สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

T047319

นางสาวกนกวรรณ แดงค้ำคูณ
นายประชา บัวจันทร์
นางสาววันเพ็ญ แก้วนาเส็ง

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47319
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546
b.....
i.....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of carbon source for lysine production in *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

Miss Kanokwan Daengkhamkhun

Mr. Pracha Buajan

Miss Wanpen Keawnaseng

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

หัวข้อโครงงานพิเศษ อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

นักศึกษา นางสาวกนกวรรณ แดงค้ำคุณ

นายประชา บัวจันทร์

นางสาววันเพ็ญ แก้วนาเส็ง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

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 *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
นักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ แดงค้ำคุณ
	นายประชา บัวจันทร์
	นางสาววันเพ็ญ แก้วนาเส็ง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2545
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของกลูโคสและซูโครสเริ่มต้นต่าง ๆ คือที่ 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสและซูโครส 60 กรัมต่อลิตร *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ 6.68 และ 3.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดคือ 13.32 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร และ 10.13 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 100 กรัมต่อลิตร โดย *Corynebacterium glutamicum* ทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดหลังจากทำการหมักเป็นเวลา 74 ชั่วโมง พีเอชมีค่าลดลงจากพีเอชเริ่มต้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของกระบวนการหมัก และคงที่หลังจากทำการหมักไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 สามารถผลิตไลซีนได้สูงกว่า *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Effect of carbon source for lysine production in *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
Name	Miss Kanokwan Daengkhamkhun
	Mr. Pracha Buajan
	Miss Wanpen Keawnaseng
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2002
Special Project Advisor	Miss Marisa Jatupornpipat

Abstract

The effect of carbon source , glucose and sucrose , on the production of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 was studied in medium containing different level of glucose and sucrose (60 , 80 , 100 and 120 g/l). We observed that in *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 glucose and sucrose at 60 g/l concentration gave highest yield of lysine , 6.68 and 3.34 g/l respectively. In *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 , the highest yield of lysine was produced at 80 g/l of glucose and 100 g/l of sucrose , 13.32 g/l and 10.13 g/l respectively. The results indicated that both strains of *Corynebacterium glutamicum* can produce high yield of lysine at 74 hours after inoculation. At the beginning of fermentation process , pH decreased rapidly and it became steady at 24 hours after inoculation. In contrast , *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 can produce higher yield of lysine than *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330.

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 *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุก ๆ ท่านที่ให้คำปรึกษาและแสดงความคิดเห็นต่อการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาของคณะผู้วิจัยด้วยดีตลอดมาและขอขอบคุณ พี่น้องและเพื่อน ๆ ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวกนกวรรณ แดงค้าคุณ
นายประชา บัวจันทร์
นางสาววันเพ็ญ แก้วนาเส็ง
มีนาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไลซีน	5
2.2 กระบวนการผลิตไลซีน	11
2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีน	14
2.4 กลไกการสังเคราะห์ไลซีนโดยจุลินทรีย์	16
2.5 ข้อมูลทั่วไปของ *Corynebacterium glutamicum*	20
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย	21
2.7 ระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีน	30
2.8 กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัตถุดิบ	34
3.2 เชื้อจุลินทรีย์	34
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	34
3.4 สารเคมี	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 อุปกรณ์	34
3.6 วิธีการทดลอง	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปราย	
ก. *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330	39
1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	39
2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	40
3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	42
ข. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475	49
1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ	49
2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	50
3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	52
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	
ก. *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330	58
1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	58
2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	58
ข. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475	58
1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ	58
2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	63
ภาคผนวก ข เทคนิคทางจุลชีววิทยา	65
ภาคผนวก ค ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ	66
ภาคผนวก ง วิธีการวิเคราะห์	86
ภาคผนวก จ หลักการขั้นพื้นฐานของ HPLC	91
ภาคผนวก ฉ ตารางค่าพารามิเตอร์	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืช และแหล่งอาหารชนิดต่างๆ	7
2.	แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในจุลินทรีย์	8
3.	แสดงปริมาณวิตามินชนิดต่างๆ ที่พบในวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก	25
4.	ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง	43
5.	ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง	46
6.	ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง	53
7.	ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงสูตรโครงสร้างของไลซีน	5
2.	แสดงโครงสร้างสามมิติของไลซีน	6
3.	แสดงไลซีนที่เกาะอยู่บริเวณพื้นผิวของโปรตีนและเอนไซม์	6
4.	แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี	14
5.	แสดงวิถีการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*	18
6.	แสดงรูปร่างของ *Corynebacterium glutamicum*	21
7.	แสดงกลไกการดูดซึมไนโตรเจนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*	23
8.	แสดงโครงสร้างของไทอะมีน	26
9.	แสดงโครงสร้างของไบโอติน	26
10.	แสดงโครงสร้างของไทอะไลซีน	27
11.	แสดงอิทธิพลของพีเอชต่อความเข้มข้นของไลซีนที่สังเคราะห์จากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*	28
12.	แสดงความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวต่อการผลิตกรดอะมิโน	29
13.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	39
14.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15.	แสดงผลของกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ	44
16.	แสดงผลของซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ	47
17.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	49
18.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475	51
19.	แสดงผลของกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

20. แสดงผลของซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

แบคทีเรีย รา และสัตว์ชั้นต่ำต่าง ๆ สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ครบทุกชนิด ในขณะที่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียงบางชนิดเท่านั้น มีกรดอะมิโนประมาณ 10 ชนิด ที่มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไม่สามารถสังเคราะห์ได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ กรดอะมิโนเหล่านี้ ได้แก่ ไลซีน เมทไธโอนีน อาร์จินีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน ฮีสติดีน ทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน และวาลีน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จัดเป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของมนุษย์ หนู และสุกร ในสัตว์ปีกยังมีกรดอะมิโนจำเป็นเพิ่มมาอีก 2 ชนิด คือ ไกลซีน และกลูตามิค ความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นนี้เอง ทำให้คนต้องรับประทานโปรตีนที่มีคุณภาพดี คือ โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำเป็นมากเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย หากร่างกายได้รับกรดอะมิโนเหล่านี้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะทำให้ร่างกายไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร เนื่องจากการสร้างโปรตีน กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อ และเอนไซม์ต่าง ๆ เกิดได้ไม่เต็มที่ สำหรับสัตว์พวกโค กระบือ แพะ แกะ และม้า สามารถสร้างกรดอะมิโนจำเป็นขึ้นได้เอง โดยเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน หรือซีกัมและโคลอน ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารประกอบพวกไนโตรเจนในอาหารให้เป็นโปรตีน (ภาสกร , 2529 ; มนตรี , 2530)

ปัจจุบันการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี มีต้นทุนการผลิตอยู่ในระดับสูงกว่าการผลิตไลซีนโดยวิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูง โดยไลซีนที่ผลิตได้จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการนำไลซีนที่แบคทีเรียผลิตได้ มาใช้เพื่อผสมในอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ จึงต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ก่อน และผลิตออกมาในรูปแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวทำให้ไลซีนที่ได้มีราคาแพง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณไลซีนในอาหารสัตว์อาจทำได้โดยการผสมจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย หรือยีสต์ ที่มีปริมาณไลซีนในเซลล์สูงลงในอาหารโดยตรง (Sands and Hankin , 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบดังนี้ คือ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจนในบางกรณี นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตสารบางอย่าง ก็อาจจำเป็นต้องมีการเติมสารชนิดอื่น ๆ เพิ่มลงไปด้วย เช่น สารเริ่มต้น (precursor) สารชักนำ (inducer) สารยับยั้ง (inhibitor) บัฟเฟอร์ หรือสารกำจัดฟอง (สมใจ , 2544)

ดังนั้นโครงงานพิเศษฉบับนี้จึงมุ่งศึกษาถึง การผลิตไลซีนโดยวิธีการหมัก โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไลซีนได้สูง คือ *Corynebacterium glutamicum* โดยใช้กลูโคสและซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสูตรอาหารผลิตไลซีนจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการเตรียมกล้าเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไลซีน
2. ศึกษาสัณฐานวิทยาเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
3. ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน โดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 โดยใช้กระบวนการหมัก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เน้นการศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร และซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ต่อการผลิตไลซีน โดยการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อในรูป lyophilize มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เจริญ เก็บรักษาสำหรับเป็นกล้าเชื้อต่อไป

1.4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ทำการศึกษาลักษณะ รูปร่างของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำเชื้อข้อ 1.4.1 มาทำการย้อมสีแกรม

1.4.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี seed medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในการศึกษาครั้งต่อไป

1.4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ถ่ายเชื้อข้อ 1.4.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ทำการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเซลล์จากค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC)

1.4.5 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

1.4.5.1 ผลของกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 1.4.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi –Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.5.2 ผลของซูโครสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 1.4.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi –Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*
2. เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ในระดับอุตสาหกรรม

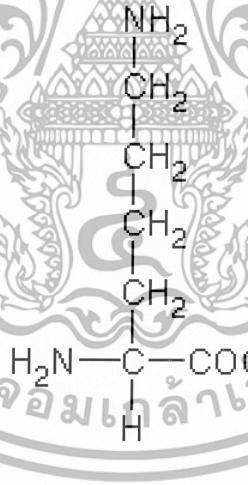
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับไลซีน

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

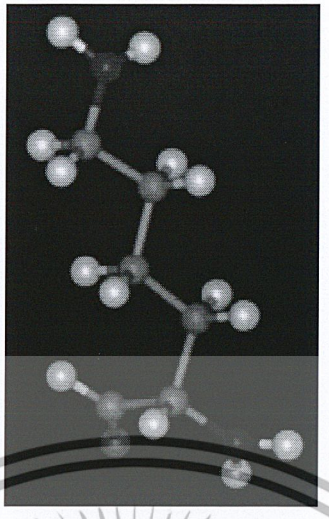
ไลซีน มีชื่อทั่วไป คือ 2 ,6 - ไดอะมิโนเฮกซาโนอิก แอซิด (2 ,6 - diaminohexanoic acid) หรือ แอลฟา-ซิกมา ไดอะมิโนคาโปรอิก แอซิด (alpha - sigma - diaminocarproic acid) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{14}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 146.19 ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำได้ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม และสามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิ 224 องศาเซลเซียส มีค่าไอโซอิเลคตริก (isoelectric) 9.82 ค่า pK_a 10.4 สูตรโครงสร้างของไลซีนแสดงดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 : แสดงสูตรโครงสร้างของไลซีน

ที่มา : http://bio.winona.msus.edu/berg/Structures.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 : แสดงโครงสร้างสามมิติของไลซีน

ที่มา : http://bio.winona.msus.edu/berg/Structures.htm

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไลซีนเป็นกรดอะมิโนซึ่งมีค่าพีเอช หรือประจุโดยรวมเป็นบวก และเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว ซึ่งพบได้ในบริเวณพื้นผิวของโปรตีนและเอนไซม์ (ดังภาพที่ 3) และในบางครั้งอาจปรากฏอยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ นอกจากนี้ ในโปรตีนจะมีปริมาณไลซีนอยู่ทั้งสิ้นร้อยละ 7 ของกรดอะมิโนทั้งหมด

ภาพที่ 3 : แสดงไลซีนที่เกาะอยู่บริเวณพื้นผิวของโปรตีนและเอนไซม์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แหล่งที่พบ

2.1.2.1 <u>แหล่งโปรตีนจากสัตว์</u> เช่น ปลา , เนื้อ , ไข่ และนม เป็นต้น (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในพืช และแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ

Constituent	Corn	Rice	Wheat	Soybean meal	Fish meal	Tankage	Dried skimmilk
Arginine	0.37	0.65	0.81	3.38	4.38	1.40	1.06
Histidine	0.22	0.18	0.38	1.12	1.24	2.05	0.78
Isoleucine	0.33	0.36	0.61	2.49	2.78	1.40	2.00
Leucine	0.95	0.62	0.96	3.48	4.48	5.74	3.09
Lysine	0.27	0.31	0.41	2.49	4.57	4.40	2.11
Methionine	0.18	0.18	0.19	0.63	1.75	0.76	0.91
Phynylalanine	0.42	0.38	0.72	2.20	2.26	0.78	1.73
Threonine	0.31	0.28	0.45	1.82	2.75	2.00	1.63
Tryptophane	0.09	0.13	0.24	0.76	0.68	0.61	0.46
Valine	0.43	0.5	0.69	2.45	3.03	4.18	2.29

ที่มา : Anderson and Jackson (1958)

2.1.2.2 <u>จุลินทรีย์</u> ได้แก่ แบคทีเรีย , ยีสต์ , สาหร่าย และรา เป็นต้น (ดังตารางที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในจุลินทรีย์

Organism	%N	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Shigella dysenteriae	-	7.5	1.0	3.0	4.7	4.1	0.5	2.6	2.7	0.5	3.6
Pseudomonas aeruginosa	-	4.6	0.9	4.0	4.5	6.3	0.5	3.2	2.2	0.5	3.6
Staphylococcus aureus 351	-	2.6	0.9	4.5	4.0	6.5	0.8	2.0	3.2	-	3.2
S. aureus 352	-	3.7	0.7	2.3	4.5	3.4	0.5	3.0	3.2	0.5	2.8
Streptococcus hemolyticus	-	6.0	1.2	2.8	4.5	6.0	0.4	2.6	3.8	0.5	3.0
51	-	-	-	4.8	4.0	-	0.6	-	4.5	0.4	4.0
S. hemolyticus 129	-	-	-	5.5	5.5	-	0.5	-	2.7	0.4	3.6
Gaffkya tetragena	6.3	3.7	1.5	4.6	5.7	6.0	1.3	3.1	3.7	-	5.0
Bacillus megaterium	10.08	3.3	1.7	5.6	5.9	5.2	1.1	2.8	3.8	0.5	5.2
Lactobacillus arabinosus	7.49	3.6	1.9	6.2	6.8	7.7	1.1	3.5	4.7	0.4	5.8
L. casei	9.74	3.1	1.5	4.9	5.1	4.6	1.0	2.7	3.3	0.3	4.8
L. pentosus	13.98	4.8	2.4	7.0	7.5	6.9	1.3	4.1	4.9	0.6	6.8
L.fermenti	10.64	6.8	1.7	5.8	6.6	3.7	1.3	3.4	4.4	0.2	5.8
Mycobacterium phlei	9.35	6.8	1.8	6.9	7.0	4.8	1.4	3.4	4.9	0.5	6.4
M. avium	10.06	7.4	0.5	-	10	6.2	11	5.8	4.9	2.5	6.4
M. tuberculosis	11.95	7.5	1.9	4.4	8.3	4.5	1.5	3.0	-	-	6.6
M. smegmatis	11.83	7.1	1.9	4.4	8.3	4.6	1.5	2.9	-	-	6.3
M. ranae	8.04	7.6	1.9	4.4	8.8	3.6	1.6	2.8	-	-	7.0
M. tuberculosis var bovis	11.81	7.7	2.1	4.4	8.9	3.9	3.9	3.2	-	-	6.7
M. tuberculosis var	12.9	5.0	2.4	6.0	6.0	4.2	5.0	5.6	1.3	-	9.3
hominis	-	4.0	1.8	6.0	4.5	6.7	3.4	7.5	5.5	-	9.3
Corynebacterium	-	3.1	3.3	6.0	4.3	7.1	2.7	4.5	5.5	1.2	5.3
diphtheriae	7.32	13	3.0	6.0	7.8	7.4	2.3	3.6	5.1	1.6	6.4
Nitrosomonas sp.	8.40	5.0	4.1	4.5	7.5	6.7	1.4	1.9	8.2	-	9.4
Brewers' yeast (debittered)	7.58	8.6	2.8	5.5	8.3	6.8	2.6	4.6	5.0	0.8	5.9
Brewers' yeast	8.3	5.0	1.4	4.9	6.1	6.0	0.8	3.5	4.6	-	5.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่พบในจุลินทรีย์ (ต่อ)

