



รายงานการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* จากตัวอย่างดินในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่มีความสามารถเจริญและผลิตกรดอะมิโนกลูตามิกได้ดีที่อุณหภูมิสูง

Isolation of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* from northeastern region of Thailand that have an ability to grow and efficiently produce glutamic acid at high temperature

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* จากตัวอย่างดินในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่มี ความสามารถเจริญและผลิตกรดอะมิโนกลูตามิคได้ดีที่อุณหภูมิสูง

Isolation of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* from northeastern region of Thailand that have an ability to grow and efficiently produce glutamic acid at high temperature

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาววรรณตรี ไพศรีศาล นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือ ทำ
ให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณ Prof. Dr. Kazunobu Matsushita แห่ง Yamaguchi
University ประเทศญี่ปุ่น สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทำนี้ขอขอบคุณ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

บทคัดย่อภาษาไทย

สายพันธุ์ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ที่แยกจากดินปนเปื้อนมูลนกเอี้ยง ที่เก็บในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ PP25 PP29 และ PP80 มีความสามารถทนอุณหภูมิสูงและผลิตกรดกลูตามิคได้ดีที่อุณหภูมิสูง

เชื้อ PP25 PP29 และ PP80 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส และสร้างกรดอะมิโนกลูตามิคได้ดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 38 ถึง 38.5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดอะมิโนกลูตามิคของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ความสามารถในการเจริญและสร้างกรดอะมิโนกลูตามิคได้ดีที่อุณหภูมิสูงของเชื้อ PP25 PP29 และ PP80 นี้ชี้ให้เห็นว่า จีโนมโปรไฟล์สำหรับการทนอุณหภูมิสูงและการสร้างกรดอะมิโนกลูตามิคของเชื้อเหล่านี้ อาจมีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปตามธรรมชาติ

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรไฟล์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PP25 PP29 และ PP80 โดยการสร้างแผนภูมิต้นวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าเชื้อ PP25 PP29 และ PP80 มีสายวิวัฒนาการที่แตกต่างจาก *C. glutamicum* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดย PP25 มีสายวิวัฒนาการที่แตกต่างและแยกออกไปจากสายวิวัฒนาการของ PP29 และ PP80

คำสำคัญ: *Corynebacterium glutamicum*, Thermotolerant, L-glutamic acid

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Thermotolerant strains of *Corynebacterium glutamicum*, PP25, PP29, and PP80, with an ability to produce L-glutamic acid at high temperature were isolated from soil contaminated with avian feces collected from northeastern region of Thailand.

The PP25, PP29, and PP80 are able to grow at a temperature range from 30–40°C. The optimum temperature for L-glutamic acid production of these strains is around 38 to 38.5°C which is not an appropriate fermentation condition for the typical strain. The ability to ferment L-glutamic acid at an elevated temperature of PP25, PP29, and PP80 suggested that genomic profiles for thermotolerance and glutamate productivity of these strains probably evolved spontaneously in nature.

The evolutionary of 16S rRNA gene profiles of PP25, PP29, and PP80 were determined by phylogenetic tree analysis. The results showed that PP25, PP29 and PP80 were phylogenetically distinct from the *C. glutamicum* ATCC13032. The results suggested that PP25 diverged from a common ancestor of PP29 and PP80.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Thermotolerant, L-glutamic acid

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 การทบทวนวรรณกรรม.....	3
1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย.....	7
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ.....	10
2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน.....	11
2.3 การจำแนกเชื้อ <i>C. glutamicum</i> อย่างหยาบโดยใช้วิธี PCR.....	11
2.4 การจำแนกเชื้อ <i>C. glutamicum</i> โดยวิธีหาลำดับเบสบน 16S rDNA.....	13
2.5 การวัดการเจริญด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm.....	18
2.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนกลูตาเมตด้วยวิธี Thin Layer Chromatography.....	18
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	20
3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก <i>C. glutamicum</i>	20
3.2 การแยกเชื้อ thermotolerant <i>C. glutamicum</i> จากตัวอย่างดิน.....	26
3.3 การจำแนกเชื้อ <i>C. glutamicum</i> จากเชื้อ 120 isolates.....	27
3.4 จำแนกเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 โดยเทียบลำดับ nucleotides ของยีน 16S rRNA.....	29
3.5 การเจริญของเชื้อ <i>C. glutamicum</i> PP25, PP29 และ PP80 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	33
3.6 การสร้างกรดอะมิโนกลูตาเมตที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80.....	35
3.7 ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80.....	37
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย.....	39
บรรณานุกรม.....	41
ภาคผนวก.....	46

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 การผลิตกรดอะมิโนกลูตาเมตโดยกระบวนการ Microbial fermentation ในระดับอุตสาหกรรม.....	3
รูปที่ 1.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
รูปที่ 3.1 โคโลนีของเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่างดิน เจริญขึ้นมาบบังโคโลนีของเชื้อ <i>C. glutamicum</i> บนอาหารแข็ง LB ที่ผสม nalidixic acid และ sodium azide.....	22
รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างดิน.....	25
รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อกลุ่ม PP เจริญที่ 37°C บนอาหาร glucose minimum.....	26
รูปที่ 3.4 ลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์ ของเชื้อสายพันธุ์ PP อายุ 24 ชั่วโมง เจริญที่ 37°C บนอาหาร glucose minimum.....	27
รูปที่ 3.5 Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 2 kb ที่ได้จาก primers C.ndh-N1 และ C.ndh-C3/1 ของเชื้อ 44 isolates.....	28
รูปที่ 3.6 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP25 กับ <i>C. glutamicum</i> ATCC13032.....	30
รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP29 กับ <i>C. glutamicum</i> ATCC13032.....	31
รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP80 กับ <i>C. glutamicum</i> ATCC13032.....	32
รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ PP25, PP29, PP80 และ <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหารเหลว glucose minimum.....	34
รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบการสร้าง glutamic acid ของเชื้อ <i>C. glutamicum</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°C, 35°C, 37°C, 38°C, 38.5°C, 39°C, 40°C และ 41°C จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร glucose minimum.....	36
รูปที่ 3.11 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 กับเชื้อแบคทีเรียใน genus ต่าง ๆ	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer C.ndh-N1 กับ C.ndh-C3/1.....	12
ตารางที่ 2.2 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer C.ndh-N1 กับ C.ndh-C3/1.....	14
ตารางที่ 2.3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้น DNA.....	15
ตารางที่ 3.1 ผลของของ Nalidixic acid และ Sodium azide ต่อการเจริญของ <i>C. glutamicum</i> และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่อาจพบ ปนเปื้อนในตัวอย่างดิน.....	24

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

ประโยชน์ของกรดอะมิโนมีอยู่ด้วยกันหลายทาง เช่น นำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์และสัตว์, เครื่องปรุงรส หรือเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการทำเครื่องสำอางค์ ยารักษาโรค และยาฆ่าแมลง เป็นต้น (Leuchtenberger, Huthmacher, & Drauz, 2005; Shih & Van, 2001) ดังนั้นการผลิตกรดอะมิโนจึงเป็นอุตสาหกรรมแขนงหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ การพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนเกิดขึ้นครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (Ikeda, 2003) โดยการค้นพบว่ากรดอะมิโนในกลูตามิค (glutamic acid) เป็นสารประกอบที่ทำให้ *คอนบุ* (สาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่คนญี่ปุ่นนิยมนำมาทำน้ำซุบ) มีรสชาติกลมกล่อม จากการค้นพบนี้ทำให้ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศญี่ปุ่น ได้ริเริ่มอุตสาหกรรมการผลิตกรดกลูตามิคขึ้นเป็นครั้งแรกโดยใช้กระบวนการทางเคมี ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะให้สารแปลกปลอมจำพวก racemic acid ปนเปื้อนมากับผลผลิต การผลิตจึงไม่ได้มีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ด้วยเหตุนี้จึงได้เกิดการวิจัยเพื่อหาทางเลือกอื่นที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูตามิค (Ikeda, 2003)

ประมาณปี ค.ศ. 1950 นักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้รายงานการค้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและแอมโมเนีย กลุ่มนักวิจัยได้ตั้งชื่อแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Micrococcus glutamicus* (Kinoshita, Udaka, & Shimono, 1957; Udaka, 1960) ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Corynebacterium glutamicum* (Shukuo Kinoshita, 1986) จากการค้นพบในครั้งนั้น ทำให้มีการใช้ *C. glutamicum* ในการผลิตกรดกลูตามิคแทนวิธีการทางเคมีแบบเดิม บริษัท Kyowa

Hakko ประเทศญี่ปุ่น เป็นบริษัทแรกที่นำเชื้อตัวนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมหมักเพื่อผลิตกรดอะมิโน กลูตาเมต

ปัจจุบัน *C. glutamicum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมการผลิตกรดกลูตามิก รวมไปถึงกรดอะมิโนที่สำคัญชนิดอื่น ๆ เช่น ไลซีน (Hermann, 2003) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่า *C. glutamicum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโน ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มทั่วโลกสนใจที่จะศึกษาเชื้อชนิดนี้กันอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาทางด้านยีนม การพัฒนาสายพันธุ์โดยใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ โดยมีเป้าหมายที่จะนำองค์ความรู้ที่ได้มาใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Kalinowski et al., 2003; Okino et al., 2008; Wendisch, Bott, & Eikmanns, 2006)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

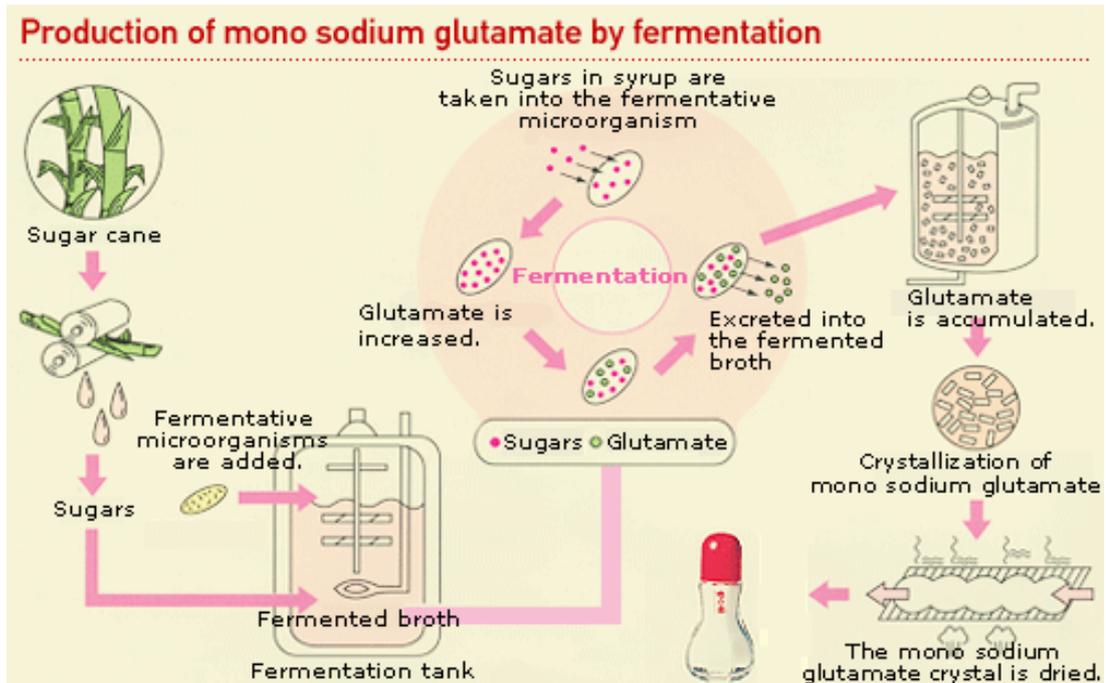
1. เพื่อคัดแยกเชื้อ *C. glutamicum* ที่มีความสามารถในการเจริญและผลิตกรดอะมิโน กลูตาเมตได้ดีที่สุดให้มีสูง
2. เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการสร้างกรดกลูตามิกระหว่างสายพันธุ์ที่แยกได้กับสายพันธุ์ดั้งเดิม *C. glutamicum* ATCC13032

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดกลูตามิก *C. glutamicum* จากแหล่งดินในแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยคาดว่าเชื้อที่แยกได้จะสามารถเจริญและผลิตกรดกลูตามิกได้ดีที่สุดสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) (อยู่ในช่วงประมาณ 37°C to 45°C)

1.4 การทบทวนวรรณกรรม

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนนิยมใช้กระบวนการหมัก (fermentation) โดยเชื้อจุลินทรีย์ (รูปที่ 1.1) เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีทางเคมี

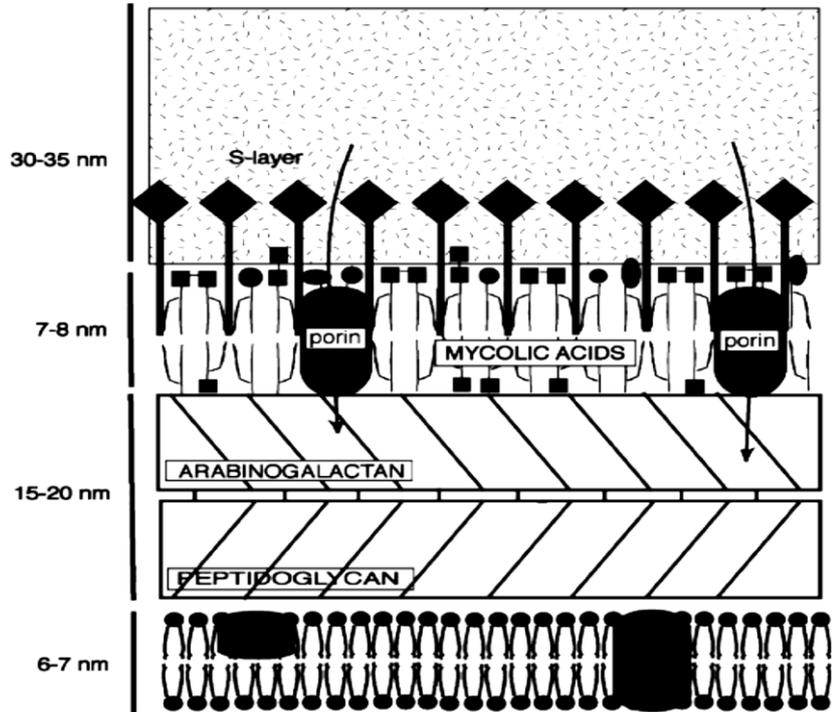


รูปที่ 1.1 การผลิตกรดอะมิโนกลูตาเมตโดยกระบวนการ Microbial fermentation ในระดับอุตสาหกรรม (Ault, 2004)

แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดอะมิโนในแฟมิลีแอสพาติกและกลูตามิคส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี Corynebacteriaceae ได้แก่ *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium calcunae*, *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium falfum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium divaricarium*, *Brevibacterium thiogenitalis* และ *Microbacterium ammoniaphilum* (Abe, Takayama, & Kinoshita, 1967) แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันหลายด้าน เช่น ชนิดของเบส guanine และ cytosine ที่เป็นองค์ประกอบในยีนโนมมีอยู่ในปริมาณสูง

(มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาใกล้เคียงกัน สมาชิกในแฟมิลี Corynebacteriaceae มีลักษณะเด่นที่เหมือนกันคือ มีผนังเซลล์ที่แข็งแรง ประกอบไปด้วยชั้นของ peptidoglycan หนา เหมือนแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และมีชั้นของ mycolic acid ล้อมรอบชั้นของ peptidoglycan อยู่อีกชั้นหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น ๆ (Abe et al., 1967) จากสมาชิกทั้งหมดในแฟมิลีนี้ มีแบคทีเรียอยู่สามสายพันธุ์ที่สามารถใช้กระบวนการหมักในการผลิตกรดอะมิโนได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *C. glutamicum*, *B. lactofermentum* และ *B. flavum* ภายหลังจากที่มีการศึกษาพบว่า ลำดับเบสบนยีนโนมของเชื้อทั้งสามนี้มีความเหมือนกันเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านี้ใหม่โดยยุบรวมให้เชื้อทั้งสามนี้เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ภายใต้อชื่อ *Corynebacterium glutamicum* (Shukuo Kinoshita, 1986; Liebl, Ehrmann, Ludwig, & Schleifer, 1991)

