



เลขที่เอกสาร: 61120115410142000

สวพ-ว-4(1)

## ใบนำส่งรายงานวิจัย

เลขที่รับ(สวพ).....

วันที่รับ.....

ขอส่งรายงานวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ (1) 2554

(2) ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว รหัส ก-ช(ด)82.54 ชื่อโครงการ การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมากรดโพลีกลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์

(3) หัวหน้าโครงการ อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น

(4) หน่วยงาน ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

(5) ประเภทโครงการวิจัย โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

(6) รายงานที่ส่ง รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 3 ชุด พร้อม CD/Diskette 5 แผ่น

(7) การเผยแพร่ผลงานวิจัย ประสงค์ให้ สวพ. เผยแพร่ได้

ลงชื่อ.....

( อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น )

หัวหน้าโครงการ

27 ต.ค. 2558

## ใบรับรายงานวิจัย

เลขที่รับ(สวพ).....

วันที่รับ.....

ขอส่งรายงานวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ (1) 2554

(2) ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว รหัส ก-ช(ด)82.54 ชื่อโครงการ การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมากรดโพลีกลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์

(3) หัวหน้าโครงการ อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น

(4) หน่วยงาน ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

(5) ประเภทโครงการวิจัย โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

(6) รายงานที่ส่ง รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 3 ชุด พร้อม CD/Diskette 5 แผ่น

(7) การเผยแพร่ผลงานวิจัย ประสงค์ให้ สวพ. เผยแพร่ได้

ลงชื่อ.....

( เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยและพัฒนา )

...../...../.....



รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
ทุนอุดหนุนวิจัย มก.ปีงบประมาณ 2554

รหัสโครงการวิจัย ก-๒(ด)82.54

การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมา-กรดกลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์  
Screening of Bacillus sp. which produce gamma-polyglutamic acid for using as animal  
feed supplement

หัวหน้าโครงการ อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น

หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์  
หน่วยงานหลัก ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**แบบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**  
**โครงการวิจัย (Project)**  
**โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2554**

**ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการวิจัย**

- 1.1 รหัส ก-ช(ด)82.54 ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมากรดโพลีกลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์
- 1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
- 1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น
- 1.4 หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์  
 หน่วยงานหลัก ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์
- 1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์
- 1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ปีงบประมาณ 2554
- 1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล  
 - ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 300,000.00 บาท ประกอบด้วย  
 ปีงบประมาณ 2554 ได้รับ 300,000.00 บาท
- 1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย
  - 1.คัดเลือกบาซิลลัสที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง gamma-polyglutamic acid (PGA) จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมมาทำให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี และ Phylogenetic analysis
  - 2.เปรียบเทียบโครงสร้างของ PGA ที่สร้างจากบาซิลลัสแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้
  - 3.ศึกษาต้นทุนการผลิต PGA ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพสัตว์ในอนาคต แทนการใช้สารเร่งปฏิชีวนะเพื่อลดต้นทุนการผลิตและการกีดกันทางการค้า
- 1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ
 

ปีงบประมาณ	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
2554	1-6	ทำการเก็บตัวอย่างและสามารถแยกได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จำนวนทั้งผู้ตัวอย่าง (isolate) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแกมมาโพลีกลูตามิก ได้ในสภาวะที่เหมาะสม
	7-12	วิเคราะห์โครงสร้างของโพลีกลูตามิก แอซิด ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัด

จากงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับโพลีกลูตามิก แอซิด ที่สร้างจากแบคทีเรีย  
พันธุ์มาตรฐาน

#### 1.11 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

- วัตถุประสงค์ (ตามแผน)

- 1.เก็บตัวอย่างและการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์
- 2.การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้าง gamma-polyglutamic acid (PGA)
- 3.การพิสูจน์เอกลักษณ์และ Phylogenetic analysis
- 4.ศึกษาภาวะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีผลต่อการสร้าง PGA
- 5.ศึกษาโครงสร้างของ PGA
- 6.สรุปและจัดทำรายงาน

- เป้าหมาย/ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)

- 1.ได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์
- 2.สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้าง PGA ได้ประมาณ 200 ตัวอย่าง (isolate)
- 3.สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์และสร้าง Phylogenetic tree ของแบคทีเรียที่สร้าง PGA ที่คัดเลือกได้
- 4.สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
- 5.วิเคราะห์โครงสร้าง PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับ PGA ที่สร้าง

จากแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

- 6.รายงานผลการวิจัย

- ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)

1.เก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยทำการทดสอบสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

2.คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้าง gamma-polyglutamic acid (PGA) จากตัวอย่างน้ำ ดิน โคลน และกะปิ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 300 ตัวอย่าง (isolate)

3.สร้างแผนภาพวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตามิก แอซิด ที่คัดเลือกได้

4.สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการเลี้ยงในอาหาร PGA production medium , pH 7.5 ซึ่งมีส่วนประกอบของ 2% glucose, 2% sodium L-glutamate และ 0.5 um/ml biotin ในสภาวะที่มีอากาศ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5.จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับ PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) และ SDS-PAGE โดยทำการย้อมด้วยสี Methylene blue พบว่าโครงสร้างของ PGA ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียที่

แยกได้ มีลักษณะเป็นโพลิเมอร์สายยาว

6. สรุปและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ และดำเนินการนำเสนอผลงานวิจัยในส่วนของภาคโปสเตอร์ ในหัวข้อ "Screening of Bacillus sp. produced gamma-polyglutamic acid for feed supplement" ในการประชุมวิชาการนานาชาติ International Conference on Life Science & Biological Engineering (LS&BE 2014) ณ Renaissance Sapporo Hotel ที่เมืองซอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น วันที่ 22-24 กรกฎาคม 2557 นอกจากนี้ยังดำเนินการเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1.12 ผลการดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนหรือไม่ อย่างไร

- เป็นไปตามแผน

1.13 ปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

- ไม่มีปัญหาและอุปสรรค

1.14 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ

1.15 ผลผลิต/สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs)

- สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์

บาซิลลัสสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง Gamma-Polyglutamic acid

1.16 จุดเด่นของผลงานวิจัย / ผลผลิต / สิ่งที่ได้จากการวิจัย (outputs)

- สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่/พัฒนานักวิจัย

พัฒนานักวิจัยให้ดำเนินโครงการในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัย

1.17 การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

1. การนำผลการวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด

1.1 วารสารวิชาการระดับชาติ/วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

-

1.2 นำเสนอในการประชุม/สัมมนาในระดับชาติและนานาชาติ

-

1.3 เผยแพร่ผลงานในรูปแบบการจัดนิทรรศการ

-

1.4 บทความ

-

1.5 จัดอบรมถ่ายทอด

-

1.6 นำเสนอทางสื่อผสม

-

1.7 ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย

-

1.8 มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง

-

1.9 อื่นๆ

-

2. เป้าหมายการนำผลลัพธ์ / ผลสำเร็จที่ได้ / หรือคาดว่าจะได้จากการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านการเกษตร

- เพื่อเพิ่มคุณภาพอาหารสัตว์ลดต้นทุนการผลิต และลดการใช้สารเร่งปฏิกิริยา

2. ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

- ใช้ทรัพยากรในธรรมชาติให้คุ้มค่า

1.18 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านใด

- ยุทธศาสตร์การบริหารราชการแผ่นดิน (พ.ศ.2548 - 2551)

1. ยุทธศาสตร์การพัฒนามาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

เป้าประสงค์ การสร้างสภาพแวดล้อมที่ดีเพื่อยกระดับคุณภาพชีวิต และการพัฒนาที่ยั่งยืน

- นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ(พ.ศ.2551 - 2553)

ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 4 การเสริมสร้างและพัฒนาทุนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 บริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

แผนงานวิจัยที่ 2 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน

1.19 การรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา

-

1.20 การได้รับรางวัล

-

1.21 งานที่จะทำต่อไป

- ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

1.22 คำชี้แจงเพิ่มเติม

-

1.23 ได้แนบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project) ตามหัวข้อในตอนที่ 2 มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(อ.ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น)

27 ต.ค. 2558

## ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2554

โครงการวิจัยรหัส ก-๒(ด)82.54

การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมา-กรดโพลีกลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์

Screening of Bacillus sp. which produce gamma-polyglutamic acid for using as animal feed

(1)ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น, (2)กัญจนา ธีระกุล, (3)วรุฒติ ฤกษ์  
อำนาจโชค, (4)วิมลรัตน์ อินศวร,

(5)อนามิกา กาญจนบรรเทิง, (6)ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, (7)  
นางสาวเสาวภา เขียนงาม

(1)thippayarat chahomchuen, (2)Gunjana Theeragool,  
(3)Worawut Rerkamnuaychoke, (4)WIMONRUT INSUAN,  
(5)Anamika Kamjanabunterng, (6), (7)

---

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตแกมมา-กรดโพลีกลูตามิก แอซิด จากตัวอย่างน้ำ ดิน และ  
กะปิ จำนวน 300 ไอโซเลท ลักษณะแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งพบทั้งลักษณะท่อนสั้นและท่อนยาว ให้ผล  
การทดสอบคะตะเลสเป็นบวก ผลการวิเคราะห์การผลิตแกมมา-กรดโพลีกลูตามิก แอซิด ด้วยอาหาร  
สูตรสร้างแกมมา-กรดโพลีกลูตามิก แอซิด ซึ่งประกอบด้วย 2% glucose, 2% L-glutamate และ 0.5  
ug/ml Biotin พบว่า 10 ไอโซ-เลท สามารถผลิต PGA ได้ในปริมาณสูง การวิเคราะห์โครงสร้าง PGA  
ด้วย TLC พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ผลิต PGA ที่เป็นโพลิเมอร์สายยาว การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ  
แบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของ 16S rDNA และจากการสร้างแผนภาพ Phylogenetic tree  
ของ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตามิกที่คัดแยกได้ เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงชนิด  
type strain ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus และ Sporosarcina สปีชีส์ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล  
Genbank โดยไอโซเลต C5 มีความเหมือนกับ Bacillus infantis 99.41% ไอโซเลท Kpa7 มีความ  
เหมือนกับ Bacillus thuringiensis 99.43% ส่วนไอโซเลท KP5-3 มีความเหมือนกับ Sporosarcina  
aquimarina 98.7% ซึ่ง Sporosarcina aquimarina คือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกับ Bacillus sp. ที่  
แยกได้จากน้ำทะเลในแถบประเทศเกาหลี Sporosarcina aquimarina เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ดัง  
นั้่งงานวิจัยนี้จึงเป็นการค้นพบแบคทีเรีย Sporosarcina aquimarina ครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งแยก  
ได้จากตัวอย่างกะปิ

คำสำคัญ : แกมมา-กรดโพลีกลูตามิก แอซิด , กะปิ , บาซิลลัส

ABSTRACT

Three hundreds isolates of r-Polyglutamic acid (r-PGA) producing bacteria were  
isolated from water, soil, mud and fermented shrimp paste in Thailand. Cell Morphology and

biochemical properties of isolated r-PGA producing bacteria were studied. The results showed that isolated bacteria were gram positive, rod shape and catalase positive. Primary screening were done by mucoid production test. Using PGA production medium contained 2% glucose, 2% L-glutamate and 0.5ug/ml biotin, 13 isolates were selected for further PGA purification and analyzed by SDS-PAGE. Ten isolates were produced high amount of  $\gamma$ -PGA. TLC analysis revealed that PGA produced by isolated bacteria was complex polymer. Three representative isolates were characterized and identified by polyphasic techniques. Phylogenetic analysis based on 16s rDNA sequencing revealed that isolate C5 showed 99.41% identity to *Bacillus infantis*, isolate kpa7 showed 99.43% identity to *Bacillus thuringiensis* and isolate Kp5-3 showed 98.7% identity to *Sporosarcina aquimarina*. Since, *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacteria isolated from seawater in Korea and transfer of *Bacillus* sp. This is the first report to isolated *Sporosarcina aquimarina* sp. nov. from fermented shrimp paste in Thailand.

Key words : gamma polyglutamic acid , fermented shrimp paste , bacillus sp.

---

(1)ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

(1)Faculty of Veterinary Technology

(2)คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

(2)Faculty of Science

(3)คณะสัตวแพทยศาสตร์ บางเขน

(3)Faculty of Veterinary Medicine

(4)คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

(4)Faculty of Veterinary Technology

(5)คณะเทคนิคการสัตวแพทย์

(5)Faculty of Veterinary Technology

(6)ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(6)

(7)ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(7)