Organism	%N	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
Wood sugar yeast	8.5	4.9	1.9	-	-	-	-	-	-	1.0	-
Bakers' yeast	7.35	5.0	4.1	4.5	7.5	6.7	1.4	5.6	5.5	-	9.4
Yeast	7.3	5.5	1.3	-	-	8.5	-	-	-	1.0	-
Saccharomyces carlsbergensis	-	5.0	2.0	-	-	10	-	-	-	-	-
Aspergillus flavus	3.1	4.9	-	5.1	6.5	2.3	-	2.8	4.2	-	4.7
Chlorella pyrenoidosa	6.93	6.1	2.0	5.3	8.7	5.1	0.5	4.9	4.3	1.2	5.7
C. vulgaris	6.54	3.8	1.4	5.9	8.4	2.2	0.9	11	2.3	1.1	5.3
C. vulgaris	3.8	8.3	2.8	4.8	8.4	7.5	2.2	4.3	4.8	2.3	7.3
C. vulgaris	4.3	8.1	1.9	5.2	9.1	8.6	2.4	5.3	4.0	2.5	7.4
Gloeotrichia sp.	-	1.3	0.9	-	-	1.7	-	-	-	0.4	-
Macrocystis sp.	-	4.4	0.9	-	-	1.6	-	-	-	0.6	-
Lessoniopsis	-	1.6	0.7	-	-	6.5	-	-	-	2.2	-
Fucus sp.	-	0	0.6	-	-	6.1	-	-	-	0.6	-
Cystoseira sp.	-	0	2.5	-	-	3.4	-	-	-	0.9	-
Egregria sp.	-	0	2.4	-	-	0.3	-	-	-	1.0	-
Caulerpa sp.	-	3.0	1.8	-	-	0	-	-	-	2.2	-
Codium sp.	-	3.6	2.6	-	-	4.5	-	-	-	0.5	-
Phormidium sp.	2.65	4.6	2.2	-	3.1	0	-	2.1	-	0.2	8.9
Ulva sp.	2.04	3.8	0.7	-	7.8	0	-	4.3	-	0.4	7.0
Laminaria sp.	0.77	8.0	0.9	-	3.8	0	-	1.9	-	1.3	7.0
Sargassum sp.	1.38	4.0	1.9	-	0.4	4.5	-	0.6	-	1.7	8.6
Chondrus sp.	1.22	5.1	1.1	-	7.9	3.4	-	2.8	-	1.9	7.6

ที่มา : Anderson and Jackson (1958)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของไลซีน

2.1.3.1 <u>ด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์</u> มักจะใช้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกร เป็ด และไก่ โดยไลซีนจะช่วยให้ปริมาณกรดอะมิโนมีความสมดุลกับส่วนประกอบอื่น ๆ ในอาหารมากขึ้น ช่วยให้สัตว์มีการเจริญเติบโตดี และได้เนื้อที่มีคุณภาพดีขึ้น โดยสัตว์จะสามารถเปลี่ยนแปลงไลซีนไปเป็นโปรตีนในร่างกายได้ ซึ่งไลซีนที่ใช้ในอาหารสัตว์ร้อยละ 98 จะอยู่ในรูปของไลซีน-โมโนไฮโดรคลอไรด์ ปริมาณไลซีนที่ใช้ผสมลงในอาหารสัตว์จะประมาณร้อยละ 0.5 (Cruger and Cruger , 1989)

2.1.3.2 <u>ด้านอุตสาหกรรมอาหาร</u> ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหารพวกธัญพืช ที่เป็นอาหารของมนุษย์ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ซึ่งปกติจะมีไลซีนอยู่ในปริมาณต่ำ เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ไลซีนขึ้นเองได้ ดังนั้นร่างกายของมนุษย์จะได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นนี้ได้โดยผ่านทางอาหาร ซึ่งสิ่งมีชีวิตจะใช้ไลซีนที่อยู่ในรูปแอลเท่านั้น โดยไลซีนจะมีความสำคัญในการสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของร่างกายที่ประกอบกันเป็นกระดูก กระดูกอ่อน ผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยวิตามินซีจะเป็นตัวควบคุม การเปลี่ยนแปลงของไลซีนไปเป็นคอลลาเจนได้ (http://www.healthy.net)

นอกจากนี้ ไลซีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นคาร์นิทีน (carnitine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ผลิตขึ้นภายในตับ เกิดจากการที่ไลซีนถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ทรานอะมิเนส (transaminase) ภายในตับ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายนี้จะขึ้นอยู่กับวิตามินบี 6 วิตามินบี 3 วิตามินบี 2 วิตามินซี เหล็ก และกรดกลูตามิก (http://www.healthy.net) สามารถพบคาร์นิทีนได้ในกล้ามเนื้อ และอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ดังนั้นในคนที่รับประทานแต่ผักจะอ่อนแอ เนื่องจากในพืชมีกรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นไม่เพียงพอ ยิ่งไปกว่านั้นคาร์นิทีนยังมีความสำคัญในการเปลี่ยนไขมันไปเป็นพลังงานได้ เนื่องจากคาร์นิทีนทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งกรดไขมันภายในเซลล์ไปยังไมโทรคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงาน ซึ่งต้องอาศัยกรดไขมันเปลี่ยนไปเป็นพลังงาน และยังมีส่วนช่วยในการควบคุมกระบวนการสลายไขมันภายในหัวใจ และกล้ามเนื้อโครงกระดูก (http://www.thewayup.com) นอกจากไลซีนสามารถเปลี่ยนเป็นคาร์นิทีนได้แล้ว ยังมีส่วนช่วยเสริมประโยชน์ของคาร์นีทีนทางอ้อมอีกด้วย ไลซีนสามารถแตกตัวเป็นอะเซททิล โคเอนไซม์เอ (acetyl coenzyme A) ซึ่งนำไปใช้ในกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรต และสร้างพลังงานขึ้นมาได้ และยังสามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนพวกซิทรูลีน (citrulline) ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้มีความจำเป็นในกระบวนการสลายโปรตีนหากมีปริมาณไลซีนไม่เพียงพออาจจะทำให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.3 <u>ด้านอุตสาหกรรมยาและการแพทย์</u> สามารถใช้ไลซีนในรูปของสารอาหารบำรุงร่างกาย เช่น ใช้ผสมในน้ำเกลือเพื่อฉีดเข้าเส้นเลือด เพื่อใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความอยากอาหารในผู้ป่วยระยะพักฟื้น ใช้เป็นส่วนประกอบในยาบรรเทาปวด ลดไข้ และแก้อักเสบ โดยจะใช้ในรูปของอนุพันธ์ของไลซีน เช่น ไลซีนซาลิไซเลท (lysine salicylate)

จากการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ไลซีนสามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมของลำไส้ และยังช่วยขับแคลเซียมออกจากปัสสาวะอีกด้วย ดังนั้นหากมีการบริโภคไลซีนในปริมาณ 400-1,000 มิลลิกรัมต่อวัน ก็จะสามารถป้องกันและรักษากระดูกไม่ให้เกิดการผุพัง (http://www.thewayup.com)

นอกจากนั้น ไลซีนสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ในขณะที่อาร์จินีน (arginine) จะไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของไวรัส (http://www.thewayup.com) ดังนั้น คนที่เป็นโรคความดันต่ำ โรคเรื้อรังที่เกิดจากไวรัส โรคหืด ต่อมไทรอยด์อักเสบ โรคไต และโรคสมองพิการ (Parkinson's disease) ล้วนแต่เกิดจากการมีระดับของไลซีนในร่างกายต่ำทั้งสิ้น ไลซีนยังมีประโยชน์อื่น ๆ อีก อาทิเช่น ช่วยป้องกันหรือลดการเพิ่มจำนวนของไวรัส การเกิดโรคเริม การป้องกัน และรักษาโรคปวดกระดูก ช่วยในการรักษาอาการกระดูกบาดเจ็บ ช่วยทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น และสุขภาพดี ช่วยสร้างกล้ามเนื้อ (http://www.thewayup.com)

2.1.3.4 <u>ด้านอื่นๆ</u> ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการผลิตสารต่าง ๆ ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง และสามารถใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวได้ (Cruger and Cruger , 1989)

ส่วนโทษหรือความเป็นพิษของไลซีน ในขณะนี้ยังไม่มีการศึกษา แต่ส่วนใหญ่ไลซีนจะมีการนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์มาก เนื่องจากไลซีนมีผลทำให้ปริมาณโคเลสเตอรอลในสัตว์สูงขึ้น แต่จะไม่นิยมนำมาใช้ในมนุษย์ นอกจากนี้หากมีปริมาณไลซีนสูงในร่างกายอาจทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วงได้ แต่จะไม่ปรากฏอาการที่รุนแรง (http://www.zestrsa.co.za)

2.2 กระบวนการผลิตไลซีน

กระบวนการผลิตกรดอะมิโน แบ่งออกเป็น 4 วิธีการใหญ่ ๆ คือ

1. <u>การสกัด</u> (extraction) ใช้การไฮโดรไลเซท (hydrolysate) โดยการเติมน้ำลงในโปรตีนหรือวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น เคราติน (keratin) แล้วแยกทำให้บริสุทธิ์ กรดอะมิโนที่ได้จะอยู่ในรูปแอล (L-amino acid) ทั้งหมด

2. <u>การสังเคราะห์ทางเคมี</u> (chemical synthesis) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นต่าง ๆ ไปเป็นกรดอะมิโน ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์ achiral amino acid glycine หรือกรดอะมิโนในรูปราซิเมต (racemate) เช่น D,L-methionine แล้วทำการแยกกรดอะมิโนในรูปแอลออกมา ส่วนรูปดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ หรืออาจทำการผลิตกรดอะมิโนในรูปแอลโดยตรงจากการใช้สารตั้งต้นที่เป็นพวกโพรไครอล (prochiral) โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาไครอล (chiral catalyst)

3. <u>การหมัก</u> (fermentation) เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้ซูโครส หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดอะมิโนได้เฉพาะรูปแอล (L-amino acid)

4. <u>การใช้เอนไซม์</u> (enzymatic catalyst) เป็นการใช้เอนไซม์จำเพาะในการผลิตกรดอะมิโนโดยใช้สับสเตรทต่าง ๆ โดยอาจใช้ในรูปตัวเซลล์ หรือส่วนประกอบของเซลล์ก็ได้ และในกรณีที่การหมักเป็นแบบต่อเนื่องอาจใช้เอนไซม์ในรูปของเซลล์ตรึงได้ การผลิตจะขึ้นอยู่กับราคาและปริมาณของสับสเตรท รวมถึงกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ และกระบวนเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียตรงที่สับสเตรทที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง แต่จะสามารถผลิตกรดอะมิโนได้ทั้งในรูปแอลและดี (L,D-amino acid)

ส่วนกระบวนการผลิตไลซีนในระดับอุตสาหกรรม จะมีการผลิตไลซีนเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจะสามารถใช้ได้เฉพาะแอล-ไลซีนเท่านั้น ในปัจจุบันนิยมผลิตไลซีนโดยใช้กระบวนการหมักจากจุลินทรีย์ เพราะมีความเหมาะสมทางด้านเศรษฐศาสตร์มากกว่าไลซีนที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นแอล-ไลซีน ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ทันที ดังนั้น กระบวนการผลิตไลซีนจึงสามารถกระทำได้ 2 วิธีการ คือ

2.2.1 <u>การผลิตไลซีนโดยจุลินทรีย์</u> แบ่งได้เป็น 2 วิธีย่อย ๆ คือ

2.2.1.1 <u>การหมักโดยตรงหรือการใช้จุลินทรีย์ในการหมักแหล่งคาร์บอน</u> โดยทำการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับการเจริญ และการผลิตไลซีน โดยมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น การให้อากาศ อุณหภูมิ และพีเอช ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ เช่น *Brevibacterium lactofermentum* ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ *Brevibacterium flavum* ที่ใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น

2.2.1.2 <u>การใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์</u> โดยอาจใช้ในรูปของเซลล์อิสระ หรือเซลล์ที่ถูกตรึงก็ได้ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ เช่น *Cryptococcus laurentii* ซึ่งผลิตเอนไซม์ L - amino carprolactam hydrolase ที่ใช้ในการเปลี่ยนไลซีนจากรูปดีแอลไปเป็นแอล และ *Achromobacter obae* ซึ่งผลิตเอนไซม์ L - amino carprolactam racemase ที่ใช้ในการเปลี่ยนไลซีนจากรูปแอลกลับไปเป็นดีแอล

ประโยชน์ที่สำคัญของการหมักคือ สามารถใช้วัตถุดิบซึ่งหมายถึงน้ำตาลที่มีราคาถูกได้ และสามารถผลิตกรดอะมิโนในรูปแอล (L-amino acid) ได้ แต่มีข้อเสียอยู่ตรงที่ว่าไม่สามารถผลิตกรดอะมิโนรูปดี (D-amino acid) ได้ วิธีนี้จะใช้ในการผลิต MSG , L-glutamate , L-lysine HCL

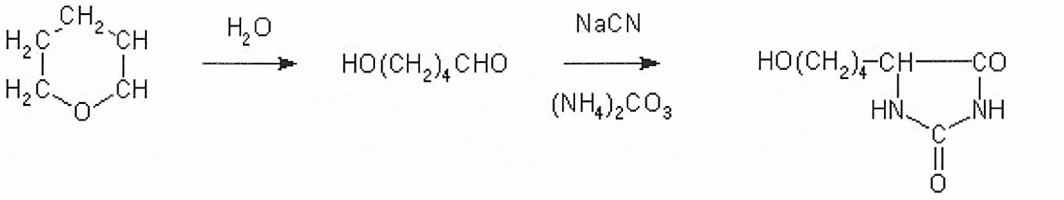
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ L-threonine รวมถึงกรดอะมิโนกลุ่มที่เป็นอะโรมาติก เช่น L-phenylalanine และ L-tryptophan ซึ่งในอดีตสามารถผลิตได้โดยการใช้เอนไซม์เท่านั้น

