 24 ชั่วโมง

4. การชักนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้ให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1 การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงUV ตามวิธีของยามะดะและคนอื่นๆ (Yamada and others. 1972) และ วัฒนวิบูลย์ (Vattanaviboon. 1985)

4.1.1 เขี่ยเชื้อจากอาหาร modified nutrient agar slant ลงใน minimal medium ( ภาคผนวก ก ข้อ 4) แล้วบ่มเชื้อโดยการเขย่าความเร็ว 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 22 ชั่วโมง

4.1.2 ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ค่า $OD_{660}$ เท่ากับ 0.1 โดยเจือจางด้วย minimal medium แล้วดูดใส่จานเพาะเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจานละ 7 มิลลิลิตร

4.1.3 นำจานเพาะเชื้อจากข้อ 4.1.2 ไปผ่านแสง UV ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ระยะห่างจากตัวอย่าง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 1-6 นาที

4.1.4 นำเชื้อที่ผ่านแสง UV แล้วใส่ลงใน complete medium บ่มเชื้อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ 2-3 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 นำไปที่ความเร็ว 10,000รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4.1.5 นำเชื้อที่ได้จากข้อ 4.1.4 ใส่ลงใน minimal medium ที่มีเพนนิซิลิน 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง

4.1.6 นำเซลล์ที่ได้เพาะลงใน complete agar บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อขึ้นดีแล้วนำไปแยกออกโซโทรปโดยใช้เทคนิค replica plating (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536) บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เชื้อที่ขึ้นได้ใน complete agar แต่ไม่ขึ้นใน minimal agar จะเป็นเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์พวกออกโซโทรป เก็บเชื้อเหล่านี้ไว้ในอาหาร complete agar slant

4.1.7 นำออกโซโทรปจากข้อ 4.1.6 ไปทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2 เปรียบเทียบกับเชื้อก่อนทำการกลายพันธุ์

4.2 การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

นำออกโซโทรปที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงจากข้อ 4.1.7 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ (NTG) ตามวิธีของ โตสะกะและคนอื่นๆ (Tosaka and others. 1978) ดังนี้

4.2.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร complete medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในหลอดทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.2.2 ล้างเซลล์ 2-3 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บเซลล์ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

4.2.3 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ซึ่งมี NTG ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.4 บ่มเชื้อไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที นำมาเจือจาง เป็นลำดับ (serial dilution) แล้วเลือกความเจือจางที่ $10^{-6}$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ย (spread) บน complete agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาทดสอบหาออกโซโทรปด้วยการเพาะลงใน minimal agar และ complete agar โดยใช้เทคนิค replica plating แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เชื้อที่ขึ้นได้ใน complete agar แต่ไม่ขึ้นใน minimal agar จะเป็นเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์พวกออกโซโทรป

4.2.5 นำออกโซโทรปที่ได้มาทดสอบหาความต้องการกรดอะมิโน โดยการเพาะลงใน minimal agar ที่มีโฮโมซีรีน ทรีโอนีน เมทไธโอนีน และโพรลีน แยกกันในจานเพาะเชื้อแต่ละจานเปรียบเทียบกับ minimal agar ที่ไม่ใส่กรดอะมิโน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เชื้อที่ขึ้นใน minimal agar ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดจะเป็นออกโซโทรปที่ต้องการกรดอะมิโนชนิดนั้น

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิค

ศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร production medium เป็นหลักแล้วแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้

5.1 ชนิดและปริมาณคาร์บอน ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับกลูโคส โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1-5

5.2 ชนิดและปริมาณไนโตรเจนใช้แอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟตและโปตัสเซียม-ไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบกับยูเรีย โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.3-1

5.3 ชนิดและปริมาณสารอินทรีย์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี meat extract หรือ peptoneหรือ meat extract และ peptone โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.25 เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ใส่สารอินทรีย์

5.4 ผลของการใช้ไบโอตินในปริมาณต่าง ๆ โดยแปรผันไบโอติน ในช่วงความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

5.5 ผลของวิตามินบี 1 โดยแปรผันปริมาณวิตามินบี 1 ในช่วงความเข้มข้น 0-6 ไมโครกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.6 อุณหภูมิ ศึกษาอุณหภูมิในช่วง 28-40 องศาเซลเซียส ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในฟลาสก์ 3 ใบ แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) 37 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ เป็นเวลา 3 วัน และวิเคราะห์หาปริมาณกรดกลูตามิคเมื่อหมักครบ 3 วัน

# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย

ผลการแยกแบคทีเรียจากผลไม้เน่า และอาหารหมักดอง จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าในอาหารต่างชนิดกันจะได้ชนิดและจำนวนแบคทีเรียที่มีลักษณะต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตาราง 1 ดังนั้นจึงเก็บเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันนี้ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 126 ไอโซเลท ไว้ในอาหาร modified nutrient agar slant เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิค

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 ในอาหาร production medium เป็นเวลา 3 วันบนเครื่องเขย่าความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวิเคราะห์หากรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษเปรียบเทียบกับกรดกลูตามิคมาตรฐาน พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนที่มีค่า Rf x 100 ใกล้เคียงกับกรดกลูตามิคมีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ เชื้อที่แยกได้จากแหนม (รหัส 6006, 6007) เชื้อที่แยกได้จากองุ่นแดง (รหัส 14001) เชื้อที่แยกได้จากขนุน (รหัส 24001, 24002) เชื้อที่แยกได้จากผักกาดดอง (รหัส 27003) เชื้อที่แยกได้จากกล้วยหักมุก (รหัส 41001) และเชื้อที่แยกได้จากหอยแครงดอง (รหัส 48003) ดังแสดงในตาราง 2 ส่วนเชื้อรหัส 35001 และ 40001 ให้เฉพาะกรดอะมิโนชนิดอื่นแต่ไม่ผลิตกรดกลูตามิค

และจากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดที่ผลิตกรดกลูตามิคได้ โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดกลูตามิค ( ภาคผนวก ข ) พบว่าเชื้อรหัส 27003 ซึ่งแยกได้จากผักกาดดองสามารถผลิตกรดกลูตามิคได้สูงที่สุดเข้มข้นร้อยละ 0.12 ดังแสดงในตาราง 3 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เชื้อรหัส 27003