C. glutamicum เป็น soil bacterium พบได้ทั่วไปในดิน ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้าง endospore และไม่ก่อโรค (Abe et al., 1967; Kazuhiko & Komagata, 1972) มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป เนื่องจากมีชั้นของ mycolic acid (รูปที่ 1.2) ล้อมรอบชั้น peptidoglycan อยู่ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีความทนทานต่อ lysozyme มากกว่าเชื้อแกรมบวกชนิดอื่น



รูปที่ 1.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ *Corynebacterium glutamicum* (Eggeling, Krumbach, & Sahm, 2001)

มีรายงานว่าคุณสมบัติจำเพาะของผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้เป็นอุปสรรคหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโน รายงานการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลายพันธุ์ในเอ็นทีที่เกี่ยวข้องกับการทน lysozyme ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติไวต่อ lysozyme มากกว่าสายพันธุ์ปกติ และสามารถปล่อยกรดกลูตามิคออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น (Hirasawa, Wachi, & Nagai, 2001) *C. glutamicum* ต้องการไบโอดีทในการเจริญ (Marrakchi, Bardou, Lanéelle, & Daffé, 2008) จากการศึกษาพบว่าเมื่อจำกัดปริมาณของไบโอดีทในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไบโอดีทเป็นสารอาหารที่สำคัญในกระบวนการสร้างกรดไขมันซึ่งนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในชั้น mycolic acid ของผนังเซลล์ ดังนั้นในสภาพที่เซลล์ขาดไบโอดีทจึงส่งผลให้กรดกลูตามิคที่ผลิตขึ้นในเซลล์ถูกปล่อยออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น เนื่องจากผนังเซลล์ในส่วน

ของชั้น mycolic acid ไม่สมบูรณ์ แข็งแรง เหมือนเซลล์ปกติที่ได้รับไบโอดีนเพียงพอ (Bona & Moser, 1997; Gutmann, Hoischen, & Krämer, 1992)

การศึกษากลไกการสร้างกรดกลูตามิกในเชื้อแบคทีเรีย *C. glutamicum* และแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดอะมิโนชนิดนี้ได้พบว่ามีปริมาณมากพบว่า เซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้มีการสร้างเอนไซม์ α -ketoglutarate dehydrogenase ออกมาน้อยกว่าปกติ ทำให้ α -ketoglutarate ที่เกิดขึ้นในวัฏจักรของ Krebs เปลี่ยนแปลงไปเป็น succinyl-CoA และ succinate ได้น้อยลง หากมีการสะสมของ α -ketoglutarate ในส่วนนี้มาก ๆ จะทำให้วัฏจักรของ Krebs ดำเนินไปไม่ได้ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการ metabolism ของเซลล์ แบคทีเรียเหล่านี้จึงต้องมีกระบวนการที่ช่วยในการลดการสะสมของ α -ketoglutarate โดยเปลี่ยนแปลงเส้นทางการเกิด metabolism ของ α -ketoglutarate ให้ผ่านไปทางการสร้างกรดกลูตามิก เพื่อให้ α -ketoglutarate ลดลง และ วัฏจักรของ Krebs ดำเนินต่อไปได้ จึงพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดกลูตามิกขึ้นภายในเซลล์ได้เป็นปริมาณมาก (Demain, 1972; Hermann, 2003) การสร้างกรดกลูตามิกปริมาณมาก ๆ ภายในเซลล์ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้มีศักยภาพที่อาจนำมาใช้ในการผลิตกรดอะมิโนที่เป็นอนุพันธ์ของ Aspartate ซึ่งต้องใช้กรดกลูตามิกเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ metabolism ภายในเซลล์ แบคทีเรียกรดกลูตามิกจึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตกรดอะมิโนสำคัญชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรม เช่น lysine, methionine, threonine และ isoleucine

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการศึกษาเพื่อแยกเชื้อกรดกลูตามิก *C. glutamicum* ที่ทนอุณหภูมิสูงจากแหล่งดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยคาดว่าเชื้อที่แยกได้จะสามารถโตและสร้างกรดกลูตามิกได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า wild type ทำให้เชื้อกลุ่มนี้มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ระบบควบคุมความเย็นเพื่อลดอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก บวกกับปัญหาสภาวะโลกร้อนที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้การหมักในระดับอุตสาหกรรมต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมความเย็นที่สูงขึ้นกว่าปกติ

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

C. glutamicum เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนมาเป็นเวลานาน โดยการผลิตกรดอะมิโนปริมาณมาก ๆ เพื่อใช้ในเชิงการค้า จำเป็นต้องมีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมัก (fermentor) ขนาดใหญ่ การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาดใหญ่จะทำให้เกิดการสะสมของความร้อนที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมาระหว่างการเจริญและแบ่งตัว ส่งผลให้อุณหภูมิในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจุดที่อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่เชื้อจะเจริญและสร้างกรดอะมิโนออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถังหมักในโรงงานอุตสาหกรรมจึงต้องมีระบบควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้อุณหภูมิตลอดกระบวนการหมักคงที่อยู่ในระดับที่แบคทีเรียจะเจริญและสร้างกรดอะมิโนออกมาได้มากที่สุด กระบวนการควบคุมอุณหภูมินั้นมีค่าใช้จ่ายสูง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตกรดอะมิโนสูงตามไปด้วย ปัญหานี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยเพื่อคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหมัก โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะไปลดต้นทุนการผลิตที่เสียไปกับการจัดการระบบควบคุมอุณหภูมิของถังหมัก

การผลิตกรดอะมิโนกลูตาเมตโดยเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ดั้งเดิมจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิประมาณ 30°C (Hermann, 2003) การหมักกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมโดยเชื้อกลุ่มนี้จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินกว่านี้

มีรายงานการวิจัยว่าเชื้อ *C. glutamicum* 2262 ที่ไม่ทนร้อน สามารถปล่อยกรดกลูตามิคออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมัก จาก 33°C ไปเป็น 39°C แต่การสร้างกรดกลูตามิคของเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่ค่อยคงที่ มีการแปรผันสูง โดยเฉพาะเมื่อมีการเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาาน และเมื่อนำเชื้อมาใช้จริงในการหมักก็ยังคงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิในการผลิตเพื่อให้ได้กรดกลูตามิคออกมามากที่สุด (Stansen et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ที่อุณหภูมิสูง มักไม่ค่อยคงตัว พบการแปรปรวนของการเจริญและการผลิตกรดอะมิโนที่อุณหภูมิสูงได้บ่อย และยังไม่มียารายงานว่ามีเชื้อสายพันธุ์ใดของ

C. glutamicum ที่มีการเจริญและสร้างกรดกลูตามิคได้คงตัวที่อุณหภูมิสูง งานวิจัยเพื่อการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* ที่ทนร้อนจึงเป็นหัวข้อที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจ เพื่อที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ประเทศไทยเป็นประเทศในแถบเส้นศูนย์สูตรที่มีอากาศร้อน-ชื้น มีอุณหภูมิในช่วงวันสูงเกือบตลอดปี จัดเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าพื้นที่ในแถบอื่นของโลก จึงเป็นแหล่งที่มีความเหมาะสมในการคัดแยกเชื้อกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูง รวมถึงเชื้อ *C. glutamicum* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* ที่มีคุณสมบัติทนร้อน สามารถเจริญและสร้างกรดอะมิโนกลูตามิคได้ที่อุณหภูมิที่สูงกว่า wild type และเนื่องจากพื้นที่ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปีสูงกว่าภูมิภาคอื่นของประเทศและยังไม่เคยมีรายงานการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ทนร้อนของ *C. glutamicum* จากภูมิภาคนี้มาก่อน กลุ่มผู้ทำวิจัยจึงมีความสนใจในการคัดแยกหาเชื้อทนร้อนจากดินในแถบนี้ โดยมุ่งหวังว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะนำไปใช้ในการพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักกรดกลูตามิครวมถึงกรดอะมิโนสำคัญชนิดอื่น ๆ ในสภาวะที่ไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ เพื่อลดพลังงานและต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนโดยแบคทีเรีย *C. glutamicum* เช่น ใช้เพื่อปรับปรุงสภาวะการหมักให้เหมาะสม ใช้ปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้ผลิตกรดอะมิโนได้สูงและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะมิโนเพื่อการค้า

3. ปรับปรุงฐานะทางเศรษฐกิจของประเทศในด้านการผลิตกรดอะมิโน เพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

4. มีการตีพิมพ์ เผยแพร่ ผลงาน ในวารสารหรือการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันอุดมศึกษาของรัฐและเอกชน

2. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

3. กระทรวงอุตสาหกรรม

4. คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

5. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

6. สถาบันวิจัยต่าง ๆ

7. บริษัทผลิตกรดอะมิโนเพื่อการค้า

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินคือ Lysogeny Broth (LB) และอาหาร glucose minimum โดย LB มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ tryptone 10, yeast extract 5 และ NaCl 10 สำหรับ glucose minimum medium มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ glucose 10, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 3, NH_4Cl 3, urea 2, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, casamino acid 0.5, thiamin-HCl 0.001, biotin 0.00003 และ metal mixture 1 ml การเตรียม metal mixture ทำโดยละลาย $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.990 g, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.880 g, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.393 g, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.072 g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.088 g และ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.037 g ในน้ำ 1 ลิตร เมื่อต้องการเตรียมอาหารแข็ง จะทำการเติม agar 1.5% ลงไปในส่วนผสม อาหารที่ใช้เก็บสายพันธุ์เชื้อระหว่างการทดลองจะใช้ LB agar และ/หรือ Nutrient agar (NA) ที่มีส่วนประกอบ (% w/v) ดังนี้ peptone 0.5, beef extract 0.3, NaCl 0.5 และ agar 1.5 สำหรับอาหารที่ใช้สำหรับวัดการเจริญและทดสอบการสร้างกรดกลูตามิกคือ glucose minimum

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส หรือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองนั้น ๆ

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 20 มล. ผสมด้วย nalidixic acid 50 µg/ml of และ sodium azide 20 µg/ml นำสารละลายตัวอย่างดินในอาหารเลี้ยงเชื้อไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายดินมาทำ serial dilution ใน normal saline (0.9% NaCl) แล้วดูตัวอย่างสารละลายดินที่ความเจือจาง 1:10 ถึง 1:10⁴ มา 0.1 มล. เพื่อทำการ spread plate ลงในจานอาหาร glucose minimum ที่ผสม nalidixic acid 50 µg/ml of และ sodium azide 20 µg/ml นำจานอาหารไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเห็นโคโลนีของแบคทีเรียปรากฏบนจานอาหาร เก็บโคโลนีที่มีลักษณะ กลม สีครีมถึงเหลืองนวล ซึ่งตรงกับลักษณะของเชื้อ *C. glutamicum* ไว้เพื่อทำการศึกษา

2.3 การจำแนกเชื้อ *C. glutamicum* อย่างหยาบโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพื่อเพิ่มจำนวนยีนจำเพาะของเชื้อ *C. glutamicum*

การเตรียม DNA แม่แบบทำโดยใช้วิธี freeze-thaw โดยใช้ปลายไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีขนาดเท่าเม็ดถั่วเขียวที่ขึ้นบนจานอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 µl ที่ใส่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มล. นำหลอดปั่นไปแช่ที่ -20°C หรือ -80°C จนสารละลายเชื้อจุลินทรีย์แข็ง หลังจากนั้น นำหลอดปั่นไปที่ 37°C จนสารละลายเชื้อละลายเป็นของเหลว ทำซ้ำประมาณ 5 ครั้ง ระหว่างที่ทำการ freeze-thaw ให้นำสารละลายเชื้อในหลอดปั่นมาผสมด้วยเครื่อง vortex-mixture เป็นระยะ ๆ เพื่อช่วยให้เซลล์แตกดีขึ้น หลังจากทำ freeze-thaw ให้นำหลอดปั่นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 g นาน 1 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก ดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 5 µl ที่มี genomic DNA ปนอยู่ไปใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR

ยีนจำเพาะที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ *C. glutamicum* อย่างหายาบคือยีน *ndh* ที่แปลรหัสให้ เอนไซม์ NADH dehydrogenase การตรวจหายีนนี้ในเชื้อที่คาดว่าจะเป็ *C. glutamicum* ทำโดยใช้ primer จำเพาะที่จับกับยีน *ndh* ของ *C. glutamicum* เท่านั้น primer คู่ที่ใช้ในการทำ PCR คือ C.ndh-N1 ที่มีลำดับเบส CTTGCCGTGCGCGTCGACCAGCAAACGCTA (Nantapong, Kugimiya, Toyama, Adachi, & Matsushita, 2004) และ C.ndh-C3/1 ที่มีลำดับเบส GCGGAATTCACCTGCGGTACCTCACAGTC (Nantapong et al., 2004) กระบวนการทำ PCR ทำโดยผสมส่วนประกอบในปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer C.ndh-N1 กับ C.ndh-C3/1

ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR	ปริมาตร (µl)
1. DNA แม่แบบ	5
2. Top Taq master mixed (2x)	12.5
3. C.ndh-N1 (10 mM)	1
4. C.ndh-C3/1 (10 mM)	1
5. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	5.5
รวม	25

หลังจากผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ลงในหลอด PCR แล้ว กระบวนการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA จำเพาะของยีน *ndh* ทำโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler ของ BIO-RAD (USA) โดยสภาวะการเพิ่มขึ้น DNA เป็นดังนี้

Preheating ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สายคู่ของ DNA แม่แบบแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์

ทำ PCR 30 รอบ โดยใช้ อุณหภูมิสำหรับ Denaturing ที่ 95°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิสำหรับ Anneling ที่ 65°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิสำหรับ Extension ที่ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที

เมื่อครบ 30 รอบ ของ PCR ทำ Extension รอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที

2.4 การจำแนกเชื้อ *C. glutamicum* โดยวิธีหาลำดับเบสบน 16S rDNA

2.4.1 โคลนชิ้นยีน 16S rRNA จากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่ pUCm-T vector

เพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16S rRNA จากเซลล์แบคทีเรียทดสอบโดยใช้วิธี PCR ซึ่งการเตรียม DNA แม่แบบสำหรับทำ PCR เตรียมโดยวิธี freeze-thaw ตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3 การเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA ทำโดยใช้ universal primers สำหรับ 16S rDNA ที่จำเพาะกับเซลล์โปรคาริโอต โดย forward primer คือ 27F ที่มีลำดับเบส AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (Lane, 1991) ส่วน reverse primer คือ 1525R ที่มีลำดับเบส AAAGGAGGTGATCCAGCC (Lane, 1991) ส่วนผสมของการทำ PCR แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer C.ndh-N1 กับ C.ndh-C3/1

ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR	ปริมาตร (µl)
1. DNA แม่แบบ	5
2. Top Taq master mixed (2x)	12.5
3. 27F (10 mM)	1
4. 1525R (10 mM)	1
5. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	5.5
รวม	25

หลังจากผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ลงในหลอด PCR แล้ว กระบวนการเพิ่มจำนวนชิ้น 16S rDNA ทำโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler ของ BIO-RAD (USA) โดยสภาวะการเพิ่มขึ้น DNA เป็นดังนี้

Preheating ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สายคู่ของ DNA แม่แบบแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์

ทำ PCR 25 รอบ โดยใช้ อุณหภูมิสำหรับ Denaturing ที่ 95°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิสำหรับ Anneling ที่ 50°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิสำหรับ Extension ที่ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที

เมื่อครบ 25 รอบ ของ PCR ทำ Extension รอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที

นำชิ้น 16S rDNA ที่ได้จาก PCR มาโคลนเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ pUCm (Bio Basic, Canada)

การเชื่อมต่อกัน 16S rDNA กับพลาสมิด pUCm ทำโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ส่วนประกอบของ

ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ DNA แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้น DNA

ส่วนผสมในปฏิกิริยา	ปริมาตร (µl)
1. 10x Ligation buffer	1
2. pUCm	1
3. ชิ้น 16S rDNA ที่ได้จากการทำ PCR	X
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	7-X
5. T4 DNA ligase	1
รวม	10