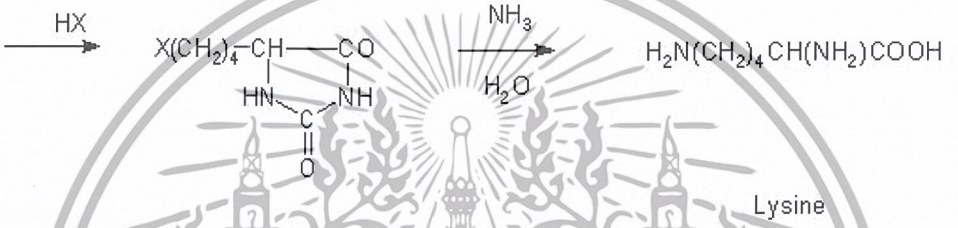
2.2.2 <u>การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมี</u> การผลิตไลซีนโดยวิธีการทางเคมีจะเริ่มจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เช่น piperidine , dihydropyran , caprolactam และ cyclohexone เป็นต้น ในกรณีที่ใช้ dihydropyran เป็นสารตั้งต้นในการผลิต จะเริ่มปฏิกิริยาโดยการเปิดวงแหวนของ dihydropyran ด้วยการดึงน้ำออก ได้ 5-hydroxyvaleraldehyde ซึ่งจะนำสารนี้มาทำปฏิกิริยากับโซเดียมไซยาไนด์หรือแอมโมเนียมคาร์บอเนต เกิดเป็น 5-(4-hydroxybutyl)hydantion เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนคลอไรด์ หรือไฮโดรเจนโบรไมด์ หมู่ไฮดรอกซิลของ hydantion จะถูกแทนที่ด้วยฮาโลเจน (halogen) จากนั้นฮาโลเจนจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะมิโนในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาพที่มีแอมโมเนีย ทำให้ได้ไลซีนเป็นผลผลิตสุดท้าย

เนื่องจากการผลิตโดยวิธีการทางเคมีไลซีนที่ได้จะเป็น ดีแอล-ไลซีน ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นแอล-ไลซีน โดยนำดีแอล-ไลซีนมาทำปฏิกิริยากับแอล-กลูตามิก D-camphoric หรือ D-homocysteinic เกิด diastereoisomer 2 ชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติการละลายที่แตกต่างกันจึงแยกจากกันได้โดยวิธีการตกผลึกแบบลำดับส่วน (fractional crystallization) โดยสารชนิดแรกคือ แอล-ไลซีน แอล-กลูตาเมท ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้โดยใช้สารละลายของน้ำกับแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกให้ได้เป็นแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ กับกรดกลูตามิก ส่วนดี-ไลซีนที่ได้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับด่างที่อุณหภูมิสูงได้ราซิเมต (racemate) ย้อนกลับไปใช้ในปฏิกิริยาเดิม (McPherson , 1966)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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



Lysine

ภาพที่ 4 : แสดงการผลิตไลซีนโดยกรรมวิธีทางเคมี

ที่มา : McPherson (1966)

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไลซีน

2.3.1 ยีสต์

การผลิตไลซีนโดยใช้ยีสต์ หรือ filamentous fungi มีการศึกษากันน้อยทั้งที่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis utilis* ให้ไลซีนสูงถึงประมาณร้อยละ 16-20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Haidaris and Bhattacharjee , 1978) โดยทั่วไปยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะมีไลซีนประมาณ 7.6 ±0.7 กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน (Nelson ; et. al. 1959)

2.3.2 รา

ได้มีการพัฒนานำรามาใช้ในการผลิต โดยทำการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของราที่มีการเจริญ และมีองค์ประกอบของโปรตีนสูง ซึ่งการเก็บเกี่ยวเซลล์ของราสามารถทำได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่น เพราะรามีขนาดใหญ่และยังสามารถใช้วัตถุดิบเพื่อการเจริญได้หลายชนิด เช่น แป้ง เซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลายชนิด เช่น รำข้าว ฟางข้าว เป็นต้น จึงทำให้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อราที่เลี้ยงในห้องทดลองมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าแบคทีเรียและยีสต์ ตลอดจนยังมีราอีกหลายชนิดซึ่งสร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งยากแก่การทำลาย ราที่มีความสามารถในการผลิตไลซีน ได้แก่ *Aspergillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการผลิตได้ เพราะเซลล์มีองค์ประกอบของโปรตีนสูง มีอัตราการเจริญสูงสามารถใช้วัตถุดิบหลายชนิดสำหรับการผลิตได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้เป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิต

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไลซีน ได้แก่ *Brevibacterium flavum* (Shito and Sano , 1969 ; Shvinka ; et. al. 1980) , *Brevibacterium lactofermentum* (Tosaka ; et. al. 1979 ; Kawahara ; et. al. 1990) , *Corynebacterium glutamicum* (Cremer ; et. al. 1991 ; Kiss and Stephanopoulos , 1991 ; Schrumpf ; et. al. 1992 ; Vallino and Stephanopoulos , 1993 ; Coello ; et . al. 1992 , 2000) , *Bacillus subtilis* (Leuchtenberger , 1996) , *Bacillus laterosporus* (Umerie ; et. al. 2000) , *Saccharomyces cerevisiae* (Haidaris and Bhattacharjee , 1977 , 1978) , *Lactobacilli* (Odunfa ; et. al. 2001)

Shvinka ; et. al. (1980) ศึกษากลไกการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพโดยเชื้อ *Brevibacterium flavum* แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กลูโคสและอะซิเตต พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.69 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส เมื่อใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.60 กรัมไลซีนต่อกรัมอะซิเตต

Coello ; et. al. (2000) ศึกษาการผลิตไลซีนด้วยกระบวนการหมักแบบกะโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 ใช้น้ำหมักปลา (fish silage) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และทำการหมักในเออเลนเมเยอร์ แบฟเฟิล ฟลาสก์ (erlenmayer baffled flasks) พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ 30 กรัมต่อลิตร

Odunfa ; et. al. (2001) คัดแยกเชื้อกลุ่ม Lactobacilli จากกระบวนการหมักโอกิ (ogi) มาใช้ในการหมักไลซีน จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม Lactobacilli จำนวนถึงร้อยละ 42 ของสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบสามารถผลิตไลซีนได้ ในขณะที่อีกร้อยละ 25 สามารถผลิตเมทไธโอนีนได้

Umerie ; et. al. (2000) คัดแยกเชื้อ *Bacillus laterosporus* จากดิน เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไลซีน โดยหมักแบบกะในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากธรรมชาติชนิดต่าง ๆ พบว่าสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุดประมาณ 5.67 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

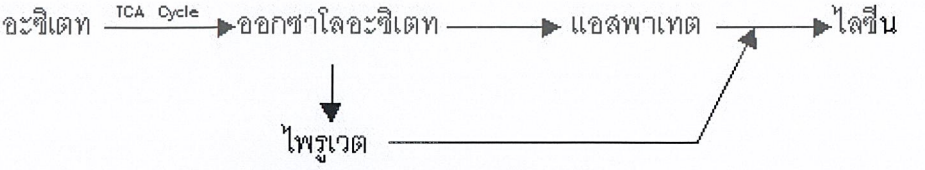
2.4 กลไกการสังเคราะห์ไลซีนโดยจุลินทรีย์ (Shvinka ; et. al. 1980)

การสังเคราะห์ไลซีนของแบคทีเรีย จัดเป็นกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ซึ่งประกอบด้วยวิถีพื้นฐาน 4 ชนิด คือ

1. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)

2. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway)

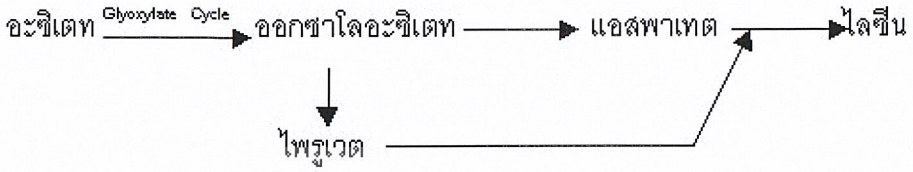
3. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนจากอะซิเตท โดยผ่านวิถีกรดไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle , TCA cycle)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4. กระบวนการสังเคราะห์ไลซีนจากอะซิเตท โดยผ่านวิถีไกลออกซิเลต (glyoxylate pathway)



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47319

2.4.1 <u>กลไกการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีน</u>

ภาพที่ 5 : แสดงวิถีการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum*

ที่มา : 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 (Broer ; et. al. 1993) จากเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่า เอนไซม์ที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ไลซีน ได้แก่ เอนไซม์แอสพาเทตไคเนส และเอนไซม์ไดไฮโดรไดพิโคลิเนต ซินเทส (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 (Hua ; et. al. 2000)

2.4.2 <u>การปรับปรุงพันธุ์</u>

การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตไลซีนจะทำโดยกระบวนการกลายพันธุ์เพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูงสุด (Haidaris and Bhattacharjee , 1977) โดยจะทำการกลายพันธุ์ที่ยีน *lys*C ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอสพาเทตไคเนสในสายพันธุ์ *Corynebacterium glutamicum* เป็นผลทำให้เอนไซม์แอสพาเทตไคเนสมีความคงทนต่อกระบวนการยับยั้งแบบย้อนกลับจากปริมาณไลซีน และทรีโอนีนที่เพิ่มสูงขึ้น (Cremer ; et. al. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ข้อมูลทั่วไปของ *Corynebacterium glutamicum*

2.5.1 อนุกรมวิธานของ *Corynebacterium glutamicum*

Superkingdom Bacteria

Kingdom Eubacteria

Phylum Firmicutes

Class Actinobacteria

Subclass Actinobacteridae

Order Actinomycetales

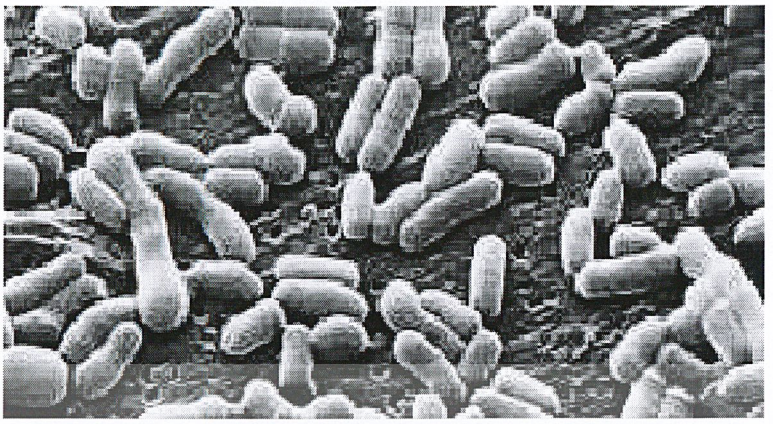
Suborder Corynebacterineae

Family Corynebacteriaceae

2.5.2 คุณสมบัติของ *Corynebacterium glutamicum*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ หรือวงรีขนาด 0.7- 1 x 1- 3 ไมโครเมตร พบได้ทั้งในลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มเซลล์ โดยในการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงระยะปรับตัว (lag phase) อาจพบเซลล์ที่มีการแตกติ่ง หรือมีรูปร่างยาวได้ แต่ในช่วงกลางหรือท้ายระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล (log phase) เซลล์จะมีรูปร่างสั้น เป็นวงรีหรือวงกลม ผิวโคโลนีเรียบ เป็นวงกลม มีลักษณะขุ่นหรืออาจเป็นมันเล็กน้อย ปกติจะมีสีเหลืองอ่อน และจะมีสีดำเมื่อเลี้ยงบน Tellurite medium เป็นแบคทีเรียกลุ่มแอโรบ (aerobe) และแฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 25-37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้เล็กน้อยที่ 42 องศาเซลเซียส ต้องการไบโอตินในการเจริญทุกสายพันธุ์ บางสายพันธุ์ยังต้องการไทอะมิน และ p-amino benzoic acid อีกด้วย ทุกสายพันธุ์สามารถผลิต L-glutamic acid ภายใต้สภาวะใช้อากาศได้เป็นจำนวนมาก ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-diaminopimelic acid , arabinose , galactose อีกทั้งพบ myolic acid สายสั้น ๆ และ peptidoglycan รูปร่างของ *Corynebacterium glutamicum* แสดงดังภาพที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 : แสดงรูปร่างของ *Corynebacterium glutamicum*

ที่มา : http://www.fz-juelich.de/ibt/amino/amino-fig-1.html

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลซีนของแบคทีเรีย

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์

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

Coello ; et. al. (1992) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณธาตุอาหารของการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อจำกัดปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ให้กับเชื้อทำให้ทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้คาร์บอนส่วนใหญ่ไปเพื่อการสร้างมวลเซลล์ไม่ได้ใช้ไปในการผลิตไลซีน แม้ว่าจะใช้อัตราการเจือจางที่ต่ำก็ตาม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

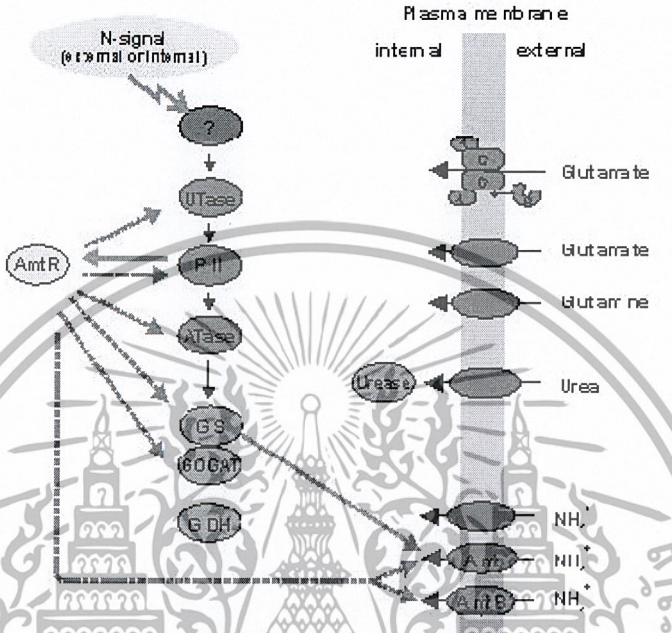
โดยทั่วไปจะนิยมใช้กำซแอมโมเนีย และเกลือแอมโมเนียม ตัวอย่างเช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) หรืออาจจะใช้ยูเรีย อาจจะมีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนพวก สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากเนื้อสัตว์ (meat extract) peptone , polypeptone , casein hydrolysate , soybean meal hydrolysate , blood meal , defatted cowpea , non-defatted cowpea , bambara groundnut , groundnut , cotton seed และ defatted soybean (Umerie ; et. al. 2000)

Haidaris and Bhattacharjee (1978) ศึกษาการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* AEC45 เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไทอะไลซีน พบว่าถ้ามีการเติมยูเรียลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการปลดปล่อยไลซีนลงสู่อาหารแต่ปริมาณผลผลิตโดยรวมจะไม่เพิ่มขึ้น การเติมสารสกัดจากยีสต์และไทอะไลซีน จะไม่มีผลต่อการปลดปล่อยไลซีนหรือการผลิตเลย ส่วนการเติมกรดแอลฟา-คีโตอะดิพิก (α- ketoadepic acid) และกรดแอลฟา-อะมิโนอะดิพิก (α- aminoadepic acid) จะทำให้ผลผลิตโดยรวมเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 25

Umerie ; et. al. (2000) ได้ศึกษาการผลิตไลซีนของเชื้อ *Bacillus laterosporus* โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะ ใช้ข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันหลายชนิด พบว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลผลิตไลซีนสูงที่สุด นอกจากนั้นยังแสดงให้เห็นว่าถั่วที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกไปก่อน (defatted) จะให้ผลดีกว่าถั่วที่ไม่ผ่านการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมัน (non-defatted) และพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มาจากธรรมชาติจะให้ไลซีนมากกว่าการใช้แอมโมนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์



ภาพที่ 7 : แสดงกลไกการดูดซึมไนโตรเจนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ;

→ การควบคุมการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน

⇢ การควบคุมระดับของการถอดรหัส

⟵ การเคลื่อนที่ของสาร

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

จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นถึงการนำเอาแหล่งไนโตรเจนมาใช้ โดยเป็นวิถีการดูดซึมแอมโมเนียม และเชื่อมต่อกับระบบควบคุมภายในเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ด้วยการส่งระบบสัญญาณต่อเนื่องกันไป (http://www.uni-koeln.de/math-nat fak/biochemie /kraemer /projekte/bacttran/pageglob.htm)

2.6.3 <u>แร่ธาตุ</u>

แร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งตามปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Mg , P , K , S , Ca และ Cl นอกจากนี้ก็ยังมี trace element ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น Co , Cu , Fe , Mn , Mo และ Zn แต่โดยทั่วไปมักจะพบ trace element เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่าง ๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว 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* พบว่าการจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อให้เกิดความสัมพันธ์ระหว่างการจำกัดปริมาณธาตุอาหารกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในการผลิตไลซีน ที่อัตราการเจริญของเชื้อต่ำสามารถผลิตไลซีนได้สูง และการผลิตไลซีนยังสามารถเกิดได้ดีในช่วงที่การเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจือจางต่ำอีกด้วย

2.6.4 <u>วิตามิน</u>

วิตามิน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่มันต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ จึงต้องมีการเติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้จากแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโน อาจมีการเติมวิตามินบางชนิด เช่น ไบโอติน ไทอะมีน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน และวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณวิตามินชนิดต่าง ๆ 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
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 (2544)

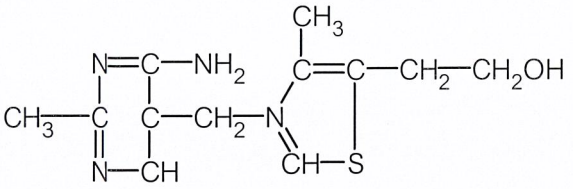
บริษัท BASF มีการใช้ถังหมักขนาดใหญ่ในการผลิตไลซีนจากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาล และมีการใช้วิตามินบี 2 (biotin) ที่สกัดจากเชื้อรา *Ashbya gossypii* ซึ่งทำให้บริษัท BASF สามารถผลิตไลซินที่บริสุทธิ์จากสารเคมีได้นั่นเอง (http://www.basf.de/en/produkte/biotech/biokatalyse/fermentation.htm?id=V00-*e2Ju.f*-bsf400)

วิตามินที่สำคัญในการผลิตไลซีน ได้แก่

2.6.4.1 ไทอะมีน (thiamine)

ไทอะมีนหรือวิตามินบี 1 ที่อยู่ในรูปของไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate ; TPP) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากโมเลกุลไพรูวิกแอซิด ให้ได้เป็น อะซิทัลดีไฮด์และแอลฟาคีโตแอซิดตัวอื่น โครงสร้างของไทอะมีนจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ไพริมิดีน (pyrimidine) และไทอะโซล (thaiazole) ดังภาพที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

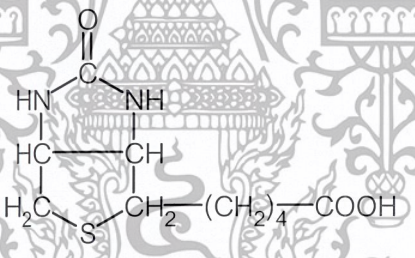


ภาพที่ 8 : แสดงโครงสร้างของไทอะมีน

ที่มา : Moore-Landecker (1996)

2.6.4.2 ไบโอติน (biotin)

ไบโอตินหรือวิตามินเอช (vitamin H) เป็นวิตามินชนิดหนึ่งในกลุ่มวิตามินบีรวม (vitamin B-complex) ไบโอตินจะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ในการย้ายคาร์บอนไดออกไซด์หรือหมู่คาร์บอกซิล เช่น เอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvatecarboxylase) อะเซทิลโคเอคาร์บอกซิเลส (acetyl co A carboxylase) และยูเรียคาร์บอกซิเลส (ureacarboxylase)



ภาพที่ 9 : แสดงโครงสร้างของไบโอติน

ที่มา : Moore-Landecker (1996)

ไบโอติน ในรูปที่สามารถทำงานได้ จะสร้างพันธะโควาเลนซ์กับอะมิโนไลซีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์คาร์บอกซิเลส โครงสร้างเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ซึ่งจะจับกับคาร์บอนไดออกไซด์หรือหมู่คาร์บอกซิลและย้ายไปสู่สับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5 สารชักนำและสารยับยั้งการผลิตไลซีน

ตามปกติแล้วสารชักนำมักจะเป็นสับสเตรทของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้ผลผลิตที่ต้องการสามารถซึมผ่านออกมานอกเซลล์ได้ง่ายขึ้น

ในการศึกษาของ Kawahara ; et. al. (1990) พบว่าการเติม glycine betaine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยให้อัตราการใช้ซูโครสของเชื้อ *Brevibacterium lactofermentum* มีมากขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีอุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียสได้และยังช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสได้อีกด้วย

ส่วนสารยับยั้งการผลิตไลซีนมักจะเป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างคล้ายกับไลซีน เช่น ไทอะไลซีน (s-2-aminoethyl-L-cysteine) และเอทไทโอนีน ซึ่งจะมีผลยับยั้งกระบวนการสร้างไลซีนโดยทำให้เกิดการยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) หรือทำให้เกิดการควบคุมแบบกดดันขึ้น (repression) (Sand and Hankin , 1976 ; Brigidi ; et. al. 1988)

ภาพที่ 10 : แสดงโครงสร้างของไทอะไลซีน

ที่มา : http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/hetgroups/indSLZ.html

2.6.6 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตมากเช่นกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่ในการผลิตไลซีนจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-33 องศาเซลเซียส (สมใจ และคณะ , 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 and Stephanopoulos , 1993) *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 (Kiss and Stephanopoulos , 1991) จะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักไว้ที่ 30 องศา

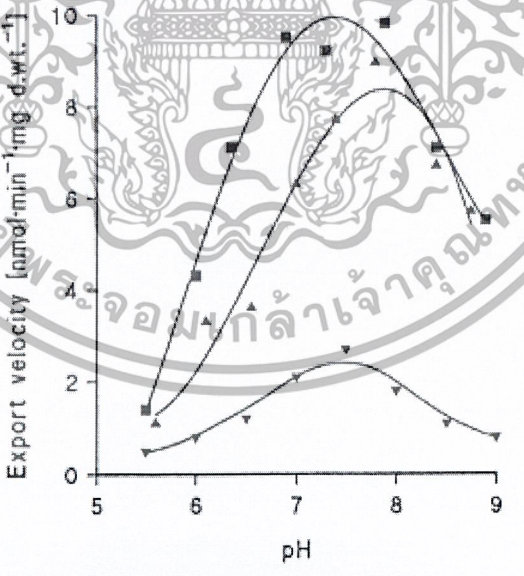
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Schrumpf ; et. al. 1992) ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

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

2.6.7 <u>พีเอช</u>

การผลิตจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวไม่ละลายน้ำ ถ้าพีเอชลดลง คาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้กรดหรือด่าง เช่น H_2SO_4 และ NaOH เติมลงไปในภายหลัง อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ฟอสเฟต ก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชได้ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอัตราส่วนที่สมดุลกันก็ช่วยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากสารพวกโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ด้วย



ภาพที่ 11 : แสดงถึงอิทธิพลของพีเอชต่อความเข้มข้นของไลซีนที่สังเคราะห์จากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ ■ , MH 20-22B ; ▲ , DG 52-5 ; ▼ , KK 25

ที่มา : Broer ; et. al. (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

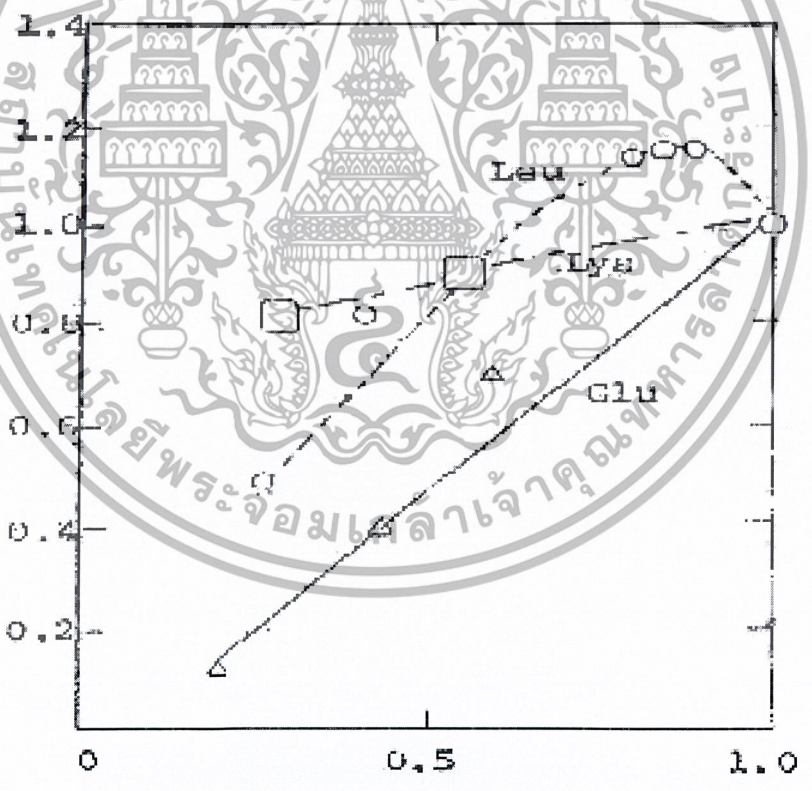
จากภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่า พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์จะอยู่ในช่วงที่เป็นด่าง (alkaline) ดังนั้น ความเข้มข้นของไลซีนที่ผลิตได้จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชนั่นเอง (Broer ; et. al. 1993)

ดังนั้น โดยทั่วไปแล้วการผลิตไลซีนจะควบคุมพีเอช 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)

2.6.8 การให้อากาศ

ออกซิเจน เป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลท์ และในการผลิตไลซีนก็เป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน

จากการศึกษาของ Hirose and Shibai (1980) รายงานว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวมีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 : แสดงความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวต่อการผลิตกรดอะมิโน
ที่มา : Cruger and Cruger (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นว่าการผลิตกรดอะมิโนในกลุ่มกลูตาเมต (กลูตามิก กลูตามีน โพรลีนและอาร์จีนีน) และแอสพาร์เตท (ไลซีน ทรีโอนีน และไอโซลิวซีน) จะลดลงเมื่ออัตราการหายใจของจุลินทรีย์ต่ออัตราการหายใจสูงสุดของจุลินทรีย์ (degree of oxygen satisfaction) เป็น 1

การสร้างกรดอะมิโนในกลุ่มกลูตาเมตและแอสพาร์เตทนั้น เปลี่ยนแปลงจากสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์ ดังนั้นถ้ามีออกซิเจนมากพอจะทำให้มีสารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์เกิดขึ้นจำนวนมาก เป็นผลให้มีการผลิตกรดอะมิโนในกลุ่มนี้จำนวนมากด้วย

ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์จะขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วความเข้มข้นสูง จะทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็ว และมีความต้องการออกซิเจนปริมาณสูง จนอาจเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมักได้

2.7 ระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลซีน

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

2.7.1 <u>กระบวนการหมักแบบชุด</u> (batch fermentation) (สาโรจน์ และคณะ , 2544)

การเพาะเลี้ยงแบบชุด (batch culture) หมายถึงการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงที่กำหนดปริมาตรเอาไว้แน่นอนในระยะเวลาที่เหมาะสม จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่กำหนดดังกล่าว ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์วิธีนี้ถือเป็นระบบปิด คือ มีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ โดยที่อัตราการเติบโตจะลดลงเรื่อย ๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากขาดแคลนอาหารและจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของของเสียและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จึงถือว่าการเพาะเลี้ยงแบบนี้ระบบจะมีลักษณะไม่คงที่ โดยมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (transient state) และโดยทั่วไปสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบนี้ได้เป็น 6 ระยะ คือ 1. ระยะปรับตัว 2. ระยะการเติบโตเร่ง 3. ระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล 4. ระยะการเติบโตลด 5. ระยะการเติบโตคงที่ 6. ระยะการเติบโตเสื่อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านระยะปรับตัวไปแล้ว และเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ได้ในระยะการเจริญเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลจะเริ่มลดลง โดยที่ปริมาณของจุลินทรีย์จะมากที่สุดเมื่อถึงระยะการเติบโตคงที่ และจะลดลงในระยะการเติบโตเสื่อม เนื่องจากมีการย่อยตัวเอง (autolysis) เกิดขึ้น

Vallino and Stephanopoulos (1993) ใช้กระบวนการหมักแบบกะในการศึกษาเมแทบอลิซึมของ *Corynebacterium glutamicum* ทั้งในการเจริญเติบโตและการผลิตไลซีนให้ได้ปริมาณสูง โดยใช้ถังหมักขนาด 15 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส การให้อากาศที่ 10 ลิตรต่อนาที (1 vvm) และพีเอชที่ 7.0

Coello ; et. al. (2000) ได้ศึกษาการผลิตไลซีนด้วยกระบวนการหมักแบบกะโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 ใช้น้ำหมักปลา (fish silage) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และทำการหมักในเออเลนเมเยอร์ แบฟเฟิล ฟลาสก์ (erlenmayer baffled flasks) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ 30 กรัมต่อลิตร ผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นสารตั้งต้น

Umerie ; et. al. (2000) ใช้กระบวนการหมักแบบกะในการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Bacillus laterosporus* ที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ทำการหมักในเออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ (erlenmayer flasks) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าข้างฟ่างจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณไลซีนสูงที่สุดคือ 30 กรัมต่อลิตร และทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตไลซีน โดยใช้ข้าวฟ่างเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตไลซีนสูงสุดคือ 5.67 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าผลผลิตที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกก่อนจะสูงกว่าที่ยังไม่ผ่านการสกัดน้ำมันออก หรือการใช้แหล่งไนโตรเจนสังเคราะห์คือ $(NH_4)_2SO_4$

2.7.2 <u>กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง</u> (continuous fermentation)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เป็นระบบที่มีการใส่วัตถุดิบและอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ในขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลาเช่นเดียวกัน ระยะการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียลของจุลินทรีย์ ในการเพาะเลี้ยงแบบชุดสามารถดำเนินต่อไปได้อีก ถ้าหากมีการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ที่เหมาะสม “สถานะคงตัว” (steady state) จะเกิดขึ้นได้ เมื่อปริมาณของเซลล์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่สมดุลกับปริมาณของเซลล์ที่ไหลออกจากถัง จึงเรียกเทคนิคการหมักแบบนี้ว่า การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และจัดว่าเป็นระบบที่ต้องการความปราศจากเชื้อที่สูง

Kiss and Stephanopoulos (1991) ใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในการศึกษาลักษณะของเมตาบอลิซึมของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 โดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการควบคุมปริมาณสับสเตรท (chemostat) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชที่ 7.0 การให้อากาศที่ 10 ลิตรต่อนาที (1 vvm)

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

2.8 กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต

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

การวัดปริมาณไลซีนในตัวอย่างทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีการทางเคมี และวิธีการที่ใช้จุลินทรีย์ในการวิเคราะห์ โดยปกติมักวิเคราะห์ปริมาณไลซีนโดยการใช้จุลินทรีย์ เพราะไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มากนัก และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ประจำวันได้ จุลินทรีย์ที่ใช้คือ แบคทีเรีย ซึ่งจะมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Lactic acid-producing bacteria โดยการประมาณค่ากรดอะมิโนโดยแบคทีเรียประเภทนี้ จะใช้เชื้อ *Streptococcus fecalis* และ *Leuconostoc mesenteroides* P-60 ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ นอกจากจะใช้แบคทีเรียในการหาปริมาณกรดอะมิโนเพื่อหา protein quality แล้ว ยังสามารถใช้ในการหาปริมาณวิตามินได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* คือ กลูโคส (Difco) และ ซูโครส (Difco)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียผลิตไลซีน ได้แก่ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 จาก Northern Regional Research Centre , U.S.A. และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 จาก American Type Culture Collection , U.S.A. ในรูปเซลล์แช่เข็งแบบแห้ง (lyophilize)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 Nutrient broth สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ

3.3.2 Nutrient agar สำหรับการเก็บรักษากล้าเชื้อ

3.3.3 Seed medium สำหรับการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.3.4 Lysine production medium สำหรับการหมัก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียม แสดงในภาคผนวก ฉ

3.4 สารเคมี

สารเคมีและวิธีการเตรียมที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน แสดงในภาคผนวก ง

3.5 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองรวมถึงรุ่นและบริษัทที่ผลิตแสดงมีดังต่อไปนี้

1. Incubator : model T490181 , Binder control E2
2. Orbital Shaker : model FT01/156 , Sanyo Gallenkamp PLC , UK.
3. Autoclave : model A052542 , Astell Scientific , England
5. Spectrophotometer : model 6405 UV/VIS , number 1259 , JENWAY , UK.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Laminar Air Flow : "ISSCO" Laminar flow model HS123 , Dryer 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.

