

## ส่วนที่ 2 เนื้อหางานวิจัย

### คำนำ

รายงานนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ จากงานวิจัย เรื่อง การคัดเลือกบาซิลลัสที่สร้างแกมมากรดโพลิ-  
กลูตามิกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์ โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปี 2554 โครงการวิจัยประเภท  
โครงการวิจัย 3 สาขา (โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์) รหัสโครงการวิจัย ก-ช(ด)82.54 จัดทำโดย  
อ.ดร. ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น หน่วยงานคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

อ.ดร. ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น  
พฤศจิกายน 2555

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงการวิจัยฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก หลายบุคคล หลายหน่วยงาน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้ข้อมูล ข้อเสนอแนะ คำปรึกษา ความคิดเห็น

ขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัย อ.ดร. ศิริพรรณ สุคนธ์สิงห์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ดร. จอมขวัญ มีรักษ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ดร. สมพร มุลมั่งมี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ขอขอบพระคุณ ท่านสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก.

ขอขอบพระคุณ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และวัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการดำเนินโครงการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัว ที่ช่วยส่งเสริม สนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลา การดำเนินโครงการวิจัยนี้ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ทิพย์รัตน์ ชาหอมชื่น

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	26

## บทที่ 1 บทนำ

$\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) คือโพลิเมอร์ของกรดอะมิโนกลูตามิกที่สร้างโดยแบคทีเรียในจีส *Bacillus* หน่วยย่อยของกรดอะมิโนกลูตามิกในโมเลกุลของ PGA เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\gamma$ -glutamyl โดยหน่วยย่อยทั้งหมดอาจเป็น D-glutamic acid เพียงอย่างเดียว หรือประกอบด้วยทั้ง D-glutamic acid และ L-glutamic acid ในอัตราส่วนที่คงที่ หรือแตกต่างกันขึ้นกับสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ผลิต นอกเหนือจากแบคทีเรียจีส *Bacillus* ยังมีแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Natronococcus occultus* (Niemetz *et al.*, 1997), *Sporosarcina halophila*, *Planococcus halophila*, *Natrialba aegyptiaca* (Hezayen *et al.*, 2001) และ *Hydra* (Weber, 1990) ที่สร้าง PGA ด้วยเช่นกัน แบคทีเรียสร้าง PGA เพื่อทำหน้าที่แตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ เช่น *B. anthracis* สร้าง PGA และสะสมไว้ที่แคปซูลเพื่อทำหน้าที่ป้องกันกลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ แบคทีเรียชอบเค็มหลัง PGA มาออกเซลล์เพื่อป้องกันภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือสูงในระหว่างที่มีการเจริญเติบโต เป็นต้น

PGA เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของ PGA ทางอุตสาหกรรม ได้แก่

- ใช้เป็นสารดูดซับน้ำในอุตสาหกรรมอาหาร (Tanimoto *et al.*, 1998)
- ใช้เป็นตัวพา (Carrier) นำยาเข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย (Bhattacharyya *et al.*, 1998)
- ใช้เป็น moisturizer และ emulsion stabilizer ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Li *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001) เป็นต้น

ปัจจุบันงานวิจัยที่นำ PGA ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ มีอยู่อย่างกว้างขวาง เช่น Li *et al.* (1999) รายงานว่า PGA-paclitaxel (โมเลกุลของ PGA ที่เชื่อมกับสาร paclitaxel) มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอกที่มดลูกและในทรวงอกของหนูทดลองได้ ต่อมา Yang *et al.* (2008) พบว่าหนูทดลองเพศเมียที่ได้รับการฉีด PGA มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมเกิดได้ดีขึ้น ดังนั้นหากนำ PGA มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจน่าจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตของสัตว์เร็วขึ้น ท้นต่อความต้องการของตลาด ลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิต และที่สำคัญลดปัญหาการกีดกันทางการค้าที่เกิดจากการมีสารเคมีหรือสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง PGA นอกเหนือจากที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้จากสิ่งแวดล้อม เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิต PGA ธรรมชาติ และใช้เป็นสารอาหารเสริมผสมอาหารสัตว์สำหรับสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว และอื่นๆ และสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศไทย โดย PGA จะมึบทบาทในการเร่งการเจริญเติบโต และป้องกันโรค ซึ่งอนาคตอาจจะมีการขยายการผลิตเป็นอาหารสำเร็จรูปสามารถจำหน่ายในท้องตลาดได้ทั่วไป ซึ่งจะมีราคาถูกกว่าการนำเข้าจากต่างประเทศ

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกบาซิลลัสที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) จากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมมาทำให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยสมบัติทางชีวเคมี และ Phylogenetic analysis
2. เปรียบเทียบโครงสร้างของ PGA ที่สร้างจากบาซิลลัสแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้
3. ศึกษาต้นทุนการผลิต PGA ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพสัตว์ในอนาคต แทนการใช้สารเร่งปฏิชีวนะเพื่อลดต้นทุนการผลิต และการกีดกันทางการค้า

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกแบคทีเรียที่สร้าง gamma-polyglutamic acid (PGA)

ระยะเวลาดำเนินงานประมาณ 3-5 เดือนแรกของระยะเวลาทั้งหมด ทำการเก็บตัวอย่างได้แก่ ดิน น้ำเค็ม น้ำจืด น้ำทิ้ง มูลสัตว์ ดอกไม้ และใบไม้ประมาณ 300 ตัวอย่าง มาทำการคัดแยกแบคทีเรียในจีสบาซิลลัสซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง PGA คาดว่าน่าจะคัดแยกบาซิลลัส (และแบคทีเรียอื่นๆ ด้วย) ประมาณ 300-500 ตัวอย่าง (isolate) และมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะพบบาซิลลัสสายพันธุ์ใหม่ (new specie) อีกด้วย

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

เมื่อแยกแบคทีเรียที่สร้าง PGA ให้บริสุทธิ์ได้แล้ว จึงนำแบคทีเรียเหล่านั้นมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อใช้จัดจำแนกในระดับจีสและสปีชีส์ ร่วมกับใช้วิธีทางโมเลกุลาร์ซึ่งได้แก่ การหาลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน *rpoB* และ *fus* รวมถึงการสร้าง Phylogenetic tree ด้วย วิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ดังกล่าวทำให้สามารถระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง PGA ที่คัดแยกได้ และหากพบว่ามีโอกาสเป็นสปีชีส์ใหม่ จะทำการทดลองเพิ่มเติมด้วยการทดสอบทางชีวเคมีและโมเลกุลาร์ เพื่อทำการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ เพื่อให้สามารถตีพิมพ์ลงวารสารระดับชาติ หรือนานาชาติได้

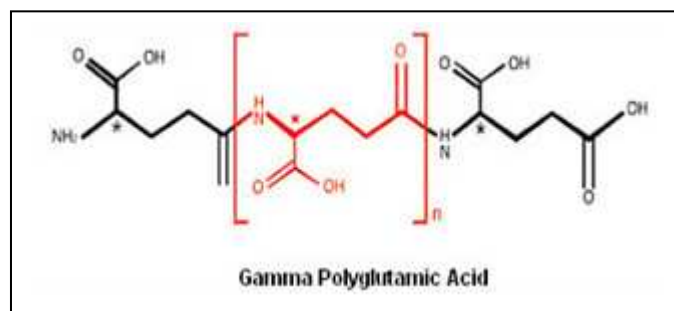
3. การศึกษาโครงสร้างของ PGA

วิเคราะห์โครงสร้างของ PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับ PGA ที่สร้างได้จากแบคทีเรียมาตรฐานได้แก่ *B. subtilis* NBRC 16449, *B. mojavensis* NBRC 15718, *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535, *B. licheniformis* NBRC 12170 และ *B. pumilus* NBRC 12094 ที่รายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่สร้าง PGA ในจีสบาซิลลัส โดยย่อย PGA ด้วยเอนไซม์ YwtD ( $\gamma$ -glutamyl hydrolase) และเอนไซม์  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (GGH)