ตาราง 1 จำนวนและลักษณะของแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของตัวอย่าง /สถานที่เก็บ | จำนวน แบคทีเรียที่พบ | ลักษณะโคโลนี |
|---|---|---|
| ปลาร้า ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 5 | ใส ขาวขุ่น ขาวขุ่นเยิ้ม เหลืองอ่อนเล็ก เหลืองอ่อนเยิ้ม |
| ปลาจ่อม ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 4 | เล็กใส ขาวเหลืองเล็ก เหลือง ส้ม |
| หอยแมลงภู่ดอง ตลาดกำแพงแสน จ.นครปฐม | 2 | ขาวเหลือง ขาวเหลืองเยิ้ม |
| หอยแครงดอง ตลาดกำแพงแสน จ.นครปฐม | 4 | เล็กใส ขาวขุ่น ขาวขุ่นเยิ้ม เหลือง |
| ไตปลา ตลาดบางลำภู กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวเหลือง ขาวเหลืองเล็ก |
| กะปิ ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวขุ่น ด้าน |
| แหนม ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 7 | เล็กใส เยิ้มใส เยิ้มขาวขุ่น เหลืองเยิ้ม เยิ้มเหลืองอ่อน เยิ้มมากเหลืองอ่อน เยิ้มเหลืองส้ม |
| เต้าเจี้ยว ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ใส ขาวขุ่นด้าน |
| ขิงดอง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | ใส เล็กใส ขาวเหลือง |
| ผักกาดดอง ตลาดกำแพงแสน จ.นครปฐม | 4 | ใส เยิ้มใส ด้าน ขาวเหลือง |
| กระเทียมดอง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | ใส ขาวเหลือง ขาวขุ่นด้าน |
| หน่อไม้ดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ขาวขุ่น เยิ้มใส เยิ้มเหลืองอ่อน |
| หอมดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 4 | ใส เยิ้มใส เยิ้มเหลืองอ่อน เหลืองอ่อน |
| ผักเสี้ยนดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ใส เล็กเหลืองอ่อน เยิ้มเหลืองอ่อน |

ตาราง 1 (ต่อ)

| ชนิดของตัวอย่าง /สถานที่เก็บ | จำนวน แบคทีเรียที่พบ | ลักษณะโคโลนี |
|---|---|---|
| พุทราดอง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | เล็กใส เหลืองอ่อนเล็ก |
| มะม่วงดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 4 | ใส เยิ้มใส แผ่ด้าน ขาวขุ่นด้าน |
| มะยมดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 2 | ขาวอมเทา ขาวขุ่นด้าน |
| มะกอกดอง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 1 | ขาวขุ่นด้าน |
| มะดันดอง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวขุ่นด้าน ขาวเหลือง |
| มะละกอ ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 1 | ขาวเหลืองเยิ้ม |
| มะยม ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 1 | ขาวอมเทา |
| มะม่วงทวาย ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | เล็กใส ขาวขุ่นด้าน เหลืองอ่อน |
| มะขวิด ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวขุ่น ใส |
| มะขามหวาน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวขุ่นด้าน ขาวขุ่นแผ่ |
| มะกอกน้ำ ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวขุ่นด้าน เยิ้มเทา |
| มะกอกฝรั่ง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 1 | เยิ้มเทา |
| กล้วยเล็บมือนาง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 4 | เยิ้มใส ขาวขุ่นเยิ้ม เยิ้มเหลือง เหลืองอ่อนเยิ้ม |
| กล้วยไข่ ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | ขาวขุ่น เยิ้มเหลือง เหลืองอ่อนเยิ้ม |
| กล้วยน้ำว้า ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | ใส เยิ้มใส เหลืองเยิ้ม |
| กล้วยหอม ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ใส ขาวเหลือง |
| กล้วยหักมุก ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | เยิ้มใส ขาวขุ่นเยิ้ม |
| กล้วยนาค ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ใส ขาวขุ่น เหลืองอ่อน |
| กล้วยนมสาว ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ใส ขาวขุ่น เหลืองเยิ้ม |
| ลูกหว้า ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 1 | ด้านขาว |
| ฝรั่ง ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ส้มเยิ้ม เยิ้มใส ส้มอ่อน |

ตาราง 1 (ต่อ)

| ชนิดของตัวอย่าง /สถานที่เก็บ | จำนวน แบคทีเรีย ที่พบ | ลักษณะโคโลนี |
|---|---|---|
| สับปะรด ตลาดกำแพงแสน จ. นครปฐม | 3 | ด้านขาว ขาวขุ่นเยิ้ม ขาวเหลืองเยิ้ม |
| ขนุน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | เยิ้มใส ใส |
| ทุเรียน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ขาวเหลือง เยิ้มขาว |
| น้อยหน่าหนัง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | | ขาวเหลือง ขาวขุ่น |
| ลางสาด ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ใสเยิ้ม เหลืองเยิ้ม |
| ระกำ ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 3 | ขาวขุ่นด้าน เหลือง ขาวขุ่นเยิ้ม |
| กระท้อน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 1 | น้ำตาลอ่อนเยิ้ม |
| ส้มเขียวหวาน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | เล็กใส เหลือง |
| องุ่นแดง ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 1 | เยิ้มใส |
| องุ่นเขียว ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 1 | เยิ้มใส |
| ชมพู่มะเหมี่ยว ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ใส ขาวเหลือง |
| สมอ ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ส้มอ่อน เหลืองส้ม |
| เงาะโรงเรียน ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | ใส ขาวเหลืองเยิ้ม |
| พุทราไทย ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 4 | เล็กใส ขาวขุ่นเยิ้ม เยิ้มขาว เทาเยิ้ม |
| ผลไข่เน่า ตลาดบางแค กรุงเทพมหานคร | 2 | เล็กใส ขาวขุ่น |

ตาราง 2 ค่า Rf x 100 ของกรดอะมิโนที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกรดกลูตามิคมาตรฐาน

| ตัวอย่างอาหาร | รหัสเชื้อ | Rf x100 ของแถบกรดอะมิโน | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| | สารละลายกรดกลูตามิค | - | - | 28 | - | - | - | - | - |
| แหนม | 6006 | 12 | 21 | 28 | 36 | 42 | - | 60 | - |
| | 6007 | 12 | 19 | 28 | 38 | - | - | - | 75 |
| องุ่นแดง | 14001 | 12 | 19 | - | - | - | - | - | 73 |
| ขนุน | 24001 | 12 | 20 | 27 | 36 | 42 | - | 60 | 75 |
| | 24002 | 12 | 17 | 28 | 37 | - | - | 59 | 73 |
| ผักกาดดอง | 27003 | 12 | 20 | 30 | 37 | - | - | - | 71 |
| มะละกอ | 35001 | - | - | - | - | - | 44 | - | 60 |
| ชมพู่มะเหมี่ยว | 40001 | - | - | - | - | - | 51 | 63 | - |
| กล้วยหักมุก | 41001 | - | 19 | 31 | 40 | - | - | 60 | 73 |
| หอยแครงดอง | 48003 | 15 | - | 30 | 38 | - | - | - | - |

ตาราง 3 ปริมาณการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรีย ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ

| รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค (%)* |
|---|---|
| 6006 | 0.08 |
| 6007 | 0.08 |
| 14001 | 0.04 |
| 17001 | 0.08 |
| 24001 | 0.08 |
| 24002 | 0.1 |
| 27003 | 0.12 |
| 41001 | 0.08 |
| 48003 | 0.08 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงที่แยกได้จากตัวอย่าง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียรหัส 27003 ซึ่งแยกได้จากผักกาดดองมาจำแนกชนิดได้ผลดังนี้