ผสมส่วนประกอบตามตาราง 2.3 ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มล. ให้เข้ากันดี แล้วนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 คืน (ประมาณ 16 ถึง 18 ชั่วโมง) เมื่อครบเวลา นำพลาสติกลูกผสมที่มีชิ้น 16S rRNA แทรกอยู่ ที่ได้จากการเชื่อมต่อ เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli*

2.4.2 นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน 16S rRNA เข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี CaCl_2 และ Heat shock

การเตรียมเซลล์ *E. coli* ที่มีประสิทธิภาพสูง (competent cells) ในการรับ DNA จากภายนอก เซลล์เตรียมจากสายพันธุ์ DH5 α (Woodcock et al., 1989)

การเตรียมหัวเชื้อ (pre-culture) ของ *E. coli* DH5 α ทำโดย เพาะเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มล. ที่บรรจุอยู่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 15 มล. นำหลอดไปบ่มโดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 18 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อ 1 มล. ลงใน flask ขนาด 300 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว LB อยู่ 100 มล. นำ flask ไปบ่มที่ 37°C พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เมื่อได้ค่า OD_{600} อยู่ในช่วง 0.4 ถึง 0.5 ให้หยุดเลี้ยงเชื้อ แล้วนำ flask ที่มีเชื้อเจริญอยู่มาแช่ในน้ำแข็งนาน 10 ถึง 20 นาที แบ่งเชื้อจาก flask ลงในหลอด conical ปิดหลอดเชื้อขนาด 50 มล. ที่ pre-chilled ในน้ำแข็งมาแล้ว นำหลอดบรรจุเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 7,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ โดยละลายตะกอนเซลล์เบา ๆ ด้วย 0.1 M MgCl_2 ที่ผ่านการแช่เย็นมาแล้ว ปริมาตร 30 มล. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M CaCl_2 แช่เย็น ปริมาตร 30 มล. บ่มหลอดในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายเซลล์ในสารละลาย 0.1 M CaCl_2 ผสม 15% glycerol แช่เย็น ปริมาตร 1 มล. แบ่งสารละลายเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มล. หลอดละ 100 μl สารละลายเซลล์ที่ได้สามารถนำไปใช้ เป็น competent cells เพื่อรับสารพันธุกรรมจากภายนอกเซลล์ได้ทันที หรือสามารถเก็บไว้สำหรับใช้งานในอนาคต โดยนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลวให้เซลล์แข็งตัวอย่างรวดเร็วและนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C

การถ่ายทอด (transformation) พลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock ทำได้โดย ผสม DNA กับ competent cells ที่เตรียมไว้ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มล. นำหลอดไปป้อนในน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ทำ heat shock โดยนำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 วินาที แล้วย้ายหลอดลงแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำหลอดไปป้อนที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 50 μ l ไปทำการ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml กับ X-gal ความเข้มข้น 80 μ g/ml นำจานไปป้อนที่ 37°C นาน 1 คืน โคโลนีสีขาวที่ปรากฏบนจานอาหารคือโคโลนีที่รับพลาสมิดลูกผสม (pUCm ที่มีชิ้น 16S rDNA แทรกอยู่) เข้าไป ส่วนโคโลนีสีฟ้า จะเป็นโคโลนีที่รับเฉพาะ vector pUCm เข้าไปภายในเซลล์

2.4.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

สกัดพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มีชิ้น 16S rDNA แทรกอยู่ออกมาจากเซลล์ *E. coli* DH5 α นำพลาสมิดที่สกัดออกมาไปวิเคราะห์ลำดับเบสบนชิ้น 16S rDNA โดยใช้เครื่อง Automated Sequencer และใช้ universal primers M13/pUC Forward ที่มีลำดับเบส CCCAGTCACGACGTTGTAACG (Helianti, Nurhayati, & Wahyuntari, 2008) และ M13/pUC Reverse ที่มีลำดับเบส AGCGGATAACAATTTC ACACAGG (Helianti et al., 2008) โดย primer คู่นี้จะมีลำดับเบสที่เข้าคู่กันกับลำดับเบสที่อยู่บน vector pUCm ในตำแหน่งที่ขนานข้ามกับชิ้น 16S rDNA ที่แทรกอยู่บน vector นั้น นำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้จากตัวอย่างตรงกับแบคทีเรียชนิดใด โดยนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank NCBI

นำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้มาทำการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม BioEdit และ MEGA 4.0

2.5 การวัดการเจริญด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD₆₀₀)

เตรียมหัวเชื้อของสายพันธุ์ที่จะวัดการเจริญโดยเฉพาะโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ของเชื้อทดสอบ ลงไปในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มล. ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 18 ถึง 20 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 500 มล. นำ flask ไปบ่มที่อุณหภูมิที่ใช้สำหรับวัดการเจริญ โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเซลล์จาก flask ออกมาวัดค่า OD₆₀₀ เป็นระยะ นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่าความขุ่นกับเวลา

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในกลูตามेटด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์การสร้างกรดกลูตามิคในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุใน flask ขนาด 500 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่จะทำการวิเคราะห์ โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วง late log หรือ early stationary ให้เก็บส่วนของน้ำเลี้ยง เชื้อมาวัดหาปริมาณกรดกลูตามิค โดยหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 ถึง 50 μ l ลงบนแผ่น silica gel 60 (Merck AG, Germany) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่น silica gel ไปแช่ในโถแก้วที่มีตัวทำละลาย ประกอบไปด้วย butanol:glacial acetic acid:น้ำ ในอัตราส่วน 60:15:25 ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนตัวทำละลายเคลื่อนที่มาจนเกือบสุดปลายอีกด้านหนึ่งของแผ่น silica gel (ระยะ 1.5 ถึง 2 ซม. จากปลายด้านที่ไม่ได้หยดตัวอย่าง) นำแผ่น silica gel ไปตากให้แห้งในตู้ดูดควัน (fume hood) ฟ่นสารละลาย 0.2% ninhydrin ลงไปให้ทั่วแผ่น silica gel อย่างสม่ำเสมอ รอจนเห็นจุดสีม่วงของกรดกลูตามิคปรากฏขึ้น คำนวณหาค่า retention factor (RF) ของตัวอย่าง แล้วนำไปเทียบกับสารละลายบริสุทธิ์ของกรดกลูตามิคที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

ค่า RF คือค่าอัตราส่วนระหว่าง ระยะทางที่กรดกลูตามิคเคลื่อนที่ (ตำแหน่งที่หยุดตัวอย่าง ถึงจุดกึ่งกลางของวงสีม่วง) ต่อ ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ตำแหน่งที่หยุดตัวอย่างถึงตำแหน่งที่ ตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง)

ปริมาณของกรดกลูตามิควัดได้โดย นำวงสีม่วงที่เกิดบนแผ่น silica gel มาสกัด แล้วนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสง โดยตัดส่วนที่เป็นวงสีม่วงจากแผ่น silica gel นำไปแช่ใน 0.005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 75% ethanol ปริมาตร 2 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืน แสงจำเพาะของกรดกลูตามิคที่ความยาวคลื่น 570 nm ปริมาณกรดกลูตามิคในตัวอย่างคำนวณได้ จากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟของสารละลายกรดกลูตามิคมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 และ 2.0 μmole ตามลำดับ

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก *Corynebacterium glutamicum* จากตัวอย่างดิน

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างในธรรมชาติมักใช้อาหารประเภท Selective และ/หรือ Differential ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อที่ต้องการแยก โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ต้องไปยับยั้งไม่ให้เชื้อชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเจริญขึ้นมา และ/หรือ ไปลดการเจริญของเชื้อปนเปื้อนให้เจริญขึ้นมาน้อยที่สุด ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อก็ควรมีคุณสมบัติส่งเสริมให้เชื้อที่ต้องการแยกเจริญขึ้นมามากที่สุด แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ต้องการแยกกับเชื้อปนเปื้อนที่ไม่ต้องการได้ เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการที่จะคัดแยกเชื้อ *C. glutamicum* จากตัวอย่างดิน ซึ่งจัดเป็นตัวอย่างที่มีความหลากหลายในด้านชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง อาหารที่ใช้คัดเลือก *C. glutamicum* จากตัวอย่างดินจึงควรมีคุณสมบัติตามที่กล่าวไว้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับอาหาร selective ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *C. glutamicum*

ในปี ค.ศ. 2007 มีบทวิทยานิพนธ์รายงานการคัดแยก *C. glutamicum* จากตัวอย่างดินในประเทศไทยโดยใช้อาหารเหลว D2 (Kithakarn & Trakulnaleamsai, 2007) ที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในดินชนิดอื่น ได้แก่ Nalidixic acid ความเข้มข้น 10 µg/ml และ Sodium azide ความเข้มข้น 2 µg/ml โดย Nalidixic acid มีคุณสมบัติไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เซลล์ต้องใช้ในการคลายเกลียว supercoil ระหว่างกระบวนการ DNA replication หากเอนไซม์ DNA gyrase ไม่ทำงาน กระบวนการ replication จะถูกยับยั้ง เซลล์ไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Boyle, Cook, & Goss, 1969; Cook, Brown, Boyle, & Goss, 1966; Goss,

Deitz, & Cook, 1964) *C. glutamicum* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีผนังเซลล์แข็งแรงกว่าเชื้อแกรมบวกทั่ว ๆ ไป เนื่องจากส่วนของผนังเซลล์ชั้น peptidoglycan ถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของสารประกอบประเภทไขมันที่เรียกว่า mycolic acid ที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรง ทนทาน ให้กับเซลล์ และยังมีรายงานว่า ชั้น mycolic acid เป็นชั้นที่ไปขัดขวางการนำ nalidixic acid เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จึงทำให้ *C. glutamicum* มีความทนทานต่อ nalidixic acid (Park et al., 2008)

Sodium azide (NaN_3) เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการสร้างพลังงาน (ATP) ของเซลล์ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome oxidase (Sousa et al., 2012) ที่ทำหน้าที่ขนส่ง electron ในลูกโซ่ขนถ่าย electron เมื่อกระบวนการขนส่ง electron ของเซลล์ถูกยับยั้ง เซลล์ไม่สามารถสร้าง ATP ได้ ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด การที่ *C. glutamicum* มีความทนทานต่อ sodium azide เนื่องจาก เซลล์มีกระบวนการขนส่ง electron เพื่อสร้าง ATP หลายสาย หากการขนส่ง electron ผ่านเอนไซม์ cytochrome oxidase ถูกยับยั้ง เซลล์ก็สามารถสร้าง ATP ผ่านการขนส่ง electron สายอื่นได้ (Das, Silaghi-Dumitrescu, Ljungdahl, & Kurtz, 2005; Kabus, Niebisch, & Bott, 2007) เชื้อจึงเจริญในสภาวะที่มี sodium azide ได้

ผู้วิจัยเริ่มต้นทำการแยกเชื้อ *C. glutamicum* จากตัวอย่างดินโดยใช้อาหาร LB ที่ผสม nalidixic acid และ sodium azide ในระดับความเข้มข้นเดียวกับที่มีรายงานไว้ในปี ค.ศ. 2007 (Kithakam & Trakulnaleamsai, 2007) ผลการทดลองพบว่า มีโคโลนีของจุลินทรีย์ขึ้นมาจากอาหารหลายชนิด จนไม่สามารถจำแนก หรือ คัดแยก *C. glutamicum* ออกมาจากจานอาหารได้ (รูปที่ 3.1) แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อที่ผสมลงไปในการอาหารอาจยังไม่เพียงพอและเหมาะสม



รูปที่ 3.1 โคลนิจของเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่างดิน เจริญขึ้นมาดบังโคลนิจของเชื้อ *C. glutamicum* บนอาหารแข็ง LB ที่ผสม naldixic acid 10 µg/ml และ sodium azide 2 µg/ml

เพื่อที่จะลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากดินให้มากที่สุด ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ naldixic acid และ sodium azide ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ naldixic acid และ sodium azide ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลาย ๆ ระดับ โดยเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ naldixic acid ตั้งแต่ 5 ไปจนถึง 65 µg/ml ผสมกับ sodium azide ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ไปจนถึง 26 µg/ml แล้วนำอาหารที่มีความเข้มข้นของ naldixic acid และ sodium azide ในระดับต่าง ๆ มาเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่อาจพบปนเปื้อนได้บ่อยในดิน ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* เทียบกับเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* แล้วสังเกตว่าความเข้มข้นระดับใดที่เชื้อทดสอบ *B. subtilis*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ไม่เจริญ แต่เชื้อ *C. glutamicum* เจริญได้

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 สรุปว่า เชื้อทดสอบทั้งหมดรวมถึง *C. glutamicum* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ naldixic acid 10 µg/ml และ sodium azide 2 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยของ Kitchakarn (Kithakarn & Trakulnaleamsai, 2007) เมื่อความเข้มข้น

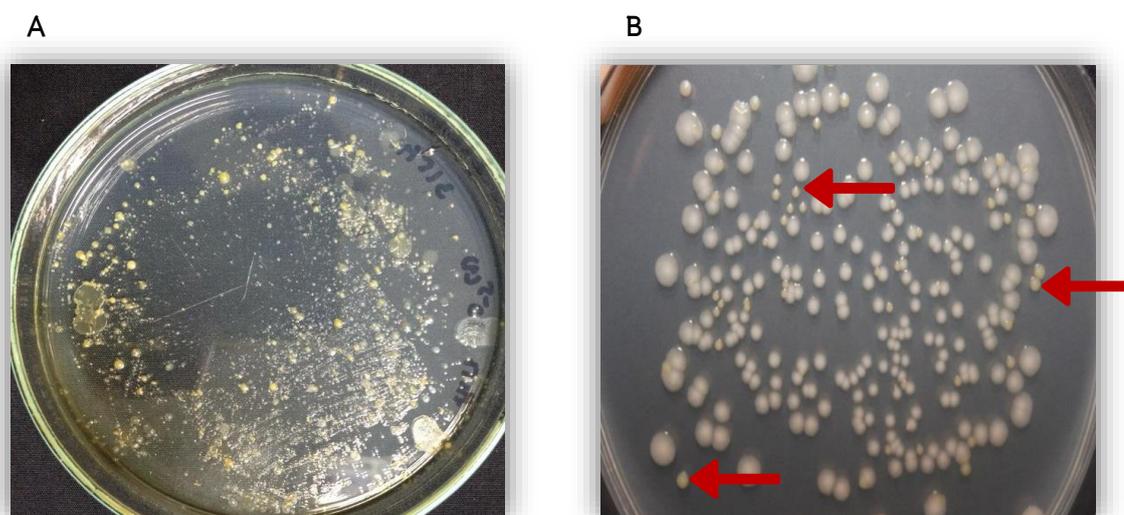
ของ nalidixic acid และ sodium azide เพิ่มมากขึ้น ชนิดของเชื้อทดสอบที่เจริญได้ก็ลดลงเป็นลำดับ และที่ความเข้มข้นของ nalidixic acid เป็น 45 µg/ml และ sodium azide เป็น 18 µg/ml พบว่า ไม่มีเชื้อทดสอบตัวใดเจริญได้ ในขณะที่ *C. glutamicum* ยังสามารถเจริญได้ (ตารางที่ 3.1) ที่ระดับความเข้มข้นของ nalidixic acid เป็น 55 µg/ml และ sodium azide เป็น 22 µg/ml พบว่า *C. glutamicum* ไม่เจริญ (ตารางที่ 3.1) ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นสูงสุดของ nalidixic acid และ sodium azide ที่ *C. glutamicum* สามารถเจริญได้ คือ ที่ความเข้มข้นของ nalidixic acid เท่ากับ 50 µg/ml และ sodium azide เท่ากับ 20 µg/ml ผสมลงในอาหารสำหรับคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน

ตารางที่ 3.1 ผลของของ Nalidixic acid และ Sodium azide ต่อการเจริญของ *C. glutamicum* และกลุ่มเชื้อ