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

$\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) คือโพลิเมอร์ของกรดอะมิโนกลูตามิกที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\gamma$ -glutamyl (รูปที่ 1) ค้นพบครั้งแรกว่าเป็นองค์ประกอบที่แคปซูลของ *B. anthracis* (Ivanovics and Erdos, 1937) ต่อมาแยกได้ในสารละลายที่เลี้ยง *B. subtilis* ที่กรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว (Bovarnick, 1942; Thorne *et al.*, 1954) และเมื่อเร็วๆ นี้ มีรายงานการแยกแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ได้แก่ *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* และ *B. pumilus* จากถั้วหมักที่เก็บจากประเทศไทย จีน เกาหลีใต้ อินเดีย เนปาล และดินที่เก็บจากประเทศญี่ปุ่น ที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง PGA ระหว่าง 0.4 มก./มล. ถึง 7.5 มก./มล. (Meerak *et al.*, 2007 และ 2008) นอกเหนือจากแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* ยังมีแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Natromococcus occultus* (Hezayen *et al.*, 1997), *Sporosarcina halophila*, *Planococcus halophila*, *Natrialba aegyptiaca* (Hezayen *et al.*, 2001) และ *Hydra* (Waber, 1990) ที่สร้าง PGA ด้วยเช่นกัน แบคทีเรียสร้าง PGA เพื่อทำหน้าที่แตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ เช่น *B. anthracis* สร้าง PGA และสะสมไว้ที่แคปซูลเพื่อทำหน้าที่ป้องกันกลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ แบคทีเรียชอบเค็มหลัง PGA มาออกเซลล์เพื่อป้องกันภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงในระหว่างที่มีการเจริญเติบโต เป็นต้น

กระบวนการสังเคราะห์ PGA ในแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามความต้องการกรดอะมิโนกลูตามิก จากภายนอกเซลล์ได้แก่ กระบวนการสังเคราะห์ PGA แบบ *de novo* PGA-production ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ PGA โดยแบคทีเรียไม่ต้องนำกรดอะมิโนกลูตามิกจากภายนอกเซลล์เข้ามาเป็นสารตั้งต้น แบคทีเรียที่สร้าง PGA ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ *B. subtilis* 5E (Sawa *et al.*, 1971), *B. licheniformis* A35 (Cheng *et al.*, 1989) และ *B. subtilis* TAM-5 (Ito *et al.*, 1971) ในทางตรงข้ามแบคทีเรียที่สร้าง PGA โดยต้องการกรดอะมิโนกลูตามิกจากภายนอกเซลล์เข้ามาเป็นสารตั้งต้นได้แก่ *B. subtilis* IFO 3335 (Kunioka and Goto, 1954) และ *B. subtilis* MR-141 (Ogawa *et al.*, 1997) โดย *B. subtilis* MR-141 สร้าง PGA ได้ 35 มก./มล. ที่ภาวะที่เหมาะสม (Ogawa *et al.*, 1997)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ  $\gamma$ -(D-/L-) polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA)

Troy *et al.* (1973 และ 1979) พบว่าเอนไซม์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. licheniformis* เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ (recemization) จาก L-glutamic acid เป็น D-glutamic acid และยังทำให้เกิดสายโพลิเมอร์ (polymerization) ของ D-glutamic acid เป็นโมเลกุล PGA แต่ขณะนั้นยังไม่สามารถทำเอนไซม์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ได้ ต่อมา Makino *et al.* (1987, 1988 และ 1989) รายงานว่า กลุ่มยีน *capBCA* สังเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGA ที่เป็นองค์ประกอบของแคปซูลของ *B. anthracis* แต่ไม่สามารถระบุหน้าที่เอนไซม์แต่ละชนิดได้ แต่หลังจากมีการรายงานลำดับเบสของจีโนมของ *B. subtilis* 168 จึงพบว่า ยีน *ywsC* และกลุ่มยีน *ywtABC* มีลำดับเบสความคล้ายคลึงกับ *capBCA* อย่างมาก (Presecan *et al.*, 1997) จึงคาดว่ากลุ่มยีนทั้งสองเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ PGA ในแบคทีเรียดังกล่าว แต่หน้าที่ของยีนแต่ละตัวต่อกระบวนการสร้าง PGA ไม่สามารถระบุได้ชัดเจนในขณะนั้น (Ashiuchi *et al.*, 1999) จนกระทั่ง Urushibata *et al.* (2002) โคลนยีน *ywsC* และกลุ่มยีน *ywtABC* ของ *B. subtilis* IFO 16449 และระบุว่าเอนไซม์ YwsC ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ส่วนคือ ขนาด 44 kDa และ 33 kDa โดย YwsC เร่งกระบวนการสังเคราะห์ PGA เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น L-glutamic acid และเติม ATP กับ  $Mn^{2+}$  จึงเรียก YwsC ว่า poly- $\gamma$ -glutamate synthetase ในขณะที่เอนไซม์ YwtA ทำหน้าที่นำโมเลกุลของ PGA ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. subtilis* (Urushibata *et al.*, 2002)

PGA เป็นโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงเป็นข้อได้เปรียบกว่าโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ใช้ดูดซับแคลเซียมและน้ำ (hydrogel) ในอุตสาหกรรมอาหาร (Tanimoto *et al.*, 1998) ใช้เป็น moisturizer และ emulsion stabilizer ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Li *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001) ใช้ผสมกับสารประกอบ ester เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นและแข็งแรงในการทำพลาสติกทนร้อน (thermoplastic) (Giannos *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1992) ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุในลำไส้ (Tanimoto *et al.*, 2000) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานแสดงการประยุกต์ใช้ PGA เป็นสารเคลือบยาเพื่อเป็นพาหนะนำยาเข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย (nano capsule drug carrier) ป้องกันยาไม่ให้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร และยังมีรายงานการใช้ PGA เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza) (Okamoto *et al.*, 2007) รวมถึงใช้ตกตะกอนโลหะหนักเพื่อบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมได้อีกด้วย (Gutcho, 1977; Nakamura *et al.*, 1976)

## บทที่ 3 วิธีวิจัย

### 3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

#### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ โคลน และอาหารหมัก จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดิน น้ำ และโคลน ทำการเก็บตัวอย่างในภาชนะปลอดเชื้อ จากนั้นนำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

#### 3.1.2 การแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในสารละลาย Sodium Chloride เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 99 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่เหมาะสมแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรีย และเหลือเพียงสปอร์ของแบคทีเรียเท่านั้นที่ยังสามารถเจริญได้ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดและเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) ด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจากจานเพาะเชื้อที่มีการกระจายกันอย่างชัดเจนของโคโลนีแบคทีเรีย มาซึบบนอาหารแข็ง NA ที่เตรียมใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ เก็บแบคทีเรียที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบต่อไป ตัวอย่างกะปิ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA ที่มีส่วนผสมของกะปิ 5 % เพื่อช่วยรักษาสภาพความเค็ม ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ชอบเค็ม จากนั้นจึงนำมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ต่อไป บนอาหารแข็ง NA ปกติ ที่เตรียมใหม่