ผลการย้อมสีแกรม ติดสีแกรมบวก คือติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อน

ผลของการย้อมสปอร์ สปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ในทุกตำแหน่งของเซลล์

ผลของการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก ข้อ. 5) พบว่าเชื้อเจริญได้ดี

ผลของการทดสอบหาเอนไซม์คะตะเลส ให้ผลบวกคือเกิดฟองก๊าซเมื่อทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3

ผลการทดสอบทางชีวเคมี ตามวิธีของโคแวน และสทีล (Cowan and Steel. 1970) ได้ผลดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Motility | + | แสดงว่าเชื้อมีการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวได้ |
| Citrate | + | แสดงว่าเชื้อมีการย่อยสลาย citrate ได้ |
| Gelatin | - | เชื้อไม่สามารถย่อยสลาย gelatin ได้ |
| Glucose (acid) | + | เชื้อสามารถใช้กลูโคสได้ |
| Arabinose (acid) | + | เชื้อสามารถใช้ Arabinose ได้ |
| Mannitol (acid) | d | เชื้อสามารถใช้ Mannitol ได้น้อย |
| Indole | - | ไม่ให้วงแหวนสีชมพูเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Kovac |
| Nitrate | + | แสดงว่าเชื้อสามารถใช้ Nitrate ได้ |
| Urease | + | แสดงว่าเชื้อนี้มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ |

ผลการจำแนกเชื้อนี้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis*

4. การชักนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้ให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1 การทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสง UV

ผลการทดลองปรากฏว่า เมื่อใช้เวลาในการผ่านแสง UV นานขึ้น จำนวนโคโลนีและอัตราการอยู่รอดลดลงตามลำดับ และเวลาที่ใช้ในการทำให้แบคทีเรียมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.1 คือ 3 นาที ดังแสดงในตาราง 4 และเมื่อนำแบคทีเรียที่ผ่านแสง UV เป็นเวลา 3 นาที มาแยกหาออกโซโทรป โดยวิธี replica plating พบว่าแยกได้ออกโซโทรปทั้งหมด 49 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคใน production medium เปรียบเทียบกับเชื้อก่อนการผ่านแสง UV พบว่ามีออกโซโทรปให้ผลผลิตสูงขึ้น 13 ไอโซเลท ให้ผลผลิตต่ำลง 31 ไอโซเลท และให้ผลผลิตเท่าเดิม 6 ไอโซเลท โดยออกโซโทรปที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดคือไอโซเลทที่ 19 ผลิตได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.22 ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 4 ผลของแสง UV ต่อจำนวน และอัตราการอยู่รอดของเชื้อ

| เวลาในการผ่านแสง UV (นาที) | จำนวนเชื้อที่เหลือหลังผ่านแสง UV (CFU) | อัตราการอยู่รอดของเชื้อ (%) |
|---|---|---|
| 0 | $7.0 \times 10^{10}$ | 100 |
| 1 | $1.6 \times 10^{8}$ | 0.23 |
| 2 | $1.2 \times 10^{8}$ | 0.17 |
| 3 | $8.8 \times 10^{7}$ | 0.12 |
| 4 | $6.2 \times 10^{7}$ | 0.09 |
| 5 | $5.0 \times 10^{7}$ | 0.07 |
| 6 | $3.0 \times 10^{7}$ | 0.04 |

ตาราง 5 ปริมาณการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสง UV

| ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* | ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* |
|---|---|---|---|
| 27003 | 0.18 | 26 | 0.1 |
| 1 | 0.18 | 27 | 0.08 |
| 2 | 0.1 | 28 | 0.2 |
| 3 | 0.2 | 29 | 0.12 |
| 4 | 0.12 | 30 | 0.1 |
| 5 | 0.1 | 31 | 0.08 |
| 6 | 0.1 | 32 | 0.08 |
| 7 | 0.12 | 33 | 0.08 |
| 8 | 0.08 | 34 | 0.08 |
| 9 | 0.12 | 35 | 0.08 |
| 10 | 0.2 | 36 | 0.08 |
| 11 | 0.12 | 37 | 0.1 |
| 12 | 0.08 | 38 | 0.08 |
| 13 | 0.08 | 39 | 0.08 |
| 14 | 0.08 | 40 | 0.2 |
| 15 | 0.2 | 41 | 0.08 |
| 16 | 0.18 | 42 | 0.08 |
| 17 | 0.1 | 43 | 0.08 |
| 18 | 0.08 | 44 | 0.1 |
| 19 | 0.22 | 45 | 0.08 |
| 20 | 0.18 | 46 | 0.12 |
| 21 | 0.1 | 47 | 0.04 |
| 22 | 0.2 | 48 | 0.08 |
| 23 | 0.2 | 49 | 0.18 |
| 24 | 0.18 | 50 | 0.08 |
| 25 | 0.08 | | |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่อ อาหาร 100 มิลลิลิตร

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

จากการนำออกโซโทรปไอโซเลทที่ 19 ซึ่งผลิตกรดกลูตามิคได้สูง จากข้อ 4.1 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำมาหาออกโซโทรป และทดสอบหาความต้องการกรดอะมิโน ผลการทดลองแยกได้ออกโซโทรป 100 ไอโซเลท พบว่าเป็นโฮโมซีรีนออกโซโทรป 100 ไอโซเลท และไม่เจริญในอาหาร minimal agar ที่มีโพรลีน และจากการนำออกโซโทรปที่ได้ 100 ไอโซเลทมาหาการผลิตกรดกลูตามิคเปรียบเทียบกับเชื้อก่อนการทำให้กลายพันธุ์ ผลปรากฏว่าออกโซโทรปผลิตกรดกลูตามิคได้มากขึ้น 6 ไอโซเลท ผลิตได้น้อยลง 91 ไอโซเลท และผลิตได้เท่าเดิม 3 ไอโซเลท ออกโซโทรปที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดคือไอโซเลทที่ 73 ผลิตได้เข้มข้นร้อยละ 0.26 ดังแสดงในตาราง 6 ดังนั้นในการทดลองเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูตามิคในขั้นต่อไปจะใช้ออกโซโทรปไอโซเลท ที่ 73