แบคทีเรียทดสอบที่อาจพบปนเปื้อนในตัวอย่างดิน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)		<i>C. glutamicum</i>	เชื้อทดสอบ				
Nalidixic acid	NaN_3		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
5	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	6	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	8	✓	✓	✓	✓	✗	✓
25	10	✓	✗	✓	✗	✗	✓
30	12	✓	✗	✓	✗	✗	✓
35	14	✓	✗	✓	✗	✗	✓
40	16	✓	✗	✓	✗	✗	✓
45	18	✓	✗	✗	✗	✗	✗
50	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗
55	22	✗	✗	✗	✗	✗	✗
60	24	✗	✗	✗	✗	✗	✗
65	26	✗	✗	✗	✗	✗	✗

อย่างไรก็ดี เมื่อผู้วิจัยทดลองเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารแข็ง LB ไปเป็นอาหารแข็ง glucose minimum พบว่า ชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาระหว่างการตัดแยก *C. glutamicum* จากตัวอย่างดินลดลงไปมาก (รูปที่ 3.2) ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อาหารแข็ง glucose minimum ผสม nalidixic acid 50 µg/ml และ sodium azide 20 µg/ml ในการแยก *C. glutamicum* จากตัวอย่างดิน



รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากตัวอย่างดินบนจานอาหาร LB (A) และ glucose minimum (B) ที่ผสม nalidixic acid 50 µg/ml และ sodium azide 20 µg/ml (ส่วนที่ลูกศรชี้ คือ โคโลนีที่คาดว่าจะเป็ *C. glutamicum*)

3.2 การแยกเชื้อ thermotolerant *C. glutamicum* จากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อแยกหาเชื้อ *C. glutamicum* โดยทำการเพาะเลี้ยงที่ 37°C บนอาหาร glucose minimum ที่ผสม nalidixic acid 50 µg/ml และ sodium azide 20 µg/ml ลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อในดินชนิดอื่น โดยวิธีการอย่างละเอียดอธิบายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 2.2 คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะตรงตามลักษณะของเชื้อ *C. glutamicum* คือ มีสีเหลือง โคโลนีกลม ขอบเรียบ (รูปที่ 3.3)

จากตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้งหมด พบเชื้อที่มีโคโลนีคล้าย *C. glutamicum* อยู่ 120 isolates โดยให้ชื่อสายพันธุ์เป็น PP1 ถึง PP120 ตามลำดับ

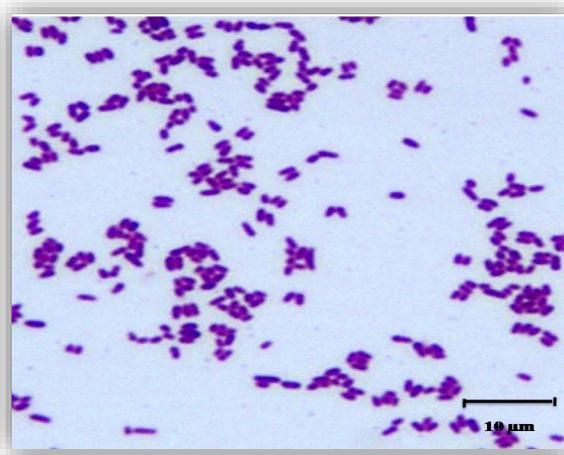


รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อกลุ่ม PP เจริญที่ 37°C บนอาหาร glucose minimum

3.3 การจำแนกเชื้อ *C. glutamicum* จากเชื้อ 120 isolates

นำเชื้อทั้ง 120 isolates มาทดสอบอย่างคร่าว ๆ ว่าเป็นเชื้อ *C. glutamicum* หรือไม่ โดยนำไปย้อมสีแกรม และทำ PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับยีน *ndh* ของ *C. glutamicum*

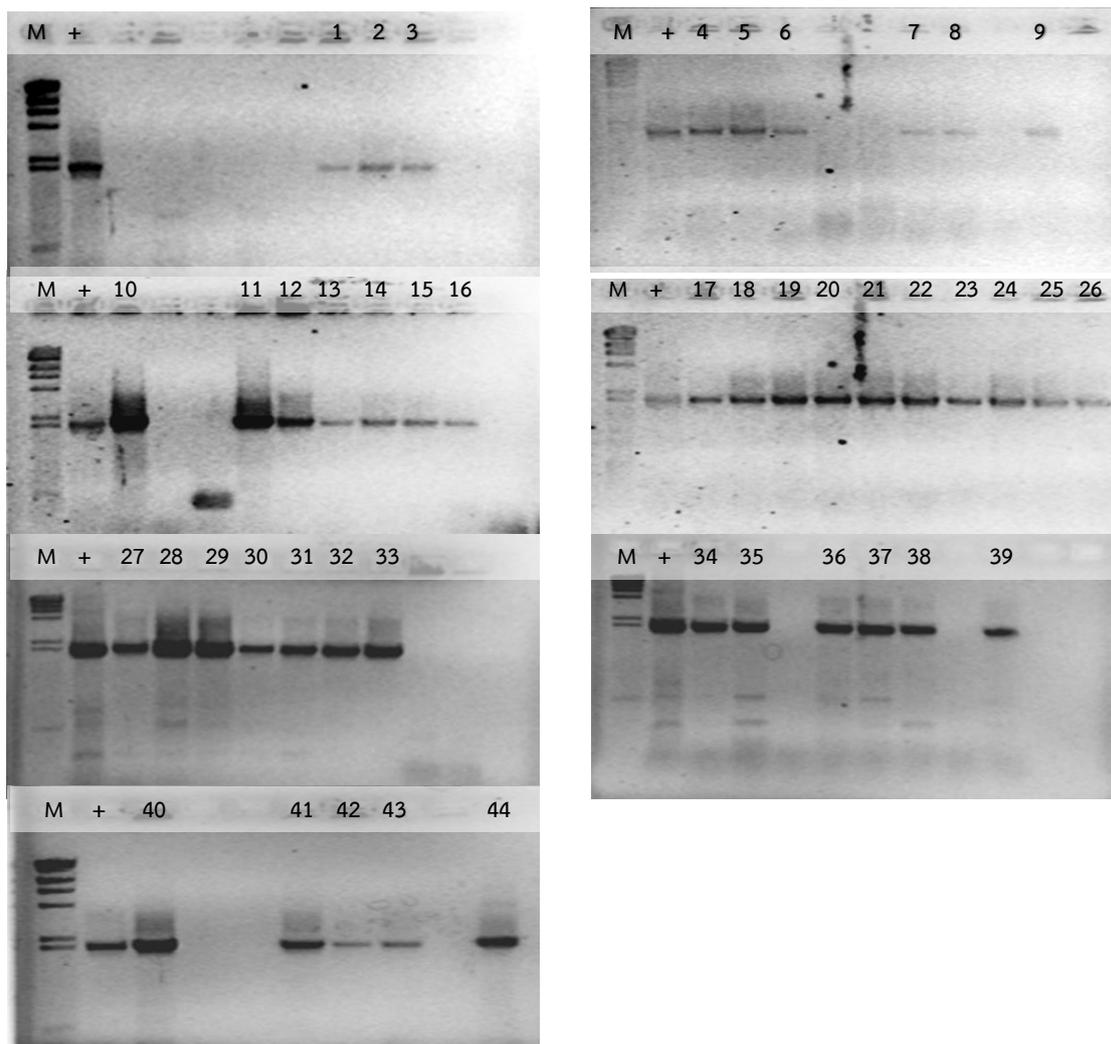
ผลการย้อมสีแกรมพบว่า เชื้อทั้ง 120 isolates ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของเชื้อ *C. glutamicum* (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 ลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์ ของเชื้อสายพันธุ์ PP อายุ 24 ชั่วโมง เจริญที่

37°C บนอาหาร glucose minimum (Bar = 10 μm; กำลังขยายของภาพ = 1000 เท่า)

เมื่อนำเชื้อทั้ง 120 isolates มาทำ PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะ (*C.ndh*-N1 และ *C.ndh*-C3/1) ต่อยีน *ndh* ของ *C. glutamicum* พบว่า มีเพียง 44 isolates ที่สามารถ amplify ชิ้นส่วนขนาด 2 kb ของยีน *ndh* จาก primers จำเพาะ *C.ndh*-N1 และ *C.ndh*-C3/1 ได้ (รูปที่ 3.5) เชื้อทั้ง 44 isolates คือ PP24, PP25, PP26, PP29, PP30, PP37, PP40, PP41, PP43, PP45, PP46, PP48, PP51, PP52, PP53, PP54, PP67, PP68, PP69, PP70, PP71, PP72, PP79, PP80, PP81, PP82, PP83, PP84, PP91, PP92, PP93, PP94, PP95, PP105, PP106, PP108, PP109, PP110, PP112, PP113, PP114, PP117, PP118 และ PP119



รูปที่ 3.5 Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 2 kb ที่ได้จาก primers C.ndh-N1 และ C.ndh-C3/1 ของเชื้อ 44 isolates

(M คือ λ Hind III marker; + คือ positive control; 1 คือ PP24; 2 คือ PP25; 3 คือ PP26; 4 คือ PP29; 5 คือ PP30; 6 คือ PP37; 7 คือ PP40; 8 คือ PP41; 9 คือ PP43; 10 คือ PP45; 11 คือ PP46; 12 คือ PP48; 13 คือ PP51; 14 คือ PP52; 15 คือ PP53; 16 คือ PP54; 17 คือ PP67; 18 คือ PP68; 19 คือ PP69; 20 คือ PP70; 21 คือ PP71; 22 คือ PP72; 23 คือ PP79; 24 คือ PP80; 25 คือ PP81; 26 คือ PP82; 27 คือ PP83; 28 คือ PP84; 29 คือ PP91; 30 คือ PP92; 31 คือ PP93; 32 คือ PP94; 33 คือ PP95; 34 คือ PP105; 35 คือ PP106; 36 คือ PP108; 37 คือ PP109; 38 คือ PP110; 39 คือ PP112; 40 คือ PP113; 41 คือ PP114; 42 คือ PP117; 43 คือ PP118; 44 คือ PP119)

เมื่อนำเชื้อทั้ง 44 isolates ไปทดสอบการสร้างกรดกลูตามิคอย่างคร่าว ๆ ที่ 37°C ในอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 5 มล. พบว่า มีเพียง 3 isolates คือ PP25, PP29 และ PP80 ที่สามารถเจริญและสร้างกรดกลูตามิคได้ดีกว่า wild type (*C. glutamicum* ATCC13032)

3.4 จำแนกเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 โดยใช้การเทียบลำดับ nucleotides ของยีน 16S rRNA

การตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 เป็นเชื้อ *C. glutamicum* ทำได้โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เพื่อนำมาเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ว่าตรงกับเชื้อ *C. glutamicum* หรือไม่ วิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA อธิบายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อที่ 2.4

ผลการทดลองพบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 มีความคล้ายคลึงกับ *C. glutamicum* ATCC13032 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมของเชื้อชนิดนี้ อยู่ถึง 99 % (รูปที่ 3.6, รูปที่ 3.7, รูปที่ 3.8) จึงสรุปว่า เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 ที่แยกได้จากดิน เป็นสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum*

PP25	GGGTCTAATACCGAATATTCACACCACCGTAGGGGTGGTGTGGAAAGCTTTATGCGGTGTGGGATGAGCCTGCGGCCATCACCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGTCTACA 	120
ATCC13032	GGGTCTAATACCGAATATTCACACCACCGTAGGGGTGGTGTGGAAAGCTTTATGCGGTGTGGGATGAGCCTGCGGCCATCACCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGTCTAGCG 	279
PP25	GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCACAAGCCTGATGCACCGACACCCCG 	240
ATCC13032	GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCACAAGCCTGATGCACCGACACCCCG 	399
PP25	TGGGGGATGACAGCCTTCTGGTTGTAACCTCTTCTCTAGGGACAAAACCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAAAACACCGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG 	360
ATCC13032	TGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCGCTAGGGACGAAGCCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAAGACACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG 	519
PP25	TGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGCTGCTGTGAAATCCCGGGGCTTAACTTCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTG 	480
ATCC13032	TGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTGCGCTGCTGTGAAATCCCGGGGCTTAACTTCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTG 	639
PP25	TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGA 	600
ATCC13032	TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGA 	759
PP25	ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGGTGGGCGCTAGGTGTAGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA 	720
ATCC13032	ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGGTGGGCGCTAGGTGTAGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA 	879
PP25	AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATAC 	840
ATCC13032	AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATAC 	999
PP25	GTTTTCCCTTGTGGTGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGT 	960
ATCC13032	GTTTTCCCTTGTGGTGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTATGGT 	1119
PP25	GGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTGGTACAGCGAGTTGCCA 	1080
ATCC13032	GGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTGGTACAGCGAGTTGCCA 	1239
PP25	CACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT 	1200
ATCC13032	CACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT 	1359
PP25	TCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTAGGGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA 	1314
ATCC13032	TCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTAGGGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA 	1473

รูปที่ 3.6 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP25 กับ *C. glutamicum* ATCC13032 (99% identity)

PP29	AGCTTTATGCGGTGTGGGATGAGCCTGCGGCCATCACCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCCTACAGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACA	120
ATCC13032	AGCTTTATGCGGTGTGGGATGAGCCTGCGGCCATCACCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCCTGACGCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACA	324
PP29	CGGCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCACACCCCGTGGGGGATGACAGCCTTCGGGTGTAACTCCTTTCTCTAGGGAC	240
ATCC13032	CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGGGGATGAAGGCCCTTCGGGTGTAACTCCTTTCTCTAGGGAC	444
PP29	AAAACCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAAAACACCCGGCTAACTACGTGCCACCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTG	360
ATCC13032	GAAGCCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCAGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTG	564
PP29	GTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAATCCCGGGCTTAACTTCTGGCGTGCAGCGGATACGGGCATAACTTGAGTGTGTATGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA	480
ATCC13032	GTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAATCCCGGGCTTAACTTCTGGCGTGCAGCGGATACGGGCATAACTTGAGTGTGTATGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA	684
PP29	TCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTGGGCGC	600
ATCC13032	TCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTGGGCGC	804
PP29	TAGGTGTAGGGTCTCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGG	720
ATCC13032	TAGGTGTAGGGTCTCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGG	924
PP29	AGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATACGTTTTCCCTTGTGGTGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA	840
ATCC13032	AGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATACGTTTTCCCTTGTGGTGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA	1044
PP29	GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGTGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGG	960
ATCC13032	GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGTGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGG	1164
PP29	GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCACACCGTGAAGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCCGA	1080
ATCC13032	GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCACACCGTGAAGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCCGA	1284
PP29	TTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACGTCATGAAAGTTGGTA	1200
ATCC13032	TTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACGTCATGAAAGTTGGTA	1404
PP29	ACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTTAGGGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA	1269
ATCC13032	ACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTTAGGGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA	1473

รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP29 กับ *C. glutamicum* ATCC13032 (99% identity)

PP80	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCGACACCCCGTGGGGGATGACAGCCTTCGGGTTGTAACCTCCTTTCGCTAGGGACAAAACCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAAAACACCGG	120
ATCC13032	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCCTTTCGCTAGGGACGAAGCCTTATGGTGACGGTACCTGGAGAAAGACACCGG	483
PP80	CTAACTACGTGCCACCGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGTGGTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAATCCC6GGGCTTAACTTC	240
ATCC13032	CTAACTACGTGCCAGCGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGTGGTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAATCCC6GGGCTTAACTTC	603
PP80	TGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAAATTGAGTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCA	360
ATCC13032	GGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAAATTGAGTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCA	723
PP80	GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTATATATCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGGTGGGCGCTATGTTAGGGGCTTCCACGACTTCTGTGCCGACGCTA	480
ATCC13032	GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGGTGGGCGCTAGGTTAGGGGCTTCCACGACTTCTGTGCCGACGCTA	843
PP80	ACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGAGTACAGGCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA	600
ATCC13032	ACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGAGTAC - GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA	962
PP80	CCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATACGTTTTCCCTTGTGGTTCACCGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC6CAACGA	720
ATCC13032	CCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATACGTTTTCCCTTGTGGTTCACCGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC6CAACGA	1082
PP80	GCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGTGGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCT	840
ATCC13032	GCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGTGGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCT	1202
PP80	TCACACATGCTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCACACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGC	960
ATCC13032	TCACACATGCTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCACACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGC	1322
PP80	TAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTTAGGGGGGAGC	1080
ATCC13032	TAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCTTTTAGGGGGGAGC	1442
PP80	TGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA 1111	
ATCC13032	TGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA 1473	

รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระหว่างเชื้อ PP80 กับ *C. glutamicum* ATCC13032 (99% identity)

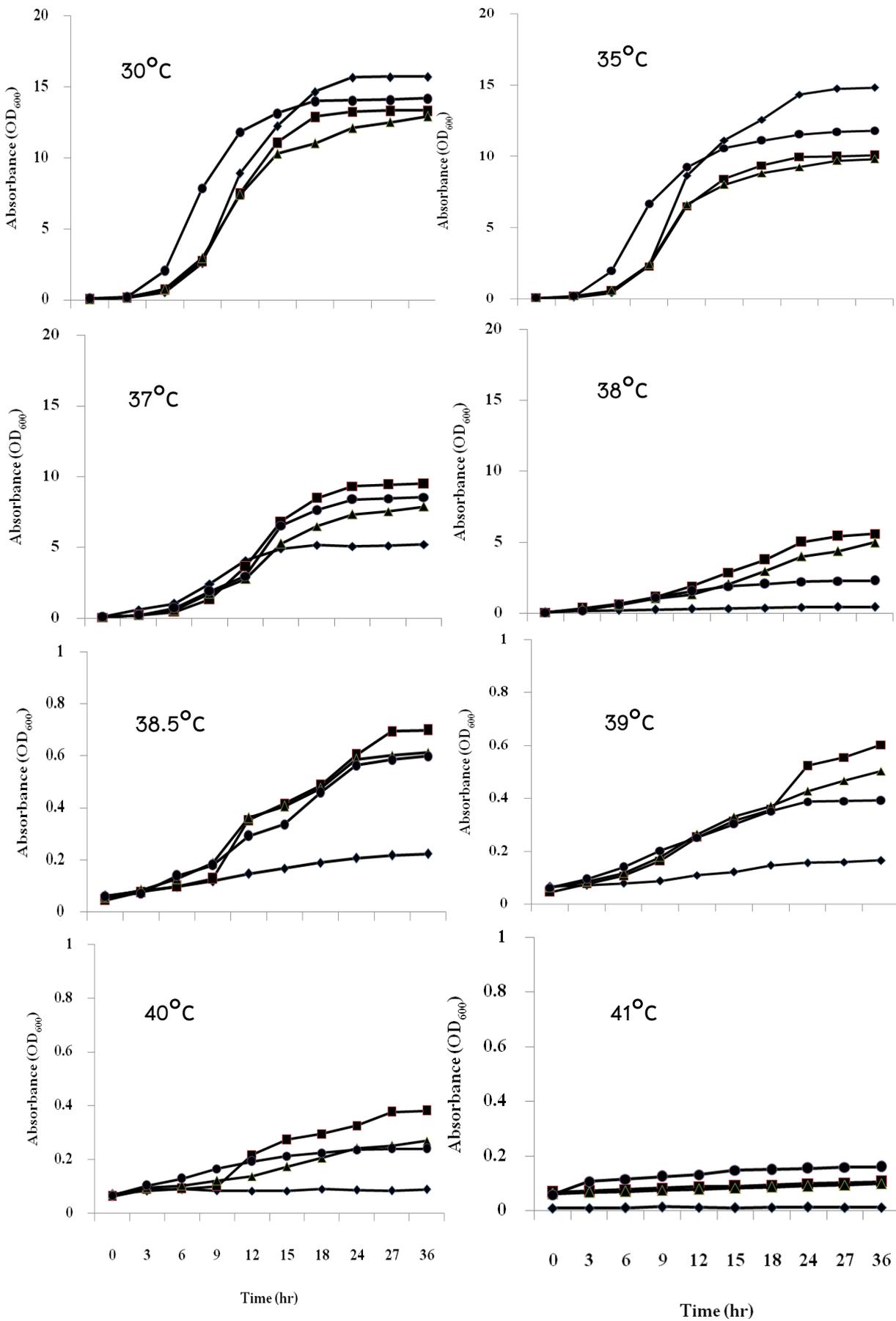
3.5 การเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* PP25, PP29 และ PP80 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การทดสอบการเจริญของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 จะทำเปรียบเทียบกับ wild type *C. glutamicum* ATCC13032 โดยจะเลี้ยงเชื้อในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30°C, 35°C, 37°C, 38°C, 38.5°C, 39°C, 40°C และ 41°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเชื้อมาวัด OD₆₀₀ ทุก ๆ 3 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่

3.9

จากภาพ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 30°C และ 35°C เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 เจริญได้ดีใกล้เคียงกับ wild type ATCC13032 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37°C เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 เจริญได้ดีกว่า wild type ที่อุณหภูมิ 38°C, 38.5°C, 39°C และ 40°C wild type ไม่สามารถเจริญได้ในขณะที่ PP25, PP29 และ PP80 ยังเจริญได้ อย่างไรก็ตามการเจริญของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 จะลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้นเป็น 41°C เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 ไม่สามารถเจริญได้

การทดลองนี้สรุปได้ว่า เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ๆ (30°C ถึง 35°C) ได้เหมือน wild type แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ($\geq 38^\circ\text{C}$) wild type *C. glutamicum* ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ PP25, PP29 และ PP80 ยังเจริญต่อไปได้ ดังนั้นเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 จึงจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ *C. glutamicum* ที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant)



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ PP25 (■), PP29 (▲), PP80 (●) และ *C. glutamicum*

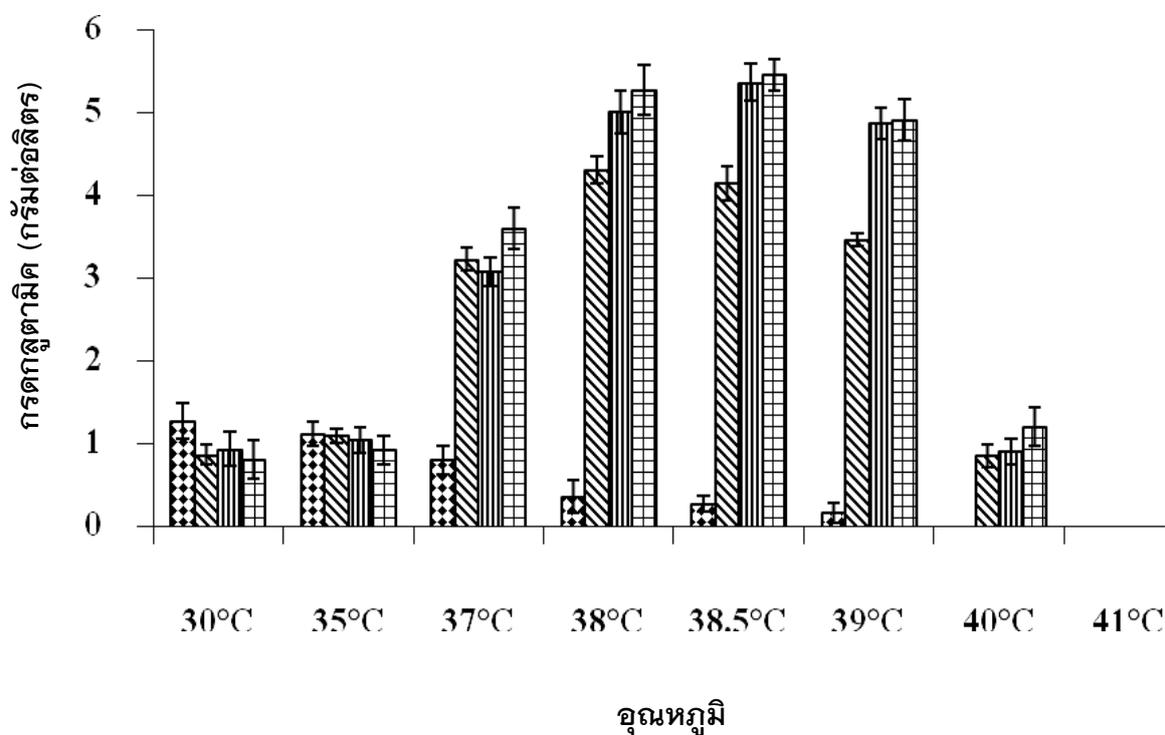
ATCC13032 (◆) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล.

3.6 การสร้างกรดอะมิโนกลูตามิตที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80

การเปรียบเทียบการสร้างกรดกลูตามิตของ wild type *C. glutamicum* ATCC13032 กับ เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30°C, 35°C, 37°C, 38°C, 38.5°C, 39°C, 40°C และ 41°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงระหว่าง late log ถึง early stationary ให้ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดปริมาณของกรดกลูตามิตที่เชื้อสร้างและปล่อยออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 30°C และ 35°C เชื้อ PP25, PP29 และ PP80 ผลิตกรดกลูตามิต ได้ดีใกล้เคียงกับ wild type ATCC13032 (รูปที่ 3.10) แต่เมื่ออุณหภูมิของการหมักสูงขึ้นในช่วง 37°C ถึง 40°C การสร้างกรดกลูตามิตของ wild type ATCC13032 จะลดลง ในขณะที่ PP25, PP29 และ PP80 สร้างได้มากขึ้น และสร้างได้มากกว่า wild type อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3.10) โดย PP25 สร้างกรดกลูตามิตออกมาได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 38°C ส่วน PP29 และ PP80 สร้างกรดกลูตามิตออกมาได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 38.5°C

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ wild type ของ *C. glutamicum* มีความสามารถผลิตกรดกลูตามิตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 30°C) เท่านั้น แต่สายพันธุ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ คือ PP25, PP29 และ PP80 สามารถสร้างกรดกลูตามิต ได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 30°C ถึง 40°C ซึ่งจัดว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีที่สามารถนำมาใช้ผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรม โดยไม่จำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักให้คงที่อยู่ที่ 30°C เหมือนกับการหมักด้วยสายพันธุ์ที่เป็น wild type จัดเป็นการประหยัดพลังงานและลดค่าใช้จ่ายในการผลิต

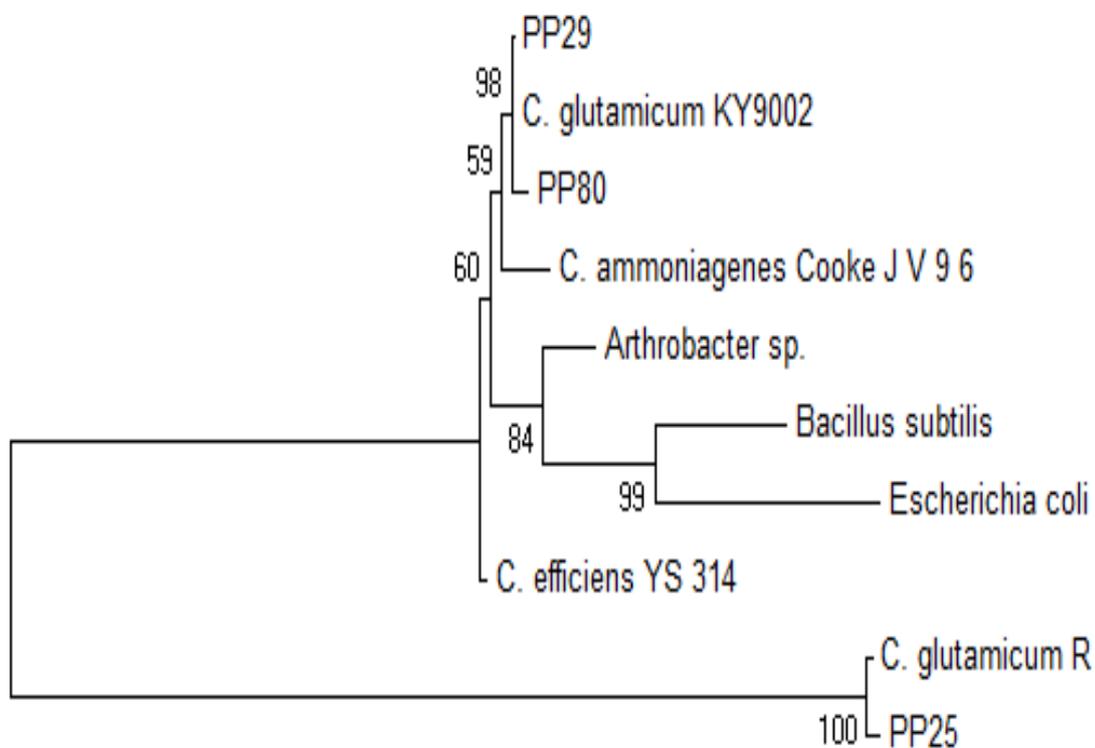


รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบการสร้าง glutamic acid ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°C, 35°C, 37°C, 38°C, 38.5°C, 39°C, 40°C และ 41°C จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดย  แสดงการสร้าง glutamic acid ของสายพันธุ์ ATCC13032 (wild type),  แสดงการสร้าง glutamic acid ของสายพันธุ์ PP25,  แสดงการสร้าง glutamic acid ของสายพันธุ์ PP29,  แสดงการสร้าง glutamic acid ของสายพันธุ์ PP80 (กราฟนี้สร้างจากผลการทดลอง (n) เท่ากับ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแปรปรวนจากตัวแปรเดียวด้วยการคำนวณโดยวิธีของ Dunnett one way ANNOVA ที่ค่าความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$)

3.7 ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80

นำเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 มาศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 โดยใช้ข้อมูลจากลำดับ nucleotides ของยีน 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า PP25, PP29 และ PP80 วิวัฒนาการแตกต่างกันออกไป (รูปที่ 3.11) โดย PP29 และ PP80 มีวิวัฒนาการมาด้วยกัน มีความสัมพันธ์กัน และสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ wild type *C. glutamicum* ATCC13032 (KY9002) โดย PP29, PP80 และ wild type มี common ancestor ชนิดเดียว ส่วน PP25 มีสายวิวัฒนาการแยกออกไปจาก PP29, PP80 และ wild type แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า PP25 มี common ancestor ที่แตกต่างออกไปจากตัวอื่น แต่ไปสัมพันธ์กับ *C. glutamicum* สายพันธุ์ R



รูปที่ 3.11 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 กับเชื้อแบคทีเรีย

ใน genus ต่าง ๆ โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA

หมายเหตุ: *C. glutamicum* KY9002 คือ สายพันธุ์เดียวกับ *C. glutamicum* ATCC13032 ซึ่งเป็นสาย

พันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

บทที่ 4

สรุปการวิจัย

สรุปการวิจัย

สายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* ที่ได้จากงานวิจัย คือ PP25, PP29 และ PP80 แยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนมูลนกเอี้ยง ที่เก็บจากจังหวัดร้อยเอ็ด เชื้อทั้ง 3 ตัวนี้ จัดเป็นสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* ในกลุ่ม thermotolerant ที่เจริญและผลิต glutamic acid ได้ดีที่อุณหภูมิสูง และสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ATCC13032 การศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 จึงเป็นหนทางที่อาจนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการหมักกรดอะมิโนกลูตาเมตในระดับอุตสาหกรรม ในสถานะที่ไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นหนทางที่จะช่วยลดพลังงานและต้นทุนการผลิต

ในปี ค.ศ. 2012 กลุ่มวิจัยของ Zheng (Zheng, Liu, Du, Ni, & Sun, 2012) ได้กระตุ้นสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* S9114 กับ *C. glutamicum* ATCC1376 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีตามด้วย genome shuffling เชื้อกลายพันธุ์ F343 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44°C และผลิตกรดกลูตามิคที่อุณหภูมิ 38°C ได้มากกว่า parental strains ถึง 1.8 เท่า เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ F343 กับ parental strains โดยวิธี Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) พบว่า F343 เกิดวิวัฒนาการ มีการเปลี่ยนแปลงด้านลำดับ nucleotides บน ยีนโนมแตกต่างไปจาก parental strains เป็นเหตุให้ F343 มีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิ และผลิตกรดกลูตามิคได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า parental strains

สายพันธุ์ของ *C. glutamicum* PP25, PP29 และ PP80 ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีคุณสมบัติบางประการคล้ายคลึงกับ F343 ที่ Zheng รายงานไว้ คือ PP25, PP29 และ PP80 สร้างกรดกลูตามิคได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 38°C เหมือนกับ F343 จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 อาจมี

ลักษณะโครงสร้างของสารพันธุกรรมบางอย่างใกล้เคียงกับ F343 การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติทางยีนและอีโนมของเชื้อ PP25, PP29 และ PP80 อาจทำให้ทราบว่า ยีน หรือ กลุ่มของยีนใดที่ควบคุมคุณสมบัติการทนอุณหภูมิและการสร้างกรดกลูตามิกที่อุณหภูมิสูง ของเชื้อในกลุ่มนี้ พื้นฐานความรู้ความเข้าใจในส่วนนี้สามารถนำไปใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* เพื่อนำมาใช้ผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- Abe, S., Takayama, K.-I., & Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 13(3), 279–301.
- Ault, A. (2004). The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of chemical education*, 81(3), 347.
- Bona, R., & Moser, A. (1997). Modelling L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Acta biotechnologica*, 17(4), 327–337.
- Boyle, J. V., Cook, T. M., & Goss, W. A. (1969). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* VI. Cell-free studies. *Journal of bacteriology*, 97(1), 230–236.
- Cook, T. M., Brown, K. G., Boyle, J. V., & Goss, W. A. (1966). Bactericidal action of nalidixic acid on *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 92(5), 1510–1514.
- Das, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Ljungdahl, L. G., & Kurtz, D. M. (2005). Cytochrome *bd* oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Journal of bacteriology*, 187(6), 2020–2029.
- Demain, A. (1972). Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 22(3), 345–362.
- Eggeling, L., Krumbach, K., & Sahm, H. (2001). L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why is penicillin treatment or Tween addition doing the same. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(1), 67–68.
- Goss, W. A., Deitz, W. H., & Cook, T. M. (1964). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 88(4), 1112–1118.

- Gutmann, M., Hoischen, C., & Krämer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1112(1), 115–123.
- Helianti, I., Nurhayati, N., & Wahyuntari, B. (2008). Cloning, sequencing, and expression of a β -1, 4-endoxylanase gene from Indonesian *Bacillus licheniformis* strain I5 in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1273–1279.
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of biotechnology*, 104(1), 155–172.
- Hirasawa, T., Wachi, M., & Nagai, K. (2001). L-Glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* *ItsA* mutant strains. *BMC biotechnology*, 1(1), 9.
- Ikeda, M. (2003). Amino acid production processes *Microbial production of l-amino acids* (1–35): Springer.
- Kabus, A., Niebisch, A., & Bott, M. (2007). Role of cytochrome *bd* oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 861–868.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., & Gaigalat, L. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of biotechnology*, 104(1), 5–25.
- Kazuhiko, Y., & Komagata, K. (1972). Taxonomic studies on coryneform bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 18(6), 417–431.

- Kinoshita, S. (1986). Glutamic acid bacteria. *Biotechnology Series. 1986*.
- Kinoshita, S., Udaka, S., & Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl, 503*, 193–205.
- Kithakarn, S., & Trakulnaleamsai, S. (2007). Isolation screening and characterization of thermotolerant glutamic acid-producing *Corynebacterium* isolated in Thailand. (Master M.Sc.), Kasetsart University, Thailand.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 125–175.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., & Drauz, K. (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology, 69*(1), 1–8.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., & Schleifer, K. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, “*Brevibacterium flavum*” DSM 20411, “*Brevibacterium lactofermentum*” DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *International journal of systematic bacteriology, 41*(2), 255–260.
- Marrakchi, H., Bardou, F., Lanéelle, M., & Daffé, M. (2008). A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthesis. *The mycobacterial cell envelope*, 41–62.

- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O., & Matsushita, K. (2004). Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(2), 187–193.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(3), 459–464.
- Park, S.-D., Youn, J.-W., Kim, Y.-J., Lee, S.-M., Kim, Y., & Lee, H.-S. (2008). *Corynebacterium glutamicum* σ^E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- σ factor CseE. *Microbiology*, *154*(3), 915–923.
- Shih, I.-L., & Van, Y.-T. (2001). The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, *79*(3), 207–225.
- Sousa, P. M. F., Videira, M. A. M., Bohn, A., Hood, B. L., Conrads, T. P., Goulao, L. F., & Melo, A. M. P. (2012). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*: from genes to supercomplexes. *Microbiology*, *158*(9), 2408–2418.
- Stansen, C., Uy, D., Delaunay, S., Eggeling, L., Goergen, J.-L., & Wendisch, V. F. (2005). Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Applied and environmental microbiology*, *71*(10), 5920–5928.
- Udaka, S. (1960). Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *Journal of bacteriology*, *79*(5), 754.

- Wendisch, V. F., Bott, M., & Eikmanns, B. J. (2006). Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Current opinion in microbiology*, *9*(3), 268–274.
- Woodcock, D., Crowther, P., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer–Weidner, M., & Graham, M. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research*, *17*(9), 3469–3478.
- Zheng, P., Liu, M., Du, Q.-y., Ni, Y., & Sun, Z.-h. (2012). Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(3), 1035–1043.

ภาคผนวก

P-IX-03

Improvement of L-glutamic acid production by a novel thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* PP25

Pawantree Paisrisan^a, Nuannoi Chudapongse^b and Nawarat Nantapong^a

^aSchool of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue Rd, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

^bSchool of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue Rd, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

Abstract

Corynebacterium glutamicum, having a thermotolerance and an ability to produce high level of L-glutamic acid, was isolated from soil samples collected from Nakorn Ratchasima province and Roi-Et province, Thailand. As a result, we obtained PP25 strain which was identified as *C. glutamicum* based on colony morphology, cellular morphology, Gram's reaction and 16S rRNA gene analysis. This strain is able to grow at temperature range from 30-40°C. The highest yield of L-glutamic acid production of PP25 is obtained at 38°C (16.30 g/L) which is not an appropriate fermentation condition for the type strain. The ability of L-glutamic acid fermentation at an elevated temperature of PP25 suggested that genomic profiles for temperature and glutamate productivity of this strain is probably be evolved in the nature spontaneously. Thus, PP25 might be applied to the fermentative production of L-glutamic acid on a large scale industry.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, L-Glutamic acid, Thermotolerance

Introduction and Objective

Corynebacterium glutamicum is an aerobic, Gram-positive, non-sporulating and biotin auxotroph bacterium. It was first isolated from soil by Kinoshita in 1956. *C. glutamicum* is an important industrial microorganism for its high production of amino acids such as glutamate and lysine [6, 9, 16]. L-Glutamate in the form of monosodium L-glutamate (MSG) has been used as a flavor enhancer, a precursor of drugs, cosmetics, pharmaceutical compounds, fodder and as supplements [2, 17, 18]. Various methods of culturing *C. glutamicum* have been employed in order to maximize the productivity of L-glutamic acid. For example, excretion of glutamic acid can be induced by biotin limitation, surfactants addition, antibiotics addition and temperature shift [14, 5, 12, 4]. However, biotin limitation strategy is the dominating process used for the commercial production of glutamate [19].

In the process of L-glutamic acid fermentation, temperature is one of the most important factors directly related to the

production efficiency. Most of microbe-based industrial strains are usually high temperature sensitive. The productivity of L-glutamic acid is gradually decreased when the culture temperature is raised by heat released from the cells along the fermentation. Thus, a cooling system has to be employed to remove the heat, providing an appropriate environment for cell growth and amino acid production. Therefore, thermotolerant strains are preferred in the production processes due to their low cost in temperature control. For these reasons, the researchers have been trying to isolate the novel glutamate producing bacteria that can grow at high temperature. In 2002, Fudou et al. was successfully isolated three L-glutamic acid-producing bacteria *Corynebacterium efficiens* from soil and vegetable samples, which capable of growing at temperature above 40°C. The fermentation of glutamic acid of *C. efficiens* does not reduce at 37°C, a temperature at which L-glutamic acid production of *C. glutamicum* is strongly decreased [7, 11]. This is particularly

relevance to reduce costs and improve productivity of glutamate fermentation.

In this study, we attempted to isolate thermotolerant *C. glutamicum* strains that could efficiently produce and secrete high amount of L-glutamic acid from soils in Northeastern Thailand.

Materials and Methods

2.1 Bacterial strains, growth and fermentation conditions

A type strain of *C. glutamicum* KY9002 (ATCC13032) was kindly gifted from Kyowa Hakko Kogyo (Tokyo, Japan). *C. glutamicum* cells were pre-cultured on 5 ml of Luria-Bertani (LB) medium [13] at their individual optimum temperature for 24 h. An overnight culture was then inoculated into 500-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of glucose minimum medium [10]. The incubation was performed at 200 rpm shaking condition by varying fermentation temperature. The cell growth in early stationary phase was measured turbidometrically at 600 nm using CE 1011 UV-VIS Spectrophotometer (Cecil Instruments, UK).

2.2 Determination of L-glutamic acid production

For determination of L-glutamic acid production, the fermentation was carried out under the conditions mentioned above. The fermented broth was applied to thin-layer chromatography (TLC) for quantitative analysis of L-glutamic acid. The solvent system composed of butanol, acetic acid and distilled water in a ratio (60:15:25 v/v). Ninhydrine in saturated butanol was used to develop the color of spots. The spots developed on plates were scraped and extracted with 75% ethanol containing 0.005% CuSO₄·5H₂O. After incubation for 2 h at room temperature without shaking, the extracts were measured spectrophotometrically at 570 nm on CE 1011 UV-VIS Spectrophotometer (Cecil Instruments, UK). The glutamate concentration of samples was determined by using calibration curve. A calibration curve was generated using L-glutamic acid standards of 0.1, 0.3 and 0.5 µmole.

2.3 Isolation of *C. glutamicum* from soil by conventional spread plate technique

Soil samples were collected from Nakorn Ratchasima province and Roi-Et province,

Thailand. One gram of soil sample was transferred into 20 ml of sterile LB broth containing 50 µg/ml of nalidixic acid and 20 µg/ml of sodium azide (NaN₃) and incubated aerobically at 37°C on an incubation shaker at 120 rpm, for 24 h. After incubation, the medium was serially diluted with sterile saline solution (0.9% NaCl) and plated on LB agar containing 50 µg/ml of nalidixic acid and 20 µg/ml of sodium azide (NaN₃). The plates were incubated at 37°C for 24 h or until colonies appeared. The yellow, smooth and circular colonies similar to those of *C. glutamicum* were selected and used for further study.

2.4 Identification of *C. glutamicum* by 16S rRNA gene analysis

Total DNA was extracted from cultures by freeze-thaw technique. The single colony grown on LB agar plates was transferred into microcentrifuge tube containing 10 µl of distilled water. The cell suspensions were incubated at -20°C for 5 minutes. Then, the samples were thawed at room temperature. The freezing and thawing of cells were repeated about 5-7 times. The suspensions were centrifuged at 12,000xg for 5 minutes and the supernatants were used as DNA template for PCR amplification of 16S rRNA gene. The 16S rRNA gene was amplified by PCR with primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1525R (5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') [8]. The amplified fragment was purified from the 0.8% agarose gel by Gel extraction kit (Qiagen, Germany). The purified DNA fragment was directly sequenced using an ABI PRISM 310 (PE Biosystems, USA). Sequencing data was analyzed using Clone Manager Software (Scientific and Educational Software, USA). Sequence similarity was determined by comparing to 16S rRNA sequences available in the nucleotide databases of the GenBank (NCBI, USA).

Results and Discussion

Isolation and identification of thermotolerant *C. glutamicum* PP25

The strains of thermotolerant *C. glutamicum* having an ability to produce high level of L-glutamic acid were isolated from soil samples collected from Nakorn Ratchasima province and Roi-Et province, Thailand. The 42 isolated strains named PP1-PP42 were roughly

PP25	GGGTCTAATACCGAATATTCACACCACCGTAGGGTGGTGTGGAAAGCTTTATGCGGTGT	60
ATCC13032	GGGTCTAATACCGAATATTCACACCACCGTAGGGTGGTGTGGAAAGCTTTATGCGGTGT	219
PP25	GGGATGAGCCTGCGGCCTATCACCTTGTGGTGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGTCTACA	120
ATCC13032	GGGATGAGCCTGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGTCGACG	279
PP25	GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCACACTCCTA	180
ATCC13032	GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCACAGACTCCTA	339
PP25	CGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCGACACCCCG	240
ATCC13032	CGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCGACGACCCCG	399
PP25	TGGGGATGACAGCCTTCTGGTTGTAACCTCTTCTAGGGACAAAACCTTATGGTGA	300
ATCC13032	TGGGGATGAAGCCTTCGGTTGTAACCTCTTCTAGGGACAAAACCTTATGGTGA	459
PP25	CGGTACCTGGAGAAAAACACCGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG	360
ATCC13032	CGGTACCTGGAGAGAAGCACCAGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG	519
PP25	TGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCCGCTCGTC	420
ATCC13032	TGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCCGCTCGTC	579
PP25	TGTGAAATCCCGGGCTTAACCTCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTG	480
ATCC13032	TGTGAAATCCCGGGCTTAACCTCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAGTGCTG	639
PP25	TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCCGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCA	540
ATCC13032	TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCCGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCA	699
PP25	ATGGCGAAGGCAGTCTCTGGGCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGA	600
ATCC13032	ATGGCGAAGGCAGTCTCTGGGCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGA	759
PP25	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTGGGCGCTAGGTGTAGGGGTCT	660
ATCC13032	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTGGGCGCTAGGTGTAGGGGTCT	819
PP25	TCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA	720
ATCC13032	TCCACGACTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA	879
PP25	AGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGATTAAT	780
ATCC13032	AGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGATTAAT	939
PP25	TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATAC	840
ATCC13032	TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGACCGGATCGGCGTAGAGATAC	999
PP25	GTTTCCCTTGTGGTCCGTTACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGAGA	900
ATCC13032	GTTTCCCTTGTGGTCCGTTACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGAGA	1059
PP25	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTATGTTGCCAGCACATTGTGGT	960
ATCC13032	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTATGTTGCCAGCACATTATGGT	1119
PP25	GGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA	1020
ATCC13032	GGGTACTCATGAGAGACTGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA	1179
PP25	TCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCA	1080
ATCC13032	TCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGTACAATGGTCGGTACAGCGAGTTGCCA	1239
PP25	CACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT	1140
ATCC13032	CACCGTGAGGTGGAGCTAATCTCTTAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACT	1299
PP25	CGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT	1200
ATCC13032	CGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT	1359

Figure 1. Comparison of the partial 16S rRNA gene of PP25 with sequences in GenBank database.

classified to the genus *Corynebacterium* based on Gram’s reaction, cellular morphology and colony morphology [1, 15]. The cells were Gram-positive, rod-shaped, non spore-forming. Their colonies appeared yellow, smooth, circular and translucent on LB agar plates incubated at 37°C. They were individually used to determine L-glutamic acid fermentation at 37°C where PP25 secreted highest amount of L-glutamic acid into the cultured medium. Then, a 16S rRNA gene analysis was performed in order to identify the species of PP25. Comparison of 16S rRNA gene between PP25 and the GenBank database revealed that this strain had 16S rDNA of more than 90% similarity to that of type strain *C. glutamicum* ATCC13032 (KY9002) (Fig. 1)

Growth and L-glutamic acid fermentation of PP25

In order to determine the growth and L-glutamic acid production of PP25, bacterial cells were cultured on 100 ml glucose minimum medium by varying incubation temperature from 30-41°C. The results showed that PP25 could grow at 30-37°C which was similar to type strain KY9002 (data not shown). When the fermentation temperature had reached 38°C, the growth of KY9002 was ceased while PP25 continued to grow (Fig. 2). Though, PP25 excreted lower L-glutamic acid than KY9002 at 30°C, its L-glutamic acid production increased with increasing temperature which was even higher than that of KY9002 (Fig. 3). The highest

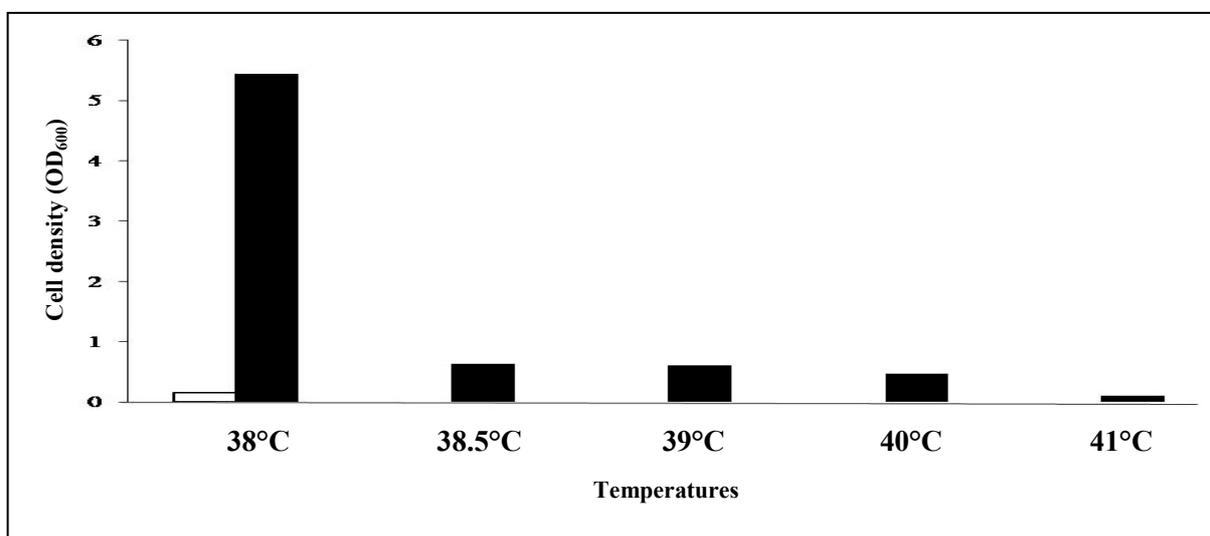


Figure 2. Growth of KY9002 and PP25 strains. The white and black bars represent the cell density of KY9002 and PP25, respectively.

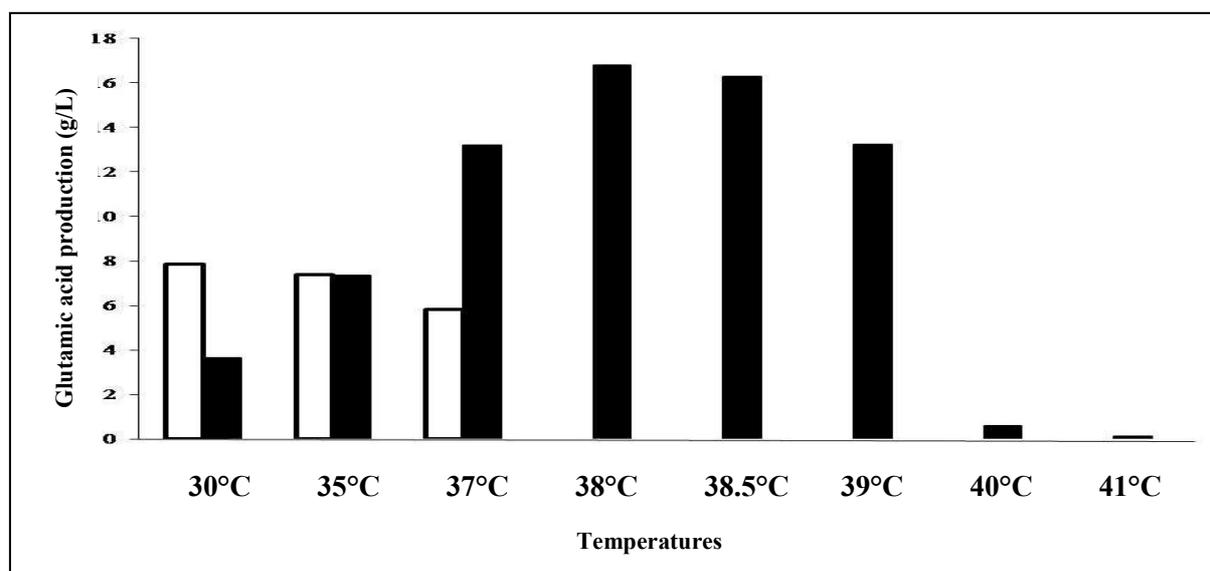


Figure 3. L-Glutamic acid production of KY9002 and PP25. The white and black bars represent the L-glutamic acid production of KY9002 and PP25, respectively.

yield of glutamate of PP25 was observed at 38°C whereas L-glutamic acid production per cell was achieved at 38.5°C. These results indicated that PP25 possesses enhanced thermotolerance glutamate fermentation.

In 2012, Zheng and coworkers improved the thermotolerance of *C. glutamicum* by genome shuffling technique. Ultraviolet (UV) irradiation and diethyl sulfate (DES) were used as the mutagenizing agents to generate the initial population diversity of mutants from two ancestors, *C. glutamicum* S9114 and *C. glutamicum* ATCC1376. Mutant strains of S9114 and ATCC1376 with subtle improvements in temperature tolerance were used for genome shuffling. The technique of genome shuffling was performed by 3 rounds protoplast fusions. The shuffled strain, F343, could grow at 44°C, while even no growth was observed for parental strains. The yield of L-glutamic acid of F343 was increased by 1.8-time comparing with that of the ancestor strains at 38°C. The genetic diversity between F343 and S9114 was also evaluated by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis. The result suggested that the phenotypes for both thermotolerance and L-glutamic acid production in F343 were evolved. PP25 obtained from this study shares some characters with F343 in which it can grow and produce L-glutamic acid at 38°C or above. However, the temperature limit for growth and optimum temperature for L-glutamic acid production of PP25 are different from F343. The highest temperature for growth of PP25 is 40°C, while F343 is 44°C. F343 retains the same level of L-glutamic acid production at temperature 32-38°C whereas the highest glutamate fermentation of PP25 is around 38°C. Therefore, we suggested that some of the genomic features of PP25 may be similar to F343, while others may not. Our future plans may involve the study of genetic variability of PP25 by genomic mapping techniques, for example, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and Rapid Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. These techniques might reveal the molecular mechanisms of L-glutamic acid production at high temperature of PP25. The study of how PP25 capable of excreting L-glutamic acid at an enhanced temperature could be beneficial for improving L-glutamic acid production on an industrial scale.

References

1. Abe S, Takayama K-I, Kinoshita S. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 1967, 13: 279-301.
2. Bourke SL, Kohn J. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Adv Drug Deliv Rev.* 2003, 55: 447-66.
3. Fudou R, Jojima Y, Seto A, Yamada K, Kimura E, Nakamatsu T, Hiraiishi A, Yamanaka S. *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002, 52: 1127-31.
4. Delaunary S, Lapujade P, Engasser JM, Goergen JL. Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002, 28: 333-7.
5. Duperray F, Jezequel D, Ghazi A, Letellier L, Shechter E. Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 1103: 250-8.
6. Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol.* 2003, 104: 155-72.
7. Kimura E. L-Glutamate production. In: Eggeling L, Bott M (eds) *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC press, Florida. 2005, 439-57.
8. Lane D. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. 1991, 115-75.
9. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005, 69: 1-8.
10. Nantapong N, Kugimiya Y, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004, 66: 187-93.
11. Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E, Sugimoto S, Matsui K, Yamagishi A, Kikuchi H, Ikeo K, Gojobori T. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements

- responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* 2003, 13: 1572-9.
12. Nunheimer T. D, Birnbaum J, Ihnen E. D, Demain A. L. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl Microbiol.* 1970, 20: 215-7.
 13. Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1986.
 14. Shiio I, Otsuka S. I, Takahashi M. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 1962, 51: 56-62.
 15. Takano H, Shimizu A, Shibosawa R, Sasaki R, Iwagaki S, Minagawa O, Yamanaka K, Miwa K, Beppu T, Ueda K. Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008, 81: 127-34.
 16. Tateno T, Okada Y, Tsuchidate T, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase and lysine decarboxylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009, 82: 115-121.
 17. Tokuma F, Uyama H, Kobayashi S. Polymerization of polyfunctional macromolecules: synthesis of a new class of high molecular weight poly(amino acid)s by oxidative coupling of phenol-containing precursor polymers. *Biomacromolecules.* 2004, 5: 977-83.
 18. US Department of Energy. Top value added chemicals from biomass, volume I-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. T. Werpy and G. Petersen, the Pacific Northwest National Laboratory (PNNL). 2004.
 19. Zheng P, Liu M, Liu X-d, Du Q-y, Ni Y, Sun Z-h. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature.* 2002, 415: 644-6.
 20. Zheng P, Liu M, Liu X-d, Du Q-y, Ni Y, Sun Z-h. Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012, 28: 1035-1043.

ST0439-12

Isolation and improvement a novel thermotolerant glutamic acid producing *Corynebacterium glutamicum* PP29 strain

Pawantree Paisrisan^{1*}, Nuannoi Chudapongse² and Nawarat Nantapong¹

¹*School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue Rd, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.*

²*School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue Rd, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.*

ABSTRACT

Corynebacterium glutamicum is a soil bacterium that widely used for the fermentative production of glutamic acid. In the glutamic acid fermentation process, *C. glutamicum* always releases heat during fermentation resulted in temperature increasing. The cooling system is necessary to remove heat from fermentation process to maintain the sustainable condition for *C. glutamicum* metabolism. However, the cost of cooling system is relatively high. Therefore, improving the temperature tolerance of *C. glutamicum* will reduce the cost for temperature control. Thus, the main objective of this study was to isolate the novel strains of thermotolerant *C. glutamicum* having an ability to produce high level of L-glutamic acid. Isolated strain, PP29, was isolated from soil samples. This strain was identified as *C. glutamicum* based on colony morphology, cellular morphology, Gram's reaction, and 16S rRNA gene analysis. The phylogenetic analysis of PP29 strain based on the comparison of 16S rDNA sequences revealed that PP29 was closely related to *C. glutamicum* ATCC13032 (99 % similarity). PP29 was able to grow at the temperature ranging from 30 to 40 °C. The highest yield of L-glutamic acid produced by PP29 could obtain at 38.5 °C (5.37 ± 0.04 g/L) which was an inappropriate fermentation condition for the wild-type. The ability of L-glutamic acid fermentation at an elevated temperature of PP29 suggested that some of the genomic profiles for temperature and glutamate productivity of this strain might probably be evolved in the nature spontaneously. Thus, PP29 might be applied to the fermentative production of L-glutamic acid on a large scale industry.

Keywords: L-Glutamic acid, *Corynebacterium glutamicum*, Soil bacterium, Thermotolerance, Cooling system

INTRODUCTION

Corynebacterium glutamicum (*C. glutamicum*) was discovered in 1957 by Kinoshita and coworkers (Kinoshita et al., 1957). *C. glutamicum* is an aerobic, Gram-positive, non-sporulating and biotin auxotroph bacterium. It is widely used for the fermentative production of amino acids such as glutamate and lysine (Herman, 2003; Leuchtenberger et al., 2005; Tateno et al., 2009). L-Glutamate in the form of monosodium L-glutamate (MSG) has been used as a flavor enhancer, a precursor of drugs, cosmetics, pharmaceutical compounds, fodder, and as supplements (Bourke and Kohn, 2003; Tokuma et al., 2004; US Department of Energy, 2004).

In the process of L-glutamic acid fermentation, the temperature is one of the most important factors directly related to the production efficiency. Most of microbe-based industrial strains are usually high temperature sensitive. The productivity of L-glutamic acid is gradually decreased when the culture temperature is raised by heat released from the cells along the fermentation. Thus, a cooling system has to be employed to remove the heat, providing an appropriate environment for cell growth and amino acid production. Therefore, thermotolerant strains are preferred in the production processes due to their low cost in temperature control. For these reasons, we attempted to isolate thermotolerant *C. glutamicum* strains that could efficiently produce and secrete high amount of L-glutamic acid from soils in Northeastern Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Reference strain

C. glutamicum KY9002 (ATCC13032) was kindly gifted from Kyowa Hakko Kogyo (Tokyo, Japan). The organism was maintained on Luria-Burtani (LB) agar (Sambrook et al., 1986) at 4 °C and sub-cultured bi-monthly on the same medium.

Isolation of *C. glutamicum* from soil

Soil samples were collected from Nakorn Ratchasima province and Roi-Et province, Thailand. One gram of soil sample was transferred into 20 ml of sterile LB broth containing 50 µg/ml of nalidixic acid and 20 µg/ml of sodium azide (NaN₃). The culture broth was incubated aerobically at 37 °C on an incubation shaker at 120 rpm, for 24 h. After incubation, the medium was serially diluted with sterile saline solution (0.9 % NaCl) and plated on LB agar containing 50 µg/ml of nalidixic acid and 20 µg/ml of sodium azide (NaN₃). The plates were incubated at 37 °C for 24 h or until colonies appeared. The yellow, smooth, and circular colonies similar to those of *C. glutamicum* were randomly picked and streaked on LB agar plates to ensure purity. After purification, pure colonies were roughly identified as *C. glutamicum* based on cellular morphology, and Gram's reaction.

Comparison of growth and L-glutamic acid production of selected strain with wild-type

A wild-type strain of *C. glutamicum* and selected strain were pre-cultured on 5 ml of LB medium at their individual optimum temperature for 24 h. An overnight culture was then inoculated into 500-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of glucose minimum medium (Nantapong et al., 2004). The incubation was performed at 200 rpm of shaking speed by varying fermentation temperature from 30 - 41 °C. The cell growth in early stationary phase was represented by measuring optical density at 600 nm using CE 1011 UV-VIS Spectrophotometer (Cecil Instruments, UK). Simultaneously, the fermented broth was subjected to centrifugation at 12,000 g for 5 min to separate microbial cells and supernatant. The microbial cells were re-suspended in water and once centrifuged. After discarding the supernatant, the cells were dried at 105 °C for 4 h before determination of the cell dry weight. The supernatant was applied to thin layer chromatography (TLC) for the quantitative analysis of L-glutamic acid. The solvent system was composed of butanol, acetic acid and distilled water in a volume ratio of 60:15:25. Ninhydrine in saturated butanol was used to develop the color of spots. The spots developed on plates were scraped and extracted with 75 % ethanol containing 0.005 % CuSO₄·5H₂O. After incubation for 2 h at room temperature without shaking, the extracts were measured spectrophotometrically at 570 nm on CE 1011 UV-VIS Spectrophotometer (Cecil Instruments, UK). The glutamate concentration of samples was calculated by using calibration curve, which was obtained using L-glutamic acid standards of 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, and 2.0 μmole.

16S rDNA and phylogenetic analysis

Total DNA of the selected strain was extracted from cultures by freeze-thaw technique. The single colony grown on LB agar plates was transferred into a microcentrifuge tube containing 10 μl of distilled water. The cell suspension was incubated at - 20 °C for 5 min. Then, the sample was thawed at room temperature. The freezing and thawing of cells were repeated about 5 - 7 times. The suspensions were centrifuged at 12,000 g for 5 min and the supernatants were used as DNA template for PCR amplification of 16S rRNA gene. The 16S rRNA gene was amplified by PCR with primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1525R (5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') (Lane, 1991). The amplified fragment was purified from the 0.8 % agarose gel by Gel extraction kit (Qiagen, Germany). The purified DNA fragment was directly sequenced using an ABI PRISM 310 (PE Biosystems, USA). Sequencing data was analyzed using Clone Manager Software (Scientific and Educational Software, USA). Sequence similarity was determined by comparing to 16S rRNA sequences available in the nucleotide databases of the GenBank (NCBI, USA). Multiple sequence alignment was done using CLUSTAL X software and a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using MEGA (Version 4.1) software. The confidence level of each branch (1,000 repeats) was tested by bootstrap analysis.

RESULTS

Isolation and identification of thermotolerant *C. glutamicum*

To isolate the thermotolerant *C. glutamicum*, soil samples were collected from Nakorn Ratchasima province and Roi-Et province, Thailand. As a result, we obtained the isolated strain and named it as PP29. This strain was roughly identified as *C. glutamicum* based on colony morphology, cellular morphology and Gram's reaction. After cultured on LB agar plates at 37 °C for 24 h, PP29 appeared yellow, smooth, entire,

circular, and translucent colonies as shown in figure 1. When observed under the microscope, this isolated strain was rod-shaped, non spore-forming and Gram-positive (Figure 2).

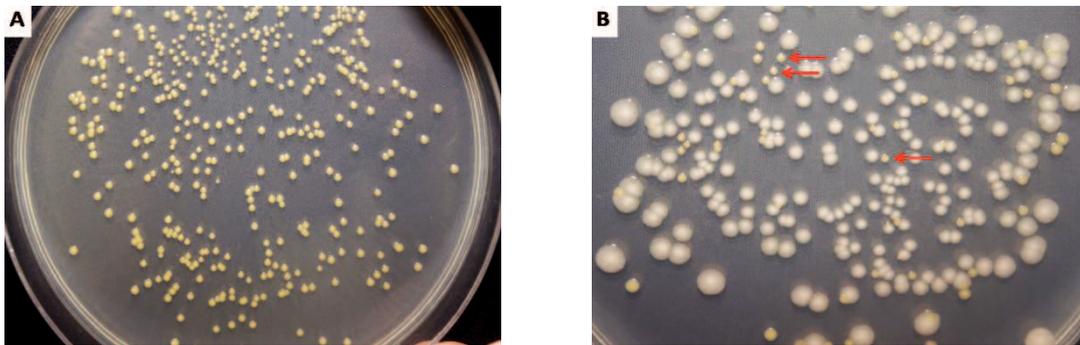


Figure 1. The colony morphology of *C. glutamicum* wild-type (A) and isolated strains (B) grown on LB agar containing 50 µg/ml of narlidixic acid and 20 µg/ml of sodium azide. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The red arrows showed the colonies similar to those of *C. glutamicum*.

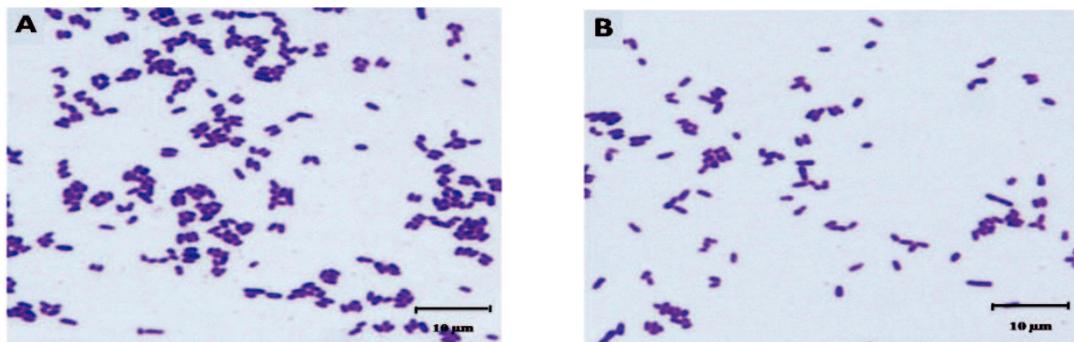


Figure 2. The cellular morphology of *C. glutamicum* wild-type (A) and isolated strains (B) under a light microscope (100X). Scale bar represents 10 µm.

Comparison of growth and L-glutamic acid production of PP29 with wild-type

To determine the growth and L-glutamic acid production of PP29, bacterial cells were cultured on 100 ml of glucose minimum medium by varying incubation temperature from 30 - 41 °C. The ability to grow and produce glutamic acid of PP29 was compared with *C. glutamicum* wild-type ATCC13032. The results showed that PP29 could grow at 30 - 37 °C which was similar to wild-type strain (data not shown). When the fermentation temperature had reached above 38 °C, the growth of wild-type strain was ceased while

PP29 continued to grow (Figure 3). Though, PP29 excreted lower L-glutamic acid than wild-type at 30 °C, its L-glutamic acid production increased with increasing temperature which was even higher than that of wild-type (Figure 4). The highest yield of glutamate of PP29 was observed at 38.5 °C (5.37 ± 0.04 g/L). The highest L-glutamic acid production per cell of PP29 was 2.82 ± 0.11 (g glutamic acid / g dried cell) (Table 1). PP29 could grow at 40 °C, while no growth was observed for wild-type strain (ATCC13032) at this temperature.

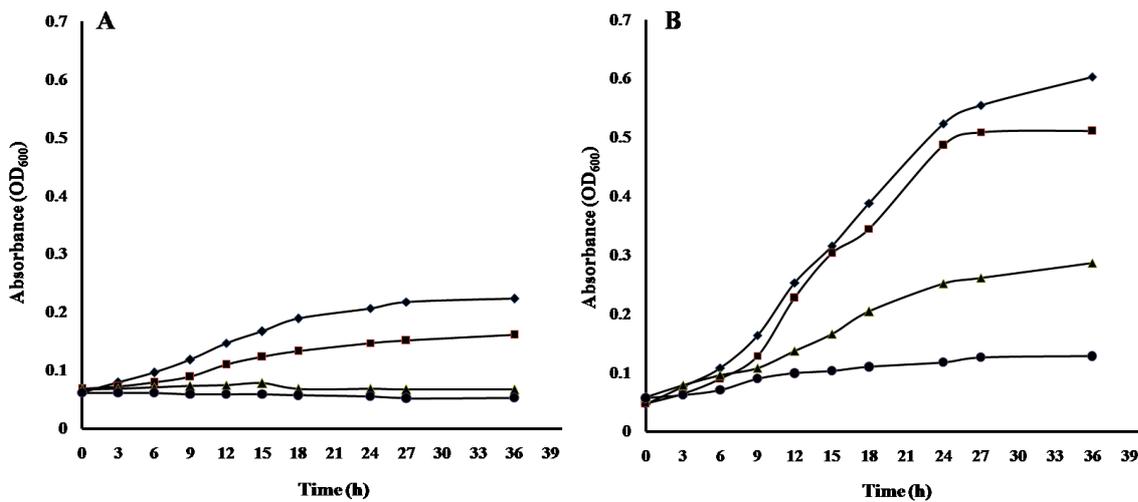


Figure 3. Effect of temperature on growth profile of *C. glutamicum* wild-type (A) and isolated strain PP29 (B). Cells were grown in 500 ml-flask containing 100 ml of glucose minimum medium with shaking speed of 200 rpm and incubated at 38.5 °C (filled-diamond), 39 °C (filled-square), 40 °C (filled-triangle) and 41 °C (filled-circle).

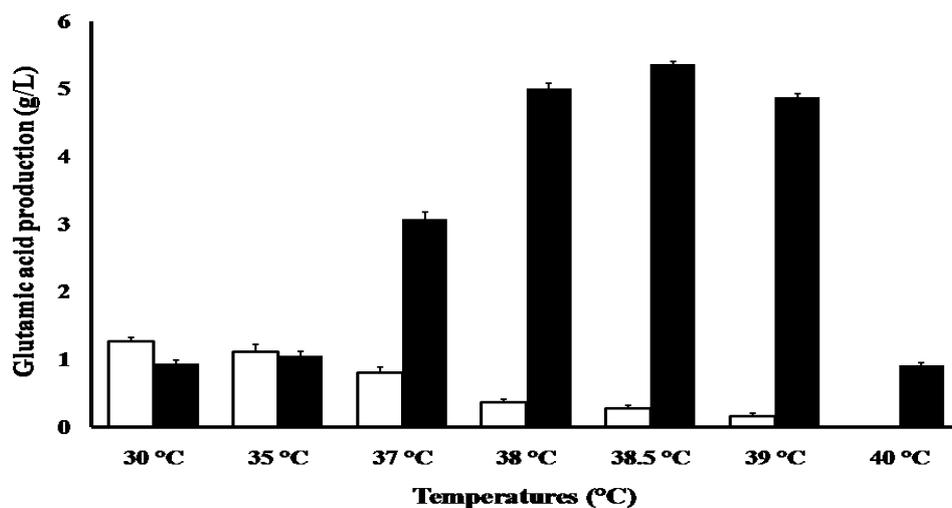


Figure 4. L-Glutamic acid production of *C. glutamicum* wild-type and isolated strain PP29 observed after 24 h of incubation. The white and black bars represent the L-glutamic acid production of *C. glutamicum* wild-type and isolated strain PP29, respectively. Error bars represents SD.

Table 1. L-glutamic acid production of the isolated strain PP29.

Strain	Temperatures (°C)	Cell dry weigh (g/L)	Glutamic acid production (g/L)	Product yield (g glutamic acid/ g dried cell)
ATCC13032 (wild-type)	30 °C	53.97 ± 0.70	1.28 ± 0.05	0.02 ± 0.00
	35 °C	34.26 ± 0.34	1.12 ± 0.11	0.03 ± 0.00
	37 °C	18.31 ± 0.63	0.81 ± 0.08	0.05 ± 0.01
	38 °C	1.72 ± 0.21	0.37 ± 0.04	0.22 ± 0.01

	38.5 °C	0.83 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.34 ± 0.07
	39 °C	0.58 ± 0.15	0.17 ± 0.04	0.29 ± 0.05
	40 °C	n.d. *	n.d. *	n.d. *
	41 °C	n.d. *	n.d. *	n.d. *
	30 °C	45.97 ± 0.90	0.94 ± 0.06	0.02 ± 0.00
	35 °C	49.45 ± 0.56	1.05 ± 0.07	0.02 ± 0.00
	37 °C	32.49 ± 0.73	3.08 ± 0.10	0.10 ± 0.01
	38 °C	17.16 ± 0.05	5.01 ± 0.07	0.30 ± 0.01
PP29 (isolated strain)	38.5 °C	1.90 ± 0.09	5.37 ± 0.04	2.82 ± 0.11
	39 °C	1.74 ± 0.06	4.88 ± 0.05	2.80 ± 0.24
	40 °C	0.91 ± 0.23	0.91 ± 0.04	1.00 ± 0.14
	41 °C	n.d. *	n.d. *	n.d. *

* n.d. not determined due to no growth; Value represents the mean score (n = 3) ± S.D.

16S rDNA and phylogenetic analysis

Accordingly, a 16S rRNA gene analysis was performed in order to identify the species of PP29. The 1.25 kb sequences obtained from this strain was aligned with all the presently available 16S rDNA sequences in the GenBank database. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, as shown in Figure 5. The phylogenetic analysis of PP29 strain based on comparison of 16S rDNA sequences revealed that this strain was closely related to *C. glutamicum* ATCC13032 (99 % similarity).

DISCUSSION

A large number of *C. glutamicum* have been isolated from various sources such as soil, soils contaminated with bird feces, sewage and manure, vegetables, and fruits (Abe et al., 1967; Kinoshita et al., 1957; Udaka, 1960). However, no selective media or enrichment procedures are known that are specifically suited for these organisms. In our study, the thermotolerant *C. glutamicum* was isolated from soils contaminated with bird feces obtained from Roi-Et province, Thailand. Nalidixic acid and sodium azide, used to inhibit the growth of unwanted bacteria, were added into the medium. Nalidixic acid was blocked DNA replication in susceptible bacteria by inhibiting a subunit of DNA gyrase (Crumplin and Smith, 1975). Sodium azide inhibited cytochrome oxidase (complex IV of the mitochondrial electron transfer chain) and growth of gram negative bacteria (Smith et al., 1991). Therefore, we suggested that these techniques could reduce the number of unwanted bacteria that cannot grow on this media. However, *C. glutamicum* could grow on the medium that contained both of Nalidixic acid and sodium azide.

The isolated PP29 was preliminary identified as *C. glutamicum* by colony morphology, cellular morphology, and gram reaction analysis (Abe et al., 1967; Takano et al., 2008). PP29 was confirmed as *C. glutamicum* by using 16S rDNA and phylogenetic tree analysis. 16S RNA gene sequence similarity values of isolate PP29 to other strains of the genus *Corynebacterium* were in the ranging of 93% - 99%. These values and the phylogenetic position shown in the phylogenetic tree (Figure 5) indicate that isolate PP29 belongs to the genus *Corynebacterium*, and was closely related to *C. glutamicum*, with 99% sequence similarity.

C. glutamicum PP29 could grow at 40 °C, while type strain (ATCC13032) failed to grow at this temperature. Though PP29 excreted lower L-glutamic acid than wild-type at 30 °C, its L-glutamic acid production increased with increasing temperature which was even higher than that of wild-type. These results indicated that PP29 possesses enhanced thermotolerance glutamate fermentation (Zheng et al., 2012). Thus, PP29 might be applied to the fermentative production of L-glutamic acid on a large scale industry. Importantly, the use of thermotolerant *C. glutamicum* PP29 in industrial fermentation process would reduce the cost of cooling during the fermentation process.

The ability of L-glutamic acid fermentation at an elevated temperature of PP29 suggested that some of the genomic profiles for temperature and glutamate productivity of this strain might probably be evolved in the nature spontaneously. Therefore, our future plans may involve the study of genetic variability of PP29 by genomic mapping techniques, for example, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and Rapid Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. These techniques might reveal the molecular mechanisms of L-glutamic acid production at high temperature of PP29. The study of how PP29 capable of excreting L-glutamic acid at an enhanced temperature could be beneficial for improving L-glutamic acid production on an industrial scale.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by The National Research Council of Thailand and Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology. We also acknowledge the Suranaree University of Technology Fund for a scholarship to Ms. Pawantree Paisrisan.

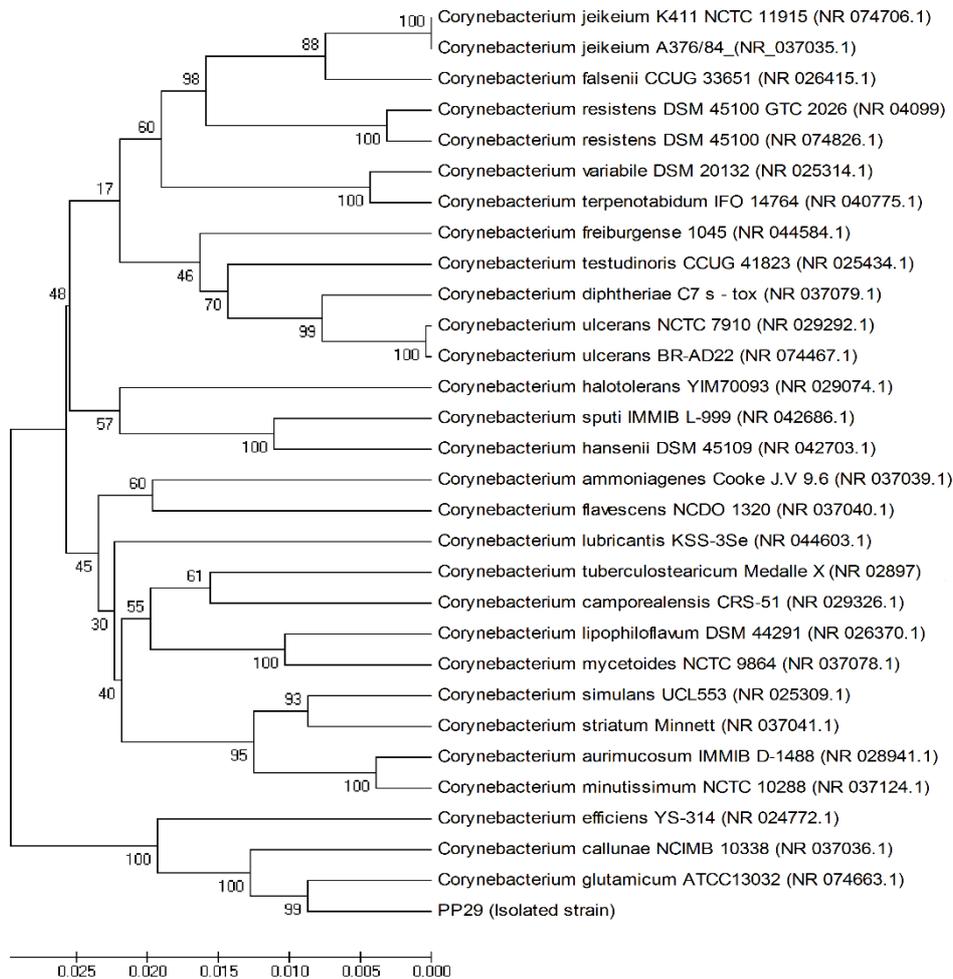


Figure 5. Neighbor-joining phylogenetic tree deduced from the 16S rRNA gene sequences representing the position of the isolated strain PP29 and other related taxa. Numbers at nodes are percentage bootstrap values based on 1,000 replications. GeneBank accession numbers of the sequences are indicated in the parentheses. Bar indicates 5 nucleotides substitution per 1,000 nucleotides.

REFERENCES

- Abe, S., Takayama, K-I., and Kinoshita, S. 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* 13:279-301.
- