ว96
ร451

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยวิธีการผ่าเหล่า

Improvement of Lysine Producing Microorganisms by Mutation

10 ต.ค. 2543

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2541

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

สมใจ ศิริโภค
ขจีนาฏ โพธิเวชกุล
พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์
สุมาลี เหลืองสกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

#142631

คำนำ

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

การผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ทั้งโดยวิธีการทางเคมี และวิธีการทางชีววิทยา ในปัจจุบันประมาณร้อยละ 80 ของไลซีนที่ผลิตจำหน่ายนั้นผลิตโดยวิธีการหมัก มีเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่ผลิตโดยวิธีการทางเคมี การใช้วิธีทางชีววิทยาโดยการหมักมีข้อดีกว่าการใช้วิธีการทางเคมี คือ ผลผลิตไลซีนที่ได้จะอยู่ในรูป L-lysine ซึ่งมนุษย์และสัตว์สามารถใช้ได้ทั้งหมด แต่การใช้วิธีทางเคมีจะทำให้ได้ทั้ง D- และ L-lysine ซึ่ง D-lysine นั้น มนุษย์และสัตว์ไม่สามารถใช้ได้ (14)

ปัจจุบัน ประเทศไทยมีโรงงานผลิตไลซีน จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ เพียงโรงงานเดียว คือ โรงงานของบริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด ซึ่งมีปริมาณการผลิตไม่เพียงพอต่อการใช้ภายในประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการนำเข้าไลซีนอีกส่วนหนึ่งจากต่างประเทศ ทำให้เสียเงินตราออกนอกประเทศเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การผลิตไลซีนภายในประเทศ ก็ใช้จุลินทรีย์ และเทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงมาก และยังมีปัญหาเรื่องการถ่ายทอดเทคโนโลยีอีกด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์และเทคโนโลยีเหล่านี้ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาอยู่เสมอเพื่อให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์และวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งการพัฒนาจุลินทรีย์และเทคโนโลยีนี้ตามปกติจะทำในประเทศผู้สร้างเทคโนโลยี โดยที่เราไม่มีโอกาสมีส่วนร่วมในการพัฒนานี้เลย ประเทศไทยจึงไม่สามารถพึ่งพาตนเองได้ เพราะต้องซื้อเชื้อจุลินทรีย์และเทคโนโลยีจากต่างประเทศอยู่ตลอดเวลา ทำให้ต้นทุนในการผลิตมีราคาสูง

ในปีก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนได้ในประเทศของเราเอง เพื่อเป็นแนวทางที่จะนำไปใช้ในการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต ผลจากการวิจัยทำให้แยกได้แบคทีเรียที่ผลิตไลซีนสูงทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ KT 7.1 , KT 9.3 , KT9.4 , KT21.1 , KT21.2 , KT22.2 , KT25.1 , NK1.5 และ PL2.2 (2)

อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาตินี้ ยังให้ผลผลิตไลซีนปริมาณไม่สูงมากพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้โดยตรง เนื่องจากการผลิตสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิของจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะมีกลไกการควบคุมแบบย้อนกลับ ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิได้ เพียงพอต่อความต้องการของตัวเองเท่านั้น (31) แต่ไม่มากพอที่

จะใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ให้มีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูงมากขึ้นไปอีก ดังนั้นในปีนี้คณะผู้วิจัยจึงได้นำแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนที่แยกได้มาปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท NTG และ EMS เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวางแผนและพัฒนา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

สมใจ ศิริโภค และคณะ

กรกฎาคม 2543

บทคัดย่อ

จากการนำแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนที่แยกได้จากดินจำนวน 9 ไอโซเลทคือ KT 7.1, KT 9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 มาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยการฉายรังสี UV แล้วนำเชื้อที่รอดชีวิตมาทดสอบหา homoserine auxotroph (hom^-) พบว่าเชื้อรหัส KT21.1, KT25.1 และ PL2.2 เท่านั้น ที่ได้ hom^- จำนวน 10, 7 และ 6 ไอโซเลทตามลำดับ และเมื่อนำ hom^- ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium เพื่อตรวจดูความสามารถในการผลิตไลซีน พบว่า hom^- ที่ได้จากเชื้อ KT21.1, KT25.1 และ PL2.2 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด ได้แก่ KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 และ PL2.2-UV3.1 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.75, 0.58 และ 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำ hom^- ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดของเชื้อแต่ละไอโซเลท ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ EMS และ NTG พบว่าเชื้อที่สามารถชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ AEC resistant mutant (AEC^R) จำนวนมากที่สุดได้แก่ PL2.2-UV3.1 AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-E2.3.14 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.89 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 3 เท่าของ prototroph) และ AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 3.68 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 6 เท่าของ prototroph)

Abstract

The improvement of lysine production from 9 isolates of the lysine-producing bacteria, KT7.1, KT 9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 and PL2.2 was performed by UV-mutagenesis. There were 10, 7 and 6 homoserine auxotrophs isolated from UV-treated cells of KT21.1, KT25.1 and PL2.2, respectively. These homoserine auxotrophs were screened for lysine production. The highest lysine-producing homoserine auxotrophs derived from KT21.1, KT25.1 and PL2.2 were KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 and PL2.2-UV3.1, which produced lysine 0.75, 0.58 and 0.66 g/l, respectively. These lysine producers were further treated with EMS and NTG. Among these homoserine auxotrophs, the PL2.2-UV3.1 yielded the highest number of AEC resistant mutants (AEC^R) when treated with either EMS or NTG. The highest lysine producer from EMS-treated cells was PL2.2-UV3.1-E2.3.14, which produced lysine 1.89 g/l (~ 3 times of prototroph), and the highest lysine producer from NTG-treated cells was PL2.2-UV3.1-N2.5.41, which produced lysine 3.68 g/l (~ 6 times of prototroph).

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	11
ขอบเขตของการวิจัย	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	12
ผลการทดลอง	15
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40

มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ

บทนำ

ไลซีน (Lysine) เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงนิยมใช้เติมลงในอาหารกันอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ในปัจจุบันความต้องการไลซีนเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมทั้งในมนุษย์และสัตว์มีปริมาณสูงมาก ในแต่ละปีมีการผลิตไลซีนประมาณ 130,000 ตัน (28) โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากการหมักโดยจุลินทรีย์ (32)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณมากเกินความต้องการ และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้สามารถแยกออกมาเป็นกรดอะมิโนบริสุทธิ์ได้ (14) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติโดยทั่วไป จะให้ผลผลิตไลซีนปริมาณไม่สูงมากพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้โดยตรง แม้ว่าจะเลือกใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์แล้วก็ตาม แต่ความสามารถสูงสุดในการผลิตจะถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอีก จึงต้องปรับปรุงยีนให้มีการเปลี่ยนแปลงไป สำหรับวิธีการที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า (induced mutation) โดยใช้มิวตาเจน (mutagen) เช่น รังสี หรือสารเคมี หลังจากนั้นจึงคัดเลือกหามิวแตนท์ที่สร้างผลผลิตได้สูงขึ้น (31)

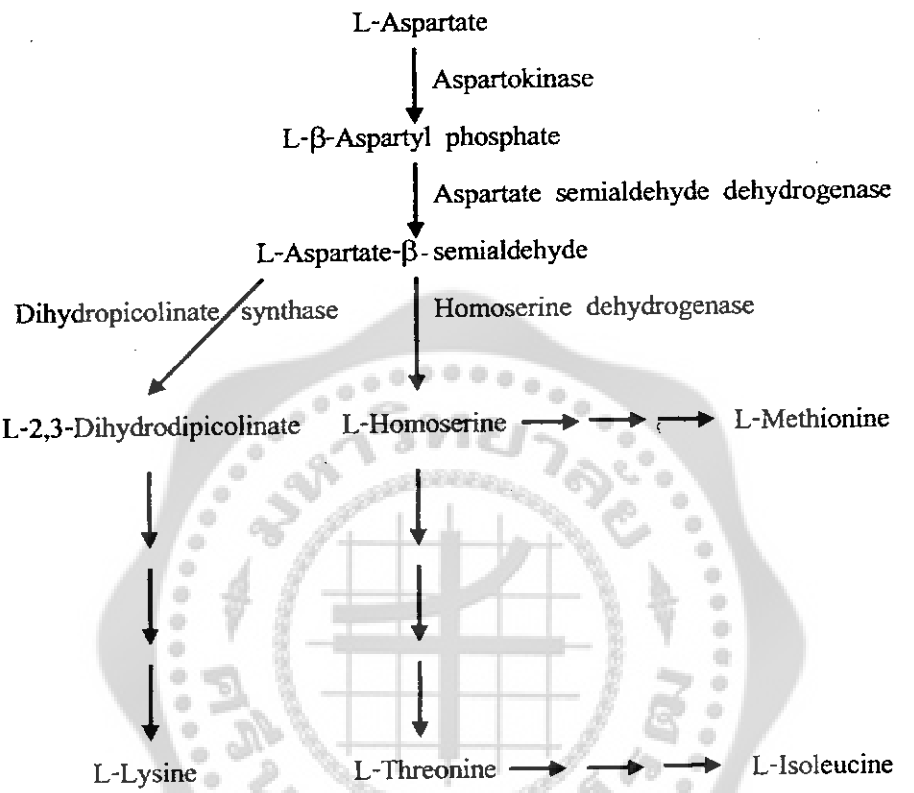
การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยวิธีการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่านั้น ตามปกติแล้วมิวแตนท์ที่ได้ส่วนใหญ่ มักจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้น้อยลง มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่สามารถผลิตสารที่ต้องการได้มากขึ้น โดยสาเหตุที่มิวแตนท์สร้างผลผลิตได้มากขึ้นนั้นปกติเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อกลไกการควบคุมปริมาณการสังเคราะห์ผลผลิต ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์และกลไกในการควบคุมการสังเคราะห์ผลผลิตนั้นจึงมีความสำคัญมาก เพราะจะช่วยให้ทำนายลักษณะของมิวแตนท์ที่ต้องการได้ และทำให้ออกแบบวิธีการแยกและคัดเลือกมิวแตนท์ที่ต้องการได้ด้วย (31)

การสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรีย โดยทั่วไปมีวิถีการสังเคราะห์ผ่าน diaminopimelate pathway ซึ่งเป็น branched pathway ที่มี L-aspartate เป็น precursor ทำให้ได้กรดอะมิโน 4 ชนิด คือ ไลซีน เมทไธโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (threonine) และไอโซลิวซีน (isoleucine) ดังแสดงในภาพที่ 1 (4, 8, 17)

การควบคุมการผลิตไลซีนใน pathway นี้ เป็นแบบ feedback control โดยมี key enzymes ที่สำคัญ 2 ชนิดคือ aspartokinase (เร่งปฏิกิริยาแรกใน pathway) และ homoserine dehydrogenase (เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน aspartate β-semialdehyde ไปเป็น homoserine ที่ branched point)

ใน *E. coli* มี aspartokinase 3 ชนิด และมี homoserine dehydrogenase 2 ชนิดซึ่งมีการควบคุมกิจกรรมและการสังเคราะห์แตกต่างกัน คือ aspartokinase I จะถูกควบคุมกิจกรรมโดย L-threonine และถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้โดย L-threonine + L-isoleucine ในขณะที่

aspartokinase II ถูกยับยั้งการสังเคราะห์โดย L-methionine และ aspartokinase III ถูกยับยั้งกิจกรรมและการสังเคราะห์ได้โดย L-lysine สำหรับ homoserine dehydrogenase I จะถูกควบคุมกิจกรรมโดย L-threonine เช่นเดียวกับ aspartokinase I ส่วน homoserine dehydrogenase II จะถูกควบคุมการสังเคราะห์โดย L-methionine เช่นเดียวกับ aspartokinase II



ภาพที่ 1 Diaminopimelate pathway of lysine biosynthesis

ใน *Rhodopseudomonas capsulatus* , *Bacillus polymyxa* , *Brevibacterium flavum* และ *Corynebacterium glutamicum* มี aspartokinase เพียงชนิดเดียว และถูกควบคุมแบบ concerted feedback inhibition โดย L-lysine และ L-threonine ในขณะที่ aspartokinase ใน *Brevibacterium lactofermentum* , *Bacillus brevis* , *Pseudomonas putida* จะถูกยับยั้งกิจกรรมได้ ทั้งในสภาวะที่มี L-lysine หรือ L-threonine เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือในสภาวะที่มีกรดอะมิโนทั้งสองชนิดอยู่ร่วมกันก็ได้

แม้ว่าการควบคุมกิจกรรมหรือการสังเคราะห์ของเอนไซม์ aspartokinase ในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อาจมีความแตกต่างกันไปบ้าง แต่การคัดเลือกมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง โดยทั่วไปจะเลือกจากพวก homoserine auxotroph หรือ analogue resistance mutant (11) เนื่องจากพวก homoserine auxotroph มีแนวโน้มที่จะให้ผลผลิตไลซีนได้สูงกว่า prototroph เพราะ L-aspartate-β-semialdehyde ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น homoserine ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาได้ทางเดียว คือ เปลี่ยนไปเป็นไลซีน นอกจากนี้ ยังทำให้ไม่สร้างเมทไธโอนีนและ ทรีโอนีน ซึ่งอาจเป็นตัวร่วม

ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ aspartokinase อีกด้วย สำหรับ analogue resistance mutant นั้น จะสามารถสร้างไลซีนสูงขึ้นได้ ในกรณีที่ความเป็นพิษของแอนาลอคเกิดจากการที่แอนาลอคสามารถควบคุมเอนไซม์ aspartokinase ได้เช่นเดียวกับผลผลิตขั้นสุดท้าย และตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในมิวแตนท์ เป็นตำแหน่งที่ถูกควบคุมโดยผลผลิตขั้นสุดท้ายด้วยเช่นเดียวกัน (31)

ในปี ค.ศ. 1958 Kinoshita และคณะ ได้รายงานว่าใช้รังสีอัลตราไวโอเลท และโคบอลท์ (Co^{60})ในการชักนำให้ *Micrococcus glutamicus* เกิดการผ่าเหล่า ทำให้ได้ออกโซโทรปหลายชนิด และในบรรดาออกโซโทรปที่ได้นี้ พบว่า homoserine auxotroph (*M. glutamicus* No. 613-1) และ methionine and threonine auxotroph (*M. glutamicus* No. 614-5) สามารถผลิตและปลดปล่อยไลซีนออกมาได้ปริมาณสูงกว่ามิวแตนท์อื่น ๆ (19)

ในปี ค.ศ. 1990 Schendel และคณะ รายงานว่าได้ชักนำเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็น thermophilic methylotroph ให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ ethyl methanesulfonate (EMS) หรือ N-methyl-N′- nitro - N - nitroso - guanidine (NTG) แล้วแยกหา homoserine auxotroph โดยใช้ replica plating technique จากนั้นนำ homoserine auxotroph ที่ได้ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำ และแยกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ S-2-amino-ethyl-L-cysteine (AEC) ซึ่งเป็นแอนาลอคของไลซีนโดยเพาะเชื้อในอาหารที่มี AEC ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำมิวแตนท์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว คัดเลือกมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด แล้วนำไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำ จนกระทั่งไม่สามารถเพิ่มผลผลิตไลซีนได้อีก พบว่า มิวแตนท์ที่ได้สามารถผลิตไลซีนในสภาวะที่เหมาะสมได้สูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร (27)

ในปี ค.ศ. 1991 Crociani และคณะ รายงานว่าได้ชักนำเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ NTG แล้วแยกหามิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC (AEC^R) โดยใช้อาหารที่เติม AEC 0.1, 0.4, 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมทรีโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าแยกได้ AEC^R ทั้งหมด 350 ไอโซเลท จากนั้นจึงนำไปแยกหามิวแตนท์ที่สามารถผลิตไลซีนได้โดยใช้ replica plating technique แล้วเททับด้วย minimal agar ที่ผสม *Leuconostoc mesenteroides* P60 ซึ่งเป็น lysine auxotroph เลือก AEC^R ที่สร้างไลซีนได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว พบว่ามิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดคือ AEC 12 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 4.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อนำ AEC 12 ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำอีกโดยใช้ NTG ผสมกับเพนนิซิลิน แล้วแยกหา homoserine auxotroph นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว พบว่ามิวแตนท์ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด คือ AEC 12 A 5 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 7.5 กรัมต่อลิตร (9)

ในปี ค.ศ. 1992 Schrumpf และคณะ ได้รายงานว่าใช้ NTG ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Corynebacterium glutamicum* แล้วแยกหา AEC^R ได้ 96 ไอโซเลท แต่มีเพียง 7 ไอโซเลท

ที่สามารถผลิตและปลดปล่อยไลซีนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และมี 4 ไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงใกล้เคียงกันประมาณ 35 mM (6.3875 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงเลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงและสามารถเจริญได้ดี (MH20) ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำอีก แล้วแยกหาออกโซโทรปที่ต้องการลิวซีน (leucine) หรือไอโซลิวซีน (isoleucine) หรือเมทไธโอนีน (methionine) ได้จำนวนประมาณ 50 ไอโซเลท และในบรรดามิวแตนท์ที่ได้ทั้งหมดนี้ พบว่าสายพันธุ์ MH20-22B ซึ่งเป็น leucine auxotroph ผลิตไลซีนได้มากเกือบ 2 เท่าของ MH20 คือ 55 mM (10.0375 กรัมต่อลิตร) (28)

ในปี ค.ศ. 1994 Ohsumi และคณะ รายงานว่าได้ใช้ UV ในการชักนำ *Saccharomyces cerevisiae* ให้เกิดการผ่าเหล่า เพื่อให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น โดยกระจายเชื้อ 10^8 เซลล์ลงบนอาหารที่มี AEC เป็นส่วนผสมอยู่ด้วยร้อยละ 0.1-0.5 แล้วนำไปฉายรังสี UV โดยใช้ germicidal lamp ขนาด 15 วัตต์ ($\lambda = 253$ นาโนเมตร) วางห่างจากจานเพาะเชื้อ 35 เซนติเมตร ผลปรากฏว่าได้ AEC^R ทั้งหมด 190 ไอโซเลท แต่ที่สามารถผลิตไลซีนสะสมภายในเซลล์ได้มี 48 ไอโซเลท และมิวแตนท์ที่ผลิตไลซีนอิสระสะสมภายในเซลล์ได้สูงสุดคือ LA-1 ซึ่งผลิตได้สูงถึงร้อยละ 4 (23)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีนที่คัดเลือกได้ ให้ผลิตไลซีนได้สูงขึ้น โดยใช้วิธีชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท (UV) EMS และ NTG

2. เพื่อคัดเลือกมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนได้สูงขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนสูงที่แยกได้จากการทดลองในปีก่อนหน้านี้ ทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ KT 7.1, KT 9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 นำมาปรับปรุงสายพันธุ์ โดยชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท แล้วนำมาคัดเลือกหาเชื้อมิวแตนท์ที่เป็น homoserine auxotroph โดยใช้ replica plating technique หลังจากนั้นนำ homoserine auxotroph ที่ได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนในอาหารเหลว เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด แล้วจึงนำมาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำโดยใช้สารเคมี EMS และ NTG เพื่อคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC (AEC^R) และคัดเลือก AEC^R ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว production medium

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้ คือ มิวแตนท์ที่สามารถผลิตไลซีนได้สูงมากพอที่จะนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป จนกระทั่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ผลิตไลซีนในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย คือ เกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนสูงที่แยกได้จากการทดลองในปีก่อนหน้านี้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ KT 7.1 , KT 9.3 , KT9.4 , KT21.1 , KT21.2 , KT22.2 , KT25.1 , NK1.5 และ PL2.2 (2)

2. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ UV

2.1 นำเชื้อจากข้อ 1 มาเลี้ยงใน inoculum medium เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยบ่มบนเครื่องเขย่า (Forma Scientific Orbital Shaker Model 4581) ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorvall รุ่น RC-5 Plus) ล้างเซลล์ด้วย normal saline

2.3 เตรียมซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 2.2 โดยเติม normal saline ลงไป ปรับให้ได้ค่า OD_{660} ประมาณ 1.0

2.3 ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 2.2 หยดลงบนผิวหน้าอาหาร NA ในจานเพาะเชื้อจานละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารอย่างสม่ำเสมอ

2.4 นำไปฉายรังสี UV เป็นเวลา 1-10 นาที โดยวางจานเพาะเชื้อห่างจากหลอด UV 20 เซนติเมตร

2.5 บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน

2.6 เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวๆไว้บนอาหาร NA slant จากนั้นนำไปทดสอบหา homoserine auxotroph ตามวิธีการในข้อ 3 ต่อไป

3. การคัดเลือกมิวแตนท์ที่เป็น homoserine auxotroph

3.1 นำเชื้อจากข้อ 2.6 มาทำ replica plate โดยเลี้ยงบนอาหาร minimal medium (MM) และ minimal medium ที่เติม homoserine (MM + H)

3.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน

3.3 เก็บเชื้อ homoserine auxotroph ลงบนอาหาร NA slant โดยเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่เจริญได้บนอาหาร MM + H แต่ไม่เจริญบน MM

4. การคัดเลือก homoserine auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูง

4.1 เขี่ยเชื้อ homoserine auxotroph จาก NA slant 1 ลูป ใส่ลงใน inoculum medium

4.2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.3 ปิเปต inoculum จากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.4 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4.5 นำ fermentation broth ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.6 นำ supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณไลซีนโดยใช้วิธี paper chromatography ตามวิธีการในภาคผนวก ข้อ 3

5. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ EMS

5.1 นำเชื้อ homoserine auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูง จากข้อ 4 มาเลี้ยงใน inoculum medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2

5.3 เตรียมซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 5.2 โดยเติม 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ลงไป ปรับให้ได้ค่า OD_{660} ประมาณ 1.0

5.4 ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 5.3 ปริมาตร 0.9, 0.8, 0.7 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Eppendorf ที่มี EMS ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ

5.5 เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5.6 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ refrigerated centrifuge (Sorvall รุ่น RMC14)

5.7 ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งลงในภาชนะบรรจุที่เตรียมไว้

5.8 ล้างเซลล์โดยเติม 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งลงในภาชนะบรรจุที่เตรียมไว้

5.9 เตรียมซัสเพนชันของเซลล์ โดยเติม 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร นำไปทดสอบหามิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC ตามวิธีการในข้อ 7 ต่อไป

6. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ NTG

6.1 นำเชื้อ homoserine auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูง จากข้อ 4 มาเลี้ยงใน inoculum medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย normal saline

6.3 เตรียมซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 6.2 โดยเติม normal saline ลงไป ปรับให้ได้ค่า OD_{660} ประมาณ 1.0

6.4 ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 6.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี NTG ความเข้มข้น 2,000-6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

6.5 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (IKA HS501) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

6.6 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.7 ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งลงในภาชนะบรรจุที่เตรียมไว้

6.8 ล้างเซลล์ด้วย normal saline นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ และใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งลงในภาชนะบรรจุที่เตรียมไว้

6.9 เตรียมซัสเพนชันของเซลล์ โดยเติม normal saline ลงไป 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบหามิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC ตามวิธีการในข้อ 7 ต่อไป

7. การคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC

7.1 ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อจากข้อ 5.9 หรือข้อ 6.9 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร NA+AEC ที่มี AEC ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อ เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารอย่างสม่ำเสมอ (ทำ 3 ซ้ำ)

7.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

7.3 เก็บ AEC^R ลงบน NA slant โดยเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญขึ้นบนอาหาร NA+AEC

8. การคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC ที่ผลิตไลซีนได้สูง

นำ AEC^R ที่แยกได้จากข้อ 7.3 มาเพาะเลี้ยงใน production medium เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตไลซีนได้สูง โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับการคัดเลือก homoserine auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูงในข้อ 4

ผลการทดลอง

1. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ UV

จากการนำแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนที่แยกได้จากดิน คือ KT 7.1 , KT 9.3 , KT9.4 , KT21.1, KT21.2 , KT22.2 , KT25.1 , NK1.5 และ PL2.2 มาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยการฉายรังสี UV เป็นเวลา 1-10 นาที ที่ระยะห่าง 20 เซนติเมตร พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความทนทานต่อรังสี UV ได้แตกต่างกัน เมื่อใช้เวลาในการฉายรังสีนานกว่า 5 นาที เชื้อส่วนใหญ่จะตายหมด ยกเว้น KT25.1 ที่พบโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีนาน 8 นาที และเมื่อเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่รอดชีวิตไปคัดเลือกหามิวแตนท์ที่เป็น homoserine auxotroph (hom^-) พบว่าได้ hom^- จำนวนค่อนข้างน้อย แม้จะทำการทดลองหลายครั้ง แต่สามารถแยก hom^- ได้เพียง 10, 7 และ 6 ไอโซเลท จากเชื้อรหัส KT21.1, KT25.1 และ PL2.2 ตามลำดับ จากจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ hom^- ของเชื้อ KT21.1 เมื่อผ่านการฉายรังสีเป็นเวลา 1, 2, 3, 4 นาที จำนวน 4, 3, 2, 1 ไอโซเลทตามลำดับ hom^- ของเชื้อ KT25.1 เมื่อผ่านการฉายรังสีเป็นเวลา 2, 4, 5, 7, 8 นาที จำนวน 1, 3, 1, 1, 1 ไอโซเลทตามลำดับ และ hom^- ของเชื้อ PL2.2 เมื่อผ่านการฉายรังสีเป็นเวลา 1, 2, 3 นาที จำนวน 3, 1, 2 ไอโซเลทตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนเชื้ออื่น ๆ ไม่พบ hom^-

ตารางที่ 1 จำนวน homoserine auxotroph ที่ได้จากการชักนำเชื้อให้เกิดการผ่าเหล่าโดย UV

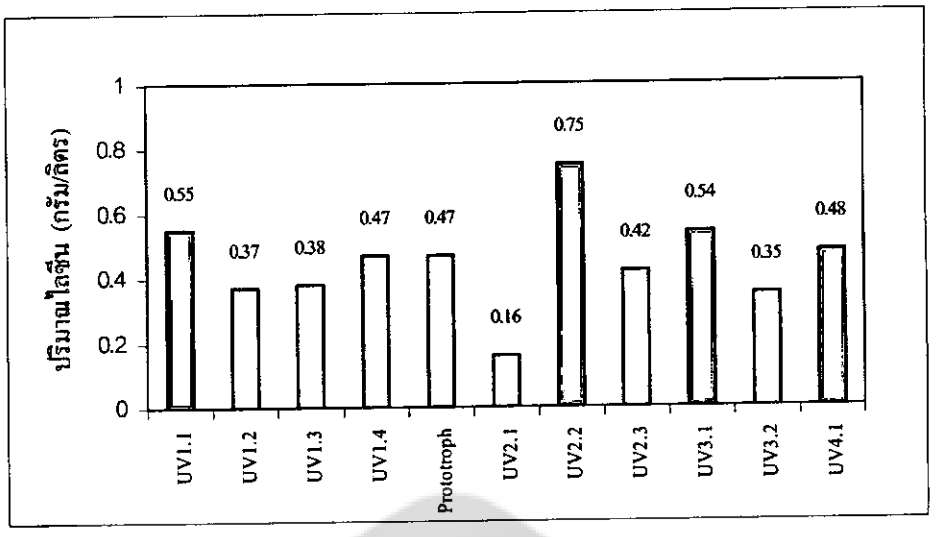
เวลาที่ฉายรังสี UV (นาที)	จำนวน homoserine auxotroph (ไอโซเลท)		
	KT21.1	KT25.1	PL2.2
1	4	-	3
2	3	1	1
3	2	-	2
4	1	3	-
5	-	1	-
6	-	-	-
7	-	1	-
8	-	1	-
9	-	-	-
10	-	-	-

2. การคัดเลือก homoserine auxotroph ที่ผลิตไลซีนได้สูง

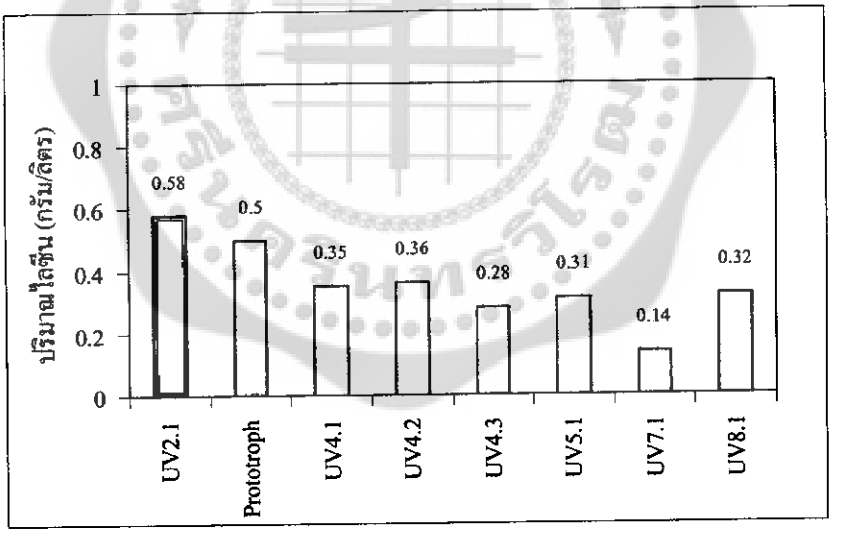
จากการนำเชื้อ hom⁻ ที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 1 ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไลซีนในอาหารเปรียบเทียบกับโปรโตโทรป (prototroph) พบว่า hom⁻ ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตน้อยกว่า prototroph มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ให้ผลผลิตสูงกว่า prototroph ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2-4 hom⁻ ของเชื้อ KT21.1 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ KT21.1-UV2.2 ซึ่งได้จากการฉายรังสี UV 2 นาที ผลิตไลซีนได้ 0.75 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 59.97 เปอร์เซ็นต์) hom⁻ ของเชื้อ KT25.1 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ KT25.1-UV2.1 ซึ่งได้จากการฉายรังสี UV 2 นาที ผลิตไลซีนได้ 0.58 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 16 เปอร์เซ็นต์) และ hom⁻ ของเชื้อ PL2.2 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ PL2.2-UV3.1 ซึ่งได้จากการฉายรังสี UV 3 นาที ผลิตไลซีนได้ 0.66 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 11.86 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ hom⁻ ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดของแต่ละเชื้อไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ EMS และ NTG

ตารางที่ 2 ปริมาณไลซีนที่ผลิตได้จาก homoserine auxotroph เปรียบเทียบกับ prototroph

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
KT21.1 (Prototroph)	0.47	KT25.1-UV4.1	0.35
KT21.1-UV1.1	0.55	KT25.1-UV4.2	0.36
KT21.1-UV1.2	0.37	KT25.1-UV4.3	0.28
KT21.1-UV1.3	0.38	KT25.1-UV5.1	0.31
KT21.1-UV1.4	0.47	KT25.1-UV7.1	0.14
KT21.1-UV2.1	0.16	KT25.1-UV8.1	0.32
KT21.1-UV2.2	0.75	PL2.2 (Prototroph)	0.59
KT21.1-UV2.3	0.42	PL2.2 –UV1.1	0.58
KT21.1-UV3.1	0.54	PL2.2 –UV1.2	0.59
KT21.1-UV3.2	0.35	PL2.2 –UV1.3	0.31
KT21.1-UV4.1	0.48	PL2.2 –UV2.1	0.58
KT25.1 (Prototroph)	0.50	PL2.2 –UV3.1	0.66
KT25.1-UV2.1	0.58	PL2.2 –UV3.2	0.21

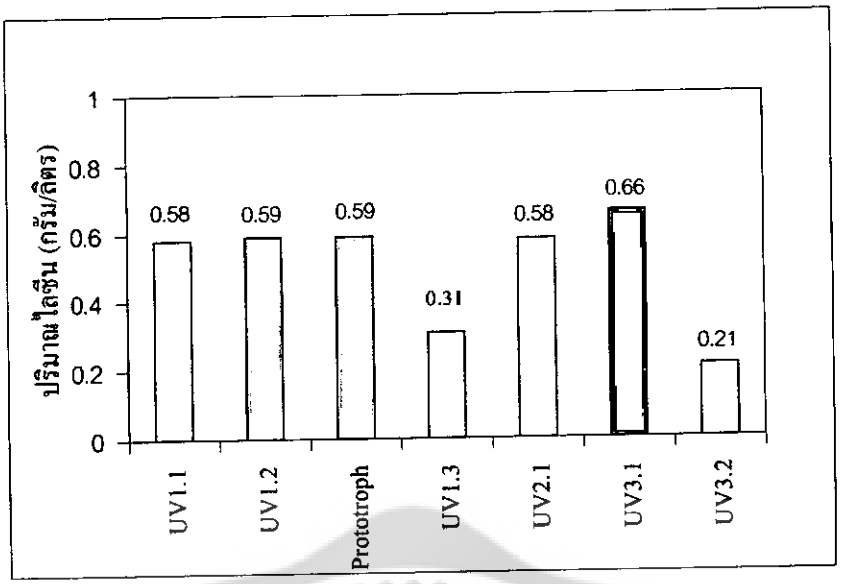


ภาพที่ 2 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย hom⁻ ของเชื้อ KT 21.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย UV เปรียบเทียบกับ prototroph



ภาพที่ 3 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย hom⁻ ของเชื้อ KT 25.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย UV เปรียบเทียบกับ prototroph

- ☐ Prototroph และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ prototroph
- ▣ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า prototroph
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า prototroph



ภาพที่ 4 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย hom⁻ ของเชื้อ PL2.2 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย UV เปรียบเทียบกับ prototroph

- ☐ Prototroph และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ prototroph
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า prototroph
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า prototroph

3. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ EMS

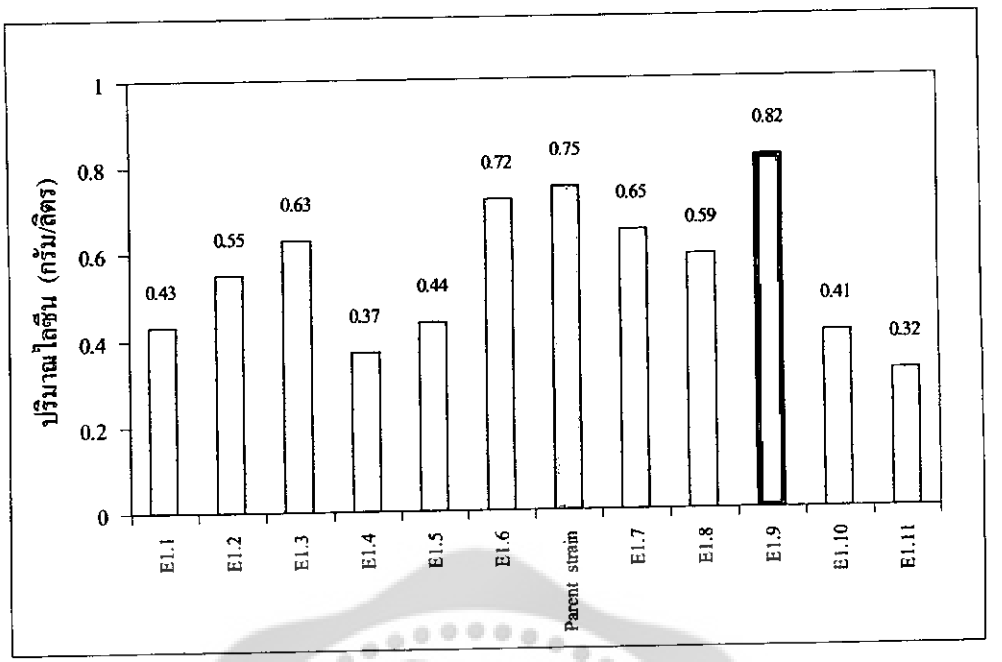
จากการนำ hom⁻ ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง จากผลการทดลองในข้อ 2 คือ KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 และ PL2.2-UV3.1 มาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า โดยใช้ EMS 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับซัสเพนชันของเซลล์ แล้วคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC (AEC^R) ผลการทดลองพบว่าแยกได้ AEC^R ของเชื้อ KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 และ PL2.2-UV3.1 จำนวน 11, 9 และ 23 ไอโซเลทตามลำดับ และเมื่อนำ AEC^R เหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนเปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5-7 AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ KT21.1-UV2.2 ส่วนใหญ่ผลิตไลซีนได้น้อยกว่า parent strain และ AEC^R บางไอโซเลทผลิตไลซีนได้น้อยลงกว่า prototroph ด้วย มีเพียงไอโซเลทเดียวที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain เพียงเล็กน้อย คือ KT21.1-UV2.2-E1.9 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.82 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 9.33 เปอร์เซ็นต์) AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ KT25.1-UV2.1 มี 3 ไอโซเลทผลิตไลซีนได้น้อยกว่า prototroph และ parent strain และมี 6 ไอโซเลทผลิตไลซีนได้มากกว่า parent strain โดยไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ KT25.1-UV2.1-E1.9 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.94 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 62.07 เปอร์เซ็นต์) สำหรับ AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ PL2.2-UV3.1 พบว่าส่วนใหญ่ผลิตไลซีนได้มากกว่าหรือใกล้เคียงกับ parent strain แต่ก็มี AEC^R บางไอโซเลทผลิตไลซีนได้น้อยกว่า prototroph AEC^R ไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-E1.13 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.15 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 74.24 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่นำมาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วย EMS ที่ให้ AEC^R จำนวนมากที่สุดคือ PL2.2-UV3.1 และ AEC^R ที่ผลิตไลซีนสูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-E1.13 อย่างไรก็ตามผลผลิตไลซีนที่ได้นี้ยังมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงนำ PL2.2-UV3.1-E1.13 ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำโดยใช้ EMS 0.1-0.3 มิลลิลิตร แล้วคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC อีกครั้ง ผลปรากฏว่าแยกได้ AEC^R ทั้งหมด 18, 43 และ 35 ไอโซเลท เมื่อใช้ EMS 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตรตามลำดับ การที่แยกได้ AEC^R จากจานเพาะเชื้อที่ผ่านการ treat ด้วย EMS 0.1 มิลลิลิตร จำนวนน้อยกว่าเมื่อใช้ EMS 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตร เนื่องจากมีเชื้อขึ้นในจานเพาะเชื้อหนาแน่นมากกว่า ทำให้แยกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้น้อยกว่า

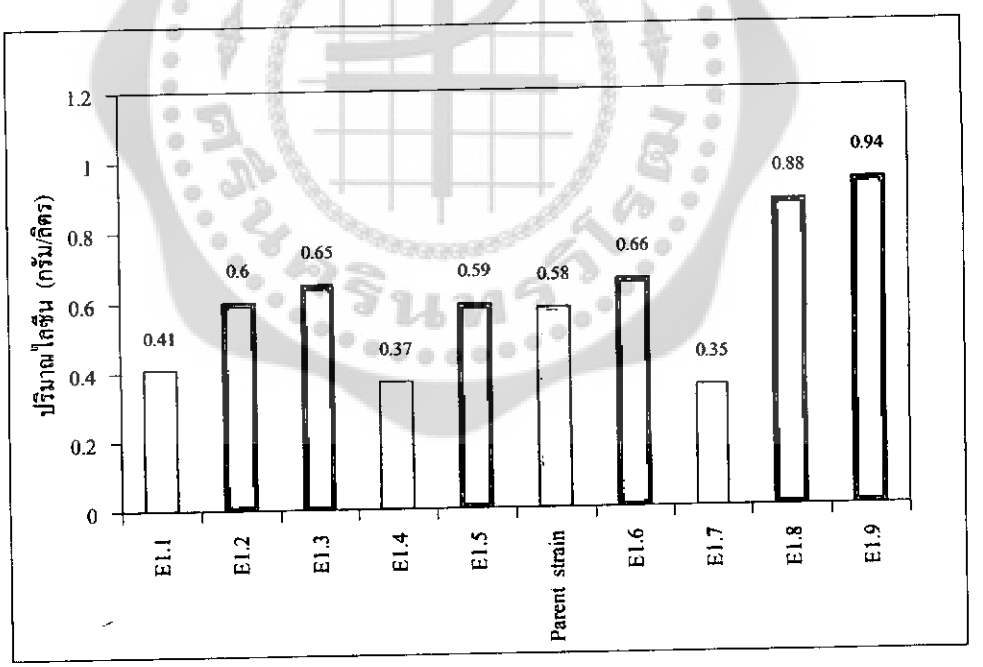
เมื่อนำ AEC^R ที่ได้ทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 8 AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตร ที่ผลิตไลซีนสูงกว่า parent strain มี 6, 5 และ 8 ไอโซเลทตามลำดับ และมิวแตนท์ที่ผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ PL2.2-UV3.1-E2.3.14 ซึ่งได้จากการ treat ด้วย EMS 0.3 มิลลิลิตร ผลิตไลซีนได้ 1.89 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่า parent strain 64.35 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 3 เท่าของ prototroph)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ EMS เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
KT21.1 (Prototroph)	**0.47**	**PL2.2 (Prototroph)**	**0.59**
KT21.1-UV2.2 (Parent strain)	**0.75**	**PL2.2-UV3.1 (Parent strain)**	**0.66**
KT21.1-UV2.2-E1.1	0.43	PL2.2-UV3.1-E1.1	0.58
KT21.1-UV2.2-E1.2	0.55	PL2.2-UV3.1-E1.2	0.76
KT21.1-UV2.2-E1.3	0.63	PL2.2-UV3.1-E1.3	0.88
KT21.1-UV2.2-E1.4	0.37	PL2.2-UV3.1-E1.4	0.82
KT21.1-UV2.2-E1.5	0.44	PL2.2-UV3.1-E1.5	0.68
KT21.1-UV2.2-E1.6	0.72	PL2.2-UV3.1-E1.6	0.74
KT21.1-UV2.2-E1.7	0.65	PL2.2-UV3.1-E1.7	0.54
KT21.1-UV2.2-E1.8	0.59	PL2.2-UV3.1-E1.8	0.62
KT21.1-UV2.2-E1.9	0.82	PL2.2-UV3.1-E1.9	0.95
KT21.1-UV2.2-E1.10	0.41	PL2.2-UV3.1-E1.10	0.74
KT21.1-UV2.2-E1.11	0.32	PL2.2-UV3.1-E1.11	0.66
KT25.1 (Prototroph)	**0.50**	PL2.2-UV3.1-E1.12	0.81
KT25.1-UV2.1 (Parent strain)	**0.58**	PL2.2-UV3.1-E1.13	1.15
		PL2.2-UV3.1-E1.14	0.72
KT25.1-UV2.1-E1.1	0.41	PL2.2-UV3.1-E1.15	0.54
KT25.1-UV2.1-E1.2	0.60	PL2.2-UV3.1-E1.16	0.63
KT25.1-UV2.1-E1.3	0.65	PL2.2-UV3.1-E1.17	0.48
KT25.1-UV2.1-E1.4	0.37	PL2.2-UV3.1-E1.18	0.45
KT25.1-UV2.1-E1.5	0.59	PL2.2-UV3.1-E1.19	0.52
KT25.1-UV2.1-E1.6	0.66	PL2.2-UV3.1-E1.20	0.37
KT25.1-UV2.1-E1.7	0.35	PL2.2-UV3.1-E1.21	0.63
KT25.1-UV2.1-E1.8	0.88	PL2.2-UV3.1-E1.22	0.94
KT25.1-UV2.1-E1.9	0.94	PL2.2-UV3.1-E1.23	0.78



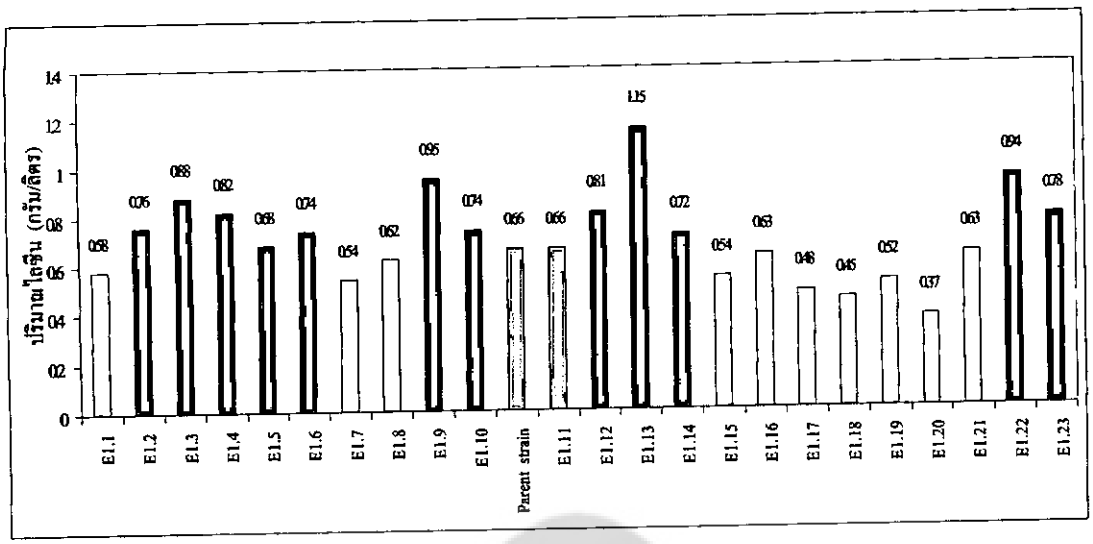
ภาพที่ 5 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ KT21.1-UV2.2 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย EMS เปรียบเทียบกับ parent strain



ภาพที่ 6 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ KT25.1-UV2.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย EMS เปรียบเทียบกับ parent strain

- ☐ Parent strain และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ parent strain
- ☑ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า parent strain

#142631



ภาพที่ 7 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย EMS เปรียบเทียบกับ parent strain

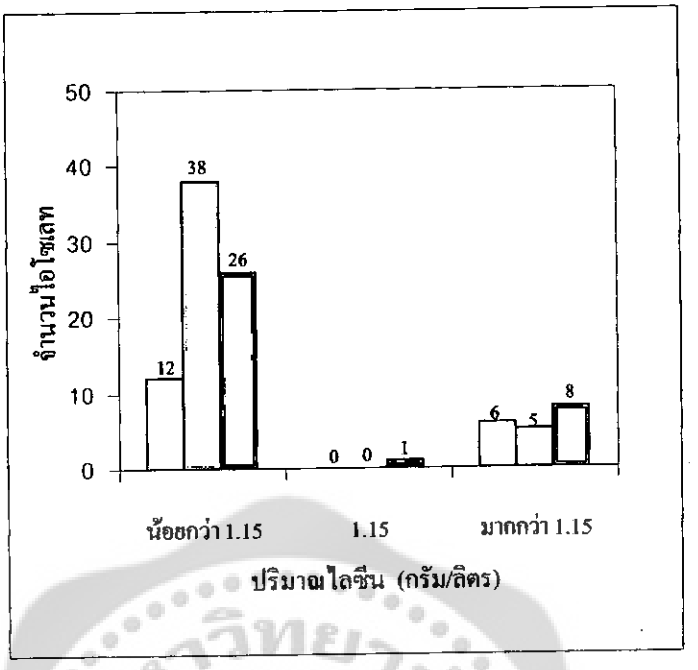
- ☐ Parent strain และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า parent strain

ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ PL2.2-UV3.1-E1.13 โดยใช้ EMS 0.1-0.3 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2 (Prototroph)	**0.59**	PL2.2-UV3.1-E2.2.4	0.41
PL2.2-UV3.1	**0.66**	PL2.2-UV3.1-E2.2.5	0.32
PL2.2-UV3.1-E1.13	**1.15**	PL2.2-UV3.1-E2.2.6	0.67
(Parent strain)		PL2.2-UV3.1-E2.2.7	0.65
PL2.2-UV3.1-E2.1.1	1.50	PL2.2-UV3.1-E2.2.8	0.84
PL2.2-UV3.1-E2.1.2	0.79	PL2.2-UV3.1-E2.2.9	0.70
PL2.2-UV3.1-E2.1.3	0.47	PL2.2-UV3.1-E2.2.10	0.45
PL2.2-UV3.1-E2.1.4	1.55	PL2.2-UV3.1-E2.2.11	0.35
PL2.2-UV3.1-E2.1.5	0.49	PL2.2-UV3.1-E2.2.12	0.25
PL2.2-UV3.1-E2.1.6	1.05	PL2.2-UV3.1-E2.2.13	0.50
PL2.2-UV3.1-E2.1.7	0.53	PL2.2-UV3.1-E2.2.14	0.89
PL2.2-UV3.1-E2.1.8	0.97	PL2.2-UV3.1-E2.2.15	0.71
PL2.2-UV3.1-E2.1.9	0.28	PL2.2-UV3.1-E2.2.16	0.79
PL2.2-UV3.1-E2.1.10	0.74	PL2.2-UV3.1-E2.2.17	0.74
PL2.2-UV3.1-E2.1.11	0.35	PL2.2-UV3.1-E2.2.18	0.96
PL2.2-UV3.1-E2.1.12	0.84	PL2.2-UV3.1-E2.2.19	1.20
PL2.2-UV3.1-E2.1.13	**1.58**	PL2.2-UV3.1-E2.2.20	0.63
PL2.2-UV3.1-E2.1.14	0.78	PL2.2-UV3.1-E2.2.21	0.83
PL2.2-UV3.1-E2.1.15	1.71	PL2.2-UV3.1-E2.2.22	0.84
PL2.2-UV3.1-E2.1.16	**1.61**	PL2.2-UV3.1-E2.2.23	0.63
PL2.2-UV3.1-E2.1.17	0.65	PL2.2-UV3.1-E2.2.24	0.89
PL2.2-UV3.1-E2.1.18	1.84	PL2.2-UV3.1-E2.2.25	0.50
PL2.2-UV3.1-E2.2.1	0.50	PL2.2-UV3.1-E2.2.26	1.42
PL2.2-UV3.1-E2.2.2	1.54	PL2.2-UV3.1-E2.2.27	1.05
PL2.2-UV3.1-E2.2.3	0.66	PL2.2-UV3.1-E2.2.28	1.07

ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ PL2.2-UV3.1-E1.13 โดยใช้ EMS 0.1-0.3 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2-UV3.1-E2.2.29	0.66	PL2.2-UV3.1-E2.3.11	0.36
PL2.2-UV3.1-E2.2.30	1.45	PL2.2-UV3.1-E2.3.12	0.25
PL2.2-UV3.1-E2.2.31	1.12	PL2.2-UV3.1-E2.3.13	0.50
PL2.2-UV3.1-E2.2.32	0.71	PL2.2-UV3.1-E2.3.14	1.89
PL2.2-UV3.1-E2.2.33	0.45	PL2.2-UV3.1-E2.3.15	0.50
PL2.2-UV3.1-E2.2.34	0.32	PL2.2-UV3.1-E2.3.16	0.75
PL2.2-UV3.1-E2.2.35	0.95	PL2.2-UV3.1-E2.3.17	1.41
PL2.2-UV3.1-E2.2.36	0.46	PL2.2-UV3.1-E2.3.18	0.72
PL2.2-UV3.1-E2.2.37	0.39	PL2.2-UV3.1-E2.3.19	0.87
PL2.2-UV3.1-E2.2.38	1.70	PL2.2-UV3.1-E2.3.20	1.07
PL2.2-UV3.1-E2.2.39	0.64	PL2.2-UV3.1-E2.3.21	0.32
PL2.2-UV3.1-E2.2.40	0.72	PL2.2-UV3.1-E2.3.22	0.32
PL2.2-UV3.1-E2.2.41	1.02	PL2.2-UV3.1-E2.3.23	1.06
PL2.2-UV3.1-E2.2.42	0.95	PL2.2-UV3.1-E2.3.24	0.48
PL2.2-UV3.1-E2.2.43	0.92	PL2.2-UV3.1-E2.3.25	1.74
PL2.2-UV3.1-E2.3.1	1.71	PL2.2-UV3.1-E2.3.26	0.64
PL2.2-UV3.1-E2.3.2	1.62	PL2.2-UV3.1-E2.3.27	0.78
PL2.2-UV3.1-E2.3.3	1.71	PL2.2-UV3.1-E2.3.28	0.29
PL2.2-UV3.1-E2.3.4	0.76	PL2.2-UV3.1-E2.3.29	1.05
PL2.2-UV3.1-E2.3.5	1.30	PL2.2-UV3.1-E2.3.30	0.55
PL2.2-UV3.1-E2.3.6	0.82	PL2.2-UV3.1-E2.3.31	0.37
PL2.2-UV3.1-E2.3.7	1.58	PL2.2-UV3.1-E2.3.32	0.42
PL2.2-UV3.1-E2.3.8	1.05	PL2.2-UV3.1-E2.3.33	0.39
PL2.2-UV3.1-E2.3.9	1.15	PL2.2-UV3.1-E2.3.34	0.37
PL2.2-UV3.1-E2.3.10	0.87	PL2.2-UV3.1-E2.3.35	0.31



ภาพที่ 8 กราฟแสดงลักษณะการกระจายของ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ผลิตไลซีนได้ปริมาณแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับ parent strain ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.15 กรัมต่อลิตร

- ☐ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS 0.1 มิลลิลิตร
- ☐ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS 0.1 มิลลิลิตร
- ☐ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS 0.1 มิลลิลิตร

4. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตไลซีน โดยใช้ NTG

จากการนำ hom⁻ ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูง จากผลการทดลองในข้อ 2 คือ KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 และ PL2.2-UV3.1 มาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ NTG ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC (AEC^R) ปรากฏว่าแยกได้ AEC^R ของเชื้อ KT21.1-UV2.2, KT25.1-UV2.1 และ PL2.2-UV3.1 จำนวน 14, 12 และ 49 ไอโซเลท ตามลำดับ และเมื่อนำ AEC^R เหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีนเปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 9-11 AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ KT21.1-UV2.2 ส่วนใหญ่ผลิตไลซีนได้น้อยกว่า parent strain และ AEC^R บางไอโซเลทผลิตไลซีนได้น้อยลงกว่า prototroph ด้วย มีเพียงไอโซเลทเดียวที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain เพียงเล็กน้อย คือ KT21.1-UV2.2-N1.10 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.77 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 2.66 เปอร์เซ็นต์) AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ KT25.1-UV2.1 ส่วนใหญ่ผลิตไลซีนได้ปริมาณใกล้เคียงกับ parent strain แต่ก็มี AEC^R บางไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้มากกว่า parent strain และไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดได้แก่ KT25.1-UV2.1 -N1.5 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.01 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 74.14 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม AEC^R บางไอโซเลทก็ผลิตไลซีนได้น้อยกว่า prototroph และ AEC^R ที่แยกได้จากเชื้อ PL2.2-UV3.1 ส่วนใหญ่ผลิตไลซีนได้ปริมาณใกล้เคียงหรือมากกว่า parent strain เล็กน้อย แต่ก็มี AEC^R บางไอโซเลทผลิตไลซีนได้สูงมากกว่า 1 กรัมต่อลิตร และมากกว่า parent strain ประมาณ 1-1.5 เท่า คือ PL2.2-UV3.1-N1.21, PL2.2-UV3.1-N1.26, PL2.2-UV3.1-N1.31 และ PL2.2-UV3.1-N1.41 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.34, 1.63, 1.38 และ 1.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่นำมาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วย NTG ที่ให้ AEC^R จำนวนมากที่สุดคือ PL2.2-UV3.1 เช่นเดียวกับเมื่อ treat ด้วย EMS และ AEC^R ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-N1.26 ซึ่งผลิตไลซีนได้มากกว่า parent strain 146.97 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามผลผลิตไลซีนที่ได้นี้ยังมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงนำ PL2.2-UV3.1-N1.26 ไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าซ้ำโดยใช้ NTG ความเข้มข้น 3,000-6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคัดเลือกมิวแตนท์ที่มีความต้านทานต่อ AEC อีกครั้ง ผลการทดลองปรากฏว่าแยกได้ AEC^R 32, 63 และ 18 ไอโซเลท เมื่อใช้ NTG 4,000, 5,000 และ 6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การที่แยกได้ AEC^R จากจานเพาะเชื้อที่ผ่านการ treat ด้วย NTG 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนน้อยกว่าเมื่อใช้ NTG 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีเชื้อขึ้นในจานเพาะเชื้อหนาแน่นมากกว่า จึงแยกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้น้อยกว่า สำหรับจานเพาะเชื้อที่ผ่านการ treat ด้วย NTG 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเจริญของเชื้อหนาแน่นมาก และมีลักษณะการเจริญเป็น spread colony จึงไม่สามารถแยกโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้

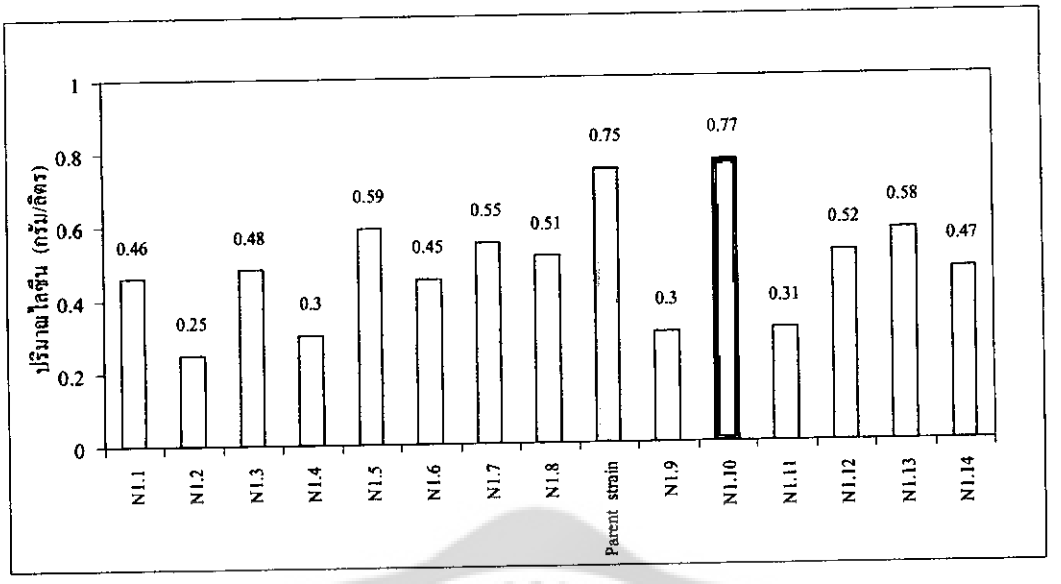
เมื่อนำ AEC^R ที่ได้ทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 12 AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงไอโซเลทเดียวที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain เล็กน้อยคือ PL2.2-UV3.1-N2.4.26 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.68 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี 11 ไอโซเลทที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain และ AEC^R ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 3.68 กรัมต่อลิตร (มากกว่า parent strain 125.77 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 6 เท่าของ prototroph) สำหรับ AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีไอโซเลทใดที่สร้างไลซีนได้มากกว่า parent strain

ตารางที่ 5 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain

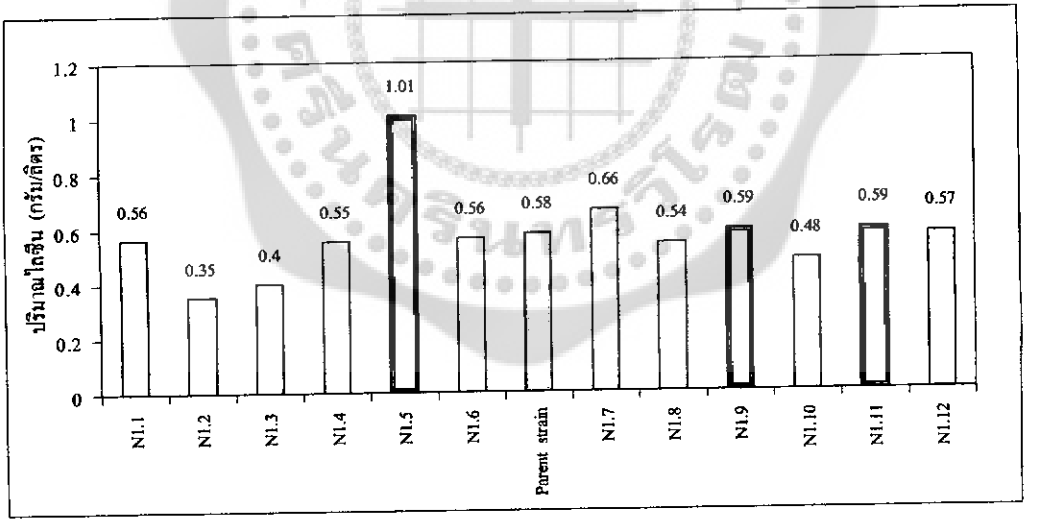
รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
KT21.1 (Prototroph)	0.47	KT25.1 (Prototroph)	0.50
KT21.1-UV2.2 (Parent strain)	0.75	KT25.1-UV2.1 (Parent strain)	0.58
KT21.1-UV2.2-N1.1	0.46	KT25.1-UV2.1-N1.1	0.56
KT21.1-UV2.2-N1.2	0.25	KT25.1-UV2.1-N1.2	0.35
KT21.1-UV2.2-N1.3	0.48	KT25.1-UV2.1-N1.3	0.40
KT21.1-UV2.2-N1.4	0.30	KT25.1-UV2.1-N1.4	0.55
KT21.1-UV2.2-N1.5	0.59	KT25.1-UV2.1-N1.5	1.01
KT21.1-UV2.2-N1.6	0.45	KT25.1-UV2.1-N1.6	0.56
KT21.1-UV2.2-N1.7	0.55	KT25.1-UV2.1-N1.7	0.66
KT21.1-UV2.2-N1.8	0.51	KT25.1-UV2.1-N1.8	0.54
KT21.1-UV2.2-N1.9	0.30	KT25.1-UV2.1-N1.9	0.59
KT21.1-UV2.2-N1.10	0.77	KT25.1-UV2.1-N1.10	0.48
KT21.1-UV2.2-N1.11	0.31	KT25.1-UV2.1-N1.11	0.59
KT21.1-UV2.2-N1.12	0.52	KT25.1-UV2.1-N1.12	0.57
KT21.1-UV2.2-N1.13	0.58		
KT21.1-UV2.2-N1.14	0.47		

ตารางที่ 5 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ NTG เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2 (Prototroph)	**0.59**	PL2.2-UV3.1-N1.24	0.68
PL2.2-UV3.1	**0.66**	PL2.2-UV3.1-N1.25	0.58
(Parent strain)		**PL2.2-UV3.1-N1.26**	1.63
PL2.2-UV3.1-N1.1	0.60	PL2.2-UV3.1-N1.27	0.84
PL2.2-UV3.1-N1.2	0.77	PL2.2-UV3.1-N1.28	0.42
PL2.2-UV3.1-N1.3	0.70	PL2.2-UV3.1-N1.29	0.38
PL2.2-UV3.1-N1.4	0.64	PL2.2-UV3.1-N1.30	0.76
PL2.2-UV3.1-N1.5	0.92	PL2.2-UV3.1-N1.31	1.38
PL2.2-UV3.1-N1.6	0.68	PL2.2-UV3.1-N1.32	0.65
PL2.2-UV3.1-N1.7	0.55	PL2.2-UV3.1-N1.33	0.72
PL2.2-UV3.1-N1.8	0.81	PL2.2-UV3.1-N1.34	0.54
PL2.2-UV3.1-N1.9	0.63	PL2.2-UV3.1-N1.35	0.58
PL2.2-UV3.1-N1.10	0.68	PL2.2-UV3.1-N1.36	0.65
PL2.2-UV3.1-N1.11	0.86	PL2.2-UV3.1-N1.37	0.58
PL2.2-UV3.1-N1.12	0.76	PL2.2-UV3.1-N1.38	0.48
PL2.2-UV3.1-N1.13	0.81	PL2.2-UV3.1-N1.39	0.69
PL2.2-UV3.1-N1.14	0.68	PL2.2-UV3.1-N1.40	0.56
PL2.2-UV3.1-N1.15	0.62	PL2.2-UV3.1-N1.41	1.14
PL2.2-UV3.1-N1.16	0.76	PL2.2-UV3.1-N1.42	0.89
PL2.2-UV3.1-N1.17	0.74	PL2.2-UV3.1-N1.43	0.55
PL2.2-UV3.1-N1.18	0.72	PL2.2-UV3.1-N1.44	0.51
PL2.2-UV3.1-N1.19	0.65	PL2.2-UV3.1-N1.45	0.81
PL2.2-UV3.1-N1.20	0.69	PL2.2-UV3.1-N1.46	0.68
PL2.2-UV3.1-N1.21	1.34	PL2.2-UV3.1-N1.47	0.86
PL2.2-UV3.1-N1.22	0.76	PL2.2-UV3.1-N1.48	0.76
PL2.2-UV3.1-N1.23	0.80	PL2.2-UV3.1-N1.49	0.53

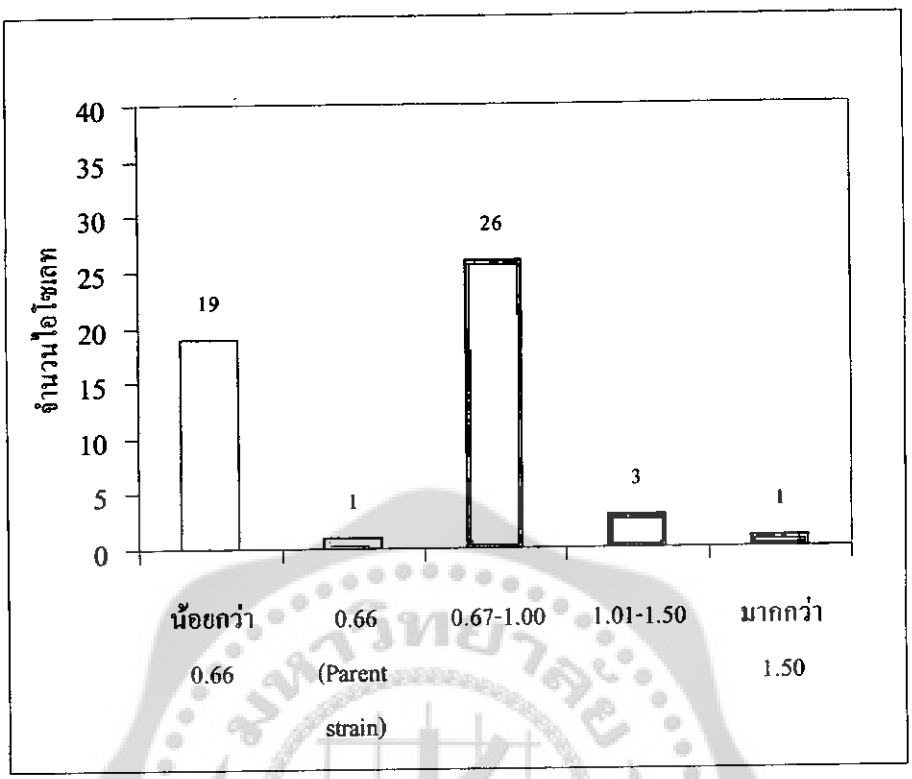


ภาพที่ 9 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ KT21.1-UV2.2 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย NTG เปรียบเทียบกับ parent strain



ภาพที่ 10 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ KT25.1-UV2.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย NTG เปรียบเทียบกับ parent strain

- ☐ Parent strain และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ parent strain
- ◘ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า parent strain



ภาพที่ 11 กราฟแสดงปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดย NTG เปรียบเทียบกับ parent strain

- ☐ Parent strain และเชื้อที่ผลิตไลซีนได้เท่ากับ parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้สูงกว่า parent strain
- ☐ เชื้อที่ผลิตไลซีนได้ต่ำกว่า parent strain

ตารางที่ 6 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ PL2.2-UV3.1-N1.26 โดยใช้ NTG 4,000-6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain

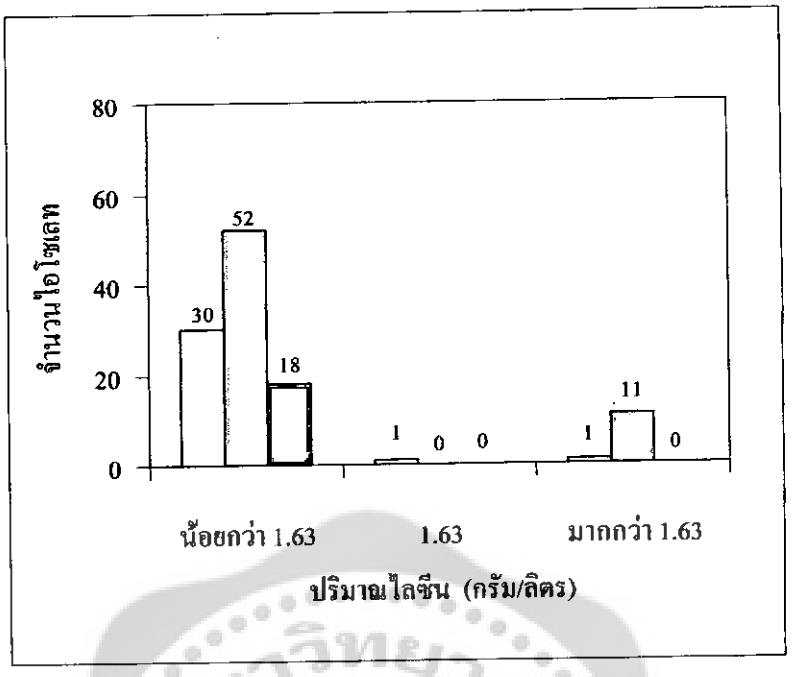
รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2 (Prototroph)	**0.59**	PL2.2-UV3.1-N2.4.22	0.87
PL2.2-UV3.1	**0.66**	PL2.2-UV3.1-N2.4.23	1.30
PL2.2-UV3.1-N1.26	**1.63**	PL2.2-UV3.1-N2.4.24	1.63
(Parent strain)		PL2.2-UV3.1-N2.4.25	0.45
PL2.2-UV3.1-N2.4.1	1.25	PL2.2-UV3.1-N2.4.26	1.68
PL2.2-UV3.1-N2.4.2	0.47	PL2.2-UV3.1-N2.4.27	1.45
PL2.2-UV3.1-N2.4.3	0.87	PL2.2-UV3.1-N2.4.28	0.95
PL2.2-UV3.1-N2.4.4	0.68	PL2.2-UV3.1-N2.4.29	1.03
PL2.2-UV3.1-N2.4.5	1.27	PL2.2-UV3.1-N2.4.30	0.66
PL2.2-UV3.1-N2.4.6	0.99	PL2.2-UV3.1-N2.4.31	0.75
PL2.2-UV3.1-N2.4.7	1.59	PL2.2-UV3.1-N2.4.32	0.53
PL2.2-UV3.1-N2.4.8	0.35	PL2.2-UV3.1-N2.5.1	1.13
PL2.2-UV3.1-N2.4.9	1.52	PL2.2-UV3.1-N2.5.2	1.18
PL2.2-UV3.1-N2.4.10	1.12	PL2.2-UV3.1-N2.5.3	1.16
PL2.2-UV3.1-N2.4.11	0.94	PL2.2-UV3.1-N2.5.4	1.49
PL2.2-UV3.1-N2.4.12	0.64	PL2.2-UV3.1-N2.5.5	1.79
PL2.2-UV3.1-N2.4.13	1.20	PL2.2-UV3.1-N2.5.6	1.22
PL2.2-UV3.1-N2.4.14	0.80	PL2.2-UV3.1-N2.5.7	1.32
PL2.2-UV3.1-N2.4.15	1.05	PL2.2-UV3.1-N2.5.8	1.45
PL2.2-UV3.1-N2.4.16	0.84	PL2.2-UV3.1-N2.5.9	1.72
PL2.2-UV3.1-N2.4.17	0.79	PL2.2-UV3.1-N2.5.10	0.89
PL2.2-UV3.1-N2.4.18	0.88	PL2.2-UV3.1-N2.5.11	0.76
PL2.2-UV3.1-N2.4.19	1.45	PL2.2-UV3.1-N2.5.12	1.04
PL2.2-UV3.1-N2.4.20	0.59	PL2.2-UV3.1-N2.5.13	1.51
PL2.2-UV3.1-N2.4.21	1.12	PL2.2-UV3.1-N2.5.14	2.05

ตารางที่ 6 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ PL2.2-UV3.1-N1.26 โดยใช้ NTG 4,000-6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2-UV3.1-N2.5.15	1.30	PL2.2-UV3.1-N2.5.40	1.54
PL2.2-UV3.1-N2.5.16	0.45	PL2.2-UV3.1-N2.5.41	3.68
PL2.2-UV3.1-N2.5.17	1.51	PL2.2-UV3.1-N2.5.42	1.10
PL2.2-UV3.1-N2.5.18	1.55	PL2.2-UV3.1-N2.5.43	0.97
PL2.2-UV3.1-N2.5.19	0.75	PL2.2-UV3.1-N2.5.44	1.05
PL2.2-UV3.1-N2.5.20	1.65	PL2.2-UV3.1-N2.5.45	0.61
PL2.2-UV3.1-N2.5.21	0.52	PL2.2-UV3.1-N2.5.46	0.94
PL2.2-UV3.1-N2.5.22	1.68	PL2.2-UV3.1-N2.5.47	0.75
PL2.2-UV3.1-N2.5.23	1.75	PL2.2-UV3.1-N2.5.48	1.58
PL2.2-UV3.1-N2.5.24	1.29	PL2.2-UV3.1-N2.5.49	1.43
PL2.2-UV3.1-N2.5.25	1.30	PL2.2-UV3.1-N2.5.50	1.15
PL2.2-UV3.1-N2.5.26	0.74	PL2.2-UV3.1-N2.5.51	0.93
PL2.2-UV3.1-N2.5.27	1.80	PL2.2-UV3.1-N2.5.52	0.89
PL2.2-UV3.1-N2.5.28	1.24	PL2.2-UV3.1-N2.5.53	1.44
PL2.2-UV3.1-N2.5.29	0.58	PL2.2-UV3.1-N2.5.54	1.12
PL2.2-UV3.1-N2.5.30	1.39	PL2.2-UV3.1-N2.5.55	1.58
PL2.2-UV3.1-N2.5.31	1.29	PL2.2-UV3.1-N2.5.56	0.97
PL2.2-UV3.1-N2.5.32	1.51	PL2.2-UV3.1-N2.5.57	1.61
PL2.2-UV3.1-N2.5.33	1.59	PL2.2-UV3.1-N2.5.58	1.55
PL2.2-UV3.1-N2.5.34	1.70	PL2.2-UV3.1-N2.5.59	0.84
PL2.2-UV3.1-N2.5.35	0.66	PL2.2-UV3.1-N2.5.60	0.98
PL2.2-UV3.1-N2.5.36	1.74	PL2.2-UV3.1-N2.5.61	1.15
PL2.2-UV3.1-N2.5.37	1.12	PL2.2-UV3.1-N2.5.62	1.54
PL2.2-UV3.1-N2.5.38	0.98	PL2.2-UV3.1-N2.5.63	1.32
PL2.2-UV3.1-N2.5.39	1.95		

ตารางที่ 6 ความสามารถในการผลิตไลซีนของ AEC^R ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ PL2.2-UV3.1-N1.26 โดยใช้ NTG 4,000-6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ prototroph และ parent strain (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)	รหัสเชื้อ	ปริมาณไลซีน (กรัม/ลิตร)
PL2.2-UV3.1-N2.6.1	1.55	PL2.2-UV3.1-N2.6.10	0.75
PL2.2-UV3.1-N2.6.2	1.42	PL2.2-UV3.1-N2.6.11	0.32
PL2.2-UV3.1-N2.6.3	0.95	PL2.2-UV3.1-N2.6.12	0.47
PL2.2-UV3.1-N2.6.4	0.66	PL2.2-UV3.1-N2.6.13	1.61
PL2.2-UV3.1-N2.6.5	0.43	PL2.2-UV3.1-N2.6.14	0.55
PL2.2-UV3.1-N2.6.6	0.52	PL2.2-UV3.1-N2.6.15	0.35
PL2.2-UV3.1-N2.6.7	0.71	PL2.2-UV3.1-N2.6.16	1.53
PL2.2-UV3.1-N2.6.8	0.88	PL2.2-UV3.1-N2.6.17	0.92
PL2.2-UV3.1-N2.6.9	0.54	PL2.2-UV3.1-N2.6.18	0.87



ภาพที่ 12 กราฟแสดงลักษณะการกระจายของ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ผลิตไลซีนได้ปริมาณแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับ parent strain ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.15 กรัมต่อลิตร

- □ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- □ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ■ AEC^R ของเชื้อ PL2.2-UV3.1 ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG 6,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำแบคทีเรียที่ผลิตไลซีนที่แยกได้จากดินจำนวน 9 ไอโซเลทคือ KT 7.1, KT 9.3, KT9.4, KT21.1, KT21.2, KT22.2, KT25.1, NK1.5 และ PL2.2 มาชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยการฉายรังสี UV ที่ระยะห่าง 20 เซนติเมตร พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีความทนทานต่อ UV ได้แตกต่างกัน เชื้อส่วนใหญ่จะตายหมดเมื่อใช้เวลาในการฉายรังสีนานกว่า 5 นาที ยกเว้น KT25.1 ที่ทนรังสีนานที่สุด 8 นาที และเมื่อนำโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่รอดชีวิตไปคัดเลือกหา hom$^-$ พบว่าเชื้อรหัส KT21.1, KT25.1 และ PL2.2 เท่านั้น ที่ได้ hom$^-$ จำนวน 10, 7 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนเชื้ออื่น ๆ ไม่พบ hom$^-$

เมื่อนำ hom$^-$ ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร production medium เพื่อตรวจดูความสามารถในการผลิตไลซีน พบว่า hom$^-$ ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตน้อยกว่า prototroph มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น และ hom$^-$ ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ KT21.1-UV2.2 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.75 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 59.57 เปอร์เซ็นต์) hom$^-$ ของเชื้อ KT25.1 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ KT25.1-UV2.1 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.58 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 16 เปอร์เซ็นต์) และ hom$^-$ ของเชื้อ PL2.2 ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดได้แก่ PL2.2-UV3.1 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 0.66 กรัมต่อลิตร (มากกว่า prototroph 11.86 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อนำ hom$^-$ ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุดของแต่ละเชื้อไปชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ EMS และ NTG พบว่าเชื้อที่สามารถชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ AEC^R จำนวนมากที่สุดได้แก่ PL2.2-UV3.1 AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย EMS ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-E2.3.14 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 1.89 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 3 เท่าของโปรโตโทรป) และ AEC^R ที่ได้จากการ treat ด้วย NTG ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ PL2.2-UV3.1-N2.5.41 ซึ่งผลิตไลซีนได้ 3.68 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 6 เท่าของโปรโตโทรป)

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า UV, EMS และ NTG สามารถกระตุ้นเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้เกิดการผ่าเหล่าและผลิตไลซีนสูงขึ้นได้ โดยมิวตาเจนที่กระตุ้นให้เกิดมิวแตนท์ที่สร้างไลซีนได้สูงสุดคือ NTG และเชื้อที่แยกได้จากดินที่สามารถนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ PL2.2 อย่างไรก็ตามปริมาณไลซีนที่ผลิตได้โดย PL2.2-UV3.1-N2.5.41 ซึ่งเป็นมิวแตนท์ที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดในงานวิจัยนี้ยังค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ AEC^R ของ *Bacillus* sp. ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ EMS และ NTG ซึ่ง Schendel และคณะ (1990) ได้รายงานไว้ว่าสามารถผลิตไลซีนได้สูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตรภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (27) และ Crociani และคณะ (1991) ได้รายงานว่าสามารถชักนำ *B. stearothermophilus* ให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้ NTG ได้ AEC^R ที่ผลิตไลซีนได้สูงสุด 7.5 กรัมต่อลิตร (9)

สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ AEC^R ที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ให้ผลผลิตไลซีนไม่สูงมากนัก อาจเนื่องมาจากการศึกษาความสามารถในการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะมาตรฐาน ซึ่งอาจยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้ แต่ถ้าใช้อาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้ว ก็อาจจะทำให้สามารถผลิตไลซีนได้สูงขึ้นอีก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนที่จะศึกษาหาส่วนประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีนของเชื้อ PL2.2-UV3.1-N41 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
2. สมใจ ศิริโภค, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ และ สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน.** รายงานการวิจัย : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
3. Ackerson , M., E. Clausen and J. Gaddy. 1989. Lysine Production in Continuous Culture. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 20/21 : 511-528.
4. Barrett , G. C. 1985. **Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids.** London : Chapman and Hall.
5. Chinard , F. D. 1952. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. **J. Biol. Chem.** 199 : 91-95.
6. Coello , N. , J. G. Pan and J. M. Lebeault. 1992. *Corynebacterium glutamicum* : Morphological and Ultrastuctural Changes of L-Lysine Producing Cells in Continuous Culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38 : 34-38.
7. Coello, N., J. G. Pan and J. M. Lebeault. 1992. Physiological Aspects of L-Lysine Production : Effect of Nutrition Limitations on Producing Strain of *Corynebacterium glutamicum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38 : 259-262.
8. Cremer , J. , L. Eggeling and H. Sahm. 1991. Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. **Appl. Envi. Microbiol.** 57 (6) : 1746-1752.
9. 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.
10. Crueger, W., A. Creuger. 1984. Strain Development. pp 9-48. In T. D. Brock (ed.), **Biotechnology : A Text Book of Industrial Microbiology.** Sunderland : Sinauer Associates.
11. Demain , A. L. and N. A. Solomon. 1985. **Biology of Industrial Microorganisms.** London : Benjamin/Cummins Publishing Company.
12. Demain , A. L. and N. A. Solomon. 1986. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington : American Society for Microbiology.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

28. 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.

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

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

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

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

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด หลังจากที่เตรียมใส่ในภาชนะที่เหมาะสมแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.1 Nutrient agar (NA)

ใช้ในการเก็บเชื้อไว้เป็น stock มีส่วนประกอบดังนี้คือ

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

1.2 Minimal medium (MM)

ใช้เป็นอาหารในการคัดเลือก homoserine auxotroph มีส่วนประกอบดังนี้คือ

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

หมายเหตุ

* แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

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

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

20% Glucose เตรียมโดยใช้กลูโคส 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 Minimal medium + Homoserine (MM+H)

ใช้เป็นอาหารในการคัดเลือก homoserine auxotroph

เตรียมได้โดยใช้ homoserine 0.2% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง) ใส่ลงในอาหาร MM 100 มิลลิลิตร

1.4 NA+AEC

ใช้เป็นอาหารในการคัดเลือก AEC resistant mutant (AEC^R)

เตรียมสารละลาย AEC 0.1% โดยชั่ง AEC 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

เตรียมอาหาร NA+AEC ที่มี AEC ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย AEC 0.1% 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร NA 100 มิลลิลิตร

1.5 Inoculum medium

ใช้ในการเตรียม inoculum ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita *et al.*, 1957 (20) 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	

1.6 Production medium

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตไลซีน ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kinoshita *et al.*, 1958 (19) โดยใช้ tryptone (pancreatic digest of casein) แทน NZ-amine (casein hydrolysate) มีส่วนประกอบดังนี้คือ

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

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

หมายเหตุ

* เตรียมโดยชั่งกลูโคส 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มิลลิลิตร แยกนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

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

2. การเตรียม 0.2 M phosphate buffer pH 7.2

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.87 กรัม และ $Na_2HPO_4.7H_2O$ 3.86 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 3.86 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยวิธี paper chromatography

3.1 การเตรียมสารเคมี

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

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

3.1.3 **สารละลายไลซีนมาตรฐาน** เตรียมโดยชั่งไลซีน 0.125 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

3.1.4 **0.005% $CuSO_4 . 5 H_2O$ ใน 75% ethanol** เตรียมโดยชั่ง $CuSO_4 . 5 H_2O$ 0.05 กรัม ละลายในน้ำ 210 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม 95% ethanol ลงไป 790 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไลซีน

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

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

3.2.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลายที่เตรียมไว้แล้ว จนกระทั่งตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษขึ้นไปถึงเส้นที่ขีดไว้ด้านบน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

3.2.4 นำกระดาษออกจาก chamber แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง

3.2.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

3.2.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

3.2.7 วัดระยะทางที่กรดอะมิโนและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อนำไปหาค่า Rf

3.2.8 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วง ใส่ลงในหลอดที่มี 0.005% $CuSo_4 . 5H_2O$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

3.2.9 นำไปวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ UV-1201V (Shimadzu)

3.2.10 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ได้กับปริมาณไลซีน

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไลซีนในตัวอย่าง

3.3.1 เตรียมกระดาษโครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

3.3.2 Spot ตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนเส้นที่ขีดไว้ด้านล่าง ให้แต่ละตัวอย่างอยู่ห่างกัน 1.5 เซนติเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) รอให้แห้งสนิท

3.3.3 นำไป develop ใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลาย เช่นเดียวกับข้อ 2.2.3

3.3.4 นำกระดาษออกจาก chamber แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง

3.3.5 สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

3.3.6 นำกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นแถบสีม่วงเกิดขึ้นในบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

3.3.7 ตัดกระดาษบริเวณที่มีแถบสีม่วงซึ่งมีค่า Rf เท่าไลซีน ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี 0.005% $CuSo_4 . 5H_2O$ ใน 75% ethanol 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้สีละลายออกมา

3.3.8 นำไปวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

3.3.9 คำนวณหาปริมาณไลซีนในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.4 Calibration curve ของไลซีน