ตาราง 6 ความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อ ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

| ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* | ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* |
|---|---|---|---|
| 27003 | 0.18 | 30 | 0.1 |
| 1 | 0.18 | 31 | 0.08 |
| 2 | 0.1 | 32 | 0.08 |
| 3 | 0.2 | 33 | 0.08 |
| 4 | 0.12 | 34 | 0.08 |
| 5 | 0.1 | 35 | 0.08 |
| 6 | 0.1 | 36 | 0.08 |
| 7 | 0.12 | 37 | 0.1 |
| 8 | 0.08 | 38 | 0.08 |
| 9 | 0.12 | 39 | 0.08 |
| 10 | 0.2 | 40 | 0.2 |
| 11 | 0.12 | 41 | 0.08 |
| 12 | 0.08 | 42 | 0.08 |
| 13 | 0.08 | 43 | 0.08 |
| 14 | 0.08 | 44 | 0.1 |
| 15 | 0.22 | 45 | 0.08 |
| 16 | 0.2 | 46 | 0.12 |
| 17 | 0.1 | 47 | 0.04 |
| 18 | 0.08 | 48 | 0.08 |
| 19 | 0.22 | 49 | 0.18 |
| 20 | 0.18 | 50 | 0.08 |
| 21 | 0.1 | 51 | 0.1 |
| 22 | 0.2 | 52 | 0.08 |
| 23 | 0.2 | 53 | 0.08 |
| 24 | 0.18 | 54 | 0.08 |
| 25 | 0.08 | 55 | 0.08 |
| 26 | 0.12 | 56 | 0.08 |
| 27 | 0.08 | 57 | 0.16 |
| 28 | 0.2 | 58 | 0.08 |
| 29 | 0.12 | 59 | 0.08 |

ตาราง 6 (ต่อ)

| ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* | ไอโซเลทที่ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* |
|---|---|---|---|
| 60 | 0.08 | 81 | 0.08 |
| 61 | 0.1 | 82 | 0.08 |
| 62 | 0.04 | 83 | 0.08 |
| 63 | 0.02 | 84 | 0.04 |
| 64 | 0.04 | 85 | 0.04 |
| 65 | 0.04 | 86 | 0.02 |
| 66 | 0.08 | 87 | 0.04 |
| 67 | 0.04 | 88 | 0.08 |
| 68 | 0.08 | 89 | 0.08 |
| 69 | 0.08 | 90 | 0.08 |
| 70 | 0.08 | 91 | 0.08 |
| 71 | 0.01 | 92 | 0.08 |
| 72 | 0.02 | 93 | 0.08 |
| 73 | 0.26 | 94 | 0 |
| 74 | 0.08 | 95 | 0.02 |
| 75 | 0.04 | 96 | 0.1 |
| 76 | 0.1 | 97 | 0.08 |
| 77 | 0.04 | 98 | 0.04 |
| 78 | 0.04 | 99 | 0.08 |
| 79 | 0.04 | 100 | 0.08 |
| 80 | 0.08 | | |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิค

จากการเลี้ยงเชื้อไอโซเลทที่ 73 ในอาหาร production medium แล้วศึกษาการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค เมื่อปรับเปลี่ยนปัจจัยต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

5.1 ผลของชนิดและปริมาณคาร์บอน เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน คือกลูโคส น้ำตาลทราย และกากน้ำตาลจากอ้อย ในปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 1-5 ผลการทดลองปรากฏว่าชนิด และปริมาณคาร์บอนมีผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิค โดยเชื้อผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.36 เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในตาราง 7 เมื่อใช้น้ำตาลทราย และกากน้ำตาลจากอ้อย เชื้อจะเจริญไม่ดีเท่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไม่ผลิตกรดกลูตามิค ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้กลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตาราง 7 ผลของชนิด และปริมาณคาร์บอนที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 73

| ชนิดคาร์บอน | ความเข้มข้น(%)* | ปริมาณกรดกลูตามิค(%)* | ความขุ่นของเชื้อ($OD_{660}$) |
|---|---|---|---|
| กลูโคส | 1 | 0.2 | 1.92 |
| | 2 | 0.25 | 2.08 |
| | 3 | 0.2 | 1.9 |
| | 4 | 0.04 | 1.89 |
| | 5 | 0.02 | 1.9 |
| น้ำตาลทราย | 1 | 0 | 0.42 |
| | 2 | 0 | 1.06 |
| | 3 | 0 | 0.76 |
| | 4 | 0 | 0.38 |
| | 5 | 0 | 0.32 |
| กากน้ำตาลจากอ้อย | 1 | 0 | 0.6 |
| | 2 | 0 | 0.45 |
| | 3 | 0 | 0.98 |
| | 4 | 0 | 1.33 |
| | 5 | 0 | 1.33 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัม ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.2 ผลของชนิด และปริมาณไนโตรเจน

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร production medium ที่ใช้กลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนแต่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย แอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟต และโปตัสเซียมไนเตรท ในปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.3 -1 ผลการทดลองพบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิค เมื่อใช้ยูเรีย และแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดกลูตามิคได้ดีกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และโปตัสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังแสดงในตาราง 8 และเชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 เมื่อใช้ยูเรียเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้ยูเรียเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน

ตาราง 8 ผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 73

| ชนิดของแหล่งไนโตรเจน | ความเข้มข้น (%)* | ปริมาณกรดกลูตามิค(%)* | ความขุ่นของเชื้อ($OD_{660}$) |
|---|---|---|---|
| ยูเรีย | 0.3 | 0.26 | 1.45 |
| | 0.5 | 0.38 | 1.56 |
| | 0.8 | 0.26 | 1.44 |
| | 1 | 0.22 | 1.47 |
| แอมโมเนีย | 0.3 | 0.26 | 1.46 |
| | 0.5 | 0.22 | 1.46 |
| | 0.8 | 0.1 | 1.4 |
| | 1 | 0.04 | 1.33 |
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 0.3 | 0.08 | 1.5 |
| | 0.5 | 0.08 | 0.41 |
| | 0.8 | 0.04 | 0.06 |
| | 1 | 0.04 | 0.05 |
| โปตัสเซียมไนเตรท | 0.3 | 0.08 | 0.47 |
| | 0.5 | 0.02 | 0.34 |
| | 0.8 | 0 | 0.27 |
| | 1 | 0 | 0.18 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.3 ผลของชนิดและปริมาณสารอินทรีย์

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร production medium ที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 ยูเรีย เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยการแปรผันชนิดของสารอินทรีย์คือ peptone หรือ meat extract หรือ meat extract และ peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 ในแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใช้สารอินทรีย์เหล่านี้เลย ผลการทดลองพบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตกรดกลูตามิคในอาหารที่ไม่ใส่สารอินทรีย์ และชนิดของสารอินทรีย์ที่ใช้มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค ดังแสดงในตาราง 9 โดยเชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่ใช้ meat extract เข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่จะผลิตกรดกลูตามิคได้เข้มข้นร้อยละ 0.1 ในขณะที่เมื่อใช้ meat extract และ peptone เชื้อจะมีการเจริญได้ดีพอสมควร แต่จะให้ผลผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ meat extract และ peptone เป็นแหล่งสารอินทรีย์

ตาราง 9 ผลของการใช้สารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 73

| ชนิด | ปริมาณกรดกลูตามิค (%)* | ความขุ่นของเชื้อ ($OD_{660}$) |
|---|---|---|
| ไม่ใส่สารอินทรีย์ | 0 | 0 |
| meat extract | 0.1 | 2.32 |
| peptone | 0.08 | 0.3 |
| meat extract และ peptone | 0.38 | 1.28 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

และจากการศึกษาผลของปริมาณ meat extract และ peptone ต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค โดยแปรผันปริมาณในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.25 พบว่าเชื้อจะมีการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 เมื่อใช้ meat extract และ peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 ในแต่ละชนิด ดังแสดงในตาราง 10 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ meat extract และ peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 ในแต่ละชนิด

ตาราง 10 ผลของการใช้ meat extract และ peptone ปริมาณต่าง ๆ ต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 73

| ความเข้มข้นของ meat extract และ peptone (%) | ปริมาณกรดกลูตามิค (%)* | ความขุ่นของเชื้อ ($OD_{660}$) |
|---|---|---|
| 0.05 | 0.04 | 0.81 |
| 0.1 | 0.18 | 0.92 |
| 0.15 | 0.25 | 0.79 |
| 0.2 | 0.38 | 1.06 |
| 0.25 | 0.3 | 0.78 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.4 ผลของไบโอติน

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร production medium ที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 ยูเรีย เข้มข้นร้อยละ 0.5 meat extract และ peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 ในแต่ละชนิด แล้วแปรผันความเข้มข้นของไบโอตินในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0-20 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีพอ ๆ กัน ทั้งในอาหารที่ไม่ใส่ไบโอติน และในอาหารที่ใส่ไบโอตินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แต่เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้ดีที่สุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ในอาหารที่ไม่ใส่ไบโอติน ดังแสดงในตาราง 11 การทดลองต่อไปจึงไม่ใช้ไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตาราง 11 ผลของการใช้ไบโอตินปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตกรดกลูตามิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 73

| ความเข้มข้นของไบโอติน (µg / l) | ปริมาณกรดกลูตามิค (%)* | ความขุ่นของเชื้อ ($OD_{660}$) |
|---|---|---|
| 0 | 0.38 | 1.06 |
| 5 | 0.3 | 1 |
| 10 | 0.25 | 1 |
| 15 | 0.26 | 1.06 |
| 20 | 0.3 | 1.06 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.5 ผลของวิตามินบี 1

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร production medium ที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 5.4 แต่ใส่วิตามินบี 1 โดยแปรผันในช่วงความเข้มข้น 0-6 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรพบว่า เชื้อจะเจริญ และผลิตกรดกลูตามิคได้ใกล้เคียงกันในอาหารที่ใส่วิตามินบี 1 ต่างกัน 1-6 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรส่วนในอาหารที่ไม่ใส่วิตามินบี 1 นั้นเชื้อจะเจริญได้น้อยกว่าอาหารที่ใส่วิตามินบี 1 เล็กน้อยแต่จะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ดังแสดงในตาราง 12 ในการทดลองต่อไปจึงไม่ใส่วิตามินบี 1 ในอาหาร

ตาราง 12 ผลของวิตามินบี 1 ที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดกลูตามิคของแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 73

| ความเข้มข้นของวิตามินบี 1 (μg/100ml) | ปริมาณกรดกลูตามิค(%)* | ความขุ่นของเชื้อ($OD_{660}$) |
|---|---|---|
| 0 | 0.38 | 1.06 |
| 1 | 0.22 | 1.21 |
| 2 | 0.26 | 1.12 |
| 3 | 0.26 | 1.78 |
| 4 | 0.22 | 1.2 |
| 5 | 0.12 | 1.22 |
| 6 | 0.15 | 1.2 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

5.6 ผลของอุณหภูมิ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างกันคือ อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 36 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถเจริญ และผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อ ไอโซเลทที่ 73

| อุณหภูมิ ($^{o}$C) | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%)* | ความขุ่นของเชื้อ ( $OD_{660}$) |
|---|---|---|
| 28 | 0.38 | 1.05 |
| 36 | 0.3 | 0.98 |
| 40 | 0.22 | 0.87 |

หมายเหตุ * คิดเป็นกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

# บทที่ 5
# สรุปและอภิปรายผล

การแยกแบคทีเรียจากผลไม้เน่าและอาหารหมักดองจำนวน 50 ตัวอย่างในกรุงเทพมหานคร และบริเวณใกล้เคียง พบว่าในอาหารต่างชนิดกันจะได้ชนิด และจำนวนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน จำนวนทั้งหมด 126 ไอโซเลท โดยในอาหารหมักดองจะได้ชนิดและจำนวนแบคทีเรียมากกว่าในผลไม้เน่า ซึ่งอาจเป็นเพราะในอาหารหมักดองมีสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อชนิดต่างๆ ดีกว่าผลไม้

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิค เมื่อนำแบคทีเรีย 126 ไอโซเลท มาทดสอบหาการผลิตกรดกลูตามิคได้ 8 ไอโซเลท คือ เชื้อจากแหนม 2 ไอโซเลท จากหอยแครงดอง 1 ไอโซเลท จากผักกาดดอง 1 ไอโซเลท จากกล้วยหักมุก 1 ไอโซเลท จากขนุน 2 ไอโซเลท จากองุ่นแดง 1 ไอโซเลท และเชื้อที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุด คือเชื้อที่แยกได้จากผักกาดดอง จากตลาดกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งสามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ร้อยละ 0.12 และเมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้มาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี พบว่ามีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacilus subtilis*

การชักนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV พบว่าเมื่อใช้เวลาในการผ่านแสงนานขึ้น เชื้อจะมีอัตราการอยู่รอดลดลงตามลำดับ และเมื่อใช้เวลาในการผ่านแสง UV 3 นาที จะทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.1 ซึ่งโดยทั่วไปการเลือกมิวแตนท์มักนิยมใช้เชื้อจากตัวอย่างที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.1 เนื่องจากจำนวนเชื้อไม่มากเกินไป และมีแนวโน้มสูงที่จะพบเชื้อกลายพันธุ์ได้

เมื่อนำเชื้อจากตัวอย่างที่ผ่านแสง UV แล้ว มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.1 มาแยกหาออกโซโทรป พบว่าได้ 49 ไอโซเลท และเมื่อนำไปทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิค พบว่ามีเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดกลูตามิคสูงขึ้น 13 ไอโซเลท ให้ผลผลิตต่ำลง 31 ไอโซเลท และให้ผลผลิตเท่าเดิม 6 ไอโซเลท และเชื้อที่ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุด ได้แก่ เชื้อไอโซเลทที่ 19 ซึ่งผลิตกรดกลูตามิคได้ร้อยละ 0.22

และเมื่อชักนำเชื้อไอโซเลทที่ 19 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ NTG 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที สามารถแยกได้โฮโมซีรีนออกโซโทรป 100 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบหาการผลิตกรดกลูตามิค พบว่าเชื้อที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงขึ้น 6 ไอโซเลท ผลิตได้ต่ำลง 91 ไอโซเลท และผลิตได้เท่าเดิม 3 ไอโซเลท เชื้อที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดคือ เชื้อไอโซเลทที่ 73 ผลิตได้เข้มข้นร้อยละ 0.26 จากผลการทดลองนี้

จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่กลายพันธุ์ที่ได้ส่วนใหญ่จะให้ผลผลิตน้อยลง เช่นเดียวกับการทดลองของมาลี ศรีสดสุข ซาโนะและชิโอะ และจันทร์เจริญสิน ( มาลี ศรีสดสุข. 2530 ; Sano. and Shiio. 1970 ; Chancharoensin 1985 )

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อไอโซเลทที่ 73 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ production mediun

ชนิดและปริมาณคาร์บอน จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส น้ำตาลทราย และกากน้ำตาลจากอ้อย ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1-5 พบว่าชนิดและปริมาณคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคโดยเชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งเมื่อใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเชื้อผลิตกรดกลูตามิคได้น้อย อาจเป็นเพราะว่าในกากน้ำตาลจากอ้อยมีไบโอตินสูง

ชนิดและปริมาณไนโตรเจน จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรีย แอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟต และโปตัสเซียมไนเตรท ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.3-1 พบว่าชนิดและปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิค เมื่อใช้ยูเรียและแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดกลูตามิคได้ดีกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและโปตัสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และเชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 เมื่อใช้ยูเรียเข้มข้นร้อยละ 0.5 แม้ว่าเชื้อจะต้องการไนโตรเจนในปริมาณมาก แต่การเติมไนโตรเจนในความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังจะเห็นได้จากการทดลอง อาจแก้ไขโดยการเติมยูเรียหรือแอมโมเนียในระหว่างการหมัก (Yamada and others. 1972)

ชนิดและปริมาณสารอินทรีย์ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 2 ยูเรียเข้มข้นร้อยละ 0.5 แต่แปรผันชนิดของสารอินทรีย์คือ meat extract หรือ peptone หรือ meat extract และ peptone ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใช้สารอินทรีย์ พบว่าชนิดของสารอินทรีย์มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค โดยเชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตกรดกลูตามิคในอาหารที่ไม่ใส่สารอินทรีย์ เชื้อเจริญได้ดีมากในอาหารที่มี meat extract อย่างเดียวแต่ผลิตกรดกลูตามิคสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ในอาหารที่มี meat extract และ peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2

และเมื่อแปรผันปริมาณของ meat extract และ peptone ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.25 ในแต่ละชนิด ผลการทดลองพบว่า ส่วนใหญ่เมื่อใช้ meat extract และ peptone ในปริมาณสูงขึ้นจากร้อยละ 0.05-0.2 เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้สูงขึ้น แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น

ร้อยละ 0.25 เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้น้อยลง ดังนั้นปริมาณ meat extract และpeptone ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดกลูตามิค คือ ร้อยละ 0.2

ผลของปริมาณไบโอตินจากปริมาณไบโอตินในช่วงความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อทดสอบหาการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิคเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ใส่โปรตีนพบว่าเชื้อเจริญได้ดีพอๆ กัน ทั้งในอาหารที่ไม่ใส่ไบโอตินและในอาหารที่ใส่ไบโอติน และเชื้อจะผลิตกรดกลูตามิคได้ดีที่สุดร้อยละ 0.38 ในอาหารที่ไม่ใส่ไบโอติน ดังนั้นไบโอตินจึงไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดกลูตามิค

ผลของปริมาณวิตามินบี 1 การใส่วิตามินบี 1 ในช่วงความเข้มข้น 0-6 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อทดสอบหาการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค พบว่า เชื้อผลิตกรดกลูตามิคได้ใกล้เคียงกันทั้งในอาหารที่ใส่วิตามินบี 1 ต่างกันและในอาหารที่ไม่ใส่วิตามินบี 1 แต่ในอาหารที่ไม่ใส่วิตามินบี 1 เชื้อเจริญได้น้อยกว่า ดังนั้นปริมาณวิตามิน 1 จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดกลูตามิค อาจเป็นเพราะมีวิตามินบี 1 เพียงพอแล้วในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เชื้อจึงไม่ต้องการเพิ่มอีก

ผลของอุณหภูมิ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ที่เหมาะสมแล้วแปรผันอุณหภูมิ คือ อุณหภูมิห้อง (28 $^{\circ}$C) 36 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบหาการเจริญและการผลิตกรดกลูตามิค พบว่า เชื้อจะเจริญและผลิตกรดกลูตามิคสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 0.38 ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เจริญในสภาพปกติ และสามารถผลิตกรดกลูตามิคได้สูงสุด

ข้อเสนอแนะ

1. แบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคได้สูง ที่แยกได้จากธรรมชาติ เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV และ NTG แล้วยังให้ผลผลิตต่ำมาก ควรมีการปรับปรุงโดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ

2. ควรมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูตามิคในส่วนที่ยังไม่ได้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้

3. ควรมีการศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของแบคทีเรียบางไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมซึ่งอาจพบแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่นได้มากและสามารถปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2530.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์ การสำรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิคจากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ, 2536 อัดสำเนา.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรกัณฑ์. คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, 2536.

มาลี ศรีสดสุข "การเพิ่มปริมาณไลซีนในยีสต์ AM-CLG 5," รายงานการวิจัย โครงการวิจัยรหัส ท-ช 2.3.0. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก, 2530.

Abe ,S., K.I. Takayama and S.Kinoshita. "Taxonomical Studies on Glutamic Acid-Producing Bacteria," J. Gen. Appl. Microbiol. 13 : 279-301 ; 1967.

Asai and others. "Method of Producing Carbon Source for Fermentation ," United States Patent No. 4,066,502 , 1978.

Bhushan, R. "Amino acid and Their Derivatives," In Sherma, J. and B. Fried. Handbook of Thin-layer Chromatography. 1990.

Chanchaoensin, S. Production of L-Lysine by Homoserine Auxotrop and S-(2-Aminoethyl) Cystine Resistant Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. Thesis. Mahidol University, 1982.

Cowan, S.T. and K.J. Steel. Manual for The Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, 1970.

Crueger and Crueger. Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology, 1990.

Gerhart, P. Manual of Method for General Bacteriology. American Society for Microbiology.washington D.C : 223-242 ; 1981.

Harwood, C.R. "Bacillus subtilis and its relatives : molecular biological and industrial workhorses," TIBTECH. 10 ; 1992.

Hong, K.T and others. "Control of Sugar Feeding for Glutamic Acid Fermetation," J. Ferment. Technol. 62 (1) : 49-54 ; 1984.

Kinoshita, S., S. Udaka and M. Shimono. "Studies on The Amino Acid Fermentation. Part I Production of L-Glutamic Acid by Various Microorganisms," J. Gen. Appl. Microbiol. 16: 373-391 ; 1970.