3.6 วิธีการทดลอง

ก. *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อในรูป lyophilize มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เจริญ เก็บรักษาสำหรับเป็นกล้าเชื้อต่อไป

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ทำการศึกษาลักษณะ รูปร่างของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำเชื้อข้อ 1 มาทำการย้อมสีแกรม

3. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี seed medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในการศึกษาครั้งต่อไป

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ทำการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเซลล์จากค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

5.1 ผลของกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

5.2 ผลของซูโครสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

ข. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อในรูป lyophilize มาทำการเพาะเลี้ยงใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient agar เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เจริญ เก็บรักษาสำหรับเป็นกล้าเชื้อต่อไป

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการศึกษาลักษณะ รูปร่างของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำเชื้อข้อ 1 มาทำการย้อมสีแกรม

3. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 มาทำการเพิ่มปริมาณในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี seed medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในการศึกษาครั้งต่อไป

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ทำการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเซลล์จากค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC)

5. การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

5.1 ผลของกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

5.2 ผลของซูโครสเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตไลซีน

ถ่ายเชื้อข้อ 3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์อาหาร lysine production medium (ปริมาตร 135 มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ที่เหลือโดยวิธี Somogyi–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nelson ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือโดยวิธีบิอูเรต (Biuret) และปริมาณไลซีนด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

ก. *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 (จาก Northern Regional Research Centre , U.S.A.) ในอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ มีทั้งที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และเกาะกันเป็นกลุ่มเซลล์ ติดสีแกรมบวก ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (ดังภาพที่ 13)

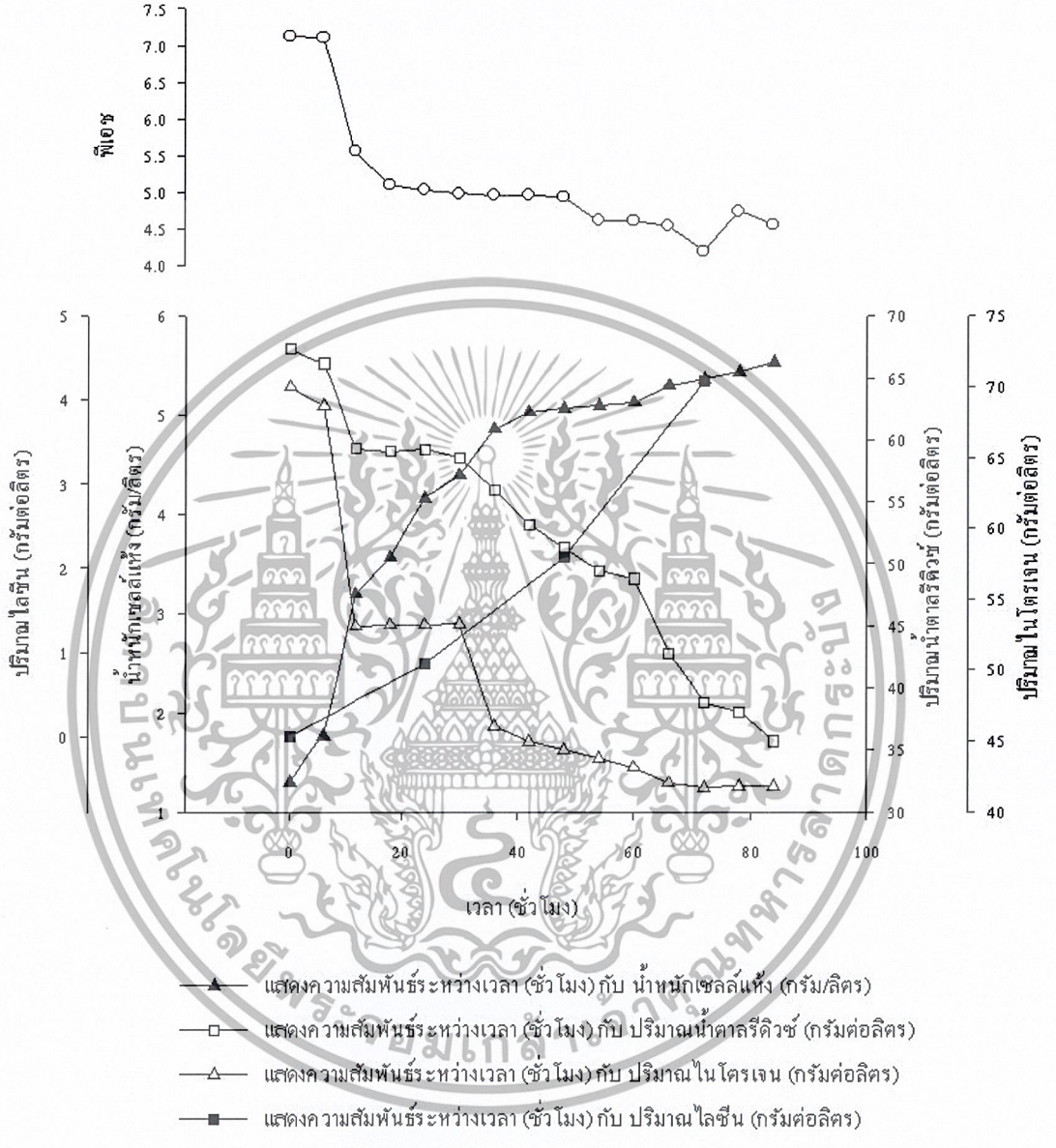
ภาพที่ 13 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ (ภาพที่ 14) พบว่า เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเติบโตเร่ง (log phase) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และจะมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเชื้อจะมีการใช้กลูโคสและไนโตรเจนไปพร้อมกับการเจริญเติบโต ทำให้กลูโคสและไนโตรเจนมีปริมาณลดลง ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง เชื้อจะนำกลูโคสและไนโตรเจนส่วนใหญ่ไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ มากกว่าใช้ในการผลิตไลซีน เนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อเข้าสู่ระยะการเติบโตเร่ง จึงมีความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตสูง ทำให้ปริมาณไลซีนในช่วงแรกมีค่าค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ ความต้องการสารอาหารลดต่ำลง กลูโคสและไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้ในการผลิตไลซีน ทำให้ไลซีนมีปริมาณสูงขึ้น โดยปริมาณไลซีนที่เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลผลิตไลซีนจากน้ำตาลกลูโคส ($Y_{P/S}$) มีค่าเท่ากับ 0.15 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส สำหรับค่าพีเอช พบว่ามีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อมีการผลิตสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นกรดออกมา ในช่วงที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต เพื่อช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี ซึ่งส่งผลให้พีเอชในน้ำหมักมีค่าลดลง และพีเอชจะเริ่มมีค่าคงที่ หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.6-5.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณของไลซีน ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

3.1 ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคส

จากการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ใน lysine production medium ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก ค) และปริมาณไลซีนที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่ลดลง การใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจะผลิตไลซีนได้สูงสุด (6.68 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.21 , 1.62 และ 0.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ โดยการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (6.97 กรัมต่อลิตร) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (3.83 , 3.67 และ 3.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นกลูโคส เริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.77) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 19.19 , 35.77 และ 10.53 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่น้อยที่สุด (3.52 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.50 , 6.54 และ 6.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าพีเอชมีค่าสูงสุด (5.24) เมื่อใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร (5.10) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (5.21 และ 5.22 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นใน lysine production medium มีผลต่อการผลิตไลซีน การผลิตมวลชีวภาพ รวมถึงการใช้กลูโคสและไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

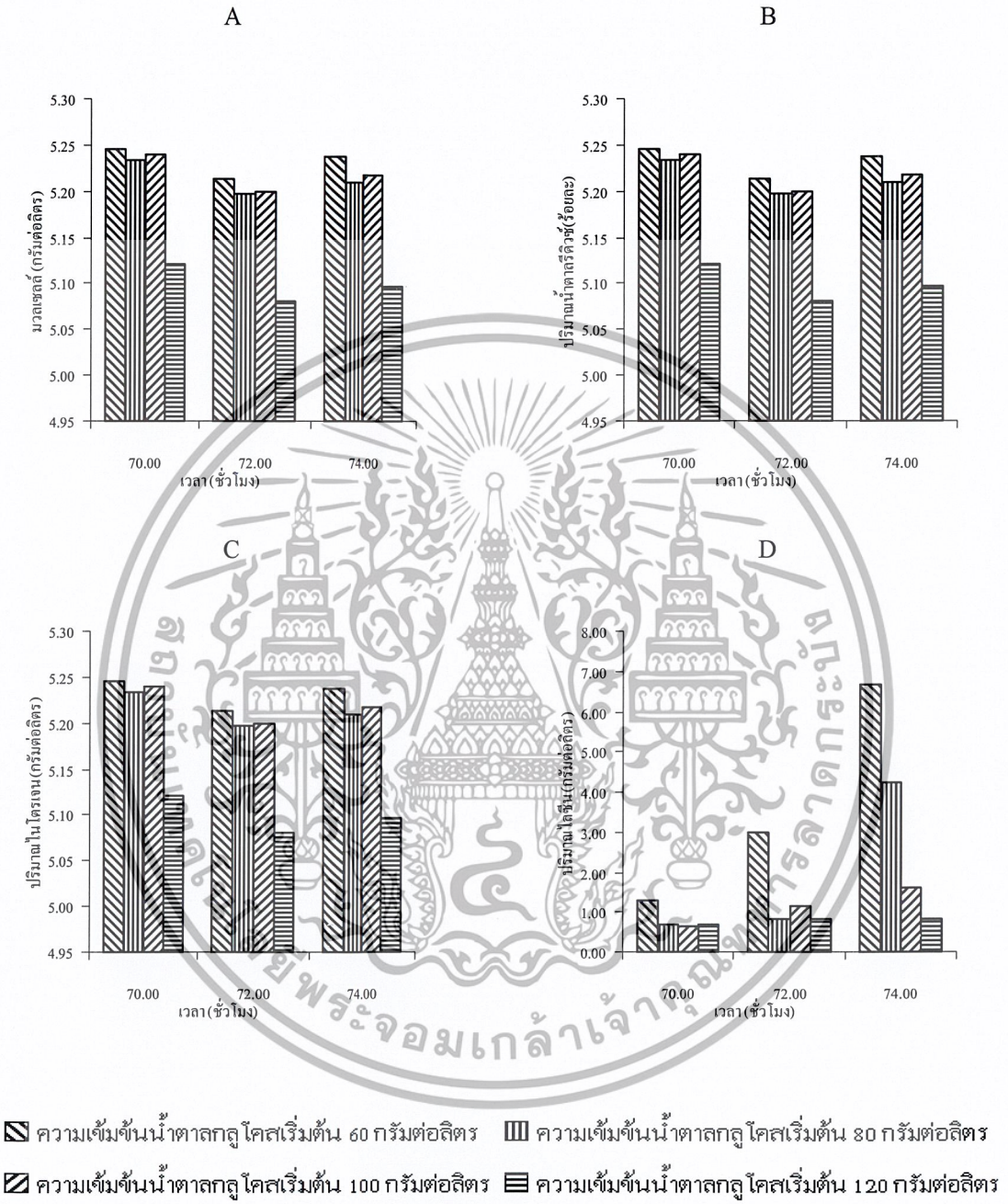
ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ถึงแม้ว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร เชื้อจะสามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูง และใช้กลูโคสได้ดี แต่ความสามารถในการผลิตไลซีนและการใช้ไนโตรเจนต่ำ อาจสรุปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสสูง ๆ กลูโคสส่วนใหญ่จะถูกนำใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตมวลชีวภาพ มากกว่าเพื่อการผลิตไลซีน ซึ่งในการทดลองนี้จะมุ่งเน้นถึงผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน ดังนั้นระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 60 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 4 : ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	6.68a	3.83c	19.19f	3.52g	5.24ab
80	4.21b	3.67cd	35.77c	4.50e	5.21abc
100	1.62d	3.60cd	10.53i	6.54d	5.22abc
120	0.84h	6.97a	0.77l	6.52d	5.10de

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 : แสดงผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครส

จากการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ใน lysine production medium ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก ค) และปริมาณไลซีนที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ลดลง การใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจะผลิตไลซีนได้สูงสุด (3.34 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (2.47 , 2.28 และ 2.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ โดยการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (11.17 กรัมต่อลิตร) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (6.53 , 7.37 และ 6.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นซูโครส เริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.17) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการ ใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 100 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 3.04 , 7.10 และ 2.09 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่น้อยที่สุด (3.25 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (3.48 , 3.44 และ 4.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าพีเอชมีค่าสูงสุด (5.18) เมื่อใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.00 , 5.07 และ 5.01) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นใน lysine production medium มีผลต่อการผลิตไลซีน การผลิตมวลชีวภาพ รวมถึงการใช้ซูโครสและไนโตรเจนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 เช่นเดียวกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ถึงแม้ว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร เชื้อจะสามารถผลิตมวลชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

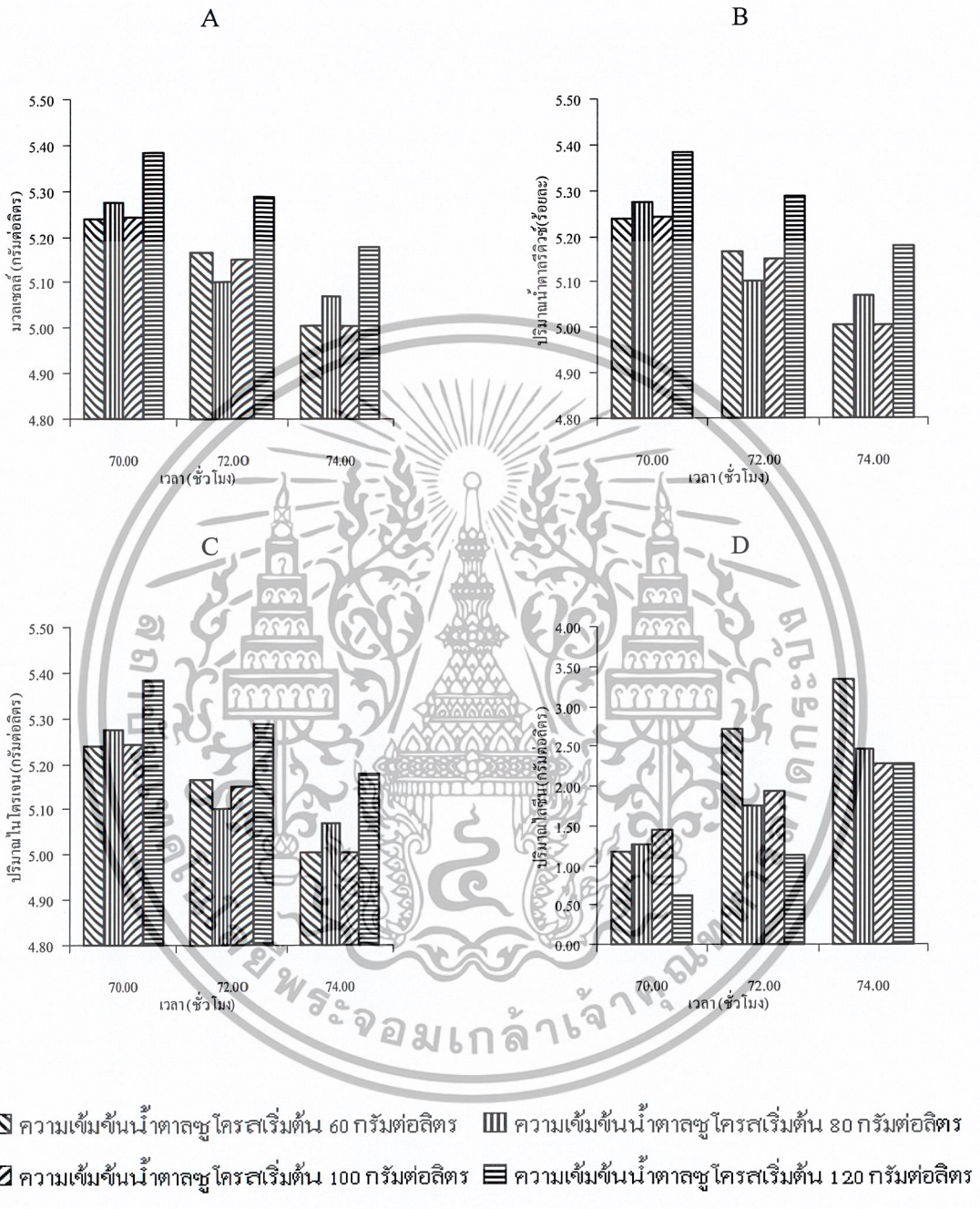
ได้สูง และใช้ซูโครสได้ดี แต่มีความสามารถในการผลิตไลซีนและการใช้ไนโตรเจนต่ำ ดังนั้นระดับความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 60 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 5 : ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	3.34a	6.53cd	3.04h	3.25h	5.00f
80	2.47c	7.37c	7.10c	3.48g	5.07ef
100	2.28d	6.97cd	2.09i	3.44g	5.01f
120	2.28e	11.17a	0.17k	4.67d	5.18cd

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่16 : แสดงผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Coello et. al. (1992) ซึ่งศึกษาผลของการจำกัดปริมาณธาตุอาหารกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่า ที่อัตราการเจริญของเชื้อต่ำ จะสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 (จาก American Type Culture Collection , U.S.A.) ในอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยการย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535) พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ กระจายตัวอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว และติดสีแกรมบวก ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ใน Bergey's manual of systematic bacteriology (ดังภาพที่ 17)

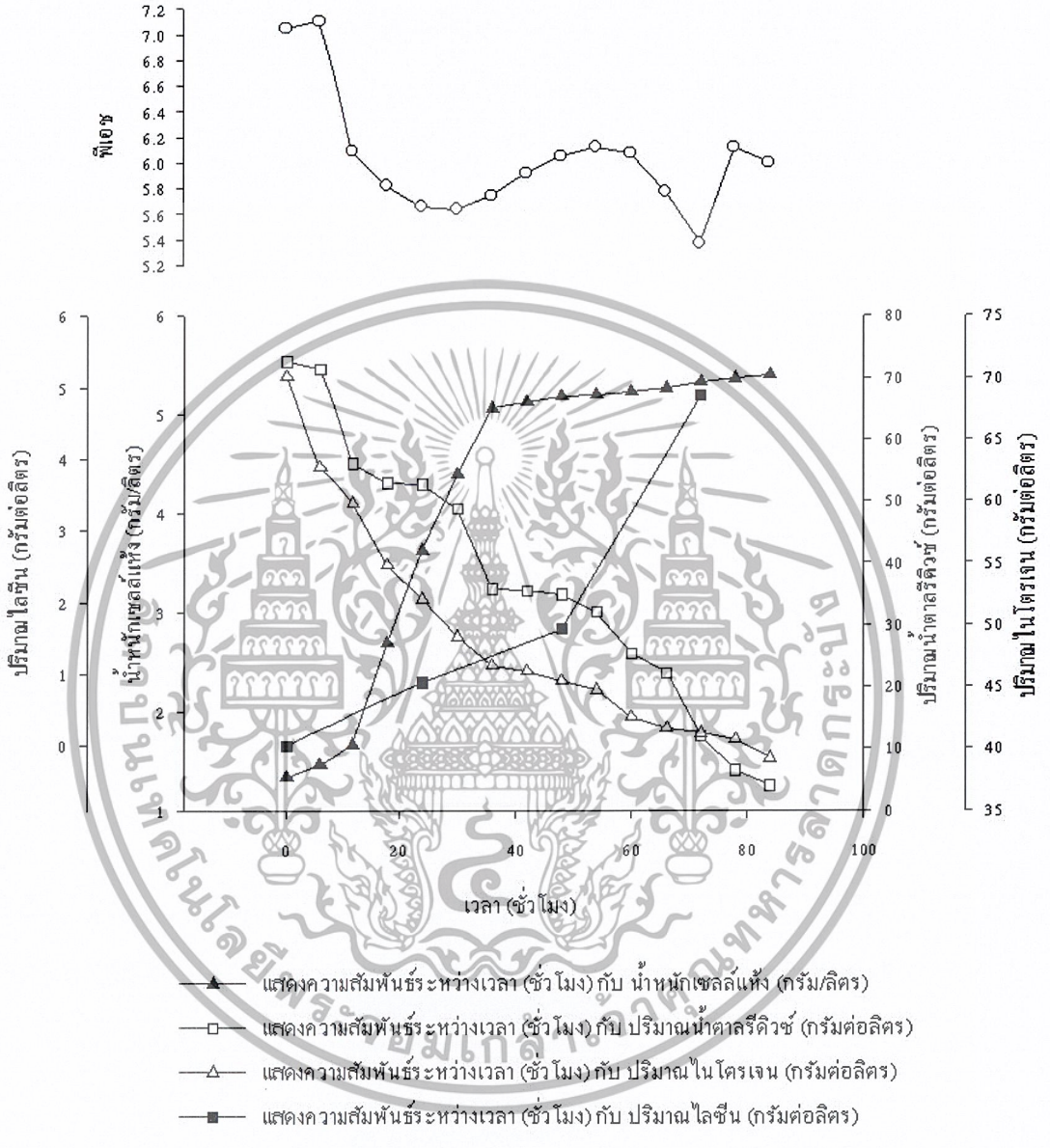
ภาพที่ 17 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน พบว่า เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเติบโตเร่ง (log phase) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และจะมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเชื้อจะมีการใช้กลูโคสและไนโตรเจนไปพร้อมกับการเจริญเติบโต เป็นผลให้กลูโคสและไนโตรเจนมีปริมาณลดลง ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง เชื้อจะนำกลูโคสและไนโตรเจนส่วนใหญ่ไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์มากกว่าใช้ในการผลิตไลซีน ทำให้ปริมาณไลซีนในช่วงแรกมีค่าค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อเข้าสู่ระยะการเติบโตเร่ง จึงมีความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตสูง แต่เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ ความต้องการสารอาหารลดต่ำลง กลูโคสและไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้ในการผลิตไลซีน ทำให้ไลซีนมีปริมาณสูงขึ้น โดยปริมาณไลซีนที่เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร ผลผลิตไลซีนจากน้ำตาลกลูโคส ($Y_{P/S}$) มีค่าเท่ากับ 0.08 กรัมไลซีนต่อกรัมกลูโคส (ตารางภาคผนวก ค) สำหรับค่าพีเอช พบว่ามีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อมีการผลิตสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นกรดออกมา ในช่วงที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต เพื่อช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี ซึ่งส่งผลให้พีเอชในน้ำหมักมีค่าลดลง โดยค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.6-6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 18 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณไลซีน ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

3.1 ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคส

จากการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ใน lysine production medium ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตไลซีน พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก ค) และเมื่อใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เชื้อจะผลิตไลซีนได้สูงสุด (13.32 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.79 , 0.89 และ 3.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ความเข้มข้นของกลูโคสมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ โดยการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 และ 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (5.53 กรัมต่อลิตร) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 และ 100 กรัมต่อลิตร (4.47 และ 0.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (ร้อยละ 4.77) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับ ความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 18.05 , 42.76 และ 56.00 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่น้อยที่สุด (3.26 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับ ความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (3.53 , 6.06 และ 5.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าพีเอชมีค่าสูงสุด (7.83) เมื่อใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.57 , 5.83 และ 5.87 ตามลำดับ) (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นใน lysine production medium มีผลต่อการผลิตไลซีน การผลิตมวลชีวภาพ รวมถึงการใช้กลูโคสและไนโตรเจน โดยพบว่าการใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 เพราะนอกจากจะให้ผลผลิตไลซีนสูงแล้ว ยังให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

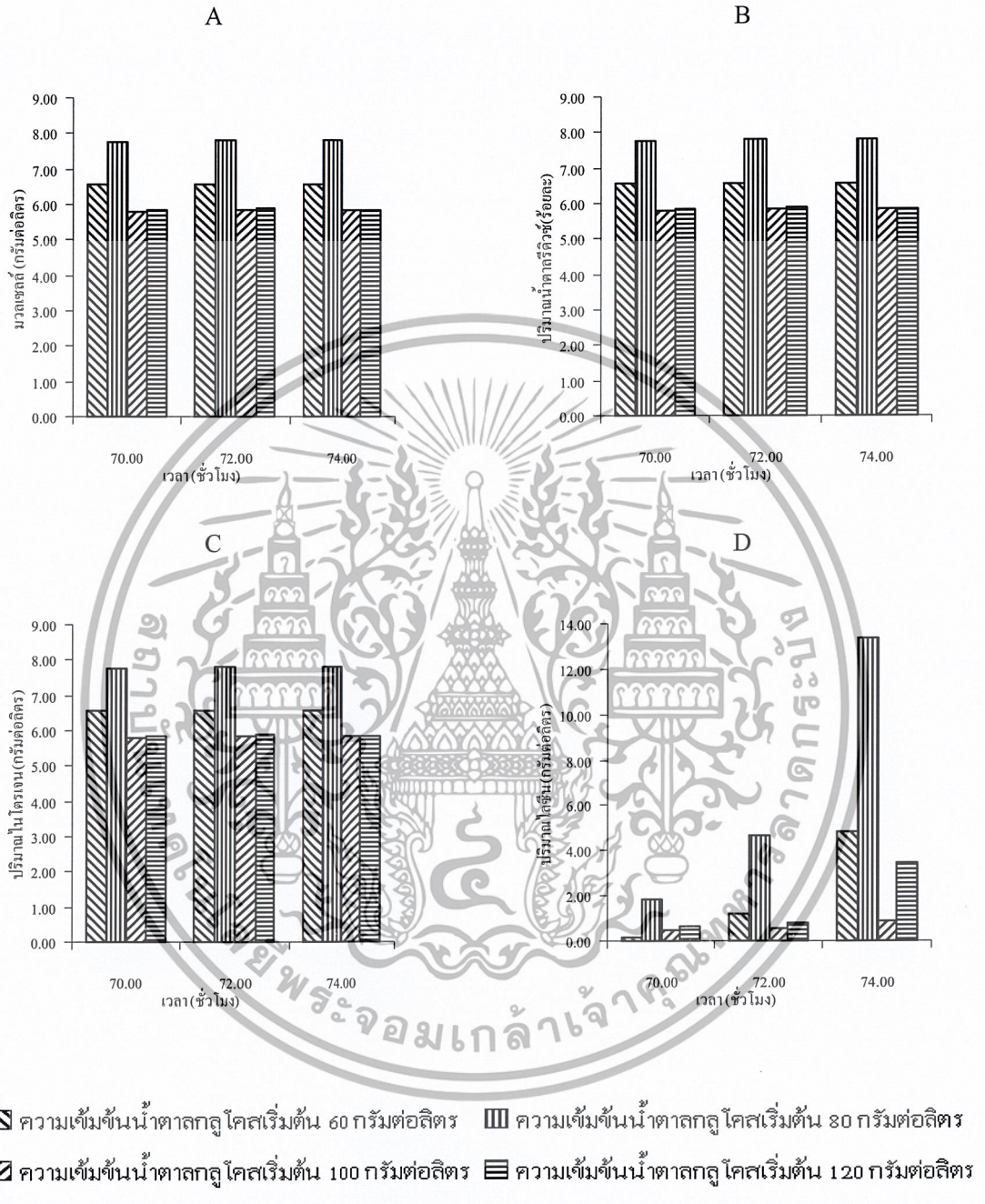
มวลชีวภาพสูงอีกด้วย อีกทั้งเป็นระดับความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้กลูโคสและไนโตรเจนได้ดีที่สุด (ภาพที่ 19)

ตารางที่ 6 : ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	4.79b	4.47c	18.05e	3.53g	6.57b
80	13.32a	5.53a	4.77f	3.26h	7.83a
100	0.89g	0.73d	42.76c	6.06c	5.83cd
120	3.43d	5.53a	56.00b	5.01e	5.87cd

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 19 : แสดงผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครส

จากการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ใน lysine production medium ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 70 , 72 และ 74 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีน เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตไลซีน พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวก ค) การใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เชื้อจะผลิตไลซีนได้สูงสุด (10.13 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 60 , 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (4.03 , 3.01 และ 1.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ โดยการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (10.33 กรัมต่อลิตร) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (7.17 , 6.80 และ 6.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นซูโครส เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (ร้อยละ 20.42) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 37.15 , 36.06 และ 44.63 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่น้อยที่สุด (4.69 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 , 80 และ 120 กรัมต่อลิตร (5.40 , 5.21 และ 5.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าพีเอชมีค่าสูงสุด (6.25) เมื่อใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร (6.05 , 5.99 และ 5.92) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นใน lysine production medium มีผลต่อการผลิตไลซีน การผลิตมวลชีวภาพ รวมถึงการใช้ซูโครสและไนโตรเจน พบว่าการใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการผลิตไลซีนโดยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 เพราะนอกจากจะให้ผลผลิตไลซีนสูงแล้ว ยังให้มวลชีวภาพสูง และเป็นความเข้มข้นที่เชื้อสามารถใช้กลูโคสและไนโตรเจนได้ดีอีกด้วย (ภาพที่ 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 : ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เพาะเลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
60	4.03b	7.17bc	20.42h	5.40d	6.25b
80	3.01d	6.80bc	37.15e	5.21d	6.05d
100	10.13a	10.33a	36.06f	4.69e	5.99ef
120	1.29i	6.07c	44.63c	5.97c	5.92gh

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 20 : แสดงผลความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 60 , 80 , 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตมวลเซลล์ (A) , ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (B) , ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (C) และปริมาณไลซีนที่ผลิตได้ (D) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ณ ชั่วโมงที่ 70 , 72 และ 74 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

ก. *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้เท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.45 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ 38.82 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ48.53) และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 41.72 กรัมต่อลิตร

2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

2.1 ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคส

ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 60 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 6.68 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ค่าพีเอช 5.24 น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 3.83 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ ร้อยละ 19.19 และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เท่ากับ 3.52 กรัมต่อลิตร

2.2 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครส

ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 60 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 3.34 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ค่าพีเอช 5.00 น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 6.53 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ ร้อยละ 3.04 และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร

ข. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่า เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ดีที่สุด หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณไลซีนที่สามารถผลิตได้เท่ากับ 4.89 กรัมต่อลิตร น้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แห้งเท่ากับ 5.34 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.37 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ 11.98 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 14.98) และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือเท่ากับ 41.26 กรัมต่อลิตร

2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลซีน

2.1 ผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคส

ระดับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 80 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 13.32 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ค่าพีเอช 7.83 น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.53 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ ร้อยละ 4.77 และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เท่ากับ 3.26 กรัมต่อลิตร

2.2 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครส

ระดับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีน คือ 100 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตไลซีนได้ปริมาณสูงสุด เท่ากับ 10.13 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 74 ชั่วโมง ค่าพีเอช 5.99 น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 10.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเท่ากับ ร้อยละ 36.06 และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เท่ากับ 4.69 กรัมต่อลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ ในช่วงที่เชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase จนถึงชั่วโมง ที่ 84 พบว่า ปริมาณของกลูโคสยังคงมีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับปริมาณไลซีนที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าเชื้อจะมีการเจริญเติบโตคงที่แล้วก็ตาม ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไปควรจะเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อให้นานขึ้น หรือจนกว่าปริมาณไลซีนจะมีค่าคงที่

2. จากการศึกษาการเจริญของเชื้อในช่วงแรก พบว่า พีเอชมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นอย่างรวดเร็ว อาจเกิดเนื่องมาจากการที่เชื้อมีการผลิตสารบางอย่างออกมา เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงสารต่างๆที่เชื้อผลิตขึ้นในช่วงการเจริญเติบโต ซึ่งอาจส่งผลต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ

3. การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการผลิตไลซีนจากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch) ซึ่งอาหาร และสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ และการผลิตไลซีนมีปริมาณจำกัด อาจไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ อีกทั้งมีการสะสมของเสียต่างๆที่เชื้อผลิตขึ้น ปัจจัยต่างๆเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตไลซีนได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงการเลี้ยงเชื้อในแบบอื่นๆด้วย เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบถึงข้อดี ข้อเสีย และปริมาณผลผลิตไลซีนที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

ภาสกร คณานุรักษ์. 2529. อาหารสัตว์เบื้องต้น เล่ม 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 46 น.

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2530. ชีวเคมี. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 651 น.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2535. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ. 886 น.

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 proteins. **Appl. Microbiol.** 6 : 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.

Coello, 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 : 259-262.

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 *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 1746-1752.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cruger, W. and A. Cruger. 1989. Biotechnology : A textbook of industrial microbiology. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc ., Sunderland, MA.

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

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

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

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

Kawahara, Y., T. Nakamura, Y. Yoshihara, S. Ikeda 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. 1991. Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch strategies. **Biotechnol. Prog.** 7 : 501-509.

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

Leuchtenberger, W. 1996. Amino acids-technical production and use. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 6 : 455-502.

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

Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of fungi fourth edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Nelson, G.E.N., R.F. Anderson, R.A. Rhodes, M.C. Shekleton and H.H. Hall. 1959. Lysine, methionine and tryptophane content of microorganism II. Yeast. **Appl. Microbiol.** 8 : 182-197.

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*. **Food Microbiol.** 63 : 159-163.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sands, D.C. and L. Hankin. 1974. Selecting lysine-excreating mutants of Lactobacilli for use in food and feed enrichment. **Appl. Microbiol.** 8(3) : 523-524.

Sands, D.C. and L. Hankin. 1976. Fortification of foods by fermentation with lysine-excreting mutants of lactobacilli. **Agric. Food Chem.** 24 : 1104-1106.

Schrumpf, B., L. Eggeling and H. Sahm. 1992. Isolation and prominent charactertics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. **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.

Shvinka, J., U. Viesturs and M. Ruklisha. 1980. Yield regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. **Biotechnol. Bioeng.** 22 : 897-912.

Tosaka, O., H. Hirakawa and K. Takmami. 1979. Effect of biotin levels on L-lysine formation in *Brevibacterium lactofermentum*. **Agric. Biol. Chem.** 43 : 491-495.

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 distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. **Biotechnol. Bioeng.** 41: 633-646.

http://bio.winona.msus.edu/berg/Structures.htm

http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/

http://www.basf.de/en/produkte/biotech/biokatalyse/fermentation.htm?id=V00-*e2Ju.f*-bsf400

http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/hetgroups/indSLZ.html

http://www.fz-juelich.de/ibt/amino/amino-fig-1.html

http://www.healthy.net

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

http://www.thewayup.com

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

http://www.zestrsa.co.za

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (NB) (Difco)

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Distilled water	1000.0	mg.

Nutrient agar (NA) (Difco)

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Agar	15.0	g.
Distilled water	1000.0	mg.

Seed medium

Glucose	20.0	g.
Yeast Extract	5.0	g.
NaCl	2.5	g.
Thiamine-HCl	300.0	µg.
Biotin	400.0	µg.
Water	1000.0	ml.
pH	7.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lysine Production Medium (Standard)

$(NH_4)_2SO_4$	75.0	g.
Yeast Extract	20.0	g.
Glucose	80.0	g.
K_2HPO_4	1.0	g.
KH_2PO_4	1.0	g.
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	g.
$MnSO_4.4H_2O$	10.0	mg.
$FeSO_4.7H_2O$	10.0	mg.
Thiamine-HCl	300.0	µg.
Biotin	400.0	µg.
Water	1000.0	ml.
pH	7.4	

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข เทคนิคทางจุลชีววิทยา

1. การย้อมสีแกรม (บัญญัติ , 2535)

การย้อมสีนี้ผู้นำมาใช้เป็นคนแรกคือ Has Christian Gram ในปี ค.ศ. 1884 ทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative)

สารเคมี

1. crystal violet
2. safranin
3. grame iodine solution
4. alcohol 95%

วิธีการ

1. เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ที่ล้างสะอาด ทิ้งให้แห้งแล้ว heat fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง การ fix เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์
2. หยดสี crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง
3. หยด grame iodine solution บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยเซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
4. นำสไลด์มาล้างสี ด้วย alcohol 95% นานประมาณ 30 วินาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ค1 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	1.27e	2.97c	6.68a
80	0.68k	0.85g	4.21b
100	0.66l	1.15f	1.62d
120	0.68j	0.83i	0.84h

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค2 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	3.83c	3.77cd	3.83c
80	3.73cd	3.87c	3.67cd
100	3.07e	3.37de	3.60cd
120	6.20b	6.73a	6.97a

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค3 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	25.55d	21.42e	19.19f
80	42.46a	39.85b	35.77c
100	18.27g	15.90h	10.53i
120	5.74j	3.11k	0.77l

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค4 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	4.52e	4.11f	3.52g
80	4.74e	4.69e	4.50e
100	7.32c	7.21c	6.54d
120	8.08a	7.69b	6.52d

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค5 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.25a	5.21abc	5.24ab
80	5.23abc	5.20c	5.21abc
100	5.24a	5.20bc	5.22abc
120	5.12d	5.08e	5.10ed

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค6 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	1.18j	2.71b	3.34a
80	1.27i	1.75g	2.47c
100	1.44h	1.94f	2.28d
120	0.62l	1.13k	2.27e

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค7 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.47cd	6.67cd	6.53cd
80	7.20cd	7.37c	7.37c
100	6.57cd	7.10cd	6.97cd
120	6.40d	9.07b	11.17a

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค8 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	4.86d	3.45f	3.04h
80	8.44a	7.86b	7.10c
100	3.74e	3.18g	2.09i
120	1.14j	0.61k	0.17l

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค9 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	3.48g	3.34gh	3.25h
80	5.66b	4.31e	3.48g
100	5.28c	3.91f	3.44g
120	6.00a	5.35c	4.67d

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค10 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.24bc	5.17cd	5.00f
80	5.27b	5.10de	5.07ef
100	5.24bc	5.15cde	5.01f
120	5.38a	5.29b	5.18cd

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค11 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	0.17l	1.18f	4.79b
80	1.85e	4.70c	13.32a
100	0.45k	0.60j	0.89g
120	0.68i	0.83h	3.43d

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค12 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	4.47c	4.50c	4.47c
80	5.27b	5.50ab	5.53a
100	0.70d	0.73d	0.73d
120	5.43ab	5.43ab	5.53a

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค13 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	42.33c	23.03de	18.05e
80	24.18d	9.54f	4.77f
100	60.79b	44.56c	42.76c
120	69.41a	68.17a	56.00b

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค14 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	5.99c	5.61d	3.53g
80	4.99e	3.88f	3.26h
100	8.16a	6.82b	6.06c
120	5.44d	5.16e	5.01e

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค15 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.59b	6.56b	6.57b
80	7.78a	7.80a	7.83a
100	5.82d	5.84cd	5.83cd
120	5.87cd	5.89c	5.87cd

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค16 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิตไลซีนของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไลซีน (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	2.88e	3.12c	4.03b
80	1.73h	2.06f	3.01d
100	0.91l	1.81g	10.13a
120	0.93k	0.98j	1.29i

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค17 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.03c	7.23bc	7.17bc
80	7.13bc	7.73bc	6.80bc
100	6.37bc	7.90b	10.33a
120	6.53bc	7.07bc	6.07c

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค18 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ร้อยละ) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	36.70ef	22.30g	20.42h
80	45.54b	39.83d	37.15e
100	44.51c	36.35f	36.06f
120	60.90a	45.94b	44.63c

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค19 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.97b	6.02c	5.40d
80	5.73c	5.40d	5.21d
100	5.34d	5.18d	4.69e
120	7.40a	6.92b	5.97c

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค20 ผลของความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นต่อค่าพีเอชของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475 ที่เลี้ยงใน lysine production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	70	72	74
60	6.30a	6.14c	6.25b
80	6.08d	6.00e	6.05d
100	6.00e	5.94gh	5.99ef
120	5.95fg	5.90h	5.92gh

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง วิธีการวิเคราะห์

1. น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสำคัญมากต่อการวิเคราะห์พารามิเตอร์อื่น ๆ เช่น ผลได้ (yield) และอัตราผลผลิต (productivity) ซึ่งมีขั้นตอนการหาโดยตรงดังนี้

สารเคมี

น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในหลอดทดลอง
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนลอยแช่แข็งเก็บเอาไว้เพื่อใช้วิเคราะห์
4. เติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ (0.9 %NaCl) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 1-2 ครั้ง
5. รินส่วนลอยทิ้งนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
7. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

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

2. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมีมากมายหลายวิธี ทั้งวิธีการทางเคมี เอนไซม์หรือด้วย HPLC การเลือกวิธีการวิเคราะห์นั้นขึ้นกับอุปกรณ์เครื่องมือที่มีอยู่ และสารประกอบที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลสำหรับในการทดลองนี้ใช้วิธี Somogyi – Nelson ในการวิเคราะห์

สารเคมี

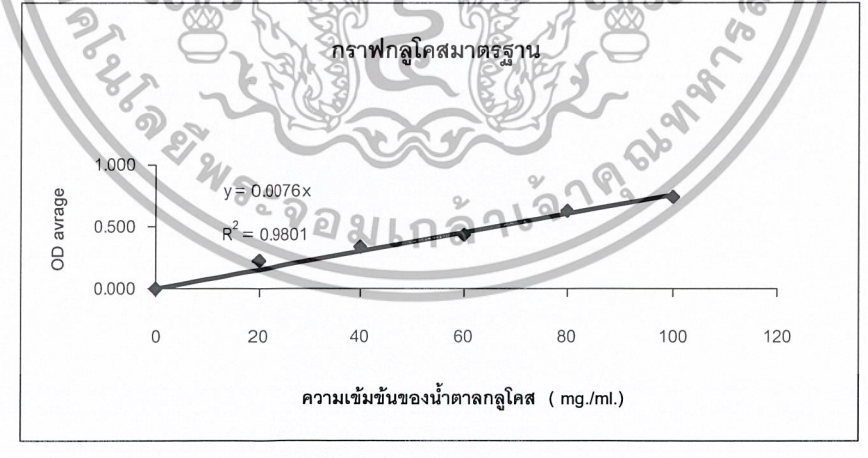
1. คอปเปอร์รีเอเจนต์
2. สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์

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. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ

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



ภาพภาคผนวก ง1 : กราฟกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปริมาณไนโตรเจน

ใช้วิธีบิอูเรต ซึ่งปฏิกิริยาบิอูเรตเป็นปฏิกิริยาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดงระหว่างไอออนคิวปริกกับสารบิอูเรต ($H_2N.CO.NH.CO.NH_2$) ในทำนองเดียวกันโครงสร้างของโปรตีน (-CO.NH-) ก็สามารถทำให้เกิดสารประกอบสีเชิงซ้อนโปรตีนคอพเพอร์ได้เช่นเดียวกันในสารละลายด่าง ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้

<u>สารเคมี</u>

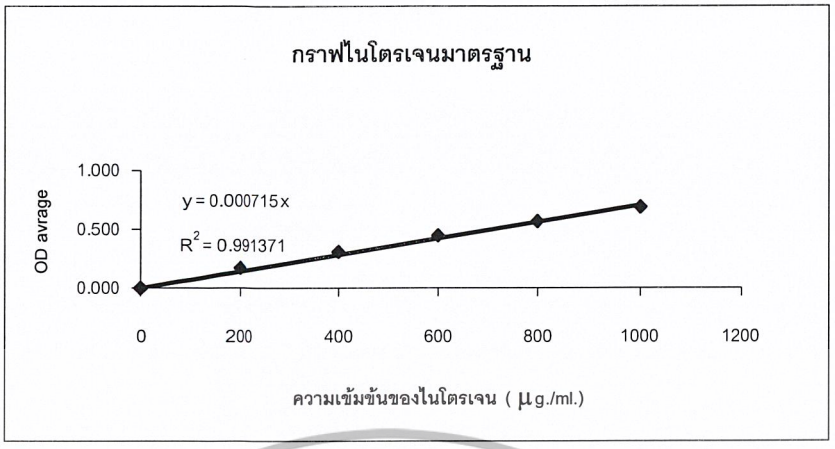
1. สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์
2. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
3. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยนำสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ปิเปตต์ตัวอย่างเจือจางที่มีปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมลงในหลอดทดลอง 1.0 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ(กรณีของสารละลายมาตรฐานโปรตีนให้ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง)
2. เติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3.0 นอร์แมล ลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทำให้เย็น
3. จากนั้นเติมสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงไปในหลอดทดลองอีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกเอาตะกอนออกด้วยการหมุนเหวี่ยง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในสารตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ(g/l)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 555 นาโนเมตร)} \times \text{(อัตราการเจือจาง)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก ง2 : กราฟมาตรฐานสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)

4. ปริมาณไลซีน

ปริมาณไลซีนทำการวิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) ซึ่งใช้ C-18 เป็นคอลัมน์ (Column)ใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detector) เป็นเครื่องตรวจวัด (Detector) ตัวทำละลาย (Solvent or Mobile phase) ที่ใช้ คือ KH_2PO_4 (Potassium dihydrogenphosphate) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยให้มีอัตราการไหล (Flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

<u>สารเคมี</u>

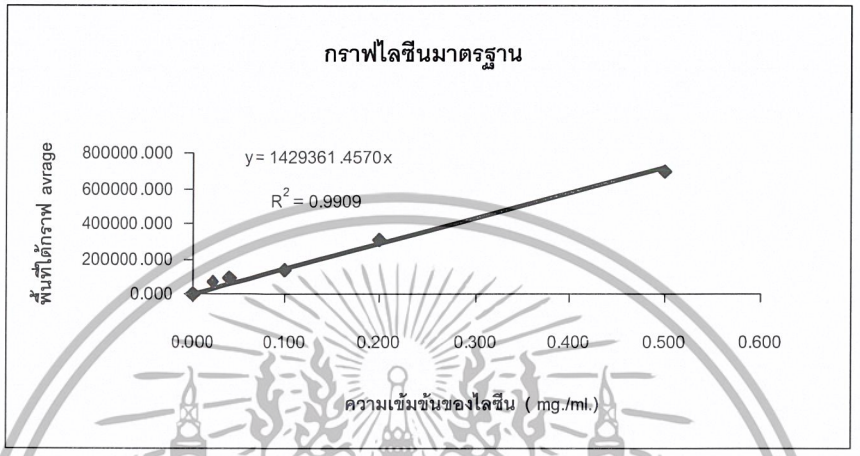
1. น้ำกลั่นเกรด HPLC
2. เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100
3. สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์
4. กรดฟอสโฟริกเข้มข้น
5. สารละลายมาตรฐานไลซีน

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ทำการเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมทำ 3 ซ้ำ (กรณีของสารละลายมาตรฐานไลซีนให้ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง)
2. ทำการฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่องวิเคราะห์ (HPLC) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยควบคุมอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการคำนวณปริมาณไลซีนที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานไลซีน



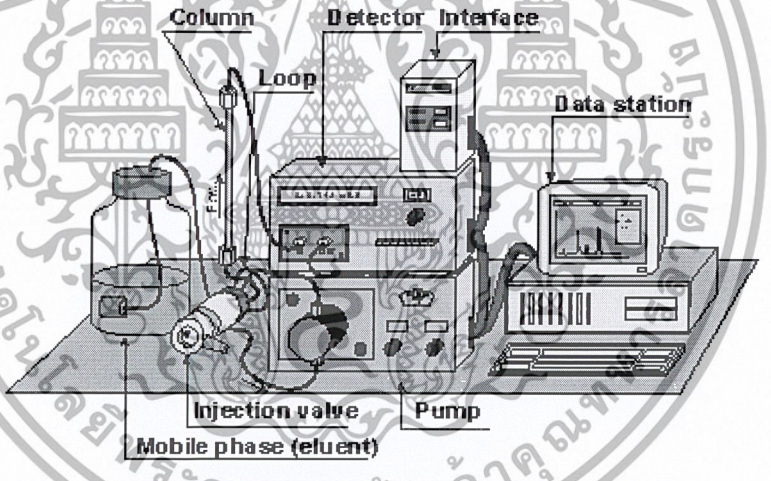
ภาพภาคผนวก ง3 : กราฟไลซีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ หลักการขั้นพื้นฐานของ HPLC

High Performance Liquid Chromatography (แม้น และ อมร , 2535)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คือ เทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เพราะใช้ความดันช่วยและของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็ก เนื่องจากการทำ HPLC ต้องใช้ความดันช่วยจึงต้องมีเครื่องมือสำหรับปั๊มตัวทำละลาย และเนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้มีจำนวนน้อย ดังนั้น หลังจากที่สารตัวอย่างถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ต้องมีเครื่องมือที่เรียกว่า ดีเทคเตอร์วัดสารปริมาณน้อยๆที่ถูกชะออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนประกอบของเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมกันเข้าเป็นเครื่องมือ 1 ชุดของ HPLC ซึ่งสรุปเป็นแผนภาพได้ ดังแสดงในภาพภาคผนวก จ1



ภาพภาคผนวก จ1 : แผนภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆของเครื่องมือ HPLC

ที่มา : http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/

ส่วนประกอบต่างๆแต่ละส่วนของ HPLC ทำหน้าที่ดังต่อไปนี้

1. ภาชนะบรรจุตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (Solvent reservoir) ภาชนะบรรจุตัวทำละลายทำด้วยแก้วหรือสเตนเลสก็ได้ มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ตามปกติควรต่อกับอุปกรณ์กำจัดก๊าซ (degassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ หรืออาจรบกวนเครื่องดีเทคเตอร์ (detector) อุปกรณ์กำจัดก๊าซประกอบด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ส่วนให้ความร้อน ตัวคนสารละลาย และส่วนทำการกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(distillation system) ถ้าการวิเคราะห์ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว เครื่องมือก็จะมีถังใส่ตัวทำละลาย และตัวทำลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าต้องใช้ตัวทำละลายผสมในการชะต้องมีเครื่องมือ 2 ชุด ต่อเชื่อมกันเพื่อทำให้ตัวทำละลายสามารถผสมกันและเปลี่ยนโพลาริตีได้อย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งเรียกว่า การโปรแกรมตัวทำละลาย (solvent programming)

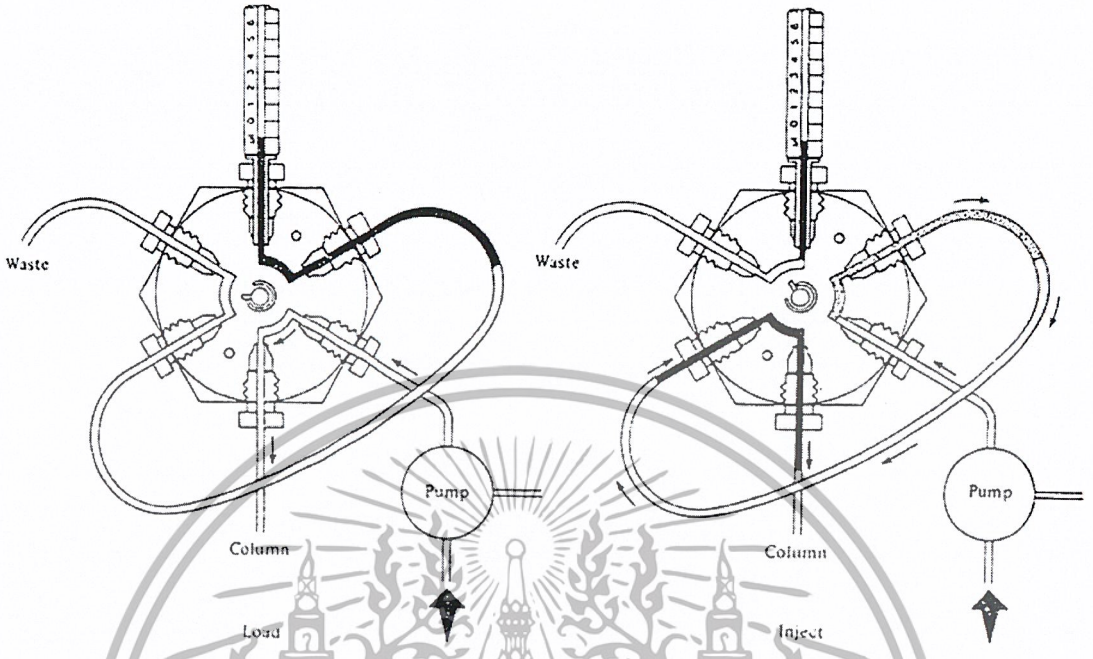
การชะโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียว (isocratic condition) จะทำให้ใช้เวลาในการแยกนาน และสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังมักจะมีหาง แต่ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทโดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีก (peak) ที่ได้ดีขึ้น การโปรแกรมตัวทำละลายสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ หรือทำเป็นขั้น (stepwise) คือเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆในช่วงเวลาหนึ่ง ต่อจากนั้นก็ควบคุมให้คงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง และก็เพิ่มขึ้นอีกจากนั้นควบคุมให้คงที่อีกเช่นนี้ตลอดการทดลอง

2. เครื่องปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ปั๊มตัวทำละลายเข้าคอลัมน์ด้วยความดันอย่างน้อย 1000 psi (lbs/in^2) ความดันที่เหมาะสมและใช้ได้ดีคือ 4000 ถึง 6000 psi ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 3 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลควรควบคุมให้คงที่ เปี่ยงเบนได้ไม่เกินร้อยละ 2 เนื่องจากการไหลมีผลโดยตรงต่อเวลาที่ใช้ในการแยก ถ้าเพิ่มความเร็วของการไหลของตัวทำละลายจะทำให้สารตัวอย่างถูกอีลูทได้เร็วขึ้น ดังนั้นในการแยก ถ้าทำการโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น การโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลายสามารถทำได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบเป็นขั้น เช่นเดียวกับการโปรแกรมตัวทำละลาย

3. พรีคอลัมน์ (Precolumn) เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อัน เรียกว่า พรีคอลัมน์ มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่าเพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทิน (contaminant) ที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะบริสุทธิ์ขึ้น

4. ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system) ที่นิยมใช้คือ ใช้ microsampling valve (ภาพภาคผนวก จ2) สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้จนกระทั่งถึงหลายมิลลิลิตร ซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกยอมให้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5000-6000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล (แม้น และ อมร , 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก จ2 : แสดงการผ่านสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ โดยใช้ microsampling valve สำหรับ HPLC

↑ แสดงทางเดินของการไหลของตัวทำละลาย

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

5. คอลัมน์ (column) คอลัมน์สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC ทำด้วยหลอดแก้วอย่างหนา หรือสเตนเลส มีขนาดความยาว 15-150 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2-3 มิลลิเมตร คอลัมน์ขนาดที่ยาวเป็นเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกันโดยขดเป็นวงกลม

สารที่บรรจุในคอลัมน์มี 2 ชนิดคือ ชนิดที่เป็นของแข็งดูดซับ ซึ่งต้องมีขนาดเล็กมากและมีได้หลายขนาด มีชื่อเรียกทางการค้าต่างๆกัน อีกชนิดหนึ่งเป็นของเหลวฉาบบน solid support ซึ่งมีทั้งแบบธรรมดาและรีเวอร์สเฟส (reverse phase) ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกา และอลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ ดังตารางภาคผนวก จ1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก จ1 แสดงชนิดของสารที่เหมาะสมกับชนิดของตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์

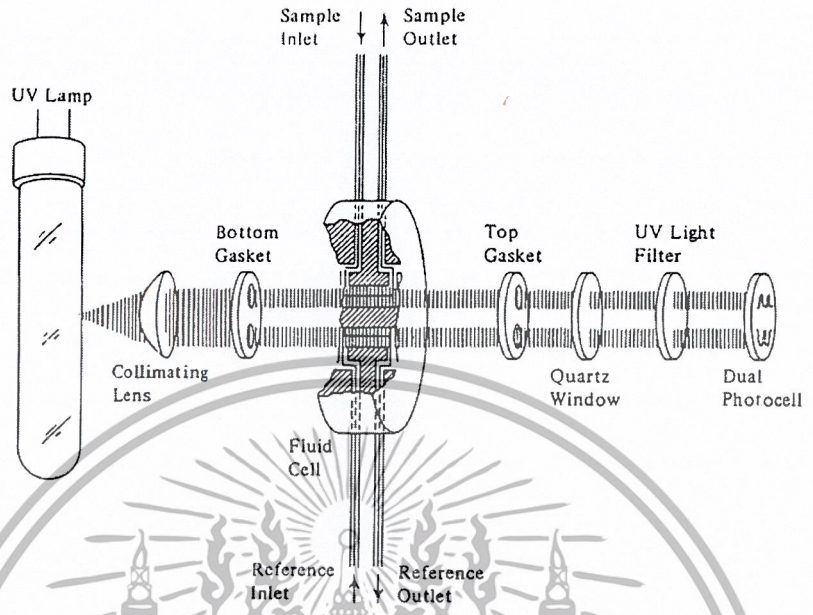
ใช้อลูมินาเป็นตัวดูดซับ	ใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ
เป็นสารประเภทกรด (acid compound) เป็นโมเลกุลไม่อิ่มตัวเช่น Olefinic และ aromatic เป็นสารที่กลุ่มฮาโลเจน เป็นสารที่ไวต่อกรด	เป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pK น้อยกว่า 5 เป็นสารที่ไวต่อเบส

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

6. ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (temperature control) ตามปกติการทำลิควิดโครมาโตกราฟีทั่วๆ ไปนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้เพื่อทำให้อุณหภูมิคงที่ แต่ถ้าต้องการให้ retention time ของสารตัวอย่างสั้นขึ้น อาจเพิ่มอุณหภูมิให้แก่คอลัมน์ก็ได้เช่นเดียวกับก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้เตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้

7. ดีเทคเตอร์ (detector) ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC ไม่มีชนิดที่มีความไวสูงแบบก๊าซโครมาโตกราฟี ดีเทคเตอร์จะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดปริมาณของสารได้ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ สำหรับดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตหรือแสงขาว (UV Spectophotometer) มีลักษณะการทำงาน ดังแสดงในภาพภาคผนวก จ3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวก จ3 : แผนภาพของ UV detector

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ ตารางค่าพารามิเตอร์

ตารางภาคผนวก ฉ1 แสดงแสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330 และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475

ค่าพารามิเตอร์	*Corynebacterium glutamicum* NRRL 3330	*Corynebacterium glutamicum* ATCC 21475
Y x/s (g. cell / g. glucose)	0.13	0.06
Y p/s (g. lysine /g. glucose)	0.15	0.08
QP ที่ชั่วโมงที่ 72 (g. lysine /l. h.)	0.06	0.07
qP ที่ชั่วโมงที่ 72 (g. lys/l. h.g. cell)	0.01	0.01
μ_{max}	0.01	0.02
k_s	80.25	23.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้