

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน

Screening of Microorganisms Suitable for Lysine Production

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ประจำปีงบประมาณ 2540

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

สมใจ ศิริโชค

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล

พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์

สุมาลี เหลืองสกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

คำนำ

ไลซีน เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ โปรตีนในอาหารพวกธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไปนั้นจะมีไลซีนอยู่ในปริมาณต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (2) ดังนั้น ถ้าต้องการให้ได้อาหารที่มีไลซีนเพียงพอ จึงต้องรับประทานโปรตีนจากเนื้อสัตว์เข้าไปด้วย อย่างไรก็ตามอาหารสัตว์ส่วนใหญ่มักจะใช้โปรตีนจากพืชเป็นหลัก เนื่องจากมีราคาถูกกว่าโปรตีนจากสัตว์มาก ดังนั้นการเติมไลซีนลงในอาหารสัตว์จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตได้ดีในเวลาอันสั้น ซึ่งจะเป็นผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์มีรายได้เพิ่มขึ้น อันเป็นผลดีต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

การผลิตไลซีนในอุตสาหกรรม สามารถทำได้ทั้งโดยวิธีการทางเคมีและวิธีการทางชีววิทยา ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 80 ของไลซีนที่ผลิตจำหน่ายนั้นผลิตโดยวิธีการหมัก มีเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่ผลิตโดยวิธีการทางเคมี การใช้วิธีทางชีววิทยาโดยการหมักมีข้อดีกว่าการใช้วิธีทางเคมีคือ ผลผลิตไลซีนที่ได้จะอยู่ในรูป L-lysine ซึ่งมนุษย์และสัตว์สามารถใช้ได้ทั้งหมด แต่การใช้วิธีทางเคมีจะทำให้ได้ทั้ง D- และ L-lysine ซึ่ง D-lysine นั้นมนุษย์และสัตว์ไม่สามารถใช้ได้ (6,21)

ปัจจุบัน ประเทศไทยมีโรงงานผลิตไลซีนจากกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงโรงงานเดียว คือ โรงงานของบริษัทอาซิโนโมะโตะ จำกัด ซึ่งมีปริมาณการผลิตไม่เพียงพอต่อการใช้ภายในประเทศ ดังนั้น จึงต้องมีการนำเข้าไลซีนอีกส่วนหนึ่งจากต่างประเทศทำให้เสียเงินตราออกนอกประเทศจำนวนมาก นอกจากนี้การผลิตไลซีนภายในประเทศขณะนี้ก็ใช้เชื้อจุลินทรีย์และเทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูงมาก และยังมีปัญหาเรื่องการถ่ายทอดเทคโนโลยีอีกด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์และเทคโนโลยีเหล่านี้ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาอยู่เสมอเพื่อให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์และวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการพัฒนาจุลินทรีย์และเทคโนโลยีเหล่านี้ตามปกติจะทำในประเทศผู้สร้างเทคโนโลยี โดยที่เราไม่มีโอกาสมีส่วนร่วมในการพัฒนานี้เลย ประเทศไทยจึงไม่สามารถพึ่งพาตนเองได้ เพราะต้องซื้อจุลินทรีย์และเทคโนโลยีจากต่างประเทศอยู่ตลอดเวลา ทำให้ต้นทุนในการผลิตมีราคาสูง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าเราน่าจะทำการคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ในประเทศของเราเอง เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้มีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูงมากพอ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต ซึ่งในระยะยาวน่าจะมีผลทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงอันจะเป็นผลดีต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และเศรษฐกิจของประเทศ ช่วยลดปริมาณการนำเข้าของไลซีน รวมทั้งทำให้เราสามารถพึ่งพาตนเองได้อีกด้วย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวางแผนและพัฒนา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร ที่ให้ความช่วยเหลือในการถ่ายภาพจุลินทรีย์จากกล้องจุลทรรศน์

สนใจ สิริโกภ และคณะ

กรกฎาคม 2541



บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้จากตัวอย่างดินที่นำมาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 82 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร minimal medium ที่เติมไฮโคลเฮกซิไมด์ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จำนวน 342 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้นี้ไปเลี้ยงในอาหาร production medium ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นกรัมต่อลิตร ดังนี้คือกลูโคส 50, NH_4Cl 10, ทรีปโตน 4, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, yeast extract 1, CaCO_3 5 โดยเฉพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ culture supernatant มาวิเคราะห์หาไลซีนโดยวิธี paper chromatography พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลท และในจำนวน 52 ไอโซเลทนี้มีแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง 9 ไอโซเลท คือ KT7.1, KT9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้ในช่วง 0.43-0.59 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลทนี้ ไปศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ทั้งหมดเป็นพวกที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดต่าง ๆ กัน และสร้างเอนโดสปอร์ได้ จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ใน جنัส *Bacillus*