Motoyama, H and others. "Amino Acid Production from Methanol by Methylobacillus glycogenes Mutants : Isolation of L-threonine and L-lysine-producing Mutants from them," Biosci. Biotech. Biochem. 57(1) : 82-87 ; 1993.

Manafi, M. and W. Kneifel. "Rapid Methods for Differentiating Gram-positive from Gram-negative Aerobic and Facultative Anaerobic Bacteria," J. Appl. Bacteriol. 69 : 822-827 ; 1990.

Nampoothiri, KM. and A. Pandey. "Solid State Fermentation for L-Glutamic Acid Production Using *Brevibacterium sp,*" Biotech. Letter, 18 (2) : 199-204 ; February, 1996.

Otani, T. and others. Amino acid and nuclic acid. 11:89 ; 1965.

Presscott, S.C. and C.G. Dunn. Industrial Microbiology. New York : Mc. Grew-Hill Book Co., 1982.

Sano, K. and I. Shiio. "Microbial Prodution of L-Lysine.III. Production by Mutants Resistant to S-(2-Aminoethyl)-L-Cyteine," J.Gen.Appl.Microbiol. 16: 373-391; 1970.

Smith, I. "Chromatographic and Electrphoretic techniques: volume I," Chromatography. 112-118 ; 1969.

Tosaka, O., K. Takinami and Y. Hirose. "L-Lysine Production by S-(2-Aminocthyl) l-Cysteine and α-Amino-β-hydroxy-Valeric AcidResistant Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*," Agric. Biol.Chem. 42(4) : 745-752 ; 1978.

Tsuchida, T. and others. "Method for producing L-Glutamic Acid by Fermentation," United States Patent No 4,427,773 ; 1984.

Vattanaviboon, P. "Protoplast Fusion in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium* sp," Thesis. Mahiol University , 1985.

Yamada, K and others. The Microbial Production of Amino Acid. Tokyo :Kodansha Ltd., 1972.

Yamaguchi, F. and others. "Detection of Gamma-Polyglutamic Acid (Gama-PGA) By SDS-PAGE," Biosci. Biotech. Biochem. 60(2): 255-258 ; February, 1996.

Zhdanova, N. and others. "Method of Preparing L-Glutamic Acid and its Sodium salt," United States Patent No. 4,054,489 ; 1977.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Modified nutrient agar (ปราโมทย์ ศิริโรจน์ 2536)

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10.00 | กรัม |
| Meat extract | 5.00 | กรัม |
| Yeast extract | 2.00 | กรัม |
| วุ้น | 15.00 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เป็น 7.0

อาหารชนิดนี้ใช้แยกและเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารต่างๆ

2. Growth medium (ปราโมทย์ ศิริโรจน์ 2536)

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.00 | กรัม |
| Peptone | 10.00 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 3.00 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.20 | กรัม |
| Yeast extract | 2.00 | กรัม |
| วุ้น | 15.00 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เป็น 7.2

อาหารชนิดนี้ใช้เพิ่มจำนวนแบคทีเรียก่อนการหมักหากรดกลูตามิค

3. Production medium (Kinoshita. 1957)

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 15.00 | กรัม |
| Urea | 2.40 | กรัม |
| Meat extract | 0.60 | กรัม |
| Peptone | 0.60 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.15 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.02 | กรัม |
| Phenol red | 0.0045 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 300.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เป็น 7.2

การเตรียมอาหารชนิดนี้แยกนึ่งฆ่าเชื้อ Glucose, $K_2HPO_4$ และ $MgSO_4.7H_2O$ ออกจากส่วนประกอบอื่นๆ แล้วนำมาผสมรวมกันภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้เย็นแล้ว

อาหารชนิดนี้ใช้หมักเพื่อหาจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดกลูตามิด

4. Minimal medium (Gerhardt. 1981)

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2HPO_4.2H_2O$ | 8.20 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 2.70 | กรัม |
| Ammonium sulfate | 1.00 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 25.00 | มิลลิกรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เป็น 7.2 ก่อนการฆ่าเชื้อเมื่ออาหารเย็นลง ให้เติมส่วนประกอบอื่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 10% $MgSO_4.7H_2O$ | 1.00 | มิลลิลิตร |
| 0.5% $Ca(NO_3)_2$ | 1.00 | มิลลิลิตร |
| 20% Glucose | 10.00 | มิลลิลิตร |

ถ้าเตรียม minimal agar ให้เติมวุ้นลงไป 1.5%

อาหารชนิดนี้ใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการเจริญของ *Bacillus* sp. หลังถูกความร้อน 80 องศาเซลเซียส

| | | |
|---|---|---|
| Nutrient agar | 15.00 | กรัม |
| agar | 5.00 | กรัม |
| glucose | 0.50 | กรัม |
| manganese sulphate | 0.05 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

pH 7.3

# ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์หากรดกลูตามิค

วิเคราะห์ตามวิธีของทานิ (Tani . personal communication) ดังนี้

1.1 ตัดกระดาษโครมาโตกราฟฟี Whatman No.1 ให้มีขนาด 20x20 เซนติเมตร ใช้ดินสอดำตีเส้นห่างจากขอบล่างของกระดาษ 1.5 เซนติเมตร และทำเครื่องหมายจุดแต่ละจุดให้ห่างกัน 1.5 เซนติเมตร

1.2 หยดตัวอย่าง 4 ไมโครลิตร (μl) ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟฟี โดยใช้ automatic pipette ดูดขึ้นมาแล้วถอด tip แล้วใช้ tip ที่มีตัวอย่างอยู่ค่อยๆ แตะลงที่จุดที่ทำเครื่องหมายไว้ ปล่อยให้ตัวอย่างหยดลงมาที่จุดทีละน้อย รอให้กระดาษแห้งแล้วหยดตัวอย่างซ้ำในที่เดิมจนกว่าจะหมดในแต่ละตัวอย่าง แล้วหยดอาหารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อเป็นตัวควบคุม และหยดกรดกลูตามิคที่ทราบค่าความเข้มข้นลงในจุดที่เหลือเพื่อใช้เป็นจุดอ้างอิง กรดอะมิโนที่คาดว่าจะผลิตกรดกลูตามิค จะต้องปรากฏสีในระยะเดียว หรือใกล้เคียงกับกรดกลูตามิค เมื่อพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin) เมื่อหยดครบปริมาตรที่ดูดมาแล้วปล่อยให้ตัวอย่างระเหยจนกระดาษแห้ง

1.3 develope ด้วยเอ็น-บิวทานอน (n-butanol) : กรดอะซิติค : น้ำ 4:1:1 โดยปริมาตร ทำให้แห้งในอากาศ

1.4 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดริน (0.5กรัม ใน 100 มิลลิลิตรของ อะซิโตน : เอทธานอล 7:3)

1.5 อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จะเห็นแถบกรดอะมิโนเป็นสีม่วงหรือชมพู อ่านค่า Rf (ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) เทียบกับค่า Rf ของกรดกลูตามิค เวลาเปรียบเทียบจะใช้ค่า Rfx100 เพื่อให้ดูง่ายขึ้นไม่ต้องคำนึงถึงจุดทศนิยม

2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดกลูตามิค

ดำเนินการวิเคราะห์หากรดกลูตามิคตามวิธีในข้อ 1 แต่เพิ่มสารละลายกรดกลูตามิคมาตราฐานที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, และ 1.5% ตามลำดับหยดลงในแต่ละจุด เมื่อได้แถบของกรดอะมิโนแล้วทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ทำเครื่องหมายวงกลมล้อมรอบแถบของกรดอะมิโนที่มีค่า Rf เท่ากับค่า Rf ของกรดกลูตามิค และใช้กรรไกรตัดออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แล้วซอยเป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในหลอดทดสอบ

2.2 เติม 0.005% $CuSO_4$ ใน เอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบแต่ละหลอด ตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที เพื่อสกัดกรดกลูตามิคออกจากกระดาษโครมาโตกราฟฟี

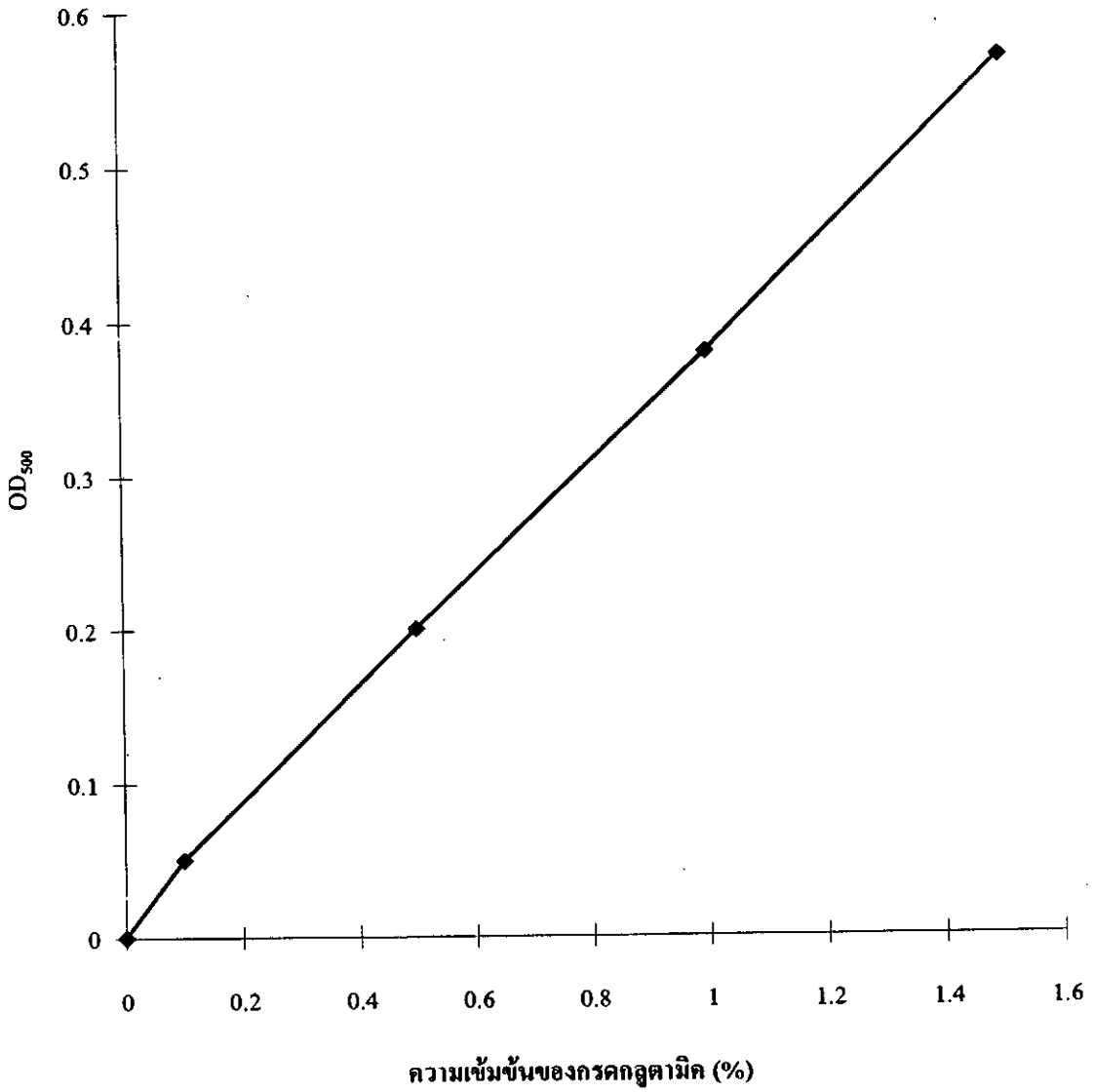
2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD)ที่ 500 นาโนเมตร

2.4 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดกลูตามิค และค่า ($OD_{500}$)

2.5 หาความเข้มข้นของกรดกลูตามิคในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่า $OD_{500}$ ที่ได้กับค่า $OD_{500}$ในกราฟมาตรฐาน

ตาราง 14 แสดงค่า $OD_{500}$และความเข้มข้นของกรดกลูตามิคมาตรฐาน

| ลำดับที่ | $OD_{500}$ | ความเข้มข้นของกรดกลูตามิค(%w/v) |
|---|---|---|
| 1 | 0.05 | 0.1 |
| 2 | 0.2 | 0.5 |
| 3 | 0.38 | 1 |
| 4 | 0.57 | 1.5 |




ภาพประกอบ 2 กราฟมาตรฐานของกรดกลูตามิค

# ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวจุรีย์ ชื่อสกุล ปานกำเหนิด

| | | |
|---|---|---|
| เกิดวันที่ 7 | เดือนมีนาคม | พุทธศักราช 2498 |
| สถานที่เกิด | | กรุงเทพมหานคร |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | | บ้านเลขที่ 22 หมู่ 8 ซอยเพชรเกษม 56 |
| | | แขวงบางด้วน เขตภาษีเจริญ |
| | | กรุงเทพมหานคร 10160 |

ปัจจุบันรับราชการ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6
ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขศาสตร์

สถานที่ทำงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน
จังหวัดนครปฐม 73140
โทร . 034 -351901-3

ประวัติการศึกษา

| | |
|---|---|
| พ. ศ. 2518 | ม.ศ. 5 (วิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนศึกษานารี |
| พ. ศ. 2520 | ป. กศ. สูง ( วิทยาศาสตร์ )จากวิทยาลัยครู บ้านสมเด็จเจ้าพระยา |
| พ. ศ. 2524 | กศ. บ. ( เคมี ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร |
| พ. ศ. 2540 | วท.ม. ( เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร |