สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

T047312

นางสาวจงกมล จริยกุล
นางสาวปนัดดา ชลสินธุ์
นางสาวประภาวดี เหล่าพนิกรกุล

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47312
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิททยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of carbon source for lysine production in *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

MISS JONGKAMON JARIYAKUL

MISS PANADDA CHONLASIN

MISS PRAPAWADEE LAOPANIKRONKUL

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

นักศึกษา	นางสาวจงกมล	จริยกุล	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 42050144
	นางสาวปนัดดา	ชลสินธุ์	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 42050170
	นางสาวประภาวดี	เหล่าพนิกรกุล	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 42050173

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ	
กรรมการ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

นักศึกษา 1. นางสาวจงกมล จริยกุล
2. นางสาวปนัดดา ชลสินธุ์
3. นางสาวประภาวดี เหล่าพนิกรกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2545
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ที่เลี้ยงใน lysine production medium โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสและซูโครสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 74 ชั่วโมง พบว่าปริมาณไลซีนสูงสุดที่เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตได้ 12.28 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร และ 5.28 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณไลซีนสูงสุดที่เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถผลิตได้ 8.35 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร และ7.40 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project TiTle Effect of carbon source for lysine production by *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

Name 1. Miss Jongkamon Jariyakul
2. Miss Panadda Chonlasin
3. Miss Prapawadee Laopanikornkul

Department Applied Biology Faculty of Science
Program **Biotechnology**
Academic Year **2002**
Special Project Advisor **Miss Marisa Jatupornpipat**

Abstract

Effect of carbon source for lysine production by *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 which studied in Lysine Production Medium. Use two carbon source : glucose and sucrose at 60 80 100 and 120 g/l respectively. Batch cultures were carried out for 74 hr in flasks under the following experimental conditions: temperature 30 °C and 250 rpm. The results showed that maximum values of L-lysine by *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 in Lysine Production medium that contained glucose (80 g/l) and sucrose (80 g/l) are 12.28 and 5.28 g/l respectively. While maximum values of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 in Lysine Production medium that contained glucose (80 g/l) and sucrose (100 g/l) are 8.35 and 7.40 g/l respectively. Statistical analysis showed that there were a significant differrence ($P<0.05$) between glucose and sucrose in both strains.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการโครงงานพิเศษ และผศ. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ข้อแนะนำปรึกษา และตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.สุทธิพงศ์ เสถียรนพเก้า อาจารย์สายวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ Arthrobacter citreus NRRL 1258 และ Corynebacterium glutamicum ATCC 21543

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุก ๆ ท่านที่ให้คำปรึกษาและแสดงความคิดเห็นต่อการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาของคณะผู้วิจัยด้วยดีตลอดมาและขอขอบคุณ พี่น้องและเพื่อน ๆ ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวจงกมล จริยกุล
นางสาวปนัดดา ชลสินธุ์
นางสาวประภาวดี เหล่าพนิกรกุล

มีนาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการทำโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไลซีน	5
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของไลซีน	5
2.1.2 แหล่งที่พบ	7
2.1.3 ประโยชน์ของไลซีน	7
2.1.4 กระบวนการผลิต	9
2.1.4.1 การผลิตไลซีนโดยวิธีทางเคมี	10
2.1.4.2 การผลิตไลซีนโดยจุลินทรีย์	11
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีน	12
2.2.1 *Arthrobacter citreus*	13
2.2.2 *Corynebacterium glutamicum*	13
2.3 กลไกการสังเคราะห์ไลซีนโดยจุลินทรีย์	14
2.3.1 กลไกการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีน	15
2.3.2 การปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างไลซีนของจุลินทรีย์	17
2.4.1 แหล่งคาร์บอน	17
2.4.2 แหล่งไนโตรเจน	18
2.4.3 แร่ธาตุ	19
2.4.4 วิตามิน	20
2.4.4.1 ไทอะมีน	21
2.4.4.2 ไบโอติน	22
2.4.5 สารที่มีผลต่อการสร้างและยับยั้งไลซีน	22
2.4.6 อุณหภูมิ	23
2.4.7 ความเป็นกรดด่าง	23
2.4.8 การให้อากาศ	24
2.5 ระบบการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีน	25
2.5.1 กระบวนการหมักแบบกะ	25
2.5.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์	28
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3.2.1 สารเคมี	28
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	29
3.3 เชื้อจุลินทรีย์	30
3.4 วิธีการทดลอง	31
3.4.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258	31
3.4.1.1 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ	31
3.4.1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	31
3.4.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	31
3.4.1.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	31
3.4.1.5 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543	32
3.4.2.1 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ	32
3.4.2.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	32
3.4.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	33
3.4.2.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	33
3.4.2.5 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	35
4.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258	35
4.1.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	35
4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	36
4.1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	39
ก. ผลความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน	39
ข. ผลความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน	42
4.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543	45
4.2.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	45
4.2.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	46
4.2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	49
ก. ผลความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน	49
ข. ผลความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน	52
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	55
5.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258	55
5.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543	55
เอกสารอ้างอิง	i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ a

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ b

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ไนโตรเจนและไลซีน c

ภาคผนวก ง ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ g

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืชและแหล่งอาหารชนิดต่างๆ 7

ตารางที่ 2 ปริมาณวิตามินชนิดต่างๆที่พบในวัตถุดิบที่พบในอุตสาหกรรมหมัก 20

ตารางที่ 3 ผลความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 40

ตารางที่ 4 ผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 43

ตารางที่ 5 ผลความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 50

ตารางที่ 6 ผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างสามมิติของไลซีน 5

ภาพที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของไลซีน 6

ภาพที่ 3 ไลซีนที่เกาะบริเวณพื้นผิวของเอนไซม์ 6

ภาพที่ 4 แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี 12

ภาพที่ 5 แสดงวิถีการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* 15

ภาพที่ 6 แสดงกลไกการดูดซึมไนโตรเจนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* 19

ภาพที่ 7 โครงสร้างของไทอะมีน 21

ภาพที่ 8 โครงสร้างของไบโอตินที่สร้างพันธะโควาเลนซ์กับไลซีน 22

ภาพที่ 9 แสดงถึงอิทธิพลของพีเอชต่อความเข้มข้นของไลซีนที่สังเคราะห์จาก *Corynebacterium glutamicum* 24

ภาพที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 34

ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลซีน , ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช ของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 37

ภาพที่ 12 ผลความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) , น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ 40

ภาพที่ 13 ผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) , น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 44

ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลซีน , ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 47

ภาพที่ 16 ผลความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) , น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ 50

ภาพที่ 17 ผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) , น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ไลซีน (lysine) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีน และจัดเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) หนึ่งในแปดชนิดที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างเองได้ (ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน และแวลีน) ต้องได้รับจากอาหารที่รับประทานเข้าไปเท่านั้น (สมใจ , 2544)

ในการผลิตกรดอะมิโนทั่วโลกปรากฏว่า ประมาณร้อยละ 95 เป็นกลูตามิก เมทไธโอนีน และไลซีน โดยที่ L-lysine มีปริมาณการผลิตประมาณ 70,000 ตัน รองจาก กลูตามิก ในอาหารพวกธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของมนุษย์และสัตว์ โดยทั่วไปจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นโดยเฉพาะไลซีน ทรีโอนีน และทริปโตเฟนปริมาณต่ำ ปัจจุบันจึงนิยมเติมกรดอะมิโนในอาหาร เช่น มีการเติมไลซีนลงในขนมปัง และผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากธัญพืชชนิดต่างๆ สำหรับอาหารสัตว์จะเติมไลซีน 3.5 กิโลกรัมต่อตัน ในทางการแพทย์มีการใช้ไลซีนเป็นส่วนผสมในสารที่ใช้ฉีด (infusion solution) สำหรับคนไข้ระยะพักฟื้น และยังมีการใช้กรดอะมิโนไลซีนเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตไลซีนไอโซไซยาเนทเรซิน (lysine isocyanate resin) เป็นต้น (สมใจ , 2544)

วิธีการที่ใช้ผลิตกรดอะมิโนสามารถทำได้ 3 วิธีได้แก่

การสกัดจากวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูงโดยตรง โดยทั่วไปจะใช้กรดช่วยย่อยสลายโปรตีนที่ได้จากพืช เช่น กลูเตนจากข้าวสาลี หรือโปรตีนจากถั่วเหลือง กรดอะมิโนที่ยังคงใช้วิธีการนี้ในการผลิต ได้แก่ ซีสเทอีน ลิวซีน แอสพาราจีน และไทโรซีน

และสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมีกรดอะมิโนบางชนิด เช่น อะลานีน เมทไธโอนีน ทริปโตเฟน และไกลซีน ยังคงนิยมใช้วิธีการทางเคมี เนื่องจากต้นทุนถูกกว่า แต่ผลผลิตที่ได้จะมีทั้ง L และ D-isomer ดังนั้นถ้าต้องการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูป L-isomer ก่อน

ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตกรดอะมิโน ทำได้โดยใช้จุลินทรีย์ในการหมักแหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น กลูโคส ซูโครส กากน้ำตาล ฯลฯ ให้เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนที่ต้องการ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เช่น *Corynebacterium glutamicum* หรือ *Brevibacterium actofermentum* เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด หรืออาจจะใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนจากสารประกอบบางอย่าง โดยอาจใช้ในรูปเซลล์อิสระ เอนไซม์ หรือเซลล์ที่ถูกตรึง

ในการผลิต L-lysine นิยมผลิตโดยใช้กระบวนการหมักโดยตรง และใช้เอนไซม์หรือเซลล์ที่ถูกตรึง

โครงงานพิเศษนี้สนใจอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน จากเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเตรียมสูตรอาหารผลิตไลซีนจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการทำโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543
2. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 เพื่อใช้ในการผลิตไลซีน
3. ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เน้นการศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 60, 80,100 และ 120 กรัมต่อลิตร และซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยง *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 เพื่อการผลิตไลซีนในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1. เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

1.4.1.1 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแช่แข็งแบบแห้ง (lyophilize) มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบน nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหาร (agar slant)

1.4.1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวที่เก็บในหลอดอาหารมาทำการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535)

1.4.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อที่เก็บในหลอดอาหาร มาทำการเพิ่มปริมาณใน seed medium เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลอง

1.4.1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงใน Lysine Production Medium ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง นำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ ส่วนปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้จะทำการวิเคราะห์ชั่วโมงที่ 24 48 และ 72

1.4.1.4 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

ก. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงใน Lysine Production Medium ซึ่งมีกลูโคสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

ข. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงใน Lysine Production Medium ซึ่งมีซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก ชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

1.4.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.4.1.1 ถึง 1.4.1.4

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการศึกษาสูตรอาหาร โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาใช้ในการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

2. เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตไลซีนโดยนำเอาวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลซีนต่อไป

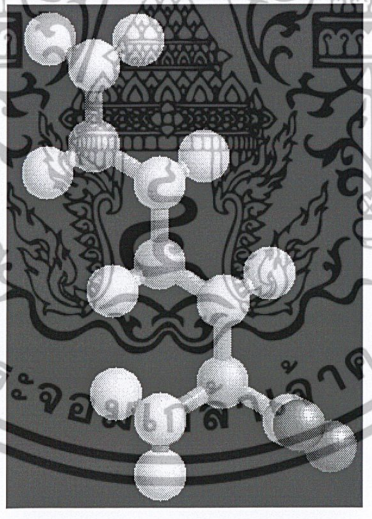
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไลซีน

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

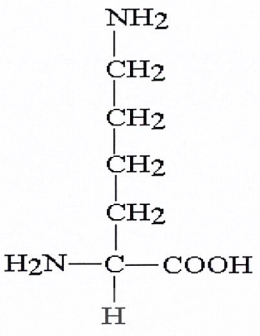
ไลซีนมีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{14}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 146.19 ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำได้ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม และสามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิ 224 องศาเซลเซียส มีค่าไอโซอิเล็คตริก (isoelectric) เท่ากับ 9.82 ค่า pK_a เท่ากับ 10.4



ภาพที่ 1 : โครงสร้าง 3 มิติของไลซีน

(ที่มา : http://www.bioscience.org/images/aminacid/lys3d.gif)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



lysine

ภาพที่ 2 : สูตรโครงสร้างของไลซีน

(ที่มา : http://www.bio.winona.msus.edu/berg/ChemStructures/Lysine.gif)

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไลซีนเป็นกรดอะมิโนซึ่งมีค่าพีเอช หรือประจุโดยรวมเป็นบวก และเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว ซึ่งพบได้ในบริเวณพื้นผิวของโปรตีน และเอนไซม์ (ดังภาพที่ 3) และในบางครั้งอาจปรากฏอยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ นอกจากนี้ในโปรตีนจะมีปริมาณไลซีนอยู่ทั้งสิ้นร้อยละ 7 ของกรดอะมิโนทั้งหมด

ภาพที่ 3 : ไลซีนที่เกาะบริเวณพื้นผิวของโปรตีนและเอนไซม์

(ที่มา : http://www.micro.magnet.fsu.edu/aminoacids/pages/lysine.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แหล่งที่พบ

2.1.2.1 พืช และอาหารที่อุดมด้วยโปรตีน เช่น ถั่วต่างๆ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ปลา เนื้อ ไข่ และนม เป็นต้น (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 : แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืช และแหล่งอาหารชนิดต่างๆ

Constituent	Corn	Rice	Wheat	Soybean meal	Fish meal	Dried skimmilk
Arginine	0.37	0.65	0.81	3.38	4.38	1.06
Histidine	0.22	0.18	0.38	1.12	1.24	0.78
Isoleucine	0.33	0.36	0.61	2.49	2.78	2.00
Leucine	0.95	0.62	0.96	3.48	4.48	3.09
Lysine	0.27	0.31	0.41	2.49	4.57	2.11
Methionine	0.18	0.18	0.19	0.63	1.75	0.91
Phynylalanine	0.42	0.38	0.72	2.20	2.26	1.73
Threonine	0.31	0.28	0.45	1.82	2.75	1.63
Tryptophane	0.09	0.13	0.24	0.76	0.68	0.46
Valine	0.43	0.5	0.69	2.45	3.03	2.29
Proline	8.05	7.84	15.28	45.29	67.38	33.44

ที่มา : Anderson and Jackson (1958)

2.1.2.2 จุลินทรีย์ ได้แก่ *Corynebacterium diphtheriae , Lactobacillus arabinosus* และ *Brewers' yeast* เป็นต้น