Abstract

The isolation of amino acid producing bacteria from soil samples was done by cultivation the bacteria on minimal medium with 100 µg/l cycloheximide. The 342 isolates of bacteria were isolated from 82 soil samples. These bacteria were screened for lysine production in the production medium of the following composition (g/l): glucose 50, NH₄Cl 10, tryptone 4, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.25, FeSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·H₂O 0.01, yeast extract 1, CaCO₃ 5. The culturing of these bacteria was carried out on a rotary shaker with 200 rpm at room temperature (in the range about 30-35°C) for 3 days. Lysine in the culture supernatants was determined by paper chromatography method. The result showed that there are 52 isolates which can produce lysine. Among these 52 isolates there are 9 potential lysine producers (KT7.1, KT9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 and PL2.2) which produced lysine ranged from 0.43 to 0.59 g/l of the medium volume. The studies on morphology and Gram's stain of these bacteria revealed that all of these isolates are Gram's positive, rod-shaped and endospore-forming bacteria. Therefore, these bacteria were considered to be the genus *Bacillus*.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	9
ขอบเขตของการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	10
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	16
สรุปผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	
1. Paper chromatogram ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ	27
2. Calibration curve ของไลซีน	28

บทนำ

ไลซีน เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงนิยมใช้เติมลงในอาหารกันอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ในปัจจุบันความต้องการไลซีนเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมทั้งในมนุษย์และสัตว์มีปริมาณสูงมาก แต่ละปีมีการผลิตไลซีนประมาณ 130,000 ตัน (16) โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากการหมักโดยจุลินทรีย์ (21)

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดอะมิโนจากจุลินทรีย์เริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 โดย Dagley และคณะ ได้รายงานไว้ว่า *E. coli* สามารถผลิตและปลดปล่อยกรดอะมิโนอะลานีน กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก และฮิสติดีน ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาณเล็กน้อย และถ้าเติมเกลียวแอมโมเนียมปริมาณมากเกินพอลงในอาหารก็จะทำให้เชื้อผลิตกรดอะมิโนได้ปริมาณสูงขึ้น ต่อมา Kita ได้ทำการทดลองพบว่า *Cephalosporium* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูเตนจากข้าวสาลี ถั่วเหลืองงา น้ำแช่ข้าวโพด ของเหลือจากการกลั่นแอลกอฮอล์ หรือยูเรีย เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ในปริมาณสูงถึง 3.5 กรัมต่อลิตร และได้จดสิทธิบัตรวิธีการผลิตกรดกลูตามิกโดยใช้เชื้อ *Cephalosporium* ไว้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1957 ในช่วงเวลาเดียวกันนี้ Tada และ Nakayama ก็ได้ค้นพบจุลินทรีย์ที่ผลิต ketoglutarate ได้ปริมาณสูงซึ่งสามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ปริมาณสูงด้วยถึง 14.5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการค้นพบที่เป็นพื้นฐานที่ทำให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้กระบวนการหมักเป็นครั้งแรกได้แก่งานวิจัยของ Kinoshita ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *Micrococcus glutamicus* (*Corynebacterium glutamicum*) สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรตและเกลียวแอมโมเนียมเป็นส่วนประกอบ โดยให้ผลผลิตสูงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (21)

หลังจากนั้นก็มีความสนใจเกี่ยวกับการผลิตกรดอะมิโน โดยใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ จำนวนมาก มีรายงานว่าจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคคีโนมัยซีต สามารถผลิตกรดอะมิโนและปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่พบว่าให้ผลผลิตกรดอะมิโนปริมาณมากพอที่จะนำมาใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้นั้นมีเพียงแบคทีเรียเท่านั้น และกรดอะมิโนที่พบว่าสามารถผลิตได้ปริมาณสูงโดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติโดยตรงนั้นได้แก่ อะลานีน กรดกลูตามิก และแอสลีน สำหรับไลซีนนั้นมีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตไลซีนได้ เช่น *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus polymyxa*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. acidovorans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces coroniformis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis utilis*, *Ustilago maydis*, *Gliocladium* sp. (4-6,10-12,14,15) แต่สายพันธุ์ที่พบในธรรมชาตินั้นไม่

สามารถผลิตไลซีนปริมาณมากพอที่จะใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากมีกลไกการควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) แม้แต่ *Ustilago maydis* สายพันธุ์ที่พบว่าผลิตไลซีนได้สูงก็ยังผลิตไลซีนได้น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร (21) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมในปัจจุบันเป็นมิวแตนต์ที่ได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดกลูตามิก เช่น *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* และ *B. lactofermentum* (16,17,21)



วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ จากแหล่งต่าง ๆ
2. เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ปริมาณสูง
3. วิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ ทำการแยกเชื้อที่สามารถผลิตไลซีนได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยใช้อาหารแข็ง minimal medium ที่เติมไซโคลเฮกซอไมด์ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างไลซีนในอาหารเหลว production medium เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด แล้วจึงนำมาศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อ การสร้างสปอร์ การติดสีแกรม และสมบัติทางชีวเคมีต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์ชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้คือเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลซีนได้สูง ซึ่งจะนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้ผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงมากขึ้นไปอีก จนกระทั่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ผลิตไลซีนในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย คือ เกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดหลังจากที่ได้ในภาชนะที่เหมาะสมแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.1 Minimal medium (MM) + ไซโคลเฮกซอไมด์ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ใช้เป็นอาหารสำหรับการแยกแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จากดิน มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
วุ้น	15	กรัม
Mineral salt *	100	มิลลิลิตร
1M $MgSO_4$ *	1	มิลลิลิตร
20% Glucose *	10	มิลลิลิตร
0.01% Cycloheximide **	1	มิลลิลิตร

หมายเหตุ

Mineral salt มีส่วนประกอบดังนี้คือ K_2HPO_4 10.5 กรัม, KH_2PO_4 4.5 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

1M $MgSO_4$ เตรียมโดยใช้ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 6.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

20% Glucose เตรียมโดยใช้กลูโคส 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย เป็น 100 มิลลิลิตร

0.01% Cycloheximide เตรียมโดยใช้ไซโคลเฮกซอไมด์ 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

* แยกนึ่งฆ่าเชือก่อนนำไปใช้

** ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรอง ก่อนนำไปใช้

1.2 Nutrient agar (NA)

ใช้เป็นอาหารสำหรับการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และการเก็บเชื้อไว้เป็น stock มีส่วนประกอบดังนี้คือ

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

1.3 Inoculum medium

ใช้ในการเตรียม inoculum คัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita et al., 1957 (9) โดยใช้กลูโคสเพียง 1% และใช้ yeast extract 0.1% แทน meat extract 0.25% มีส่วนประกอบดังนี้คือ

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

1.4 Production medium

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน คัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita et al., 1958 (8) โดยใช้ tryptone (pancreatic digest of casein) แทน NZ-amine (casein hydrolysate) มีส่วนประกอบดังนี้คือ

Glucose *	50.00	กรัม
NH ₄ Cl	10.00	กรัม
Tryptone	4.00	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.50	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.50	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	1.00	กรัม
CaCO ₃ **	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ (ยกเว้นกลูโคสและ CaCO₃) ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แบ่งบรรจุในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร ฟลask ละ 20 มิลลิลิตร

หมายเหตุ

* เตรียมโดยชั่งกลูโคส 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร แยกหนึ่งมาเชื่อก่อนนำไปใช้ (ใช้ 5 มิลลิลิตรต่อฟลask)

** เตรียมโดยชั่ง CaCO₃ 0.125 กรัม ใส่ในฟลask ขนาด 125 มิลลิลิตร ก่อนที่จะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. แหล่งของจุลินทรีย์

แหล่งของจุลินทรีย์ คือ ดินที่เก็บมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังนี้คือ

2.1	ดินจากเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร	30	ตัวอย่าง
2.2	ดินจากเขตจังหวัดลพบุรี	22	ตัวอย่าง
2.3	ดินจากเขตจังหวัดเชียงใหม่	3	ตัวอย่าง
2.4	ดินจากเขตจังหวัดสระบุรี	2	ตัวอย่าง
2.5	ดินจากเขตจังหวัดหนองคาย	5	ตัวอย่าง
2.6	ดินจากเขตจังหวัดสกลนคร	3	ตัวอย่าง
2.7	ดินจากเขตจังหวัดกาฬสินธุ์	2	ตัวอย่าง
2.8	ดินจากเขตจังหวัดอุดรธานี	2	ตัวอย่าง
2.9	ดินจากเขตจังหวัดพัทลุง	13	ตัวอย่าง
	รวม	82	ตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บเฉพาะดินที่อยู่บริเวณผิวหน้า ลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร

3. การแยกจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอะมิโนได้จากดิน

จุลินทรีย์ที่ต้องการได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้ ซึ่งแยกจากตัวอย่างดินโดยใช้ spread plate technique ตามวิธีการดังต่อไปนี้

3.1 เตรียมซัสเพนชันของดิน โดยใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ซัสเพนชันของดินที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1}

3.2 นำซัสเพนชันของดินจากข้อ 3.1 มาเจือจางให้เป็น 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ

3.3 ปิเปตซัสเพนชันของดินจากข้อ 3.2 ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MM + ไซโคลเฮกซอไมด์ (1.1)

3.4 ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ เกลี่ยให้ซัสเพนชันของตัวอย่างกระจายบนผิวหน้าของอาหารอย่างสม่ำเสมอ โดยแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ

3.5 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน

3.6 เมื่อเห็นว่าเชื้อเจริญขึ้นบนผิวหน้าอาหารแล้ว นำมาคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน เก็บไว้บน NA slant เพื่อนำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak บนอาหาร NA แล้วจึงเก็บเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ไว้บนอาหาร NA slant เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในขั้นต่อไป

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้

4.1 เตรียม inoculum โดยถ่ายเชื้อจากข้อ 3.6 ลงในอาหารเหลว inoculum medium (1.3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดสอบขนาด 20x150 มิลลิเมตร

4.2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific rotary shaker รุ่น Innova 4000) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 ปิเปิด inoculum จากข้อ 4.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน production medium ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร

4.4 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

4.5 นำ fermentation broth ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออก โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorvall รุ่น RC-5 Plus) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ไปวิเคราะห์หาไลซีนโดยวิธี paper chromatography

4.6 วิเคราะห์ปริมาณไลซีนในตัวอย่างที่สร้างไลซีนได้ เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตสูง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตามข้อ 5.3

5. การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยวิธี paper chromatography

5.1 การเตรียมสารเคมี

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

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

5.1.3 สารละลายไลซีนมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งไลซีน 0.125 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

5.1.4 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% ethanol เตรียมโดยชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัม ละลายในน้ำ 210 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม 95% ethanol ลงไป 790 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

5.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไลซีน

5.2.1 ตัดกระดาษโครมาโตกราฟฟี Whatman No.1 ให้มีขนาดกว้างxสูงเท่ากับ 40x25 เซนติเมตร ใช้ดินสอด่ขีดเส้นตรงให้ห่างจากขอบกระดาษด้านล่างขึ้นมา 2 เซนติเมตรและขีดเส้นห่างจากขอบด้านบนลงมา 3 เซนติเมตร

5.2.2 Spot สารละลายไลซีนมาตรฐานปริมาณ 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 และ 3.0 ไมโครลิตร (2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 15 ไมโครกรัมตามลำดับ) ลงบนเส้นที่ขีดไว้ด้านล่างให้มีระยะห่างกันจุดละ 1.5 เซนติเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) รอให้แห้งสนิท

5.2.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลายที่เตรียมไว้แล้ว จนกระทั่งตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษขึ้นไปถึงเส้นที่ขีดไว้ด้านบน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

5.2.4 นำกระดาษออกจาก chamber แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง

5.2.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

5.2.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นเป็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

5.2.7 วัดระยะทางที่กรดอะมิโนและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อนำไปหาค่า Rf

5.2.8 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

5.2.9 นำไปวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-1201V (Shimadzu)

5.2.10 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ได้กับปริมาณไลซีน

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนในตัวอย่าง

5.3.1 เตรียมกระดาษโครมาโตกราฟฟี เช่นเดียวกับข้อ 5.2.1

5.3.2 Spot ตัวอย่างปริมาตร 4 ไมโครลิตรลงบนเส้นที่ขีดไว้ด้านล่าง ให้แต่ละตัวอย่างอยู่ห่างกัน 1.5 เซนติเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) รอให้แห้งสนิท

5.3.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลายเช่นเดียวกับข้อ 5.2.3

5.3.4 นำกระดาษออกจาก chamber แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง

5.3.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

5.3.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นเป็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

5.3.7 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงซึ่งมีค่า Rf เท่าไลซีน ใส่ลงในหลอดที่มี 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

5.3.8 นำไปวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.3.9 คำนวณหาปริมาณไลซีนในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

6.1 นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาย้อมสีแกรม ศึกษารูปร่างลักษณะ และการสร้างสปอร์

6.2 ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่าง ๆ

6.3 วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ Bergy's Manual (19) เป็นคู่มือเปรียบเทียบ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะมิโนได้จากดิน

ผลการแยกแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จากตัวอย่างดินจำนวน 82 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อ จากดินตัวอย่างชนิดต่าง ๆ กัน ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 342 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนได้ที่แยกได้จากดินในแหล่งต่าง ๆ

รหัสตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้
KT1-KT30	กรุงเทพมหานคร	142
LB1-LB22	ลพบุรี	48
CH1-CH3	เชียงใหม่	16
SR1-SR3	สระบุรี	35
NK1-NK5	หนองคาย	35
SK1-SK3	สกลนคร	16
KS1-KS2	กาฬสินธุ์	9
UD1-UD2	อุดรธานี	11
PL1-PL13	พัทลุง	30

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในการทดลองนี้ พบว่าส่วนใหญ่ได้จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียจากดินแต่ละตัวอย่างค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อเป็น minimal medium ซึ่งเป็น selective medium ที่เชื้อเฉพาะบางชนิดเท่านั้นที่เจริญได้ เชื้อที่สามารถเจริญขึ้นบนอาหารชนิดนี้ได้ต้องสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้จากอนินทรีย์ในโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่แยกได้พบว่าทั้งแบบที่เป็นทรงกลมและเป็นท่อนขนาดต่างๆ กัน บางชนิดย้อมติดสีแกรมบวก และบางชนิดย้อมติดสีแกรมลบ โดยพวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนและย้อมติดสีแกรมบวกส่วนใหญ่สามารถสร้างสปอร์ได้

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 ในอาหาร production medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ fermentation broth ไปวิเคราะห์หาไลซีนโดยวิธี paper chromatography เปรียบเทียบกับไลซีนมาตรฐาน พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโนที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกับไลซีนมีทั้งหมด 52 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้ที่แยกได้จากดินในแหล่งต่าง ๆ

รหัสแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	รหัสแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน
KT1.1	กรุงเทพมหานคร	KT22.2	กรุงเทพมหานคร
KT1.3	กรุงเทพมหานคร	KT23.1	กรุงเทพมหานคร
KT1.5	กรุงเทพมหานคร	KT23.2	กรุงเทพมหานคร
KT4.1	กรุงเทพมหานคร	KT24.1	กรุงเทพมหานคร
KT4.2	กรุงเทพมหานคร	KT24.2	กรุงเทพมหานคร
KT4.4	กรุงเทพมหานคร	KT24.3	กรุงเทพมหานคร
KT7.1	กรุงเทพมหานคร	KT24.4	กรุงเทพมหานคร
KT7.4	กรุงเทพมหานคร	KT24.5	กรุงเทพมหานคร
KT9.1	กรุงเทพมหานคร	KT25.1	กรุงเทพมหานคร
KT9.2	กรุงเทพมหานคร	LB7.1	ลพบุรี
KT9.3	กรุงเทพมหานคร	LB10.1	ลพบุรี
KT9.4	กรุงเทพมหานคร	LB11.3	ลพบุรี
KT10.1	กรุงเทพมหานคร	LB14.3	ลพบุรี
KT10.2	กรุงเทพมหานคร	LB19.4	ลพบุรี
KT11.2	กรุงเทพมหานคร	LB21.5	ลพบุรี
KT13.2	กรุงเทพมหานคร	LB22.14	ลพบุรี
KT13.3	กรุงเทพมหานคร	NK1.5	หนองคาย
KT14.3	กรุงเทพมหานคร	NK5.3	หนองคาย
KT14.5	กรุงเทพมหานคร	UD2.1	อุดรธานี
KT15.1	กรุงเทพมหานคร	UD2.2	อุดรธานี
KT15.2	กรุงเทพมหานคร	UD2.9	อุดรธานี
KT16.1	กรุงเทพมหานคร	PL2.2	พัทลุง
KT16.2	กรุงเทพมหานคร	PL3.3	พัทลุง
KT21.1	กรุงเทพมหานคร	PL7.1	พัทลุง
KT21.2	กรุงเทพมหานคร	PL10.2	พัทลุง
KT22.1	กรุงเทพมหานคร	PL10.3	พัทลุง

เชื้อที่ให้ผลผลิตสูง (ดูจากความเข้มของแถบสีใน paper chromatogram) ได้แก่ เชื้อรหัส KT7.1, KT9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 ซึ่งแยกได้จากดินที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ กันดังนี้

KT7.1 แยกได้จากดินสวนบริเวณโรงอาหาร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

KT9.3, KT9.4 แยกได้จากดินบริเวณหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

KT21.1, KT21.2 แยกได้จากดินในวงเวียน หน้าคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

KT22.2 แยกได้จากดินข้างตึกคณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

KT25.1 แยกได้จากดินหน้าคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

NK1.5 แยกได้จากดิน ต.ดอนวัน อ.เมือง จ.หนองคาย

PL2.2 แยกได้จากดินในนาข้าว ม.ไสกุณ อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนได้ปริมาณสูง

การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนใน fermentation broth ของเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงจากข้อ 2 ซึ่งเลือกไว้ 9 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ fermentation broth ที่ได้จากการเลี้ยง *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 1

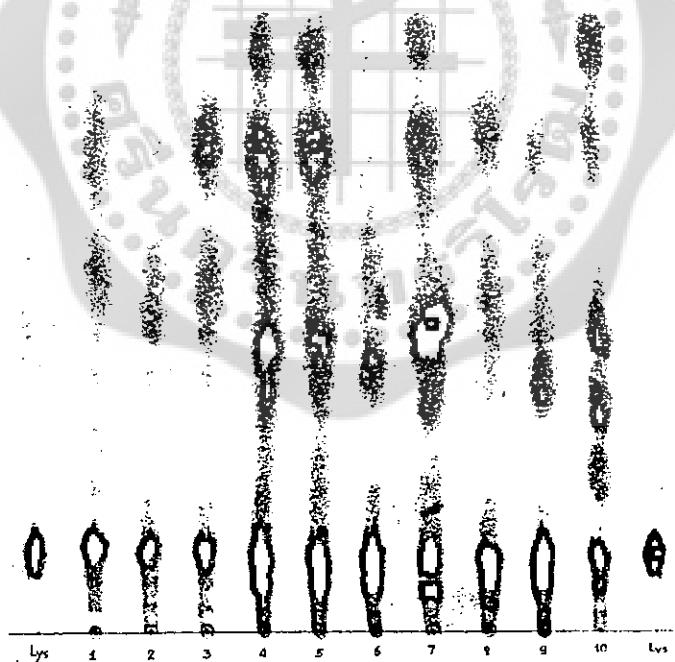
ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตไลซีนของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเปรียบเทียบกับ

C. glutamicum ATCC 13032

รหัสแบคทีเรีย	ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)
KT7.1	0.56
KT9.3	0.45
KT9.4	0.48
KT21.1	0.43
KT21.2	0.53
KT22.2	0.57
KT25.1	0.52
NK1.5	0.49
PL2.2	0.59
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	0.51

เชื้อที่คัดเลือกไว้ที่สามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงกว่า *C. glutamicum* ATCC 13032 ได้แก่ เชื้อรหัส KT7.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1 และ PL2.2 โดยเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด ได้แก่ เชื้อรหัส PL2.2 ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้สูง 0.59 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเชื้อที่คัดเลือกไว้แต่ละไอโซเลทก็สามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก และเชื้อบางไอโซเลทยังสามารถผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย ดังนั้นถ้าเชื้อใดสามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกมิวแทนต์ที่ให้ผลผลิตไลซีนหรือกรดอะมิโนชนิดอื่นสูงขึ้นได้ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อไป

สำหรับปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดยเชื้อที่คัดเลือกได้นี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติที่ได้จากการทดลองของคนอื่นๆ ก็พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก แม้แต่ในรายงานที่ใช้ *Ustilago maydis* สายพันธุ์ที่พบว่าผลิตไลซีนได้สูงก็ยังผลิตไลซีนได้น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร (21)

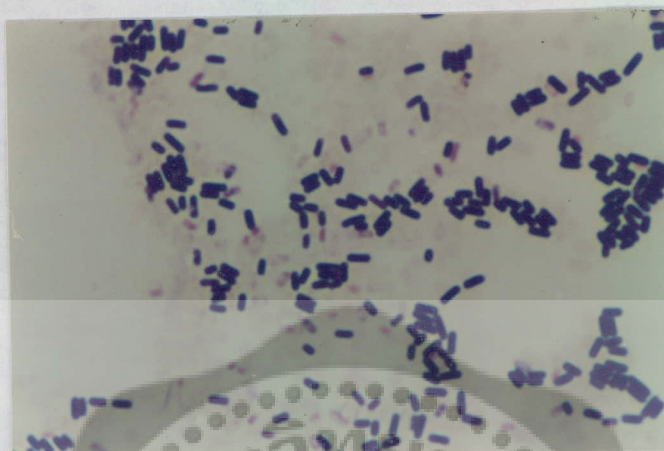


ภาพที่ 1 Paper chromatogram ของกรดอะมิโน ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับ *C. glutamicum* ATCC 13032

- | | | | | |
|-----------|-----------|----------|-----------|-------------------------------------|
| 1. KT7.1 | 2. KT9.3 | 3. KT9.4 | 4. KT21.1 | 5. KT21.2 |
| 6. KT22.2 | 7. KT25.1 | 8. NK1.5 | 9. PL2.2 | 10. <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 |

4. การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

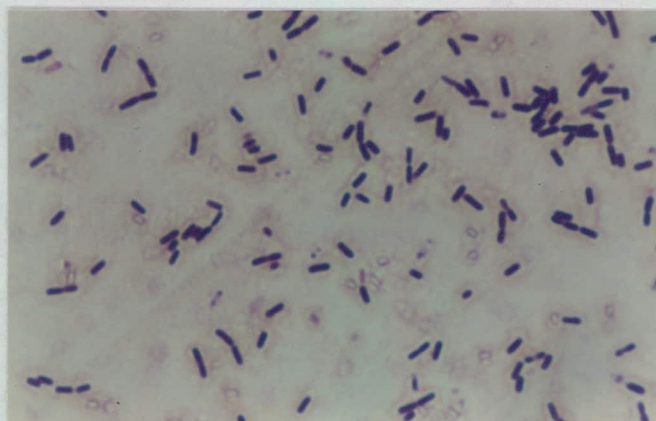
การศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อจากการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดต่าง ๆ กัน และสร้างสปอร์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 2-10 และการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่าง ๆ ของแบคทีเรียเหล่านี้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4



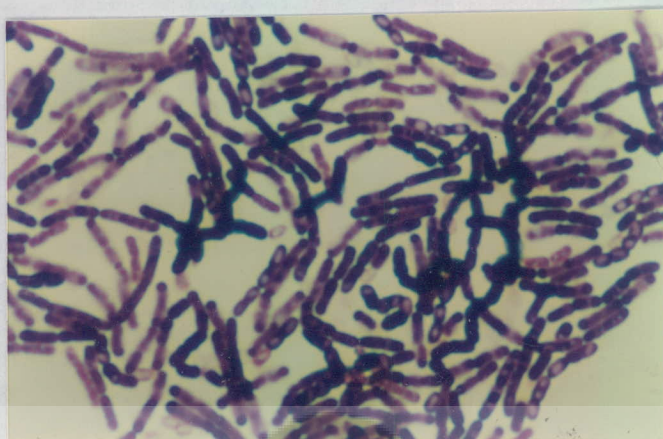
ภาพที่ 2 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT7.1 (500X)



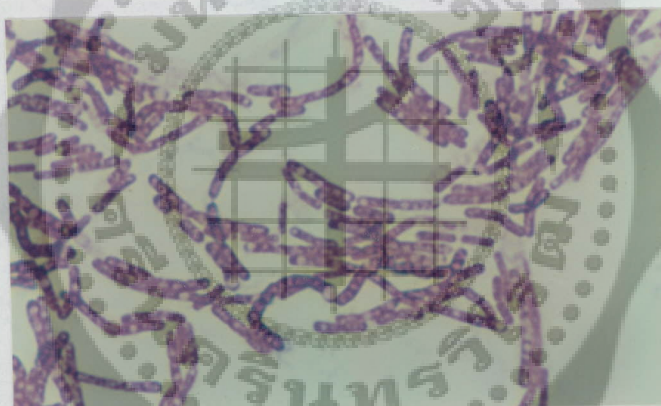
ภาพที่ 3 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT9.3 (500X)



ภาพที่ 4 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT9.4 (500X)



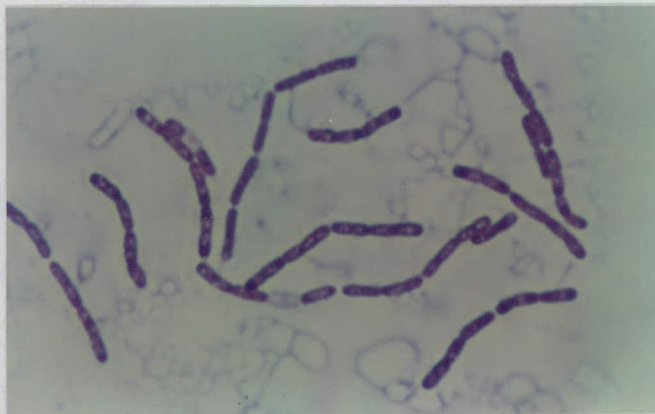
ภาพที่ 5 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT21.1 (500X)



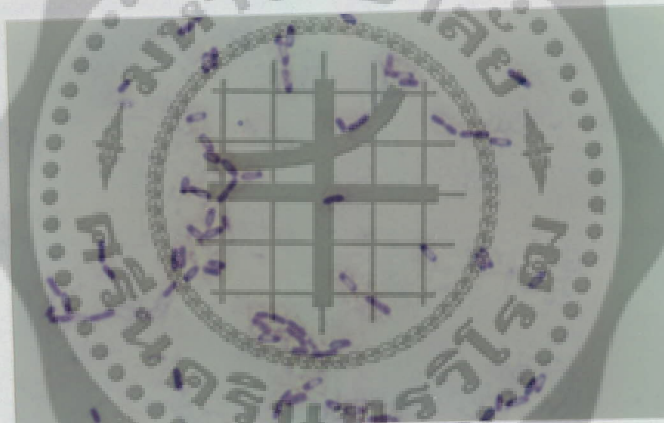
ภาพที่ 6 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT21.2 (500X)



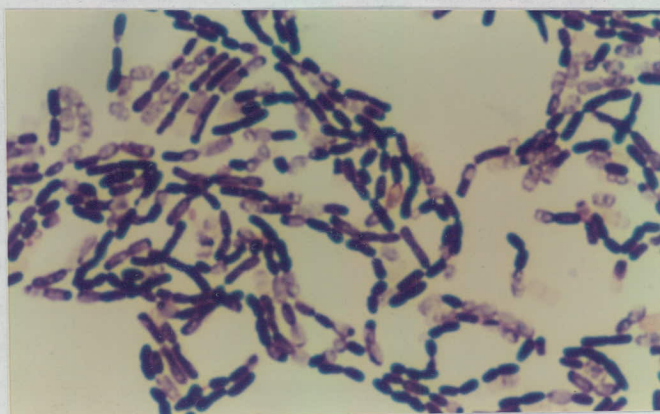
ภาพที่ 7 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT22.2 (500X)



ภาพที่ 8 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส KT25.1 (500X)



ภาพที่ 9 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส NK1.5 (500X)



ภาพที่ 10 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของเชื้อรหัส PL2.2 (500X)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไคซีนสูง

Characteristics	KT 7.1	KT 9.3	KT 9.4	KT 21.1	KT 21.2	KT 22.2	KT 25.1	NK 1.5	PL 2.2
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	-	-	-	+	+
pH in VP broth	5.5	7	7.5	5.5	5.5	5.5	5.5	7.5	5
Acid from D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of casein	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Hydrolysis of gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Utilization of citrate	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Growth at 55 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้จากตารางที่ 4 กับ Bergy's Manual (19) ได้ผลดังนี้

KT7.1 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus polymyxa*

KT9.3 และ NK1.5 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis*

KT9.4 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus pumilis*

KT21.1 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus coagulans*

KT21.2, KT22.2 และ KT25.1 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus circulans*

PL2.2 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับ *Bacillus licheniformis*

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในการทดลองนี้ เป็นเพียงการวิเคราะห์เบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากวิเคราะห์เฉพาะสมบัติทางชีวเคมีเพียงบางอย่างเท่าที่จะทำได้ในขณะนี้ ถ้าต้องการความถูกต้องแน่นอน ควรจะต้องมีการวิเคราะห์สมบัติอื่น ๆ เพิ่มเติมอีก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดนี้สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ทุกไอโซเลต จึงสรุปได้แน่นอนว่าอยู่ในจีนัส *Bacillus*

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้จากตัวอย่างดินที่นำมาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 82 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร minimal medium ที่เติมไฮโคลเฮกซิไมด์ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดอะมิโนได้จำนวน 342 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้นี้ไปเลี้ยงในอาหาร production medium ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นกรัมต่อลิตรดังนี้ คือ กลูโคส 50, NH_4Cl 10, ทริปโตน 4, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01; yeast extract 1, CaCO_3 5 โดยเฉพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ culture supernatant มา วิเคราะห์หาไลซีนโดยวิธี paper chromatography พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลซีนได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลท และในจำนวน 52 ไอโซเลทนี้มีแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง 9 ไอโซเลท คือ KT7.1, KT9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้ในช่วง 0.43-0.59 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ PL2.2 อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลทนี้ผลิตไลซีนได้ปริมาณแตกต่างกันไม่มากนัก และเชื้อบางไอโซเลทยังสามารถผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่นได้อีกด้วย จึงเห็นว่าน่าจะนำไปศึกษาต่อ ถ้าเชื้อใดสามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกมิวแทนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนหรือกรดอะมิโนอื่นสูงขึ้นได้ ก็อาจเป็นประโยชน์ต่อไปได้

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลทนี้ โดยการศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ทั้งหมดเป็นพวกที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนขนาดต่าง ๆ กัน และสร้างเอนโดสปอร์ได้ จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในจีนัส *Bacillus* สำหรับผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบกับ Bergy's Manual แล้วยังไม่สามารถวิเคราะห์สปีชีส์ได้อย่างแน่นอน เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเพียงบางอย่างเท่าที่จะทำได้ ในขณะนี้เท่านั้น ดังนั้น ถ้าต้องการทราบสปีชีส์ที่แน่นอนก็ควรวิเคราะห์สมบัติอื่น ๆ เพิ่มเติมอีก

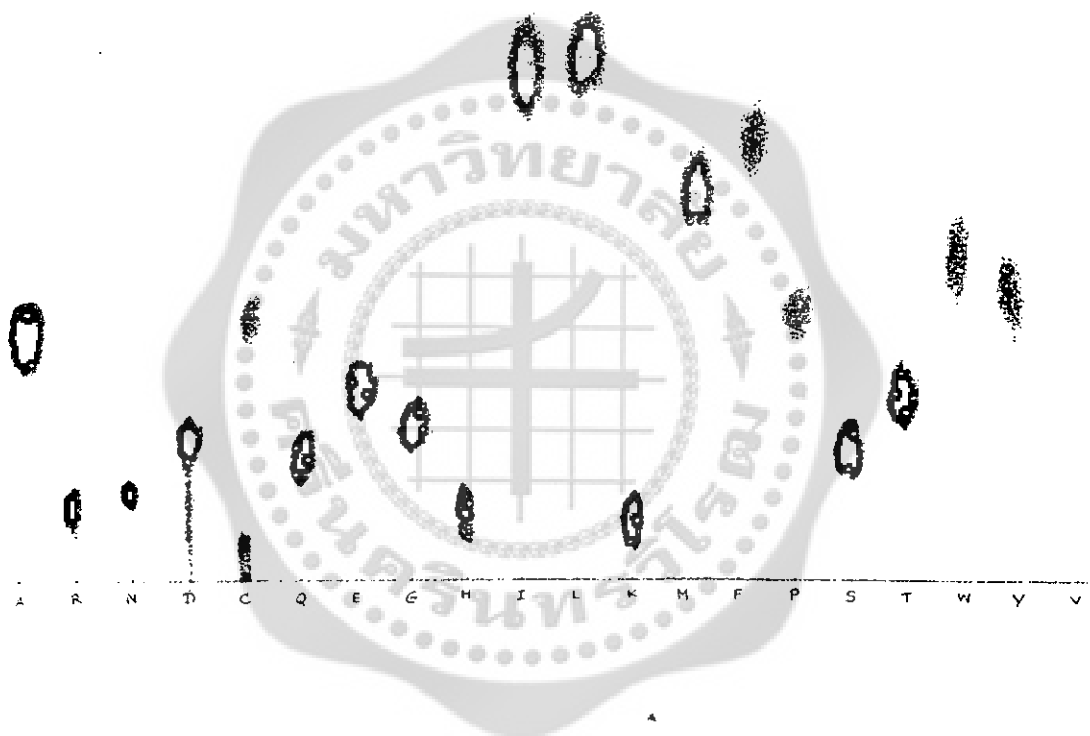
เอกสารอ้างอิง

1. สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
2. Barrett, G.C. 1985. **Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids.** London: Chapman and Hall.
3. Chinard F.D. 1952. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. **J. Biol. Chem.** 199: 91-95.
4. Crociani, F., A. Selli, G. Crisetig, D. Di Gioia and D. Matteuzzi. 1991. L-Lysine Production at 65°C by Auxotrophic-Regulatory Mutants of *Bacillus stearothermophilus*. **J. Indus. Microbiol.** 8: 127-132.
5. Demain, A.L. and N.A. Solomon. 1986. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington : American Society for Microbiology.
6. Hirose, Y. and H. Shibata. 1980. Amino Acid Fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 22 (1): 115-125.
7. Jayaraman, J. 1981. **Laboratory Manual in Biochemistry.** New Delhi: Wiley Eastern Limited.
8. Kinoshita, S., K. Nakayama and S. Kitada. 1958. L-Lysine Production Using Microbial Auxotroph. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 4(2) : 128-129.
9. Kinoshita, S., U. Shigezo and S. Masakazu. 1957. Study on the Amino Acid Fermentation. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 3(3): 193-205.
10. Miller, B.M. and W. Litsky. 1976. **Industrial Microbiology.** New York : McGraw-Hill Book Company.
11. Ohsumi, T., H. Sato, Y. Yoshihara and S. Ikeda. 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.
12. Peppler, H.J. and Perlman, D. 1979. **Microbial Technology.** London: Academic Press, Inc.
13. Plummer, D.T. 1978. **An Introduction to Practical Biochemistry.** 2nd ed. New York : McGraw-Hill Book Company.
14. Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. **Industrial Microbiology.** 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company.

15. Schendel, F.J., C.E. Bremmon, M.C. Flickinger, M. Guettler and R.S. Hanson. 1990. L-Lysine Production at 50°C by Mutants of a Newly Isolated and Characterized Methylophilic *Bacillus* sp. **Appl. Envi. Microbiol.** 56(4): 963-970.
16. Schrumpf, B., L. Eggeling and H. Sahm. 1992. Isolation and Prominent Characteristics of an L-Lysine Hyperproducing Strain of *Corynebacterium glutamicum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37(5) : 566-571.
17. Shvinka, J., U. Viesturs and M. Ruklisha. 1980. Yield Regulation of Lysine Biosynthesis in *B. flavum*. **Biotechnol. Bioeng.** 22 : 897-912.
18. Sikyta, B. 1983. **Methods in Industrial Microbiology**. Chichester : Ellis Horwood Limited.
19. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol 2. London : Williams and Wilkins. P.1105-1139.
20. Stanbury, P.F. and A. Whitaker. 1984. **Principles of Fermentation Technology**. Oxford: Pergamon Press.
21. Yamada, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda and K. Aida. 1972. **The Microbial Production of Amino Acids**. Tokyo : Kodansha Ltd.

ภาคผนวก

1. Paper chromatogram ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ



A = alanine	R = arginine	N = asparagine
D = aspartic acid	C = cysteine	Q = glutamine
E = glutamic acid	G = glycine	H = histidine
I = isoleucine	L = leucine	K = lysine
M = methionine	F = phenylalanine	P = proline
S = serine	T = threonine	W = tryptophan
Y = tyrosine	V = valine	

2. Calibration curve ของไลซีน