#### 3.1.3 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ทำการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาโดยการสังเกตลักษณะโคโลนี การย้อมแกรม การตรวจดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นด้วยการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

##### 3.1.3.1 การย้อมแกรม (Gram's Stain)

นำเชื้อมาเกลี่ย (smear) บางๆ ลงบนสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการตรึงแบคทีเรียให้ยึดติดกับสไลด์ (fixed) โดยการผ่านเปลวไฟ แล้วหยด Crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยด Iodine solution ทิ้งไว้ 1 นาที ทำการล้างสี (decolorized) ด้วย 95 % แอลกอฮอล์ 30 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วหยดสี Safanin solution ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่กำลังขยาย 100x ผลการทดสอบคือ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

### 3.1.3.2 วิธีการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test)

เพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส ที่จะย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้แตกตัวได้เป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ ทดสอบโดยใช้รูปเปียเชื้อจากโคโลนี มาแตะลงบนสไลด์ที่สะอาดแล้ว หยด 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นในทันทีแสดงว่าให้ผลบวก แต่ถ้าหากไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบ

### 3.1.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้าง $\gamma$ -PGA (Mucoïd Colony Production)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาขีดลงบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) agar ซึ่งประกอบด้วย 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl และ 1.5% Agar จากนั้นป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเยิ้ม สร้างสารเมือก ซึ่งบ่งชี้ถึงลักษณะการสร้าง  $\gamma$ -PGA

### 3.1.5 การทดสอบความสามารถในการสร้าง crude $\gamma$ -PGA

นำโคโลนีเดี่ยว ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง LB ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด LB (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาถ่ายลงในอาหาร PGA production medium, pH 7.5 (2% glucose, 2% sodium L-glutamate, 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Biotin) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้น 1% นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 5,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาทำการตกตะกอน crude  $\gamma$ -PGA ด้วย Cold-absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน เพื่อให้เกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้นำไปประเหยแอลกอฮอล์ออก ชั่งน้ำหนักแห้งของ crude PGA ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

### 3.1.6 การวิเคราะห์โพลีเมอร์ของ PGA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย

นำตะกอน PGA มาละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการย่อย (Hydrolyzed) ด้วย 6N HCl ปริมาตรเท่ากัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง PGA ที่ผ่านการย่อยแล้วนำมาทำให้เป็นกลาง (neutralized) ด้วย 6M NaOH จากนั้นวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ด้วยตัวทำละลาย n-butanol-acetic acid-water ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยทำการหยด (spot) ตัวอย่างลงบนแผ่นซิลิกา จากนั้นทิ้งให้แห้งแล้วทำการแยกด้วยตัวทำละลายข้างต้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปถึงด้านบนของแผ่นซิลิกา นำแผ่นซิลิกาออกจากแท่งตัวทำละลาย ทิ้งให้แห้ง แล้วทำการสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดริน ความเข้มข้น 0.2% ในตัวทำละลายอะซีโตน โดยทำการอุ่นแผ่นซิลิกาบนฮอทเพลท เพื่อสังเกตสีของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น

### 3.1.7 SDS-PAGE ของ crude $\gamma$ -PGA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่แยกได้

#### 3.1.7.1 Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ mini slab gel ขนาด 10x12 เซนติเมตร หน้า 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วนคือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ทำการเตรียม separating gel ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 12% โดยมีส่วนประกอบดังตาราง เมื่อทำการเตรียมเจลแล้ว ทำการเตรียมตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่างกับ Sample buffer (Bio-Rad) ซึ่งประกอบด้วย 0.5M-Tris-HCl, pH 6.8, Glycerol, 10% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) Bromophenol blue และ 5%  $\beta$ -mercaptoethanol จากนั้นให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 5 นาที

Solution	12% Separating Gel (1 gel)	5% Stacking gel (2 gel)
40% Acrylamide	1,200 $\mu$ l	250 $\mu$ l
1.5M Tris, pH 8.8	1,000 $\mu$ l	-
0.5M Tris, pH 6.8	-	500 $\mu$ l
10% SDS	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l
10% Ammonium persulfate	20 $\mu$ l	5 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Distilled water	1,738 $\mu$ l	1,234 $\mu$ l

### 3.1.7.2 Electrophoresis

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วใส่ในช่องด้านบน (well) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อช่อง จากนั้นทำอิเล็กโตรโพลีซิส ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3 ผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าสี Bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล จึงปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมสีต่อไป

### 3.1.7.3 Methylene blue staining

ย้อมสี  $\gamma$ -PGA ด้วย 3% Methylene blue ใน Acetic acid โดยหลังจากทำอิเล็กโตรโพลีซิสแล้ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่เจลในสารละลาย Methylene blue นาน 30 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งพื้นหลังสะอาดและสังเกตเห็นแถบ  $\gamma$ -PGA ชัดเจน

## 3.1.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA

### 3.1.8.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณ 16S rDNA

นำโคลนเดี่ยวๆ ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด LB เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000g แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการสกัดแยก genomic DNA ด้วยชุดสกัด gDNA (QAIGEN kit) gDNA ที่สกัดได้ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณ 16s rDNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1510R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้

### สภาวะของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Hot start:* 94 °C 10 minutes

*PCR 30 cycle:* 94 °C 1 minute      55 °C 1 minute      72 °C 2 minutes

*Heat:* 72 °C 7 minutes

*Keep:* 4 °C  $\alpha$

ผลิตภัณฑ์ของ PCR (PCR product) ที่ได้ นำมาทำการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโพลีซิสบนวุ้น (Agarose gel Electrophoresis) ที่ 0.8% agarose ใน 1x TAE บัฟเฟอร์ (Tris-acetate-EDTA buffer, pH 8.0) ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการย้อมเจลด้วย Syber green dye และตรวจสอบภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่อง UV transilluminator

### 3.1.8.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA (DNA sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ด้วย BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์คู่เดียวกับข้างต้น 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1510R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ (Multiple sequences alignment) ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W version 1.81 (version 1.81: Thompson *et al.*, 1994)

### 3.1.9 แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) ของ 16S rDNA

สร้างแผนภาพ Phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตาเมตที่คัดแยกได้ ลำดับเบสขนาดประมาณ 1000 เบส เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงชนิด type strain ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ *Sporosarcina* สปีชีส์ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล Genbank โดยการนำข้อมูลมาทำซ้ำ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Clustal X2 และ NJ plot และได้ทำการส่งลำดับเบสของเชื้อดังกล่าวเข้าเก็บในฐานข้อมูล NCBI

## บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำทะเล น้ำจืด ดิน โคลน และอาหารหมัก เช่น กะปิ จากนั้นคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำ โคลน และดิน โดยกระจายตัวอย่างบนอาหารแข็งชนิด NA (Nutrient Agar) หรือตัวอย่างกะปิ กระจายบนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของกะปิ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 1) จากนั้น คัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยขีดบนอาหารแข็งชนิด NA ที่เตรียมใหม่จนได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ จากตัวอย่างทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 300 ไอโซเลท โดยคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีที่มีเมือก เยิ้ม (รูปที่ 2) ผลจากการย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ประกอบด้วยทั้งแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (Bacilli) (รูปที่ 4) การทดสอบเบื้องต้นทางชีวเคมีพบว่า แบคทีเรียทั้งหมดให้ผลคตะเลสบวก (รูปที่ 3) เมื่อขีดบนอาหารแข็งชนิด LB (Luria-Bertani) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถสร้างสารเมือก ลักษณะโคโลนีเยิ้ม (รูปที่ 5) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp.