2.1.3 ประโยชน์ของไลซีน

ไลซีนเป็นหนึ่งในกรดอะมิโนที่จำเป็น เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ดังนั้นร่างกายของมนุษย์จะได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นนี้ได้โดยผ่านทางอาหาร ซึ่งปริมาณไลซีนส่วนใหญ่จะพบได้ในกล้ามเนื้อของมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลซีนมีความสำคัญในการสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของร่างกาย ประกอบกันเป็นกระดูก กระดูกอ่อน ผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การที่ไลซีนสามารถเปลี่ยนเป็นคอลลาเจนได้นั้น จะถูกควบคุมโดยวิตามินซี (http://www.healthy.net/asp/templates/article.asp?Page Type=article&ID=1744)

จากการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ไลซีนสามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมของสำไส้ และยังช่วยขับแคลเซียมออกจากปัสสาวะอีกด้วย ดังนั้นหากมีการบริโภคไลซีนในปริมาณ 400-1,000 มิลลิกรัม/วัน ก็จะสามารถช่วยป้องกัน และรักษากระดูกไม่ให้เกิดการผุพัง (http://www.thewayup.com/products/0003.htm)

นอกจากนี้ ไลซีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นคาร์นิทีน (carnitine) ซึ่งคาร์นิทีนเป็นกรดอะมิโนที่ผลิตขึ้นภายในตับ เกิดจากการที่ไลซีนถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ทรานอะมิเนส (transaminase) ภายในตับ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายนี้จะขึ้นอยู่กับวิตามินบี 6 วิตามินบี 3 วิตามินบี 2 วิตามินซี และเหล็ก (http://www.healthy.net/asp/templates/article.asp?PageType=article&ID=1744) และสามารถพบคาร์นิทีนได้ในกล้ามเนื้อ และอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ส่วนคนที่รับประทานแต่ผักจะทำให้อ่อนแอเนื่องจากมีกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นไม่เพียงพอ

คาร์นิทีนจะมีความสำคัญในการเปลี่ยนไขมันไปเป็นพลังงานได้ เนื่องจากคาร์นิทีนทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งกรดไขมันภายในเซลล์ไปยังไมโทรคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงาน ซึ่งต้องอาศัยกรดไขมันเปลี่ยนไปเป็นพลังงาน นอกจากนี้คาร์นิทีนยังมีส่วนช่วยในการควบคุมกระบวนการสลายไขมันภายในหัวใจ และกล้ามเนื้อโครงกระดูก (http://www.thewayup.com/products/0190.htm) ดังนั้นนอกจากไลซีนสามารถเปลี่ยนเป็นคาร์นิทีนได้แล้ว ยังมีส่วนช่วยเสริมประโยชน์ของคาร์นีทีนทางอ้อมอีกด้วย

นอกจากนี้ไลซีนสามารถแตกตัวเป็นอะเซททิล โคเอนไซม์เอ (acetyl Co.A) ได้ ซึ่งนำไปใช้ในกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรต และสร้างพลังงานขึ้นมาได้ และยังสามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนพวกซิทรูลีน (citrulline) ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้มีความจำเป็นในกระบวนการสลายโปรตีน หากมีปริมาณไลซีนไม่เพียงพออาจจะทำให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องได้เช่นเดียวกัน นอกจากนั้น ไลซีนสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ในขณะที่อาร์จินีน (arginine) จะไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของไวรัส (http://www.thewayup.com/products/0192.htm)

ดังนั้น คนที่เป็นโรคความดันต่ำ โรคเรื้อรังที่เกิดจากไวรัส โรคหืด ต่อมไทรอยด์อักเสบ โรคไต และโรคสมองพิการ (Parkinson's disease) ล้วนแต่เกิดจากการมีระดับของไลซีนในร่างกายต่ำทั้งสิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ไลซีนยังมีประโยชน์อื่นๆอีก อาทิเช่น

1. ป้องกัน หรือลดการเพิ่มจำนวนของไวรัส
2. ป้องกัน หรือลดการเกิดโรคเริม
3. ใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคปวดกระดูก
4. ช่วยในการรักษาอาการกระดูกบาดเจ็บ
5. ช่วยทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น และสุขภาพดี
6. ช่วยสร้างกล้ามเนื้อ (ที่มา : http://www.thewayup.com/products/0003.htm)

ส่วนโทษของไลซีน หรือความเป็นพิษของไลซีน ในขณะนี้ยังไม่มีการศึกษา แต่ส่วนใหญ่ไลซีนจะมีการนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์มาก เนื่องจากไลซีนมีผลทำให้ปริมาณโคเลสเตอรอลในสัตว์สูงขึ้น แต่จะไม่นิยมนำมาใช้ในมนุษย์ นอกจากนี้หากมีปริมาณไลซีนสูงในร่างกายอาจทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วงได้ แต่จะไม่ปรากฏอาการที่รุนแรงนัก (http://www.zestrsa.co.za/products/info/lysine-info.htm)

2.1.4 กระบวนการผลิต

กระบวนการผลิตกรดอะมิโน แบ่งออกเป็น 4 วิธีการใหญ่ๆ คือ

1. การสกัด (extraction)

ใช้การ hydrolysate โดยการเติมน้ำลงในโปรตีนหรือวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น เคราติน (keratin) blood meal แล้วแยกทำให้บริสุทธิ์ กรดอะมิโนที่ได้จะอยู่ในรูปแอล (L-amino acid) ทั้งหมด

2. การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis)

เป็นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นต่างๆไปเป็นกรดอะมิโน ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์ achiral amino acid glycine หรือกรดอะมิโนในรูป racemate เช่น D,L-methionine แล้วทำการแยกกรดอะมิโนในรูปแอลออกมา ส่วนรูปดีจะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ หรืออาจทำการผลิตกรดอะมิโนในรูปแอลโดยตรงจากการใช้ precursor ที่เป็นพวก prochiral โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาไครอล (chiral catalyst)

3. การหมัก (fermentation)

เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโน โดยใช้ซูโครส หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แบ่งได้เป็น 2 วิธีย่อยๆคือ การหมักโดยตรง และการผลิตเป็นสารเริ่มต้น ประโยชน์ที่สำคัญของการหมักคือ สามารถใช้วัตถุดิบซึ่งหมายถึงน้ำตาลที่มีราคาถูกได้ และสามารถผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะมิโนในรูปแอล (L-amino acid) ได้ แต่มีข้อเสียอยู่ตรงที่ว่าไม่สามารถผลิตกรดอะมิโนรูปดี (D-amino acid)ได้ จะใช้ในการผลิต MSG L-glutamate L-lysine HCL และL-threonine รวมถึงกรดอะมิโนกลุ่มที่เป็น aromatic เช่น L-phenylalanine และ L-tryptophan ซึ่งในอดีตสามารถผลิตได้โดยการใช้เอนไซม์เท่านั้น

4. การใช้เอนไซม์ (enzymatic catalyst)

เป็นการใช้เอนไซม์จำเพาะในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้สับสเตรทต่างๆ โดยอาจใช้ในรูปตัวเซลล์ หรือส่วนประกอบของเซลล์ก็ได้ และในกรณีที่การหมักเป็นแบบต่อเนื่องอาจใช้เอนไซม์ในรูปของเซลล์ตรึงได้ การผลิตจะขึ้นอยู่กับราคาและปริมาณของสับสเตรท รวมถึงกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ และกระบวนเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียตรงที่สับสเตรทที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง แต่จะสามารถผลิตกรดอะมิโนได้ทั้งในรูปแอลและดี (L,D-amino acid)

ส่วนกระบวนการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรม จะมีการผลิตไลซีน เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถใช้ได้เฉพาะแอล-ไลซีนเท่านั้น ในปัจจุบันนิยมผลิตไลซีนโดยใช้กระบวนการหมักจากจุลินทรีย์ เพราะมีความเหมาะทางด้านเศรษฐศาสตร์มากกว่าไลซีนที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นแอล-ไลซีน ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ทันที

กระบวนการผลิตไลซีนจึงสามารถกระทำได้ 2 วิธีการ คือ

2.1.4.1 การผลิตไลซีนโดยจุลินทรีย์

แอล-ไลซีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียมักจะปล่อยออกมานอกเซลล์ และสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถแยกออกได้โดยนำอาหารนั้นมาผ่าน ion-exchange column แล้วชะไลซีนออกจากเรซินโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นแอมโมเนียมที่ออกจากคอลัมน์จะถูกกำจัดออกในรูปของแอมโมเนียในขณะทำแห้ง ทำให้ได้ไลซีนอยู่ในรูปโมโนไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธีการตกผลึก (recrystallization) สำหรับประเทศที่มีการผลิตแอล-ไลซีนเป็นอุตสาหกรรม เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส ใช้ *Corynebacterium glutamicum* หรือ *Micrococcus glutamicus* เป็นจุลินทรีย์สำหรับการผลิต โดยมีกากน้ำตาลเป็นสับสเตรท และใช้ betain ซึ่งเป็นสาร osmoprotective compound เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการใช้น้ำตาล เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ invertase และทำให้สามารถผลิตไลซีนที่อุณหภูมิสูงได้ (Kawahara ; et. al. 1990)

การผลิตไลซีนโดยใช้ยีสต์ หรือ filamentous fungi มีการศึกษากันน้อยทั้งที่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis utilis* ให้ไลซีนสูงถึงประมาณ 16-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Haidaris and Bhattacharjee , 1978) โดยทั่วไปยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะมีไลซีนประมาณ 7.6 ± 0.7 กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน (Nelson ; et.al. 1959)

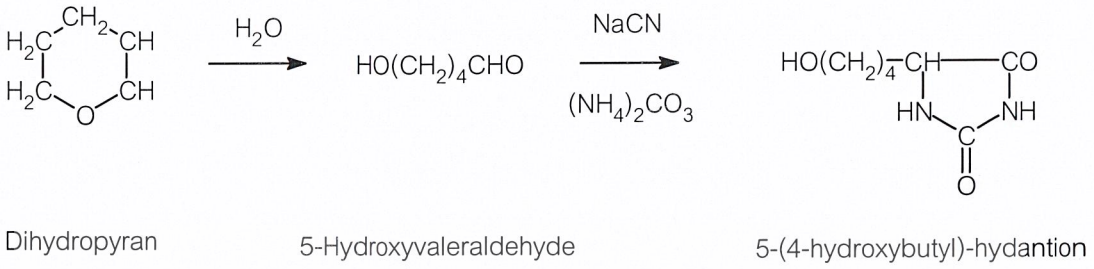
การวัดปริมาณไลซีนในตัวอย่างทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีการทางเคมี และวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์ในการวิเคราะห์ โดยปกติมักวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยการใช้จุลินทรีย์ เพราะไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มากนัก และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ประจำวันได้ จุลินทรีย์ที่ใช้คือ แบคทีเรีย ซึ่งจะมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ lactic acid-producing bacteria การประมาณค่ากรดอะมิโนโดยแบคทีเรียประเภทนี้ทำเป็นครั้งแรกโดย Snell and Strong ในปี 1939 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ *Streptococcus fecalis* และ *Leuconostoc mesenteroides* P-60 นอกจากจะใช้แบคทีเรียในการหาปริมาณกรดอะมิโนเพื่อหา protein quality แล้ว ยังสามารถใช้ในการหาปริมาณวิตามินได้อีกด้วย

2.1.4.2 การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมี

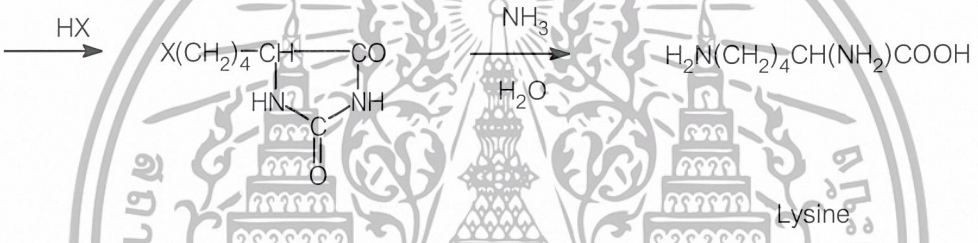
การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมีจะเริ่มจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เช่น piperidine dihydropyran caprolactam และ cyclohexone เป็นต้น ในกรณีที่ใช้ dihydropyran เป็นสารตั้งต้นในการผลิต จะเริ่มปฏิกิริยาโดยการเปิดวงแหวนของ dihydropyran ด้วยการดึงน้ำออก ได้ 5-hydroxyvaleraldehyde ซึ่งจะนำสารนี้มาทำปฏิกิริยากับโซเดียมไซยาไนด์ หรือแอมโมเนียมคาร์บอเนต เกิดเป็น 5-(4-hydroxybutyl)hydantion เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนคลอไรด์ หรือไฮโดรเจนโบรไมด์ หมู่ไฮดรอกซิลของ hydantion จะถูกแทนที่ด้วยฮาโลเจน (halogen) จากนั้นฮาโลเจนจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะมิโนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาพที่มีแอมโมเนีย ทำให้ได้ไลซีนเป็นผลผลิตสุดท้าย (ดังภาพที่ 4)

เนื่องจากการผลิตโดยวิธีการทางเคมีไลซีนที่ได้จะเป็น ดีแอล-ไลซีน ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นแอล-ไลซีน โดยนำดีแอล-ไลซีนมาทำปฏิกิริยากับแอล-กลูตามิก D-camphoric หรือ D-homocysteinic เกิด diastereoisomer 2 ชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติการละลายที่แตกต่างกัน จึงแยกจากกันได้โดยวิธีการตกผลึกแบบลำดับส่วน (fractional crystallization) โดยสารชนิดแรกคือ แอล-ไลซีนแอล-กลูตาเมท ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้โดยใช้สารละลายของน้ำกับแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกให้ได้เป็นแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์กับกรดกลูตามิก ส่วนดี-ไลซีนที่ได้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับด่างที่อุณหภูมิสูงได้ racemate ย้อนกลับไปใช้ในปฏิกิริยาเดิม (McPherson , 1966)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Dihydropyran 5-Hydroxyvaleraldehyde 5-(4-hydroxybutyl)-hydantion



ภาพที่ 4 : แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี

ที่มา : McPherson (1996)

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีน

1. *Brevibacterium flavum* (Shyinka ; et. al. 1980)
2. *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara ; et. al. 1990)
3. *Corynebacterium glutamicum* (Cremer ; et. al. 1991 ; Kiss and Stephanopoulos, 1992 ; - -Schrumpf and ,1992 ; Vallino and Stephanopoulos ,1993 ; Coello ; et. al. 1992,1999)
4. *Bacillus laterosporus* (Umerie ; et. al. 2000)
5. *Saccharomyces cerevisiae* (Haidaris and Bhattacharjee,1977, 1998)
6. Lactobacilli (Odunfa ; et. al. 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 *Arthrobacter citreus*

Arthrobacter citreus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic) และมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) สามารถเจริญได้ในอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (http://www.sciencenet.com.au/frames/profiles/positive/families/micrococ/family.htm#species) โคโลนีของ *Arthrobacter citreus* บนอาหารยีสต์สกัดที่มีเปปโตนเป็นองค์ประกอบ เป็นสีเหลือง สร้างเม็ดสีขึ้นได้ แต่เม็ดสีไม่สามารถละลายได้ในอีเทอร์ และอะซีโตน มีความต้องการไบโอติน ไทอะมีน กรดนิโคตินิก ไทโรซีน เมทไธโอนีน ซีสทีน และ siderophore เช่น ferrichrome หรือ mycobactin เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนกรดกลูตามิค จะใช้เมื่อต้องการให้มีการเจริญสูงสุด และสามารถใช้ synthesis metal chelator แทน siderophore ได้ ในผนังเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโทส ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้ง (Mair and Sharpe, 1984)

2.2.2 *Corynebacterium glutamicum*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ หรือวงรีขนาด 0.7-1.0 x 1.0-3.0 ไมโครเมตร พบได้ทั้งในลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มเซลล์ โดยในการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงระยะปรับตัวอาจพบเซลล์ที่มีการแตกติ่งหรือมีรูปร่างยาวได้ แต่ในช่วงกลางหรือท้ายระยะ log phase เซลล์จะมีรูปร่างสั้น เป็นวงรีหรือวงกลม ผิวโคโลนีเรียบ เป็นวงกลม มีลักษณะขุ่นหรืออาจเป็นมันเล็กน้อย ปกติจะมีสีเหลืองอ่อน และจะมีสีดำเมื่อเลี้ยงบน tellurite medium เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและสามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 25-37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้เล็กน้อยที่ 42 องศาเซลเซียส ต้องการไบโอตินในการเจริญทุกสายพันธุ์ บางสายพันธุ์ยังต้องการไทอะมีน และพาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (p-amino benzoic acid) อีกด้วย ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดกลูตามิก (L- glutamic acid) ภายใต้สภาวะใช้อากาศได้เป็นจำนวนมาก ผนังเซลล์ประกอบด้วย มีโซไดอะมิโนพิมิลิกแอซิด (meso- diaminopimelic acid) อาราบิโนส (arabinose) กาแลกโทส (galactose) อีกทั้งพบกรดไมโอลิก (myolic acid) สายสั้นๆ และ เปปติโดไกลแคน (Mair and Sharpe, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

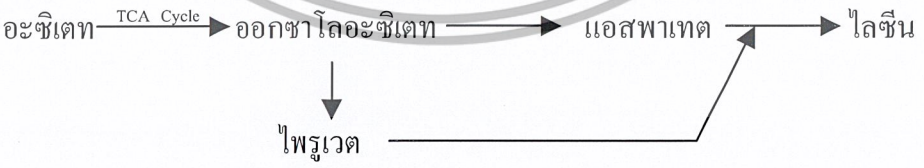
2.3 กลไกการสังเคราะห์ไลซีนโดยจุลินทรีย์

การสังเคราะห์ไลซีนของแบคทีเรีย จัดเป็นกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ซึ่งประกอบด้วยวิถีพื้นฐาน 4 ชนิด (Shvinka ; et. al. 1980) คือ

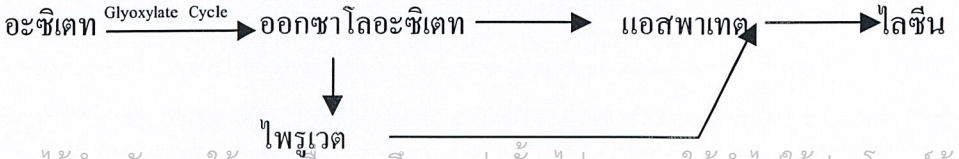
1. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)

2. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway)

3. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนจากอะซิเตท โดยผ่านวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)



4. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนจากอะซิเตท โดยผ่านวิถีไกลออกซิเลต (Glyoxylate Pathway)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 กลไกการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีน

ภาพที่ 5 : แสดงวิถีการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* (ดัดแปลงจาก Hua ; et. al. 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่า การผลิตไลซีนจากแอล-แอสพาเทต จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 6 ชนิด (Cremer ; et. al. 1991) ได้แก่

1. แอสพาเทตไคเนส (aspartate kinase)
2. แอสพาทอลดีไฮเดรต ดีไฮโดรจีเนส (aspartaldehydate dehydrogenase)
3. ไดไฮโดรไดพิโคลิเนต ซินเทส (dihydrodipicolinate synthase)
4. ไดไฮโดรไดพิโคลิเนต รีดักเทส (dihydrodipicolinate reductase)
5. ไดอะมิโนพิมิเลต ดีไฮโดรจีเนส (diaminopimelate dehydrogenase)
6. ไดอะมิโนพิมิเลต ดีคาร์บอกซิเลส (diaminopimelate decarboxylase)

กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ส่วนใหญ่เอนไซม์แอสพาเทตไคเนสจะถูกควบคุมโดยกระบวนการยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) จากปริมาณของไลซีน และทรีโอนีนที่เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ผลิตเพิ่มสูงขึ้น (Broes ; et. al. 1993) จากเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่า เอนไซม์ที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ไลซีน ได้แก่ เอนไซม์แอสพาเทตไคเนส และเอนไซม์ไดไฮโดรไดพิโคลิเนตซินเทส (Cremer ; et. al. 1991)

ดังนั้น จึงมีการทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* โดยกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) เพื่อให้เกิดสายพันธุ์ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ที่สามารถผลิตไลซีนในปริมาณที่สูงได้ โดยที่เอนไซม์แอสพาเทตไคเนสไม่ถูกยับยั้งจากไลซีนหรือทรีโอนีนที่เพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง (Broer ; et. al. 1993)

นอกจากเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดข้างต้น ยังมีเอนไซม์ที่ควบคุมการขนส่งไลซีนจากภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์เพอร์มิเอส (ดังภาพที่ 5) (Hua ; et. al. 2000)

2.3.2 การปรับปรุงพันธุ์

การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตไลซีน จะทำโดยกระบวนการกลายพันธุ์ เพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูงสุด (Constantine ; et. al. 1977) โดยจะทำการกลายพันธุ์ที่ยีน *lysC* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอสพาเทตไคเนส ในสายพันธุ์ *Corynebacterium glutamicum* เป็นผลทำให้เอนไซม์แอสพาเทตไคเนสมีความคงทนต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กระบวนการยับยั้งแบบย้อนกลับจากปริมาณไลซีน และเอนไซม์ทรีโอนีนที่เพิ่มสูงขึ้น (Cremer ; et. al. 1991)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างไลซีนของแบคทีเรีย

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์

กระบวนการหมักทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาการผลิตไลซีนได้แก่ กลูโคส และซูโครสซึ่งมีทั้งซูโครสบริสุทธิ์และที่อยู่ในรูปของกากน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet molasses) หรือกากน้ำตาลจากอ้อย(sugar cane molasses) (Kawahara ; et. al. 1990) วัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ข้าวโพด หญ้าหวาน ข้าวฟ่างบด(millet) แป้งมันสำปะหลัง (casava) แป้งมันเทศ(yam) (Umerie ; et. al. 2000) และอะซิเตต (Shivinka ; et. al. 1980)

จากการศึกษาของ Umerie ; et. al. (2000) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus laterosporus* พบว่าเมื่อใช้ข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณไลซีนประมาณ 3 กรัมต่อลิตร

Shivinka ; et. al. (1980) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพโดยเชื้อ *Brevibacterium flavum* แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคสและอะซิเตตด้วยวิถีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลผลิตสูงสุด (Y_p^{max}) ถึง 0.69 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงดังสมการ

$$1.18\ C_6H_{12}O_6 + 2NH_3 + 0.08O_2 \longrightarrow C_6H_{14}O_2N_2 + 3.08H_2O + 1.08CO_2$$

ส่วนเมื่อใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลผลิตสูงสุด (Y_p^{max})ได้ 0.60 กรัมไลซีนต่อกรัมอะซิเตต เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงดังสมการ

$$CH_3COOH + 2NH_3 + 0.94O_2 \longrightarrow C_6H_{14}O_2N_2 + 3.94H_2O + 1.94CO_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
47312

Coello ; et. al. (1992) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณธาตุอาหารของการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อจำกัดปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ให้กับเชื้อ ทำให้ทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้คาร์บอนส่วนใหญ่ไปเพื่อการสร้างมวลเซลล์ไม่ได้ใช้ไปในการผลิตไลซีนแม้ว่าจะใช้อัตราการเจือจางที่ต่ำก็ตาม

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

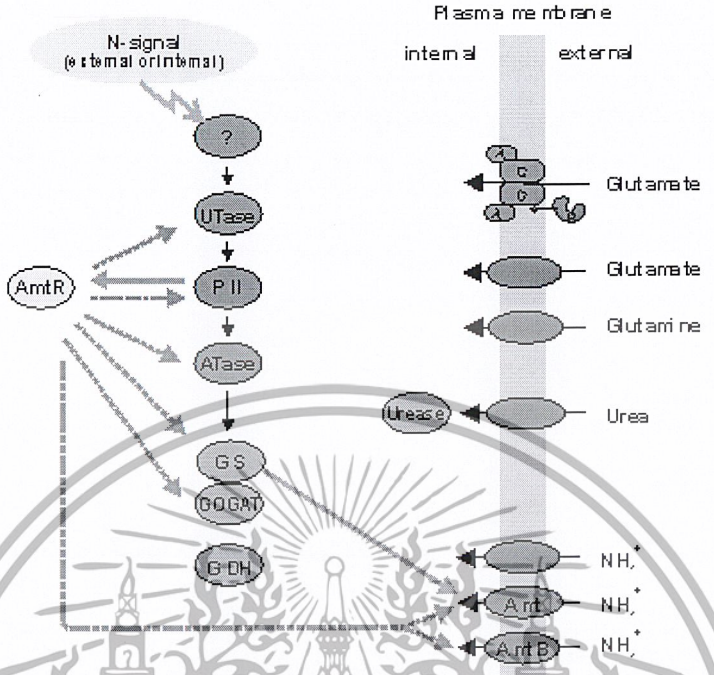
จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

โดยทั่วไปจะนิยมใช้ก๊าซแอมโมเนีย และเกลือแอมโมเนียม ตัวอย่างเช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) หรืออาจจะใช้ยูเรีย อาจจะมีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนพวก สารยีสต์สกัด (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) เปปโตน โพลีเปปโตน เคซีอินไฮโดรไลเสท(casein hydrolysate) Soybean meal hydrolysate Blood meal Defatted cowpea Non-defatted cowpea Bambara groundnut Groundnut เมล็ดคอตตอน และกากถั่วเหลือง (Umerie ; et. al. 2000)

Umerie ; et. al. (2000) ได้ศึกษาการผลิตไลซีนของเชื้อ *Bacillus laterosporus* โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะใช้ข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันหลายชนิด พบว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลผลิตไลซีนสูงที่สุด นอกจากนั้นยังแสดงให้เห็นว่าถั่วที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกไปก่อน (defatted) จะให้ผลดีกว่าที่ไม่ผ่านการสกัดน้ำมันออกก่อน (non-defatted) และพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มาจากธรรมชาติจะให้ไลซีนมากกว่าการใช้แอมโมนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์

Haidaris and Bhattacharjee (1978) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* AEC45 เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไทอะไลซีน (thialysine) พบว่าถ้ามีการเติมยูเรียลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการปลดปล่อยไลซีนลงสู่อาหารแต่ปริมาณผลผลิตโดยรวมจะไม่เพิ่มขึ้น การเติมสารสกัดจากยีสต์และไทอะไลซีน จะไม่มีผลต่อการปลดปล่อยไลซีนหรือการผลิตเลย ส่วนการเติม แอลฟา-คีโตอะดิพิก แอซิด และแอลฟา-อะมิโนอะดิพิก แอซิดจะทำให้ผลผลิตโดยรวมเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 : แสดงกลไกการดูดซึมไนโตรเจนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ; → การควบคุมการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน ; ⊣ , การควบคุมระดับของการถอดรหัส ; ⊸ ,การเคลื่อนที่ของสาร

(ที่มา: http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/biochemie/kraemer/projekte/bacttran/pageglob.htm)

จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นถึงการนำเอาแหล่งไนโตรเจนมาใช้ โดยเป็นวิถีการดูดซึมแอมโมเนียม และเชื่อมต่อกับระบบควบคุมภายในเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ด้วยการส่งระบบสัญญาณต่อเนื่องกันไป (http://www.uni-koeln.de/math-net/fak/biochemie/kraemer/projekte/bacttran/pageglob.htm)

2.4.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งตามปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ก็ยังมีแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดินัมและสังกะสี แต่โดยทั่วไปมักจะพบเจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย ในปริมาณที่เพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ KH_2PO_4 K_2HPO_4 $MgSO_4$ $FeSO_4$ KCl $MgCl_2$ $MnCl_2$ $CaCl_2$ H_3BO_3 $CuSO_4$ Na_2MoO_4 $CoNO_3$ NaH_2PO_4 และ $CoCl_2$

Coello ; et. al. (1992) ได้ศึกษาผลของฟอสเฟตที่มีต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* พบว่าการจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างการจำกัดปริมาณธาตุอาหารกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในการผลิตไลซีน ที่อัตราการเจริญของเชื้อต่ำสามารถผลิตไลซีนได้สูง และการผลิตไลซีนยังสามารถเกิดได้ดีในช่วงที่การเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจือจางต่ำอีกด้วย

2.4.4 วิตามิน

วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่มันต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ จึงต้องมีการเติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้จากแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโน อาจมีการเติมวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน ไทอะมีน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน และวิตามินบี 12

บริษัท BASF มีการใช้ถังหมักขนาดใหญ่ในการผลิตไลซีนจากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาล และมีการใช้วิตามินบี 2 (biotin) ที่สกัดจากเชื้อรา *Ashbya gossypii* ซึ่งทำให้บริษัท BASF สามารถผลิตไลซินที่ปราศจากสารเคมีได้นั่นเอง (http://www.basf.de/en/produkte/biotech/biokatalyse/fermentation.htm?id=V00-*w2J01x**bsf 100)

ตารางที่ 2 : ปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ที่พบในวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

Vitamin (μg/g)	Maize flour	Barley	Soybean flour	Beet molasses	Cane molasses	Yeast extract	Stillage
Thiamine	4.5	6.5	13.5	0.8	0.8	10	3.5
Riboflavin	0.9	1.2	3.5	-	-	20	11.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ) : ปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ที่พบในวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

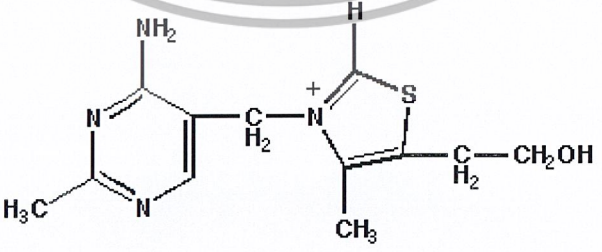
Vitamin (μg/g)	Maize flour	Barley	Soybean flour	Beet molasses	Cane molasses	Yeast extract	Stillage
Nicotinic acid	23.0	115	25.2	35.0	15.0	400	75.8
Pantothenic acid	4.6	4.4	26.1	50.0	20.0	50	10.8
Pyridoxine	6.9	11.5	8.5	-	-	25	1.0
Biotin	0.1	-	0.7	0.1	1.5	1	0.3
Inositol	-	-	3850	5000	2000	1500	7170
Choline	-	1110	2880	-	-	1500	3083

ที่มา : สมใจ ศิริโภค และคณะ (2540)

วิตามินที่สำคัญในการผลิตไลซีน ได้แก่

2.4.4.1 ไทอะมีน (thiamine)

ไทอะมีนหรือวิตามินบี 1 ที่อยู่ในรูปของไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate ; TPP) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากโมเลกุลไพรูวิกแอซิด ให้ได้เป็น อะซิทัลดีไฮด์และแอลฟาคีโตแอซิดตัวอื่น โครงสร้างของไทอะมีนจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ไพริมิดีน(pyrimidine) และไทเอซอล (thaiazole) (ดังภาพที่ 7)



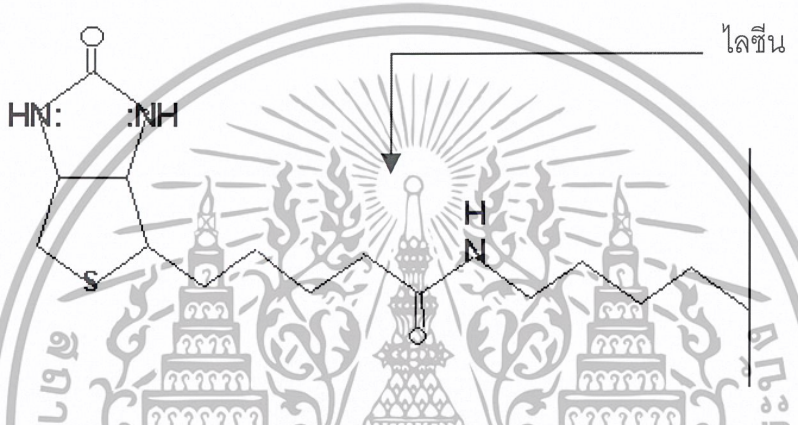
ภาพที่ 7 : โครงสร้างของไทอะมีน

(ที่มา : http://www.opbs.okstate.edu/…/Chapter8/Cpt8Figs/THIAMINE.GIF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4.2 ไบโอติน (biotin)

ไบโอตินหรือวิตามินเอช (vitamin H) เป็นวิตามินชนิดหนึ่งในกลุ่มวิตามินบีรวม (vitamin B-complex) ไบโอตินจะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ในการย้ายคาร์บอนไดออกไซด์หรือหมู่คาร์บอกซิล เช่นเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส อะเซทิลโคเอคาร์บอกซิเลส และยูเรียคาร์บอกซิเลส (ดังภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 : โครงสร้างของไบโอตินที่สร้างพันธุโควาเลนซ์กับไลซีน

(ที่มา : ดัดแปลงจาก http://www.opbs.okstate.edu/…/Chapter8/Cpt8Figs/THIAMINE.GIF)

ไบโอตินในรูปที่สามารถทำงานได้จะสร้างพันธะโควาเลนซ์กับอะมิโนไลซีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์คาร์บอกซิเลส โครงสร้างเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะทำหน้าเป็นโคเอนไซม์ซึ่งจะจับกับย้ายคาร์บอนไดออกไซด์หรือหมู่คาร์บอกซิลและย้ายไปสู่สับสเตรท

2.4.5 สารที่มีผลต่อการสร้าง และการยับยั้งไลซีน

ตามปกติแล้วสารชักนำมักจะเป็นสับสเตรทของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท ส่วนสารยับยั้งอาจมีผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้ผลผลิตที่ต้องสามารถซึมผ่านออกมานอกเซลล์ได้ง่ายขึ้น

เช่นในการศึกษาของ Kavahara ; et. al. (1990) พบว่าการเติม glycine betaine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยให้อัตราการใช้ซูโครสของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brevibacterium lactofermentum มีมากขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีอุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียสได้และยังช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสได้อีกด้วย

2.4.6 อุณหภูมิ

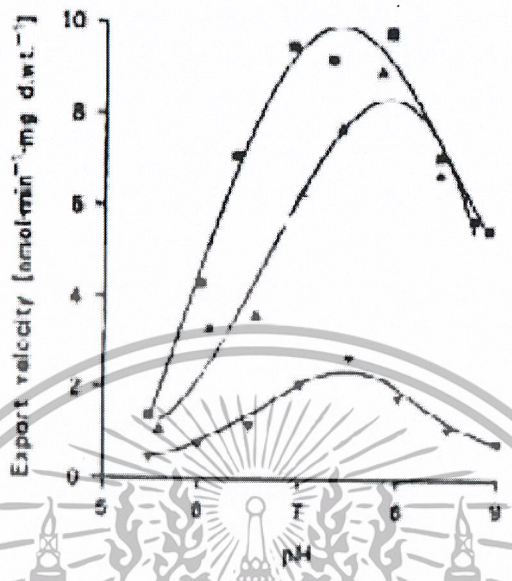
เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตมากเช่นกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่ในการผลิตไลซีนจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-33 องศาเซลเซียส (สมใจและคณะ, 2540) ตัวอย่างเช่น การผลิตไลซีนจากเชื้อ *Bacillus laterosporus* (Umerie ; et. al. 2000) *Saccharomyces cerevisiae* (Haidaris and Bhattacharjee, 1978) Yeast และ lactobacilli (Odunfa ; et. al. 2001) *Corynebacterium glutamicum*ATCC 21253 (Vallino ; et. al. 1992) *Corynebacterium glutamicum*ATCC 21513 (Kiss and Stephanopoulos, 1992) จะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส *Corynebacterium glutamicum*ATCC 13032 (Schrumpf ; et. al. 1992) จะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ในการศึกษาของ Kawahara ; et. al. (1990) พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสที่ระยะคงตัว (stationary phase) กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสของเชื้อ *Brevibacterium lactofermentum*จะลดลง มีผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง

2.4.7 ความเป็นกรดด่าง

การผลิตจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอนเนต ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชลดลงคาร์บอนเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี พีเอช คงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุม พีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้กรดหรือด่าง เช่น กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เติมลงไปในภายหลัง อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ฟอสเฟต ก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชได้ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอัตราส่วนที่สมดุลกันก็ช่วยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากสารพวกโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 : แสดงถึงอิทธิพลของพีเอชต่อความเข้มข้นของไลซีนที่สังเคราะห์จากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ ; □ , MH 20-22B ; ▲ , DG 52-5 ; ▼, KK 25
(ที่มา : Broer ; et. al. 1993)

จากภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่า พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์จะอยู่ที่พีเอชที่เป็นด่าง (alkaline) ดังนั้น ความเข้มข้นของไลซีนที่ผลิตได้จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชนั่นเอง (Broer ; et. al. 1993)

ดังนั้น โดยทั่วไปแล้วการผลิตไลซีนจะควบคุม พีเอช ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.5 (สมใจ และคณะ, 2540) สารเคมีที่นิยมใช้ในการปรับพีเอชสำหรับการผลิตไลซีนได้แก่ NH_4OH KOH NH_3 (ในรูปก๊าซ) (Kawahara ; et. al. 1990) และ NaOH (Coello ; et. al. 1992)

2.4.8 การให้อากาศ

ออกซิเจน เป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมแทบอไลท์ และในการผลิตไลซีนก็เป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Hirose and Shibai (1980) รายงานว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวมีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ การผลิตกรดอะมิโนในกลุ่มกลูตาเมต (กลูตามิก กลูตามีน โพรลีนและอาร์จีนีน) และแอสพาร์เตท (ไลซีน ทรีโอนีนและไอโซลิวซีน) จะลดลงเมื่ออัตราการหายใจของจุลินทรีย์ต่ออัตราการหายใจสูงสุดของจุลินทรีย์ (degree of oxygen satisfaction) เป็นหนึ่ง

การสร้างกรดอะมิโนในกลุ่มกลูตาเมตและแอสพาร์เตทนั้น เปลี่ยนแปลงจากสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์ดังนั้นถ้ามีออกซิเจนมากพอจะทำให้มีสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์เกิดขึ้นจำนวนมาก เป็นผลให้มีการผลิตกรดอะมิโนในกลุ่มนี้จำนวนมากด้วย

ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์จะขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วความเข้มข้นสูง จะทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็ว และมีความต้องการออกซิเจนปริมาณสูง จนอาจเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมักได้

2.5. ระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีน

ไลซีนเป็นกรดอะมิโนที่ผลิตกันมากเป็นอันดับที่สามในอุตสาหกรรม โดยผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักคิดเป็นร้อยละ 80 ของไลซีนที่ผลิตได้ทั้งหมด (Coello ; et. al. 1992) ซึ่งการผลิตไลซีนในอุตสาหกรรมและในการศึกษาคุณสมบัติทางสรีระวิทยาของการผลิตไลซีนส่วนใหญ่จะใช้กระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation) นอกจากนั้นยังมีการนำกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) มาใช้เพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิต โดยจะมีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกับกระบวนการหมักแบบกะ

2.5.1 กระบวนการหมักแบบกะ

การเพาะเลี้ยงแบบกะ หมายถึงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงที่กำหนดปริมาตรเอาไว้แน่นอนในระยะเวลาที่เหมาะสม จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่กำหนดดังกล่าว ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์วิธีนี้ถือเป็นระบบปิด คือ มีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ โดยที่อัตราการเติบโตจะลดลงเรื่อย ๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากขาดแคลนอาหารและจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของของเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จึงถือว่าการเพาะเลี้ยงแบบนี้ระบบจะมีลักษณะไม่คงที่ โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (transient state) และโดยทั่วไปสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบนี้ได้เป็น 6 ระยะ คือ 1. ระยะปรับตัว 2. ระยะการเติบโตเร่ง 3. ระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล 4. ระยะการเติบโตลด 5. ระยะการเติบโตคงที่ 6. ระยะการเติบโตเสื่อม พบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านระยะปรับตัวไปแล้ว และเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ได้ในระยะการเจริญเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลจะเริ่มลดลง โดยที่ปริมาณของจุลินทรีย์จะมากที่สุดเมื่อถึงระยะการเติบโตคงที่ และจะลดลงในระยะการเติบโตเสื่อม เนื่องจากมีการย่อยตัวเอง (autolysis) เกิดขึ้น

Coello ; et. al. (2000) ได้ศึกษาการผลิตไลซีนด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*ATCC 21543 ใช้น้ำหมักปลา (fish silage) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และทำการหมักในเออเลนเมเยอร์ แบฟเฟล ฟลาสก์ (erlenmayer baffled flasks) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าผลผลิตที่ได้จะไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นสารตั้งต้น

Umerie ; et. al. (2000) ใช้กระบวนการหมักแบบกะในการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Bacillus laterosporus* ที่คัดแยกได้จากดิน แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ทำการหมักในเออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ (erlenmayer flasks) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าข้างฟ่างจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ที่ให้ปริมาณไลซีนสูงที่สุดคือ 30 กรัมต่อลิตร แล้วทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยมีแหล่งคาร์บอนคือข้าวฟ่างด้วยกระบวนการหมักแบบเดียวกัน พบว่ากากถั่วเหลืองให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดเป็น5.67 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าผลผลิตที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกก่อนจะสูงกว่าที่ยังไม่ผ่านการสกัดน้ำมันออก หรือการใช้แหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์คือ $(NH_4)_2SO_4$

Vallino and Stephanopoulos (1993) ใช้กระบวนการหมักแบบกะในการศึกษาเมแทบอลิซึมของ *Corenebacterium glutamicum* ทั้งในการเจริญเติบโตและการผลิตไลซีนให้ได้ปริมาณสูง โดยใช้ถังหมักขนาด 15 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมการให้อากาศที่ 10 ลิตรต่อนาที (1 vvm) และควบคุมพีเอชที่ 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เป็นระบบที่มีการใส่วัตถุดิบและอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ในขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลาเช่นเดียวกัน ระยะการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียลของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบกะสามารถดำเนินต่อไปได้อีก ถ้าหากมีการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ที่เหมาะสม " สถานะคงตัว " (steady state) จะเกิดขึ้นได้ เมื่อปริมาณของเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่สมดุลกับปริมาณของเซลล์ที่ไหลออกจากถัง จึงเรียกเทคนิคการหมักแบบนี้ว่า การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและจัดว่าเป็นระบบที่ต้องการความปราศจากเชื้อที่สูง

Coello ; et. al. (1992) ใช้กระบวนการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาผลของการจำกัดปริมาณธาตุอาหาร คือฟอสเฟตและคาร์บอนของกระบวนการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corenebacterium glutamicum* ใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของใบกวน (immpeller speed) 700 รอบต่อนาทีและควบคุมพีเอชที่ 7.0 โดยให้มีอัตราการละลายของออกซิเจนเป็นร้อยละ 30 และมีการควบคุมอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ถังหมัก

Kiss and Stephanopoulos (1992) ใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในการศึกษาลักษณะของเมแทบอลิซึมของเชื้อ *Corenebacterium glutamicum* ATCC 21253 โดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการควบคุมปริมาณสับสเตรท (chemmostat) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชที่ 7.0 ควบคุมการให้อากาศที่ 10 ลิตรต่อนาที (1 vvm.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองรวมถึงรุ่นและบริษัทที่ผลิตแสดงมีดังต่อไปนี้

1. Rotary Evaporator: model BUCHI 011, RE 111,Switzerland
2. Incubator: model T490181, Binder control E2
3. Orbital Shaker: model FT01/156, Sanyo Gallenkamp PLC, UK.
4. Autoclave: model A052542, Astell Scientific, England
5. Spectrophotometer: model 6405 UV/VIS, number 1259, JENWAY, UK.
6. Laminar Air Flow: "ISSCO" Laminar flow model HS123, Dwyer Instruments, INC. U.S.A.
7. เครื่องชั่งน้ำหนัก: model AG204, Metter Toledo, Switzerland
8. Hot air oven: Model 600 (D06062), Memmert
9. pH meter: Model 215, Denver Instrument
10. High Performance Liquid Chromatrography: SHIMADZU
11. C-R7A chromatopac: SHIMADZU
12. Column: ODS-3 5 µm , 250 x 4.6 I.D. , GL Sciences Inc.

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 สารเคมี

1. Ammonium molibdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)
2. Bovine serum albumin
3. Coppersulphate ($CuSO_4.5H_2O$)
4. Calsium carbonate ($CaCO_3$)
4. Hydrochloric acid (HCl)
5. Magnesium sulfate ($MgSO_4$)
6. Methanol (CH_3OH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
8. Sodium arsinate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$)
9. Sodium potassium tartrate
10. Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
11. Sodium chloride (NaCl)
12. Sodium hydroxide (NaOH)
13. Sodium sulphate (anhydrous) (Na_2SO_4)
14. Sulfulric acid (H_2SO_4)
15. Water (H_2O)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารที่ใช้ คือ nutrient broth nutrient agar seed medium และ Lysine Production Medium อาหารทุกชนิดต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

nutrient broth (NB) and agar (NA) (Difco)

Beef extract	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 6.8 ส่วนการเตรียมอาหาร NA จะเติมวุ้น 15 กรัม ใน 1 ลิตรของ NB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

seed medium

กลูโคส	20.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Thiamine-HCl	300.0	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400.0	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 7.2 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Lysine Production Medium

$(NH_4)_2SO_4$	75.0	กรัม
ยีสต์สกัด	20.0	กรัม
กลูโคส	80.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	300.0	ไมโครกรัม
ไบโอติน	400.0	ไมโครกรัม
$CaCO_3$	5.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชอาหาร ให้ได้ 7.4 หลังนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

1. *Arthrobacter citreus* NRRL 1258
   ที่เก็บรักษาในรูปเซลล์แช่แข็งแบบแห้ง (lyophilize) (USDA Agricultural Reserch Service Culture Collection , U.S.A)
2. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543
   ที่เก็บรักษาในรูปเซลล์แช่แข็งแบบแห้ง (lyophilize) (The American Type Culture Collection , U.S.A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

3.4.1.1 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

นำเชื้อแช่แข็งแบบแห้ง (lyophilize) มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบน nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เจริญเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหาร (agar slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 จากหลอดอาหาร มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยทำการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) (ภาคผนวก ก)

3.4.1.3การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อที่เก็บในหลอดอาหาร มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี seed medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลอง

3.4.1.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ควบคุมสภาวะที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง นำมาวัดพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ ส่วนปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้จะทำการวิเคราะห์ชั่วโมงที่ 24 48 และ 72

3.4.1.5 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

ก. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ซึ่งมีกลูโคสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก ณ ชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

ข. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ซึ่งมีซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด (จากผลการศึกษาในข้อ 3.4.1.4) โดยทำการกำหนดช่วงการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ช่วง เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

3.4.2.1 การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

นำเชื้อแช่แข็งแบบแห้ง (lyophilize) มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบน nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เจริญเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหาร (agar slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 จากหลอดอาหาร มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยทำการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.3การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อที่เก็บในหลอดอาหาร มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี seed medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลอง

3.4.2.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ควบคุมสภาวะที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง นำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ ส่วนปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้จะทำการวิเคราะห์ชั่วโมงที่ 24 48 และ 72

3.4.2.5 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนของ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ก. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ซึ่งมีกลูโคสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

ข. ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครส

ทำการถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรของ seed medium) ลงในฟลาสก์ที่มี Lysine Production Medium (135 มิลลิลิตร) ซึ่งมีซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก ณ ชั่วโมงที่เชื้อผลิตไลซีนได้สูงสุด (จากผลการศึกษาในข้อ 3.4.2.4) โดยทำการกำหนดช่วงการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ช่วง เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

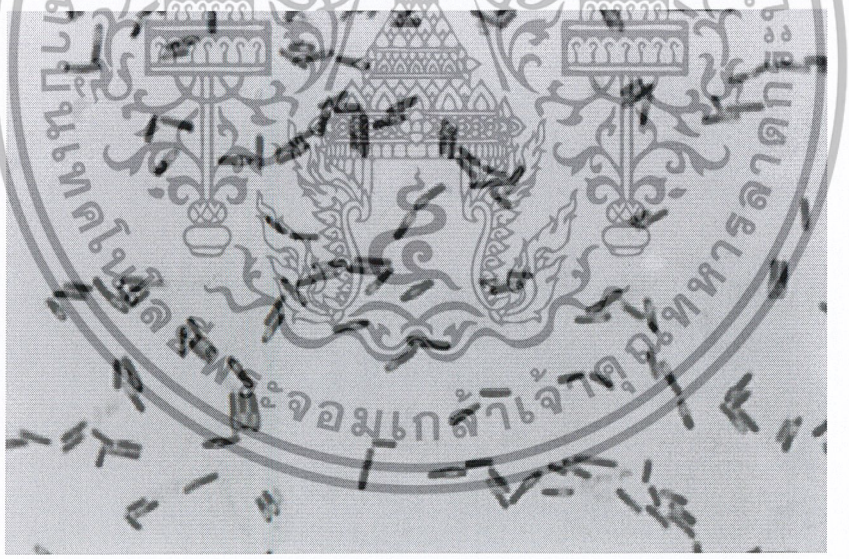
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

4.1.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535)

เมื่อนำเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 จากหลอดอาหารมาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยทำการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเป็นแท่งสั้น และติดสีแกรมบวก (สีม่วงของคริสตัลไวโอเลต) ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อ *Arthrobacter citreus* ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (ดังภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

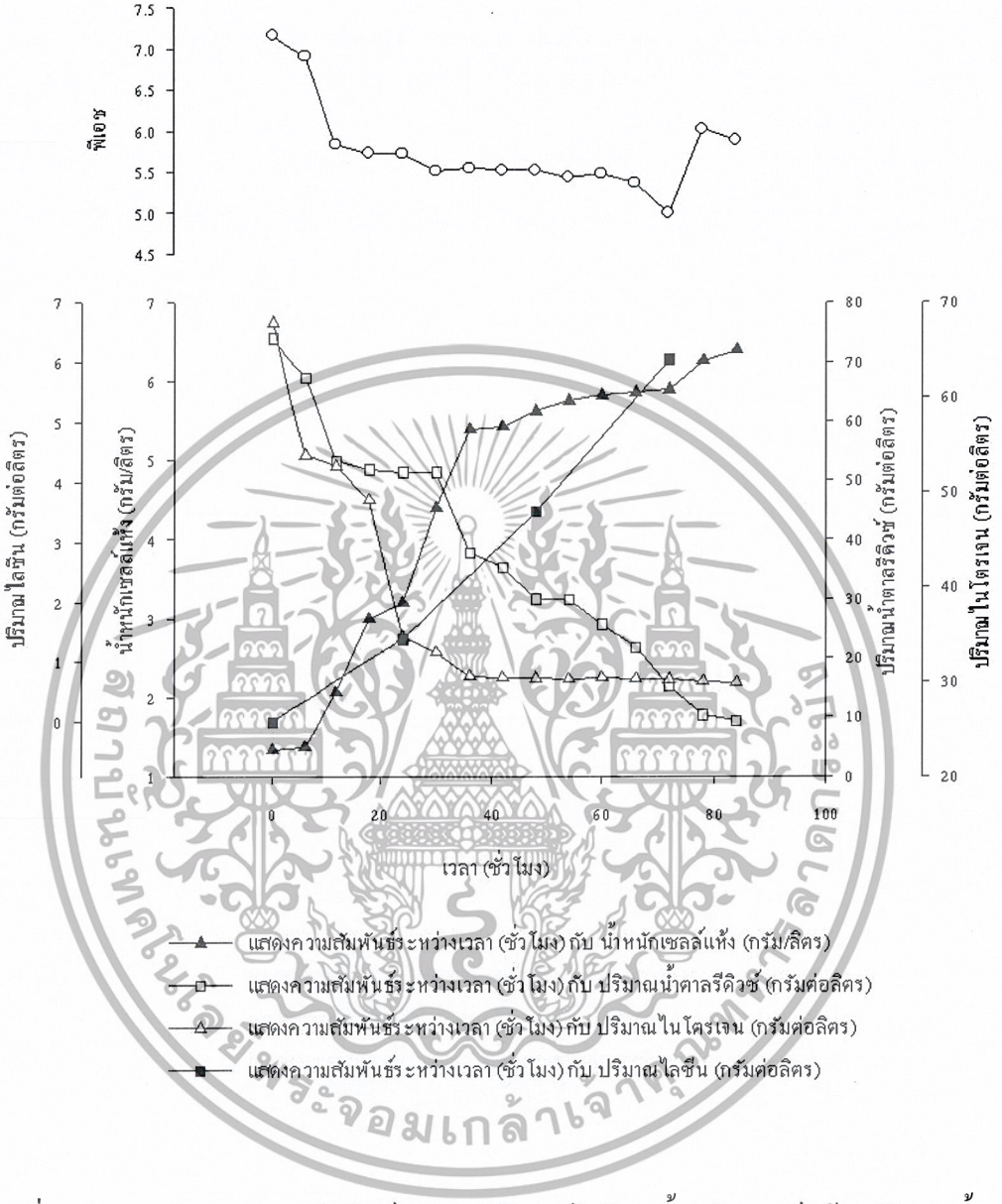
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ใน Lysine Production Medium โดยควบคุมสภาวะที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช พบว่า ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง เชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล จะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคส และปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า กลูโคสและไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (Colleo ; et. al. 2000) ในขณะที่ค่าพีเอชจะลดลงจากชั่วโมงแรก (มีค่าประมาณ 7.4) อย่างรวดเร็ว และค่าพีเอชจะเริ่มคงที่ภายหลังชั่วโมงที่ 12 (มีค่าในช่วง 5.5-5.7) และเชื้อจะเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่หลังชั่วโมงที่ 36 จะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ ซึ่งจะสัมพันธ์กับอัตราการใช้กลูโคส และไนโตรเจนของเชื้อ สังเกตได้จากปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณไนโตรเจนที่เริ่มคงที่ โดยชั่วโมงที่ 24 48 และ 72 สามารถวัดปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ 1.39 3.51 และ 6.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตไลซีนของเชื้อจะสูงสุด เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ และภายหลังจากชั่วโมงที่ 72 ค่าพีเอชจะลดลงอีกเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ณ ชั่วโมงที่ 84 (ดังภาพที่ 11)

การที่พีเอชมีค่าลดลง เนื่องจากเชื้ออาจมีการผลิตสารบางชนิดออกมา เช่น กรดกลูตามิก โดยทั่วไปที่สภาวะที่ใช้ในการผลิตไลซีนเชื้อก็สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้เช่นเดียวกัน (http://web.mit.edu/7.13/www.restricted/ProjectOverviews-2002.pdf) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชยังส่งผลต่อการปลดปล่อยไลซีนออกนอกเซลล์ คือ เมื่อพีเอชมีค่าลดลงจะส่งผลต่อปริมาณไฮโดรเนียมไอออน (OH^-) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งไลซีนออกนอกเซลล์ลดลง ทำให้ปริมาณไลซีนที่เชื้อปลดปล่อยออกนอกเซลล์ลดลงเช่นกัน (http://www.ftns.wau.nl/micr%ApplMolGen/Chapter%2006A%20industrial%20biotechnology.pdf) จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่า ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ไม่ลดลงตามการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่เกิดขึ้นดังกล่าวข้างต้น อาจเกิดจากการลดลงของค่าพีเอชซึ่งส่งผลต่อการปลดปล่อยไลซีนออกนอกเซลล์ ในขณะที่การผลิตไลซีนก็ยังคงดำเนินต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 72 โดยสามารถผลิตไลซีนได้ 6.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตไลซีนต่อน้ำตาลกลูโคส ($Y_{P/S}$) และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลกลูโคส ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.10 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส และ 0.08 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ โดยเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.05 ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ มาศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอชของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีน

ก. ผลความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน Lysine Production Medium ที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 มาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอส พบว่า

เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเท่ากับ 12.28 กรัมต่อลิตรชั่วโมงที่ 74 ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.96 1.00 และ 1.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร (5.30 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (2.12 0.95 และ 3.33 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 4.23) มีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 15.63 30.60 และ 28.11 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหลือที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (4.28 กรัมต่อลิตร) จะต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.89 7.43 และ 7.59 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า ที่กลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.35 7.73 6.10 และ 6.22 ตามลำดับ) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 3)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 74 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกลูโคสทุกระดับความเข้มข้น แต่เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถนำน้ำตาลกลูโคส และไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร ใน lysine production medium ไปใช้ในการผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังนั้นความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งเชื้อสามารถนำไปผลิตไลซีนได้สูงที่สุด คือ 80 กรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 11) โดยค่าที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Colleo ; et. al. (2000) ที่ศึกษาในเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำหมักปลา (fish silage) เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

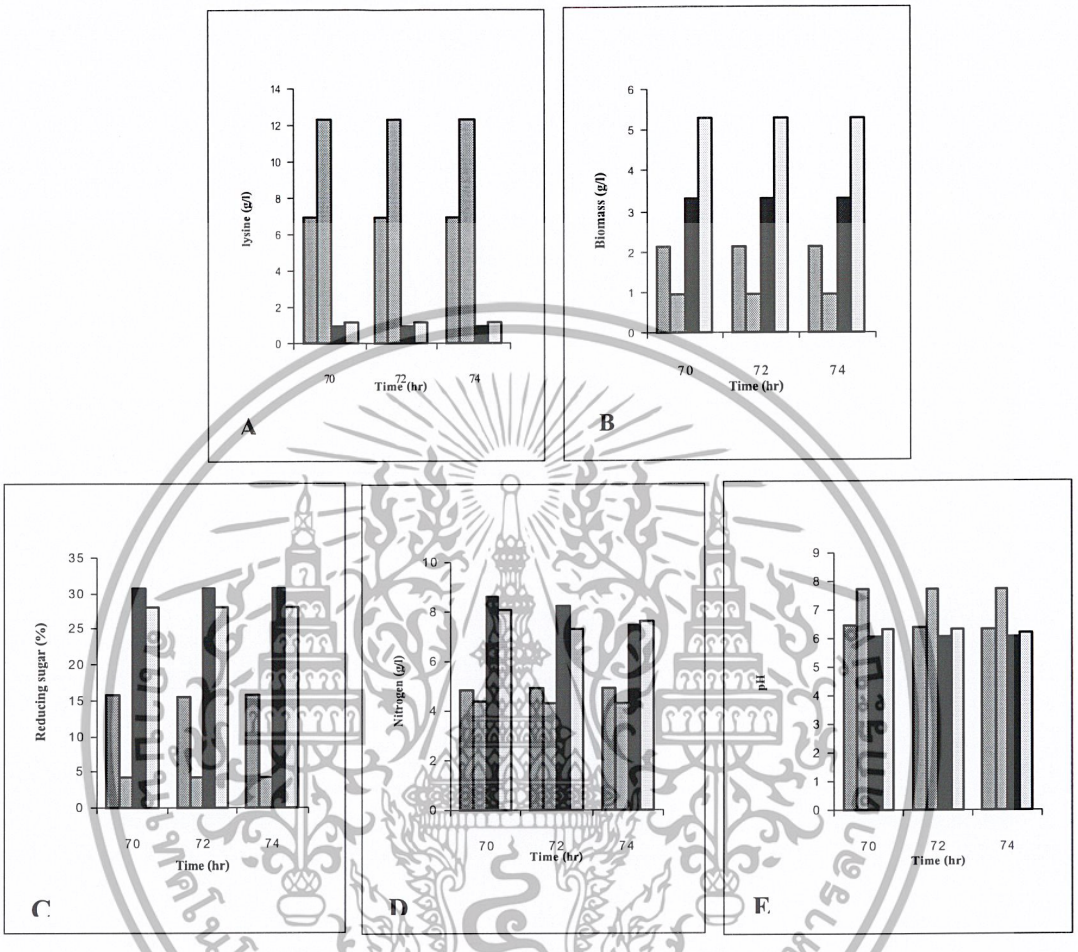
คาร์บอนและมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 30 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอชของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ที่เลี้ยงใน Lysine Production Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	6.96 b	2.12 c	15.63 a	4.89 b	6.35 bc
80	12.28 a	0.95 d	4.23 d	4.28 a	7.73 d
100	1.00 d	3.33 b	30.60 b	7.43 cd	6.10 a
120	1.17 c	5.30 a	28.11 c	7.59 d	6.22 ab

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร

ภาพที่ 12 : ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ผลความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน Lysine Production Medium ที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 มาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเท่ากับ 5.28 กรัมต่อลิตรชั่วโมงที่ 74 ที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.84 1.78 และ 1.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง จะเห็นว่าความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร (7.19 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.19 6.28 และ 5.64 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ที่ซูโครสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 16.61) ต่ำกว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ17.22 22.02 และ 18.47 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (4.61 กรัมต่อลิตร) จะต่ำกว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.06 6.32 และ 8.03 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอชพบว่า ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.13 5.78 5.69 และ 5.60 ตามลำดับ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 4)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 74 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในซูโครสเริ่มต้นทุกระดับความเข้มข้น แต่เชื้อสามารถนำน้ำตาลซูโครส และไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นใน Lysine Production Medium 80 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถนำไปผลิตไลซีนได้สูงที่สุด คือ 80 กรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 13)

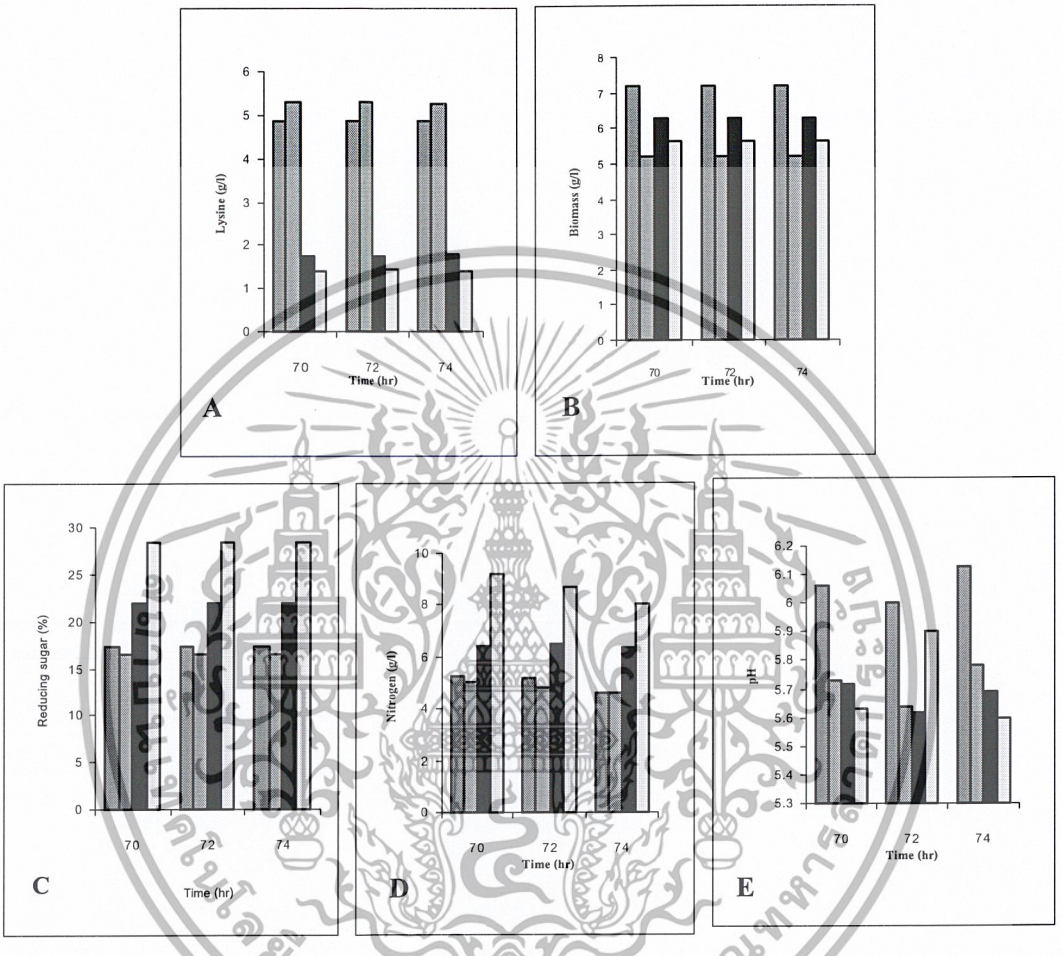
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 : ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช ของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ที่เลี้ยงใน Lysine Production Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	4.84 b	7.19 a	17.22 c	4.61 a	6.13 d
80	5.28 a	5.19 d	16.61 d	4.61 a	5.78 abc
100	1.78 c	6.28 b	22.02 b	6.32 b	5.69 ab
120	1.42 d	5.64 c	28.47 a	8.03 c	5.60 a

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร

ภาพที่ 13 : ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมารไลซีน (A) น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) ค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258 ณ ชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

4.2.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมสีแกรม

เมื่อนำเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 จากหลอดอาหารมาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยทำการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเป็นแท่งสั้น และติดสีแกรมบวก (สีม่วงของคริสตัลไวโอเลต) ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (ดังภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

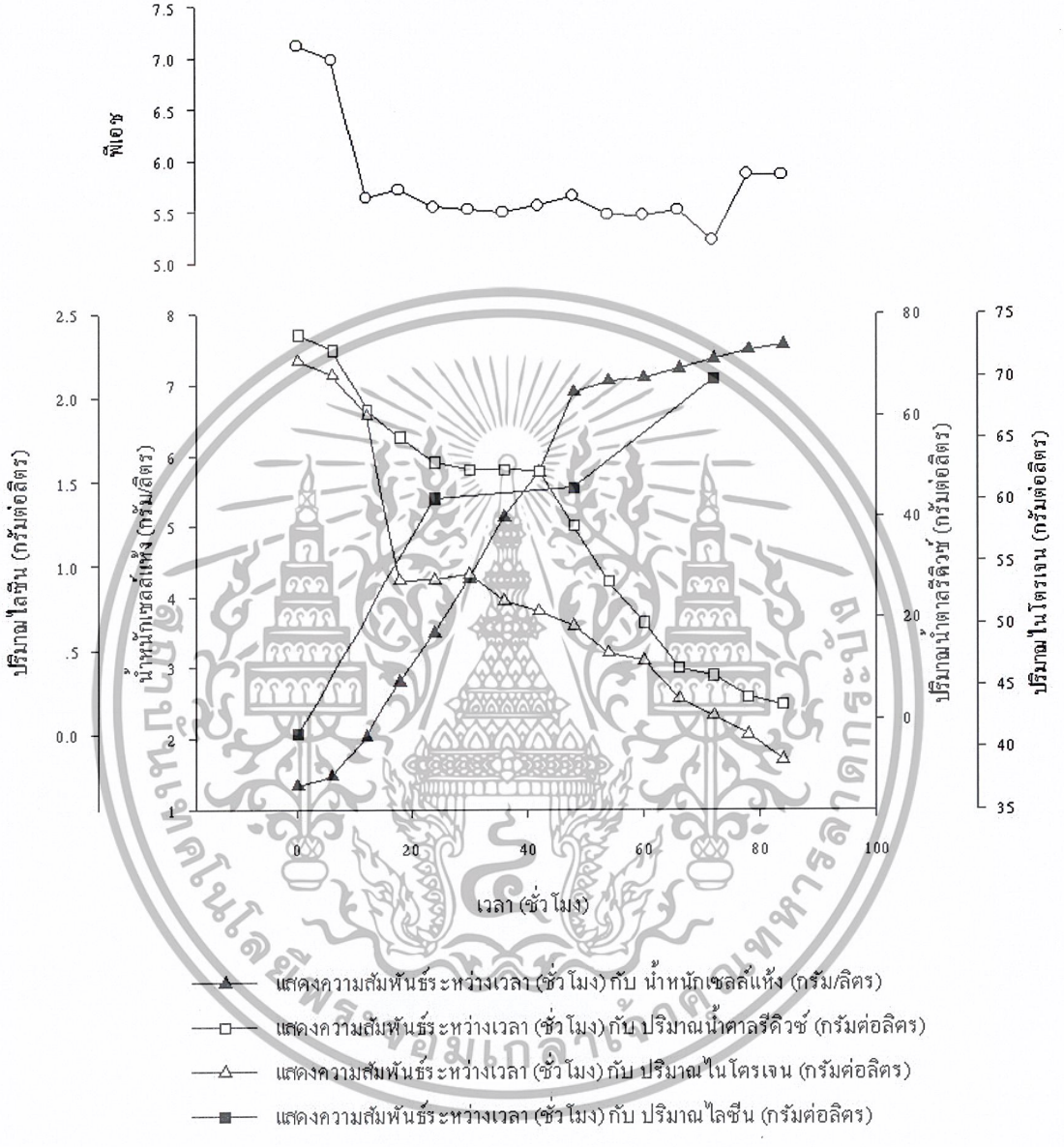
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ใน Lysine Production Medium โดยควบคุมสภาวะที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช พบว่า ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง เชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล จะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคส และปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ค่าพีเอชจะลดลงจากชั่งโมงแรก (มีค่าประมาณ 7.4) อย่างรวดเร็ว และค่าพีเอชจะเริ่มคงที่ภายหลังชั่วโมงที่ 12 (มีค่าในช่วง 5.5-5.7) และเชื้อจะเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่หลังชั่วโมงที่ 36 จะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ ซึ่งจะสัมพันธ์กับอัตราการใช้กลูโคส และไนโตรเจนของเชื้อ สังเกตได้จากปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณไนโตรเจนที่เริ่มคงที่ โดยชั่วโมงที่ 24 48 และ 72 สามารถวัดปริมาณ ไลซีนที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 1.40 1.47 และ 2.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตไลซีนของเชื้อจะสูงสุด เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ และภายหลังจากชั่วโมงที่ 72 ค่าพีเอชจะลดลงอีกเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ณ ชั่วโมงที่ 84 (ดังภาพที่ 15)

การที่พีเอชมีค่าลดลง เนื่องจากเชื้ออาจมีการผลิตสารบางชนิดออกมา เช่น กรดกลูตามิก โดยทั่วไปที่สภาวะที่ใช้ในการผลิตไลซีนเชื้อก็สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้เช่นเดียวกัน (http://web.mit.edu/7.13/www.restricted/ProjectOverviews-2002.pdf) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชยังส่งผลต่อการปลดปล่อยไลซีนออกนอกเซลล์ คือ เมื่อพีเอชมีค่าลดลงจะส่งผลต่อปริมาณไฮโดรเนียมไอออน (OH^-) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งไลซีนออกนอกเซลล์ลดลง ทำให้ปริมาณไลซีนที่เชื้อปลดปล่อยออกนอกเซลล์ลดลงเช่นกัน (http://www.ftns.wau.nl/micr%ApplMolGen/Chapter%2006A%20industrial%20biotechnology.pdf) จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่า ปริมาณไลซีนที่เชื้อผลิตได้ไม่ลดลงตามการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่เกิดขึ้นดังกล่าวข้างต้น อาจเกิดจากการลดลงของค่าพีเอชซึ่งส่งผลต่อการปลดปล่อยไลซีนออกนอกเซลล์ ในขณะที่การผลิตไลซีนก็ยังคงดำเนินต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถผลิตไลซีนได้สูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 72 โดยสามารถผลิตไลซีนได้ 2.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตไลซีนต่อน้ำตาลกลูโคส ($Y_{P/S}$) และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลกลูโคส ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.03 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส และ 0.09 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ โดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.09 ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ มาศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีน

ก. ผลความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน Lysine Production Medium ที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 มาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอส พบว่า

เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเท่ากับ 8.35 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 74 ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.07 0.26 และ 1.09 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง จะเห็นว่า ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 80 กรัมต่อลิตร (9.33 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (9.17 6.30 และ 5.13 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 8.35) จะต่ำกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 37.50 40.35 และ 39.11 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร (4.27 กรัมต่อลิตร) จะต่ำกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.60 5.46 และ 5.21 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.15 4.97 5.73 และ 5.76 ตามลำดับ) มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 5)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ณ ชั่วโมงที่ 74 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกลูโคสเริ่มต้นความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร และสามารถนำน้ำตาลกลูโคส และไนโตรเจน ที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นใน Lysine Production Medium 80 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังนั้นความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถนำไปผลิตไลซีนได้สูงที่สุด คือ 80 กรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 16) ค่าที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Collelo ; et. al. (2000) ที่ศึกษาในเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำหมักปลา (fish silage) เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

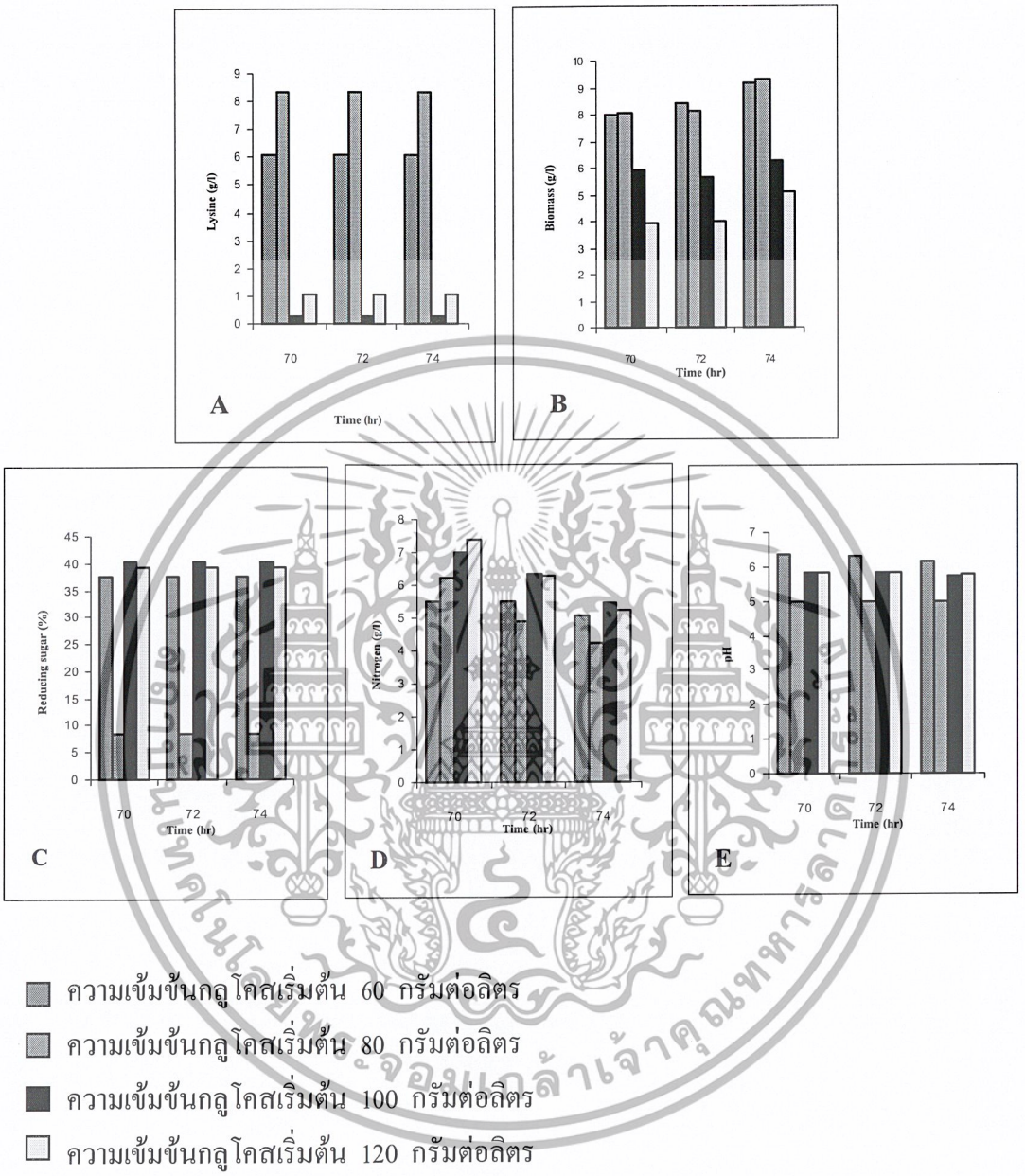
คาร์บอนและมีกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด 30 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 : ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ที่เลี้ยงใน Lysine Production Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	6.07 b	6.30 c	37.50 c	4.25 a	6.15 d
80	8.35 a	5.13 bc	8.35 d	5.07 bc	4.97 a
100	0.26 d	9.33 e	40.35 a	5.46 c	5.73 b
120	1.09 c	9.17 de	39.11 b	5.21 bc	5.76 bc

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 16 : ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณไลซีน (A) น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) และค่าพีเอช (E) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ผลความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน Lysine Production Medium ที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 มาวัดปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอช พบว่า

เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดเท่ากับ 7.39 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 74 ที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 60 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (3.80 2.68 และ 4.72 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อดูจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง จะเห็นว่า ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร (8.93 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (7.90 5.73 และ 7.17 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 3.78) จะต่ำกว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 33.7 41.9 และ 4.26 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร (3.79 กรัมต่อลิตร) จะต่ำกว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.58 5.75 และ 4.27 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนค่าพีเอช พบว่า ที่ซูโครสเริ่มต้น 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.85 5.31 5.50 และ 5.56 ตามลำดับ) มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 6)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ณ ชั่วโมงที่ 74 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน Lysine Production Medium ที่มีซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และสามารถนำน้ำตาลซูโครส และไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการผลิตไลซีนได้ดีที่สุด ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นซูโครสที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถนำไปผลิตไลซีนได้สูงที่สุด คือ 100 กรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 17)

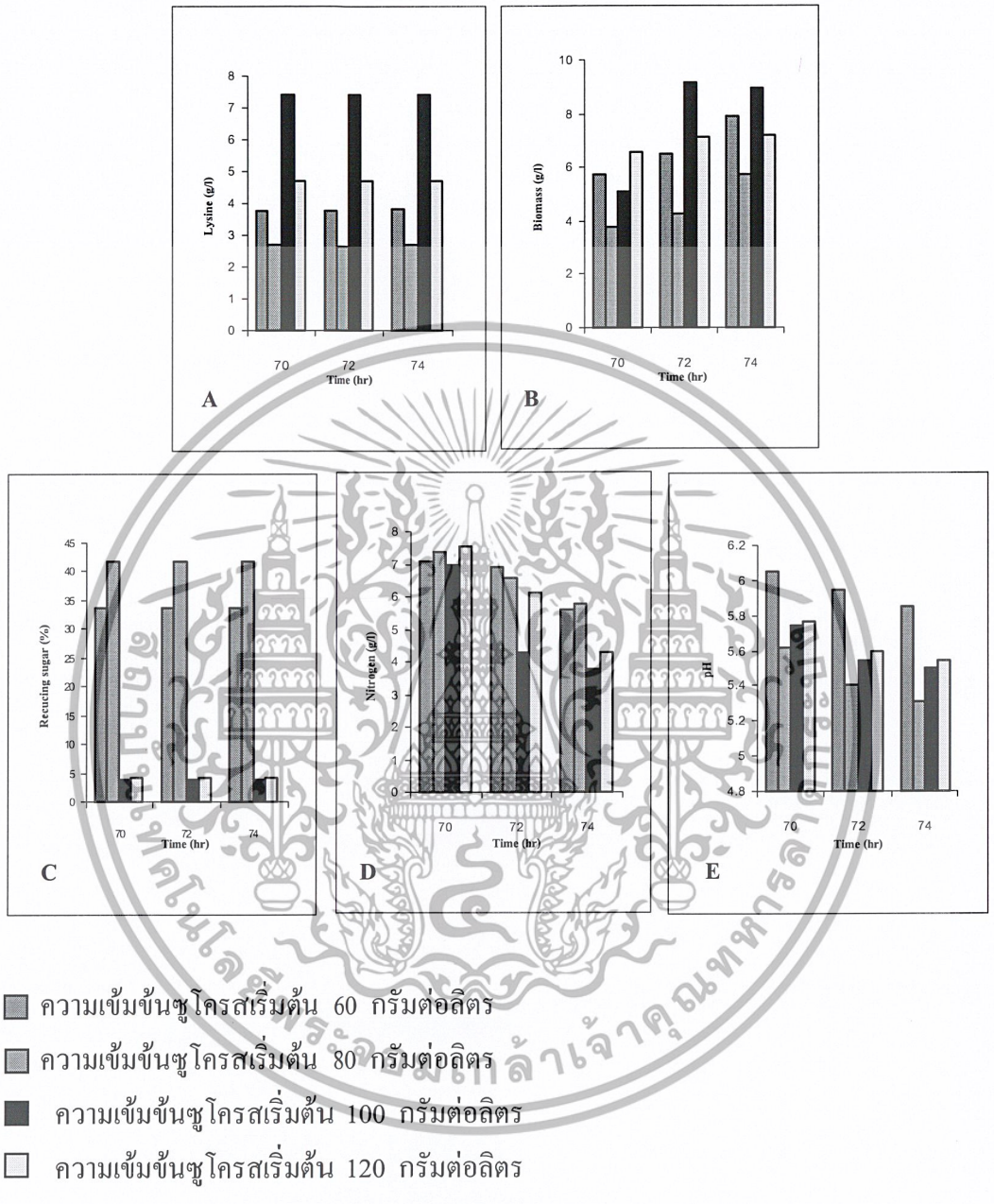
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 : ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีน น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ที่เลี้ยงใน Lysine Production Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	3.80 c	7.90 cde	33.7 b	5.38 b	5.85 def
80	2.68 d	5.73 abcd	41.9 a	5.75 b	5.31 a
100	7.39 a	8.93 de	3.78 d	3.79 a	5.50 abc
120	4.72 b	7.17 abcde	4.26 c	4.27 a	5.56 abcd

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 17 : ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ 60 80 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อปริมารไลซีน (A) น้ำหนักเซลล์แห้ง (B) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) (C) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (D) ค่าพีเอช (E) ของการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 ชั่วโมงที่ 70 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 เชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

5.1.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วง มีลักษณะเป็นแท่งสั้น (ดังภาพที่ 10)

5.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด 6.05 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 สามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ได้ 15.14 และ 30.21 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชวัดได้ 5.00

5.1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีน

ก. ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตได้ดีในชั่วโมงที่ 74 ค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 7.73 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือร้อยละ 4.23 และปริมาณไนโตรเจนเหลือ 4.28 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 12.28 กรัมต่อลิตร

ข. ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตได้ดีในชั่วโมงที่ 74 ค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 5.78 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือร้อยละ 16.61 และปริมาณไนโตรเจนเหลือ 4.61 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 5.28 กรัมต่อลิตร

5.2 เชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

5.2.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วง มีลักษณะเป็นแท่งสั้น (ดังภาพที่ 14)

5.2.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด 2.12 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 สามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ได้ 8.48 และ 42.56 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชวัดได้ 5.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไลซีน

ก. ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตได้ดีในชั่วโมงที่ 74 ค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 4.97 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือร้อยละ 8.35 และปริมาณไนโตรเจนเหลือ 4.27 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 8.35 กรัมต่อลิตร

ข. ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตได้ดีในชั่วโมงที่ 74 ค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 5.50 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือร้อยละ 23.42 และปริมาณไนโตรเจนเหลือ 3.79 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 7.40 กรัมต่อลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อใช้ในการรักษาระดับพีเอชของการเพาะเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับที่คงที่
2. ควรทำการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตไลซีน โดยเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เป็นวัตถุดิบราคาถูก หาได้ง่าย เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต
3. ควรทำการศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน โดยเลือกแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัตถุดิบราคาถูก หาได้ง่าย อาทิเช่น กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง เป็นต้น เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต
4. ควรทำการศึกษาความสามารถในการผลิตไลซีนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น ยีสต์ รา หรือแบคทีเรียชนิดอื่น ว่าสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูง และมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมหรือไม่
5. เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้กระบวนการหมักแบบกะโดยใช้ฟลาสก์ ซึ่งอาจจะทำให้การผลิตไลซีนของเชื้อไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป อาจนำวิธีการหมักแบบอื่นๆมาใช้ในการผลิตไลซีน อาทิเช่น การใช้ถังหมัก เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

การย้อมสีแกรม (บัญญัติ, 2535)

การย่อมสีนี้ผู้นำมาใช้เป็นคนแรกคือ Has Christian Gram ในปี ค.ศ. 1884 ทำให้สามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ได้

สารเคมี

crystal violet

safranin

grame iodine solution

แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95

วิธีการ

1. เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ที่ล้างสะอาด ทิ้งให้แห้งแล้วผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์
2. หยดสี crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง
3. หยด grame iodine solution บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยเซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
4. นำสไลด์มาล้างสี ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 นานประมาณ 30 วินาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์

1. หนักเซลล์แห้ง

สารเคมี

น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาดเล็กที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 3 หลอด
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนลอยแช่แข็งเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาล ปริมาณโปรตีน และปริมาณไลซีน
4. เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและนำไปหมุนเหวี่ยงซ้ำอีก 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยน้ำทิ้ง นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
7. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

$$C_X \text{ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์แห้ง(กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดลอง(กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง(มล.)} \times 10^{-3}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ไนโตรเจนและไลซีน

1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วิธีการวิเคราะห์น้ำตาลมีมากมายหลายวิธี ทั้งวิธีการทางเคมี เอนไซม์หรือด้วย HPLC การเลือกวิธีการวิเคราะห์นั้นขึ้นกับอุปกรณ์เครื่องมือที่มีอยู่ และสารประกอบที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีผลต่อการวิเคราะห์หาน้ำตาลสำหรับในการทดลองนี้ใช้วิธี Somogyi –Nelson ในการวิเคราะห์

สารเคมี

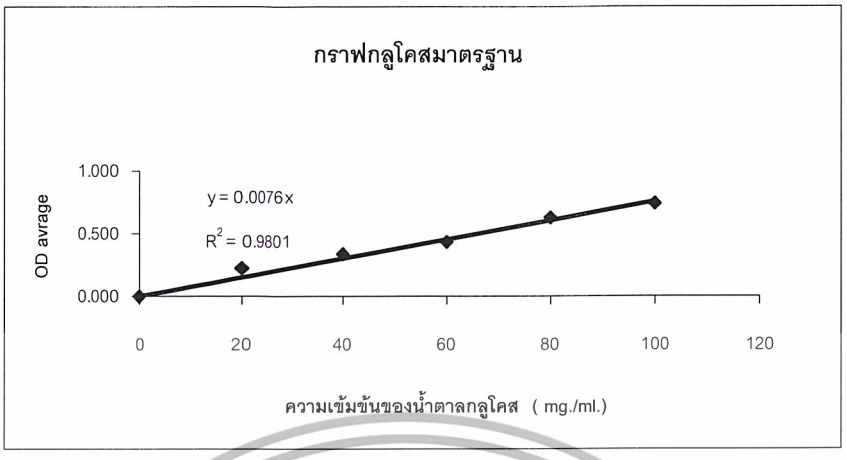
1. คอปเปอร์รีเอเจนต์
2. สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการทดลอง

1. เติมตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที
3. ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ
4. เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2 นาที สารละลายจะเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินเขียว
5. เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคส
8. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคส

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (g/L)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm.) X (อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน) X (1000)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวก ค1 : กราฟกลูโคสมาตรฐาน

2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีบิอูเรต (Biuret method)

สารเคมี

1. สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.0 นอร์แมล
2. สารละลายด่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$ $5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 25 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)
3. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยนาสารละลายโปรตีนของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

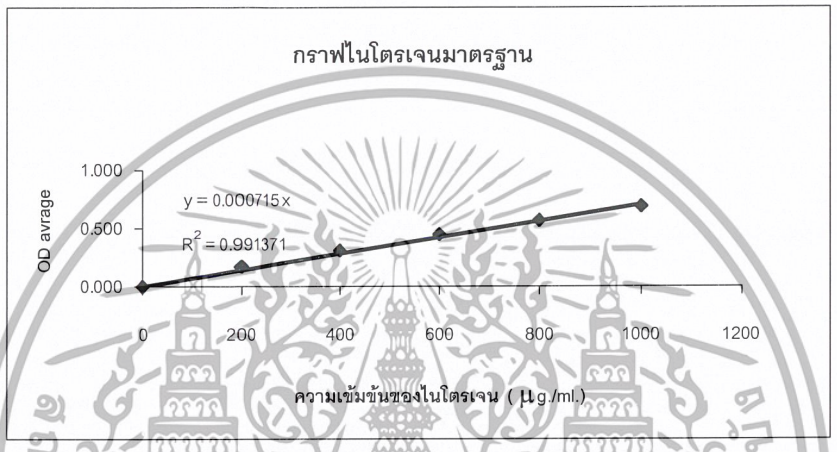
วิธีการ

1. ดูดตัวอย่างเจือจางที่มีความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ(กรณีของสารละลายมาตรฐานโปรตีนให้ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง)
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3.0 นอร์แมล ลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีแล้วทำให้เย็น
3. เติมสารละลาย $CuSO_4$ $5H_2O$ ความเข้มข้นร้อยละ 25 ลงในหลอดทอลองอีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกเอาตะกอนออกด้วยการหมุนเหวี่ยง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 555 นาโนเมตร X อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$



ภาพภาคผนวก ค2 : กราฟมาตรฐานสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)

3. วิเคราะห์ปริมาณไลซีนด้วยเครื่อง HPLC

สารเคมี

น้ำกลั่นเกรด HPLC

เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100

สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

กรดฟอสโฟริกเข้มข้น

สารละลายมาตรฐานไลซีน

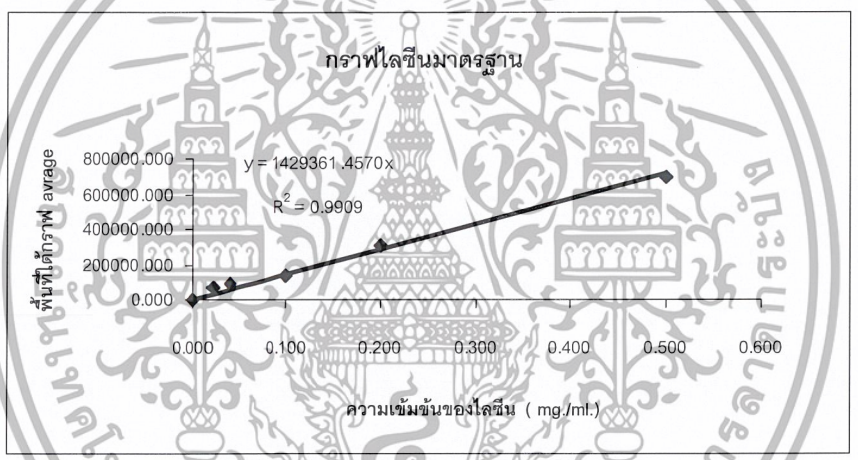
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. ทำการเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมทำ 3 ซ้ำ(กรณีของสารละลายมาตรฐานไลซีนให้ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง)

2. ทำการฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ (HPLC) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยควบคุมอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร

3. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการคำนวณปริมาณไลซีนที่มีในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานไลซีน



ภาพภาคผนวก ค3 : กราฟไลซีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ง1 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีนของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.95 b	6.95 b	6.96 b
80	12.28 a	12.28 a	12.27 a
100	0.98 d	0.99 d	1.00 d
120	1.18 c	1.18 c	1.17 c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง2 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	2.13 c	2.12 c	2.12 c
80	0.93 d	0.94 d	0.95 d
100	3.33 b	3.32 b	3.33 b
120	5.29 a	5.30 a	5.30 a

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	15.63 c	15.62 c	15.63 c
80	4.24 d	4.24 d	4.23 d
100	30.60 a	30.60 a	30.60 a
120	28.10 b	28.11 b	28.11 b

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง4 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	4.85 b	4.92 b	4.89 b
80	4.40 a	4.32 a	4.28 a
100	8.56 f	8.23 e	7.43 cd
120	8.11 e	7.33 c	7.59 d

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง5 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.48 c	6.40 c	6.35 bc
80	7.76 d	7.71 d	7.73 d
100	6.10 a	6.06 a	6.10 a
120	6.31 bc	6.31 bc	6.22 ab

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง6 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีนของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	4.85 b	4.85 b	4.84 b
80	5.28 a	5.28 a	5.27 a
100	1.77 c	1.76 c	1.78 c
120	1.42 d	1.43 d	1.42 d

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง7 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	7.19 a	7.19 a	7.19 a
80	5.19 d	5.19 d	5.19 d
100	6.28 b	6.27 b	6.28 b
120	5.64 c	5.63 c	5.64 c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง8 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	17.23 c	17.23 c	17.22 c
80	16.60 d	16.60 d	16.61 d
100	22.03 b	22.03 b	22.02 b
120	28.47 a	28.46 a	28.47 a

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง9 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.24 a	5.20 a	4.61 a
80	5.05 a	4.85 a	4.61 a
100	6.45 b	6.51 b	6.32 b
120	9.20 d	8.68 cd	8.03 c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง10 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Arthrobacter citreus* NRRL 1258

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.06 cd	5.99 bcd	6.13 d
80	5.73 ab	5.64 a	5.78 abc
100	5.72 ab	5.62 a	5.69 ab
120	5.63 a	5.89 abcd	5.60 a

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง11 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.06 b	6.06 b	6.07 b
80	8.34 a	8.34 a	8.35 a
100	0.27 d	0.27 d	0.26 d
120	1.08 c	1.08 c	1.09 c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง12 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.93 c	5.37 c	6.30 c
80	3.90 a	4.03 ab	5.13 bc
100	8.07 d	8.13 de	9.33 e
120	8.03 d	8.40 de	9.17 de

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง13 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	37.50 c	37.49 c	37.50 c
80	8.35 d	8.36 d	8.35 d
100	40.35 a	40.36 a	40.35 a
120	39.10 b	39.11 b	39.11 b

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง14 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.25 d	4.90 b	4.25 a
80	5.51 c	5.49 c	5.07 bc
100	7.00 e	6.35 d	5.46 c
120	7.41 e	6.30 d	5.21 bc

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง15 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.36 e	6.30 e	6.15 d
80	4.98 a	4.97 a	4.97 a
100	5.82 bc	5.82 bc	5.73 b
120	5.82 bc	5.83 bc	5.76 bc

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง16 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	3.79 c	3.79 c	3.80 c
80	2.68 d	2.67 d	2.68 d
100	7.39 a	7.39 a	7.39 a
120	4.72 b	4.72 b	4.72 b

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง17 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.70 abcd	6.53 abcde	7.90 cde
80	3.80 a	4.30 ab	5.73 abcd
100	5.10 abc	9.17 e	8.93 de
120	6.60 abcde	7.70 bcde	7.17 abcde

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง18 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	33.70 b	33.66 b	33.70 b
80	41.89 a	41.89 a	41.90 a
100	3.78 d	3.79 d	3.78 d
120	4.27 c	4.28 c	4.26 c

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางภาคผนวก ง19 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	7.11 def	6.94 de	5.58 b
80	7.38 ef	6.55 cd	5.75 b
100	6.98 def	4.26 a	3.79 a
120	7.55 f	6.14 bc	4.27 a

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ง20 ผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543

ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.05 f	5.95 ef	5.85 def
80	5.62 bcd	5.40 ab	5.31 a
100	5.74 cde	5.54 abc	5.50 abc
120	5.77 cde	5.59 abcd	5.56 abcd

หมายเหตุ ในแต่ละสดมภ์ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2535. จุลชีววิทยาเบื้องต้น. น. 53 – 63. โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และคณะ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 284 น.

สมใจ ศิริโภค และคณะ. 2540. การผลิตจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลซีน. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, กรุงเทพฯ. 28 น.

สมใจ ศิริโภค. 2544. จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. ศูนย์หนังสือกรุงเทพฯ, กรุงเทพฯ.

Anderson, R.F. and R.W. Jackson. 1958. Microbial process report : Essential amino acids in microbial protein. pp. 369-373.

Brigidi, P., D. Mattauzzi and F. Fava. 1988. Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 : 268-271.

Broer,S., L. Eggeling and R. Kramer. 1993. Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 316-321.

Colleo,N., J.G. Pan and J.M. Lebeault. 1992. Physiological aspects of L-lysine production :effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 259-269.

Coello,N., L. Brito and M.Nonus. 2000. Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage. Bioresource Biotechnol. 73 : 221-225.

Cremer,J.,L. Eggeling and H. Sahm. 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in by *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1746-1752.

Haidaris,C.G. and J.K. Bhattacharjee. 1977. High lysine excreting mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Technol. 55 :189-192.

Haidaris,C.G. and J.K. Bhattacharjee. 1978. Lysine production by thialysine-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Technol. 56 :189-192.

Hirose, Y. and H. Shibai. 1980. Amino acid fermentation. Biotechnol. Bioeng. 22 : 115-125.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hua, Q., C. Yang and K. Shimisu. 2000. Metabolic control analysis for lysine synthesis using *Corynebacterium glutamicum* and experimental verification. J. Biosci. Bioeng. 90 : 184-192.

Kawahara,Y., T. Nnakamura, Y. Yoshihara, S. Ikedo and H. Yoshii. 1990. Effect of glycine betaine on the sucrose catabolism of an L-lysine producing mutant of *Brevibacterium lactofermentum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 :340-343.

Kiss,R.D. and G. Stephanopoulos. 1992. Metabolic characterization of a L-lysine producing strain by continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 39: 565-574.

Mair, N.S. and E. Sharpe. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. USA: Waverly Press,Inc.

McPherson, A.T. 1966. World Protein Resource. Medical and Technical Publishing, Lancaster. 285 p.

Odunfa, S.A., S.A. Adeniran, O.D. Teniola, and J. Nordstrom. 2001. Evaluation of lysine and methionine production in some lactobacilli and yeasts from *Ogi*. International J. Food Microbiol. 63 : 159-163.

Schrumpf, B., L.Eggeling and H. Sahm. 1992. Isolation and prominent charactertics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium gultamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 566-571.

Shito, I. and K. Sano. 1969. Microbial production of L-lysine II. Production by mutants sensitive to threonine or methionine. Gen. Appl. Microbiol. 15 : 267-287.

Shivinka, J.,U. Viesturs and M. Rukliska. 1980. Yield regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Biotechnol. Bioeng. 26 : 897-912.

Umerie, S.C.,I.A. Ekwealor and I.O. Nwagbo. 2000. Lysine production by *Bacillus laterosporus* from various carbohydrates and seed meals. Bioresource technol. 75 : 249-252.

Vallino,J.J. and G. Stephanopoulos. 1993. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium gultamicum* during growth and lysine overproduction. Biotechnol. Bioeng. 41: 633-646.

http://www.2estrsa.co.za/products/info/lysine-info.htm

http://www.basf.de/en/corporate/innovationen/inardeit/biotech/thema.htm?id=v00-*j21OaV**bsf200

http://www.bio.winona.msus.edu/berg/ChemStructures/Lysine.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.biocatarta.com/pathfiles/lysinePathway.asp

http://www.bioscience.org/images/aminacid/lys3d.gif

http://dcwww.epflch/le/ICP3-PDF_Publications/PDF-2000/Electroanalysis_12_2000_811.pdf

http://www.ftns.wau.nl/micr%ApplMolGen/Chapter%2006A%20industrial%20biotechnology.pdf

http://www.gnc.com/health_notes/Concern/Genital_Herps.html

http://www.healthy.net/asp/templates/article.asp?Page Type=article&ID=1744

http://www.micro.magnet.fsusu.edu/aminacids/pages/lysine.html

http://www.opbs.okstate.edu/…/Chapter8/Cpt8Figs/THIAMINE.GIF

http://www.odu.edu/webroot/instr/sci/ppleban.nsf/files/aminoacids&proteins.pdf/$FILE/aminoacids&proteins.pdf

http://web.mit.edu/7.13/www.restricted/ProjectOverviews-2002.pdf

http://www.sciencenet.com.au/frames/profiles/positive/families/Micrococ/family.htm#species

http://www.thewayup.com/products/003.htm

http://www.uni-koeln.de/math-nat-ak/biochemie/kraemer/projekte/bacttran/pageglob.htm

http://www.zestrsa.co.za/products/info/lysine-info.htm

http://www.ziobio.com/ICN%20PDF/Molecular%20Biology/enzymes.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้