### การวิเคราะห์ปริมาณ Crude PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

การทดสอบคุณสมบัติในการผลิต PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้อมด้วยสี Methylene Blue แบคทีเรียไอโซเลทที่สร้างเมือกบนอาหารแข็ง LB เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต PGA (PGA Production medium) ที่มี 2% glucose, 2% L-glutamate และ 0.5ug/ml Biotin โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 1% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากตัวอย่างแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลทสามารถผลิต  $\gamma$ -PGA ได้ เมื่อวิเคราะห์ crude PGA ที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Methylene Blue ไอโซเลทที่สร้าง  $\gamma$ -PGA ได้ ได้แก่ ไอโซเลทต่อไปนี้ BFT1-7, BFT1-28, BFT1-39, KP5-3, SFT1-27, SFT1-28, STF3-8, KP4.1-7, KP4.2-4, KP4.2-5 (รูปที่ 6) เมื่อวิเคราะห์การสร้างโพลีเมอร์ของ PGA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้กรดกลูตามิกเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งแบคทีเรียทั้งสิ้น 10 ไอโซเลทที่สามารถวิเคราะห์โพลีเมอร์ของ PGA ได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าโพลีเมอร์ของ PGA นั้นถูกย่อยไม่สมบูรณ์ (Wang *et al.*, 2008) จากการย่อยด้วย 6M HCl ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (รูปที่ 7) อย่างไรก็ตามปริมาณ crude PGA ที่วิเคราะห์ได้ สัมพันธ์กับปริมาณ PGA จากผลของ SDS-PAGE ซึ่งความสามารถในการผลิต PGA ตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้แก่ ไอโซเลท BFT1-28, BFT1-39, SFT1-27, STF3-8, BFT1-7, KP4.2-5, KP4.1-7, SFT1-28, KP4.2-4 และ KP5-3 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่ไม่ผลิต PGA ได้แก่ BFT1-16, SFT2-14 และ LK1-1

จากผลการทดลองข้างต้นแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกนั้น สามารถผลิต  $\gamma$ -PGA ได้ปริมาณสูงใกล้เคียงกันหลายๆ ไอโซเลท ดังนั้นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการสร้าง  $\gamma$ -PGA ยกตัวอย่างเช่น สภาวะในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง ส่วนประกอบของสูตรอาหารเพื่อใช้ในการผลิต  $\gamma$ -PGA เช่น pH ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของเกลือ ขั้นตอนในการตกตะกอน PGA โดยปัจจัยต่างๆเหล่านี้ อาจนำมาซึ่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของ PGA ที่ผลิตได้

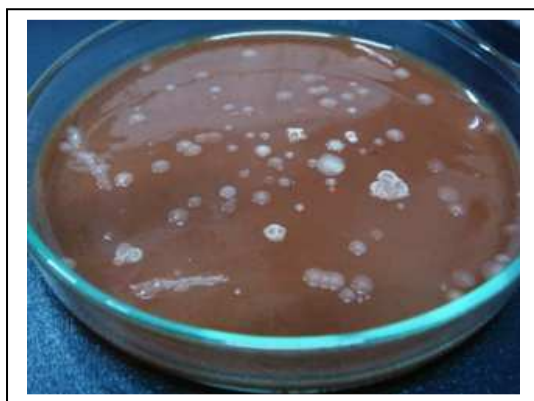
### การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

จากแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตามาเมตที่คัดแยกได้ (รูปที่ 9)

ลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลท C5, Kpa7 และ KP5-3 ขนาดประมาณ 1000 เบส เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงชนิด type strain ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ *Sporosarcina* สปีชีส์ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล Genbank จากการทำซ้ำ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Clustal X2 และ NJ plot พบว่า ไอโซเลท C5 หมายเลข NCBI access no. JQ7814721 มีค่า identity 99.41% ต่อ *Bacillus infantis* SMC4352-1<sup>T</sup> (NR043267)

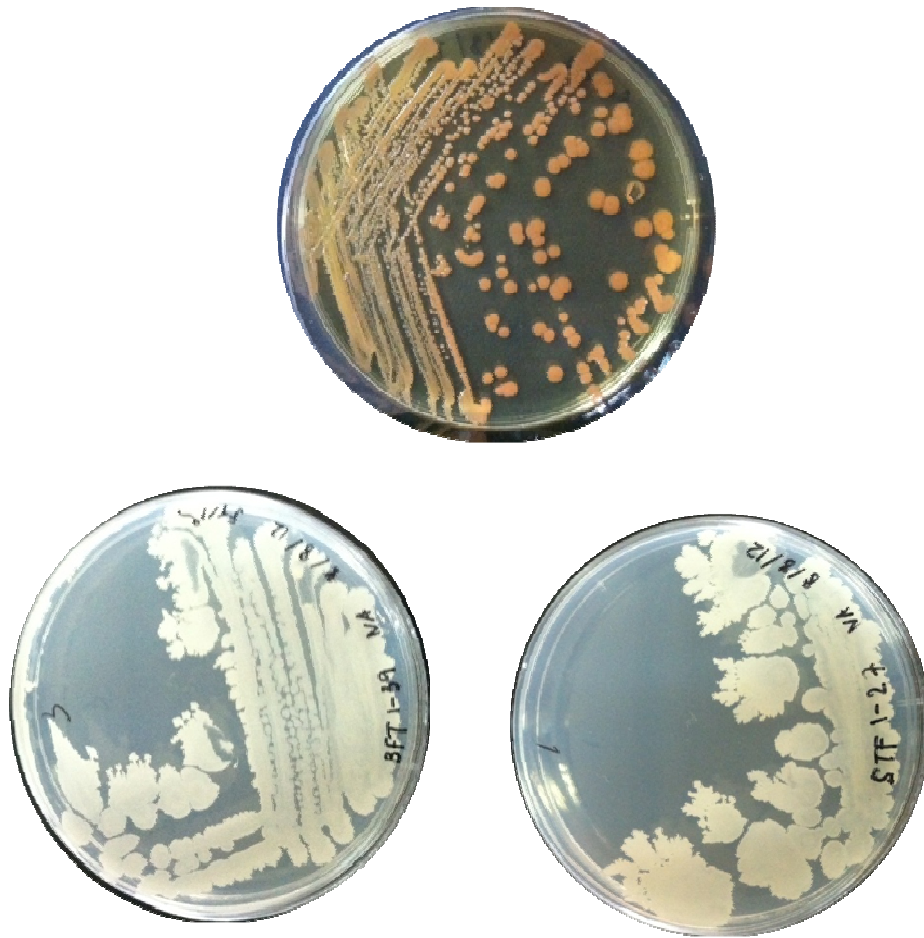
ไอโซเลท Kpa7 หมายเลข NCBI access no. JQ7814720 มีค่า identity 99.43% ต่อ *Bacillus thuringiensis* IAM12077<sup>T</sup> (NR043403)

ไอโซเลท KP5-3 หมายเลข NCBI access no. JQ794609 มีค่า identity 98.7% ต่อ *Sporosarcina aquimarina* SMC4352-1<sup>T</sup> (NR025409) ซึ่ง *Sporosarcina aquimarina* คือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากน้ำทะเลในแถบประเทศเกาหลี เป็นเชื้อแกรมบวกชนิดใช้อากาศ (aerobic or facultatively anaerobic) สร้างสปอร์ได้ รูปร่างเป็นแท่ง โคโลนีสีส้มอ่อน จากค่า identity ของ KP5-3 ต่อ *Sporosarcina aquimarina* เท่ากับ 98.7% ซึ่งมีโอกาสเป็นเชื้อใหม่และเนื่องจากจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus* sp. ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ โดยอาจจะมีสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ และถือเป็นการตรวจพบเชื้อชนิดนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ที่แยกได้จากตัวอย่างกะปิ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบในน้ำทะเล เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนระหว่างการผลิตกะปิ และเนื่องจากโคโลนีมีสีส้ม ซึ่งน่าสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและการประยุกต์ใช้ต่อไป



### รูปที่ 1 ลักษณะแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกจากตัวอย่าง

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำ และดิน บนอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) หรือแบคทีเรียที่แยกได้จากกะปิ บนผิวหน้าอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของกะปิ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง



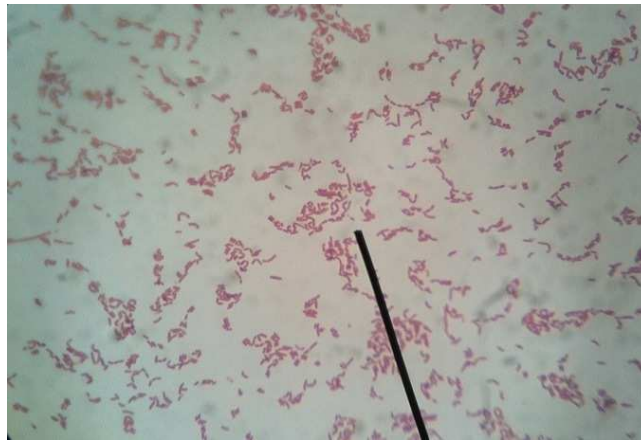
รูปที่ 2 แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจากงานเพาะเชื้อ

แบคทีเรียที่มีการกระจายกันอย่างชัดเจนของโคโลนี โดยนำมาชีดบนอาหารแข็ง NA (Nutrient Ager) ที่เตรียมใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง



### รูปที่ 3 ทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test)

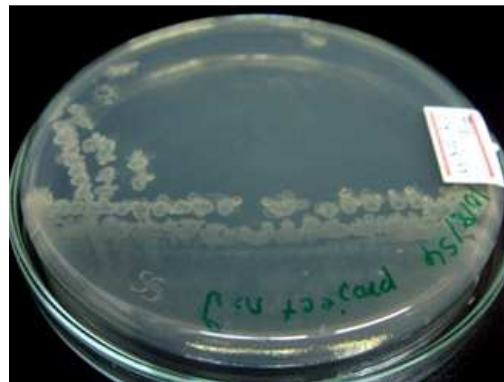
แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดเลือก นำมาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส โดยหยด 3%  $H_2O_2$  ลงบนแบคทีเรียที่เกลี่ยไว้บนแผ่นสไลด์ พบว่าแบคทีเรียที่เกิดฟองแก๊ส ให้ผลคะตะเลสบวก



**รูปที่ 4 การย้อมแกรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้**

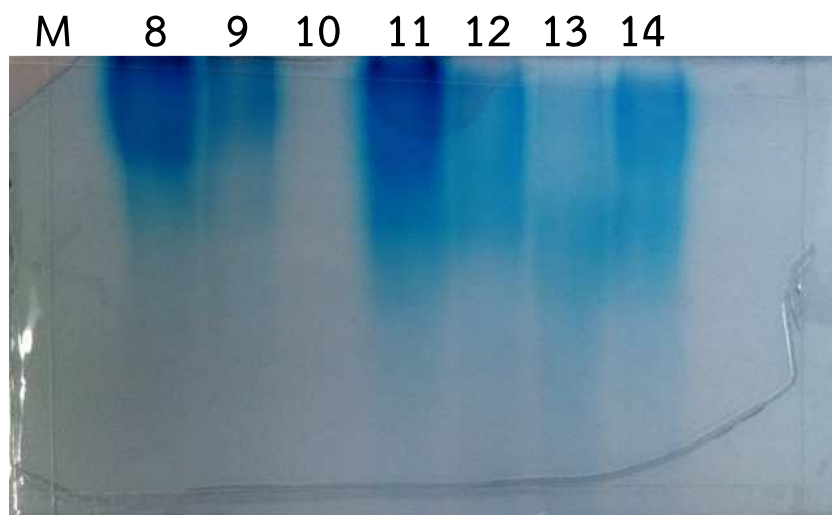
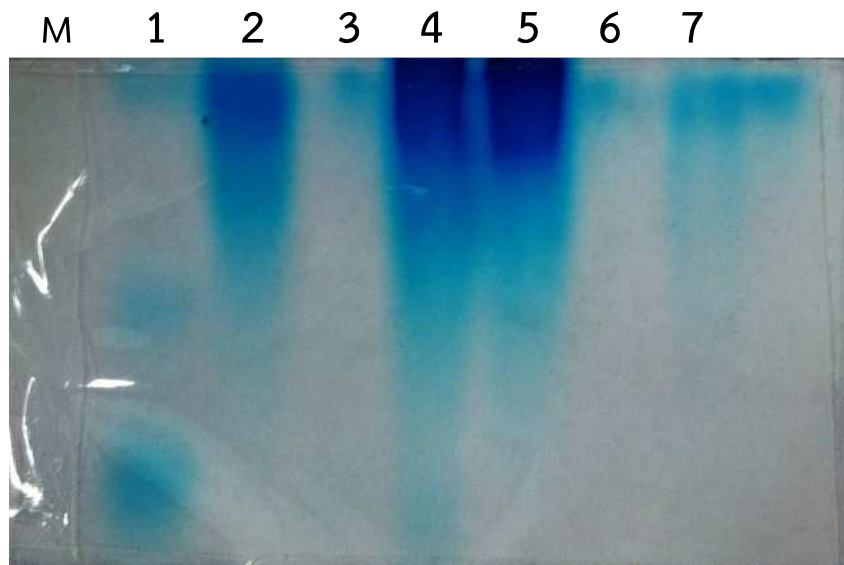
ย้อมแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ที่กำลังขยาย 100x

แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง



### รูปที่ 5 การผลิตสารเมือก (Mucoïd colony productions)

แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาช้ดบนอาหารแข็งชนิด LB (Luria-Bertani) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่สร้าง PGA จะมีการสร้างสารเมือก

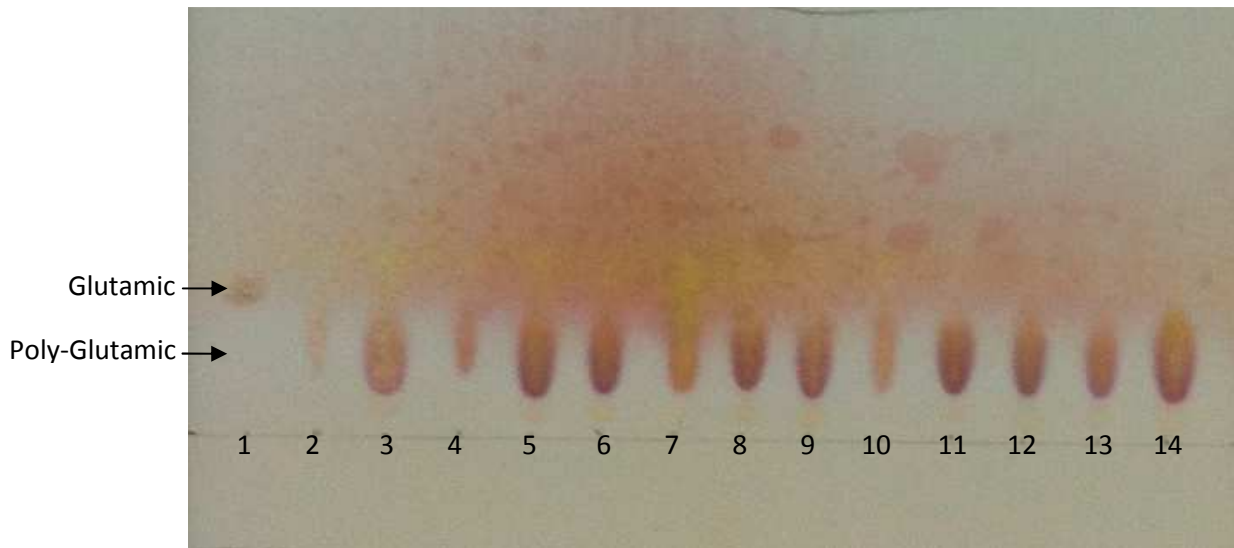


รูปที่ 6 การวิเคราะห์ PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE

PGA ที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้อมด้วย Methylene Blue

M= Media, 1= *B. Subtilis*, 2= BFT1-7, 3= BFT1-16, 4= BFT1-28, 5= BFT1-39, 6= KP5-3, 7= LK1-1

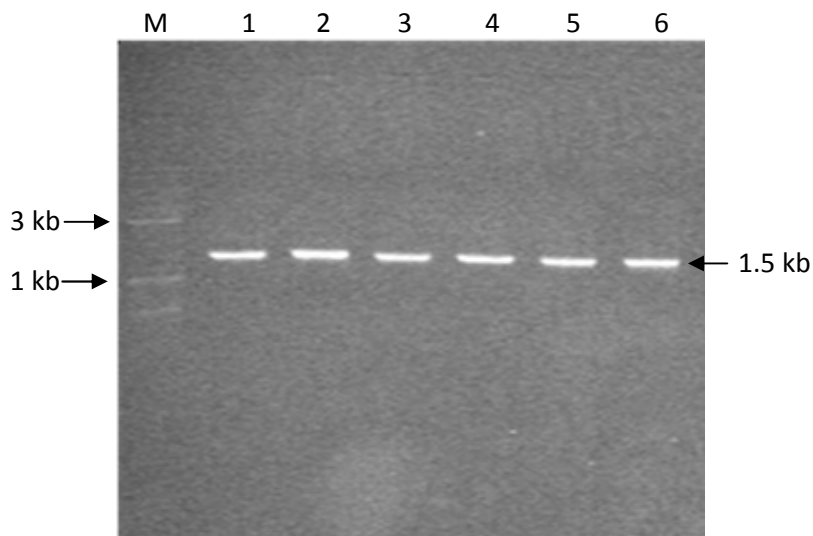
8= SFT1-27, 9= SFT1-28, 10= SFT2-14, 11= STF3-8, 12= KP4.1-7, 13= KP4.2-4, 14= KP4.2-5



รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์การสร้างโพลีเมอร์ของ PGA จากแบคทีเรีย ด้วยวิธี TLC

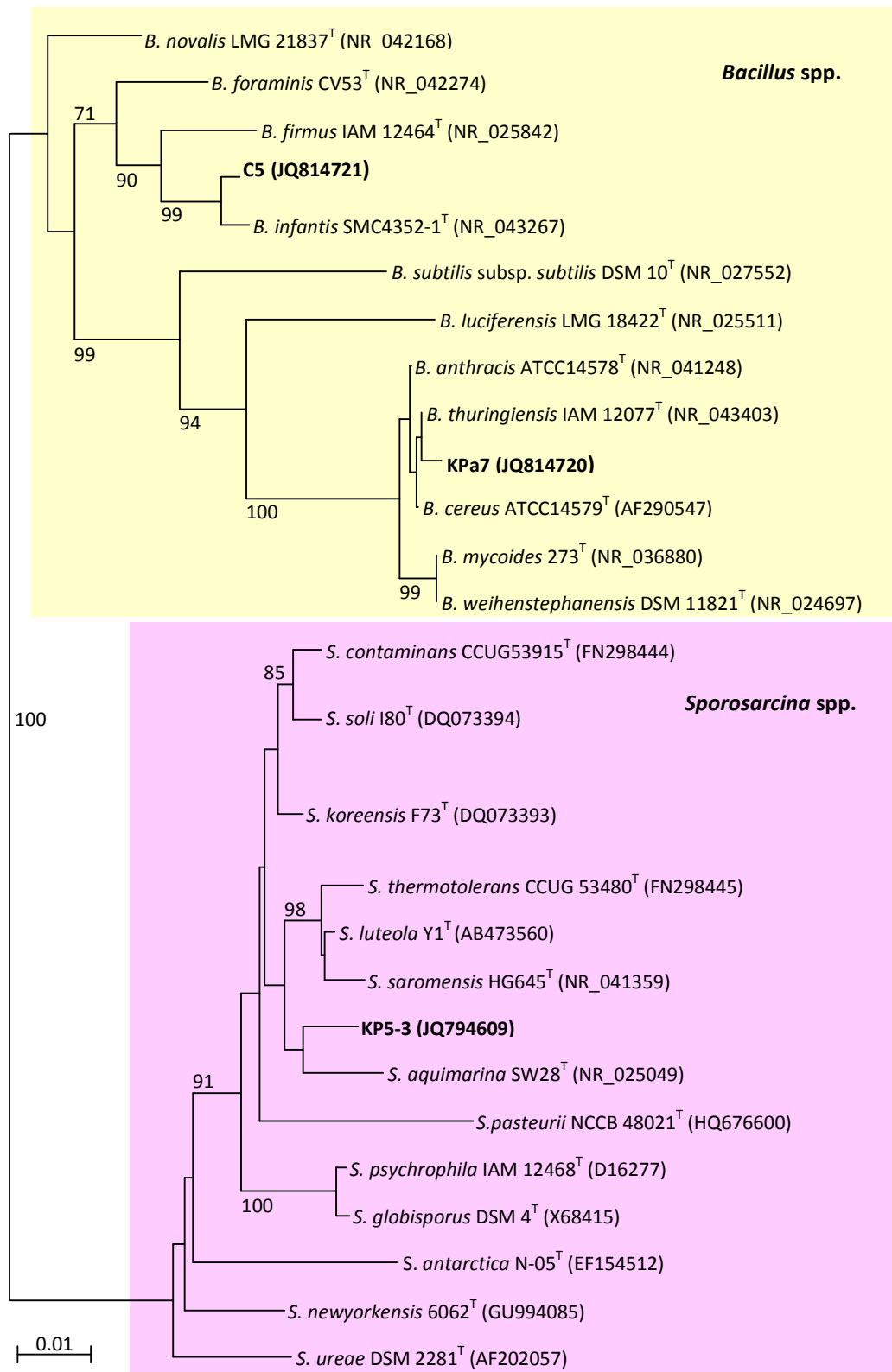
(Thin Layer Chromatography)

1= L-Glutamic, 2= *B. Subtilis*, 3= BFT1-7, 4= BFT1-16, 5= BFT1-28, 6= BFT1-39, 7= KP5-3,  
 8= SFT1-27, 9= SFT1-28, 10= SFT2-14, 11= STF3-8, 12= KP4.1-7, 13= KP4.2-4, 14= KP4.2-5



รูปที่ 8 รูปแสดงผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้าง โพลีกลูตามาเมตที่คัดแยกได้

PCR product ของดีเอ็นเอที่บริเวณ 16S rDNA จากแบคทีเรียที่แยกได้ที่สร้าง PGA ซึ่งทำการย้อมด้วย Syber green จากนั้นตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยขึ้นดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 1.5 kb  
M= DNA ladder, 1= BFT1-7, 2= BFT1-16, 3= BFT1-28, 4= BFT1-39, 5= KP5-3, 6= SFT1-27,  
7= SFT1-28



รูปที่ 9 แผนภาพ Phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตาเมตที่คัดแยกได้ ไอโซเลต C5, Kpa7 และ KP5-3 ขนาดประมาณ 1500 เบส เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงชนิด type strain ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และ *Sporosarcina* สปีชีส์ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล Genbank จากการทำซ้ำ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Clustal X2 และ NJ plot

## ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส

ลำดับเบสของ 16S rDNA จากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการแยกได้ พบว่าเป็นสายพันธุ์บาซิลลัส (*Bacillus* spp.) และสายพันธุ์สปอร์โรซาร์ซิน่า (*Sporosarcina* spp.) โดยแสดงหมายเลข Access Number ที่ได้ทำการเสนอ ลำดับเบสไว้ในฐานข้อมูล Genbank

### *Bacillus* sp. KPa7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ814720.1

>gi|386278551|gb|JQ814720.1| *Bacillus* sp. KPa7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TGCAGTCGAGCGATGGATAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA
TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG
CTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACCGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGCAGACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGGAAATCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
AACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACAC
ACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC
```

### *Bacillus* sp. C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ814721.1

>gi|386278552|gb|JQ814721.1| *Bacillus* sp. C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TACATGCAAGTCGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC
TGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATGCATTTCCCTCATGGGGATATGCTGAAA
GATGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAA ACTCTGTTG
TCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAACTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGGACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGGAAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA ACTGACGC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCTTCGGGGACAGGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
CTGTCG
```

*Sporosarcina* sp. KP5-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ794609.1

>gi|387281850|gb|JQ794609.1| *Sporosarcina* sp. KP5-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGCAGTCGAGCGGATCAATGGGAGCTTGCTCCCGGCGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCT  
GCAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCAGTTCCTCCGCATGGAGGAACTCTGAAAGACGG  
TTTCGGCTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATGCGT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCGA  
GGGAAGAACACGTACGGGAGTCACTGCCCGTACCTTGACGGTACCTCGTCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGA  
TGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCC  
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA  
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG  
GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  
ATCCCGCTGACCGGCATGGAGACATGCCTTCCCCTTCGGGGGCGAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAATCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGT  
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGACGGTACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAAACCGTTCCAGTTCCGATTGCAGG  
CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT  
ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTA

## บทที่ 5 สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยนี้สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิต  $\gamma$ -PGA จากตัวอย่างน้ำ ดิน และอาหารหมัก เช่น กะปิ จากทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง จำนวน 300 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจนได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ซึ่งพบทั้งลักษณะท่อนสั้นและท่อนยาว ให้ผลการทดสอบคดตะเลสเป็นบวก ซึ่งคาดว่าจะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. วิเคราะห์การผลิต  $\gamma$ -PGA ด้วยอาหาร PGA production medium ซึ่งประกอบด้วย 2% glucose, 2% L-glutamate และ 0.5  $\mu$ g/ml Biotin พบว่า 10 ไอโซเลท สามารถผลิต PGA ได้ในปริมาณสูง เป็นโพลีเมอร์สายยาว นอกจากนี้ยังทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของ 16S rDNA พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus infantis* และ *Bacillus thuringiensis* และจากการสร้างแผนภาพ Phylogenetic tree ของเชื้อที่สร้างสารโพลีกลูตามิกที่คัดแยกได้ ไอโซเลท C5, Kpa7 และ KP5-3 ขนาดประมาณ 1500 เบส เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงชนิด type strain ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ *Sporosarcina* สปีชีส์ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล Genbank จากการทำซ้ำ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม Clustal X2 และ NJ plot ซึ่งแบคทีเรีย *Sporosarcina aquimarina* เป็นสายพันธุ์ใหม่ซึ่งเพิ่งจะถูกค้นพบในน้ำทะเลแถบประเทศเกาหลี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการค้นพบแบคทีเรียดังกล่าวครั้งแรกในประเทศไทย แยกได้จากตัวอย่างกะปิ

## เอกสารอ้างอิง

1. Ashiuchi, M., Soda, K., and Mison, H. (1999) A poly- $\gamma$ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- $\gamma$ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 6-12.
2. Ashiuchi, M and Misono, H. (2002) Biochemistry and molecular genetics of poly- $\gamma$ -glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 9-14
3. Bhattaryya, D., Hestekin, J.A., Brushber, P., Cullen, L., Bachas, L. G., and Sikdar, S. K. (1998) Novel poly- $\gamma$ -glutamic acid functionalized microfiltration membranes for absorption of heavy metals at high capacity. *J. Mem. Sci.*, **14**, 121-135.
4. Bovarnick, M. (1942) The formation of extracellular D(-)-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **145**, 415-424.
5. Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **148**, 107-127.
6. Cheng, C., Asada, Y., and Aida, T. (1989) A poly- $\gamma$ -glutamate synthetic system of *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2369-2375.
7. Chunchart, O., Hanayama, T., Hidesaki, M., Tanimoto, H., and Tahara, Y. (2006a) Structure of hydrolysed product (F-2) released from  $\gamma$ -glutamic acid by  $\gamma$ -glutamyl hydrolase YwtD of *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2289-2291.
8. Chunchart, O., Itoh, T., Sukchotiratana, M., Tanimoto, H., and Tahaa, Y. (2006b) Characterization of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase produced by *Bacillus* sp. isolated from Thai Thuanoa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2779-2782.
9. Cromwick, A. M. and Gross, R. A. (1995) Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A physiology and  $\gamma$ -poly(glutamic acid) formation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **17**, 259-267.

10. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
11. Giannos, S. A., Shah, D., Gross, R.A., Kaplan, D.L., and Mayer, J.M. (1990) Poly (glutamic acid) produced by bacterial fermentation. In: E.A. Dawes(Ed), *Novel Biodegradable Microbial polymers*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 457-460.
12. Gutcho, S. (1977) Waste treatment with poly electrolytes and other flocculants. Noyes Data Corp. Park Ridge, NJ. Pp. 1-37.
13. Handy, W. E. and Rydon, H. N. (1946) The capsule substance of *Bacillus anthracis*. *Biochem. J.*, **40**, 297-309.
14. Hara, T., Fujio, Y., and Ueda, S. (1982b) polyglutamate production of *Bacillus subtilis* (natto). *J. Appl. Biochem.*, **4**, 112-120.
15. Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A., Tinall, B. J., Steinbuchel, A. (2001) Transfer of IB1T to *Natriaba taiwanensis* sp. nov. a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented, member of the Archaea from Egypt that produced extracellular poly (glutamic acid). *Int. J. Evol. Microbiol.*, **51**, 1133-1142.
16. Ho, G., Ho, T., Hsieh, K., Su, Y., Lin, P., Yang, J., Yang, K., and Yang, J. (2006)  $\gamma$ -polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities., *J. Chinese Soc.*, **53**, 1363-1384.
17. Ito, Y., Tanaka, T., Ohmachi, T., and Asada, Y. (1996) Glutamic acid independent production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosic. Biotech. Biochem.*, **60**, 1239-1242.
18. Ivanovics, G. and Bruckner, V. (1973a) Chemische and immunologische studien uber den mechanismus der milibrandinfektion und immunitat, die chemische spezifischen substanz des *Bacillus mesentericus*. *Z. Immunitforsch Exp. Ther.*, **90**, 304-315.
19. Ivanovics, G. and Erls, L. (1936b) Ein beitrag zum wesen den kapselsubstanz des milzbrandbacillus *Z. Immunitforsch Exp. Ther.*, **90**, 5-19.

20. Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.
21. Ko, Y., H. and Gross, R. A. (1998) Effects of glucose and glycerol on  $\gamma$ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a. *Biotech. Bioeng.*, **57**, 430-437.
22. Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J. M., Fisher, E. R., DeLeo, R., and Otto, M. (2005) Key role of poly- $\gamma$ -glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.*, **115**, 688-694.
23. Kubota, H., Nambu, Y., Takeda, H., and Endo, T. (1992) Poly- $\gamma$ -glutamic acid estr shaped body theorof. US patent, **5**, 118-784.
24. Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., satoh, A., Tanaka, T., and Taniguchi, M. (1993) Production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01., **57**, 1212-1213.
25. Kumar S, Dudley J, Nei M & Tamura K (2001) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, **9**, 299-306.
26. Kunioka, M. and Goto, A. (1994) Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -polyglutamic acid) from L- glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 867-872.
27. Li, C., Wallace, S., Yu, D., F., and Yang, D. (1999) Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **76**, 499-503.
28. Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N., and Yoshikawa, M. (1998) Cloning and CO<sub>2</sub>-dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.*, **2**, 371-376.
29. Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., and Yoshikawa, M. (1989) Molecular characterization and protein analysis of the cap region which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **171**, 722-730.

30. Milnerowicz, H. and Szewczuk, A. (1984) Bovine kidney  $\gamma$ -glutamyl transferase solubilized forms, biochemical and immunochemical properties. *Enzyme*, **32**, 208-217.
31. Meerak, J., Iida, H., Watanabe, Y., Miyashita, M., Sato, H., Nakagawa, Y., and Tahara, Y. (2007) Phylogeny of  $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **53**, 315-323.
32. Meerak, J., Yukphan, P., Miyashita, M., Sato, H., Nakagawa, Y., and Tahara, Y. (2008) Phylogeny of  $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented locust bean product manufactured in West Africa. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **54**, 159-166.
33. Nagai, T. and Itho, Y. (1997a) Characterization of a generalized transducing phage of poly- $\gamma$ -glutamic acid-producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917-LTV1 insertional mutants defective in poly- $\gamma$ -glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4087-4089.
34. Nagai, T., Koguchi, K., and Itoh, Y. (1997b) Chemical analysis of poly- $\gamma$ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto): evidence that plasmids are not involved in poly- $\gamma$ -glutamic acid production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 139-143.
35. Nakamura, J., Miyashiro, S., and Hirose, Y., (1976) Conditions for production of microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7002. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1341-1347.
36. Nimetz, R., Karcher, U., Kandler, O., Tindall, B., J., and König, H. (1997) The cell wall of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 905-911.
37. North, M.O. and Bell, D.D. (1990) *Commercial chicken production manual*, (Chapman and Hall: New York, London), 472-473.

38. Ogawa, Y., Sugiura, D., Motai, H., Yuasa, K., and Tahara, Y. (1997) Efficient production of  $\gamma$ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1684-1600.
39. Okamoto, S., Yoshii, H., Akagi, T., Akashi, M., Ishikawa, T., Okuno, Y., Takahashi, M., Yamanishi, K., Mori, Y. (2007) Influenza hemaagglutinin vaccine with poly( $\gamma$ -polyglutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, **25**, 8270-8278.
40. Park, Y., Liang, J., Zhiqiang, Y., and Yang, V.C. (2001) Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel. *J. Control Release*, **76**, 37-44.
41. Potter, M., Opermann-Sanio, F. B., and Steinbuchel, A. (2001) Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 617-622.
42. Prescan, E., Moszer, I., Boursier, L., Ramos, R.H.C., Fuente de la V., Hullo, M.F., Lelong, C., Schleich, S., Sekowska, A., Song, B.H., Villani, G, Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, O. (1997) The *Bacillus subtilis* genome from *gerBC* (311 degrees) to *licR* (334 degrees). *Microbiology*, **143**, 3313-3328.
43. Saito, H. and Miura, K. (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem. Biophys. Acta*, **72**, 619-629.
44. Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.*, **4**, 406-425.
45. Sato, H. (2006) Development of methods for systematic classification of microorganisms. In Construction of a genetic resource library of unidentified microbes based on genome information. NEDO report database (<http://www.tech.nedo.go.jp/index.htm>), pp. 698-762 (in Japanese).
46. Sawa, S., Murakawa, T., Watanabe, T., Murao, S., and Omata, S. (1973) Isolation and purification of poly- $\gamma$ -polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* no. 5E and

- studies on its chemical properties (polyglutamic acid fermentation part IV). *Nippon Nogeigakaku Kaishi.*, **47**, 159-165.
47. Shin, I. and Van, Y. (2001) The production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various application. *Bioresource Technol.*, **79**, 207-225.
  48. Suzuki, T. and Tahara, Y. (2003) Characterization of *Bacillus subtilis* *YwtD* gene, whose product is involved in  $\gamma$ -polyglutamic acid degradation. *J. Bacteriol.*, **185**, 2379-2382.
  49. Tanimoto, H., Sato, H., Karasawa, M., Iwasaki, K., Oshima, A., and Adachi, S. (2000) Feed composition containing poly- $\gamma$ -polyglutamic acid. JP Patent WO9635339.
  50. Thompson, J.D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higns, D. G. (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.*, **25**, 4876-4882.
  51. Throne, C.B., Gomez, C. G., Noyes, H. G., Housewright, R. D. (1954) Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **68**, 307-315.
  52. Troy, F. A. (1973) Chemistry and biosynthesis of the poly( $\gamma$ -D-glutamyl) casule in *Bacillus licheniformis*: properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *J. Biol. Chem.*, **248**, 305-315.
  53. Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y. (2002a) Characterization of the *Bacillus subtilis* *YwsC* gene, involved in  $\gamma$ -polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.*, **184**, 337-343.
  54. Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y. (2002b) Difference in transcription levels of *cap* genes or  $\gamma$ -polyglutamic acid production between *Bacillus subtilis* IFO 16449 and Marburg 168. *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 252-254.
  55. Waber, J. (1990) Poly( $\gamma$ -glutamic acid) are the major constituents of nematocysts in hydra (*Hydrozoa, Cnidaria*). *J. Biol. Chem.*, **265**, 9664-9669.
  56. Yamaguchi, F., Ogawa, Y., Kikuchi, M., Yuasa, K., and Motai, H. (1996) Detection of  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) by SDS-PAGE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 255-258.

57. Yang, L.C., Wu, J. B., Ho, G. H., Yang, S. C., Huang, Y. P., and Lin, W. C. (2008) Effects of poly- $\gamma$ -polyglutamic acid on calcium absorption in rats. *Biosci, Biotechnol. Biochem.*, 72, 3084-3090.
58. Yoa, R., Nimec, Z., Ryan, T. J., and Galivan, J. (1996) Identification, cloning and sequencing of a cDNA coding for rat  $\gamma$ -glutamyl hydrolase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8525-852.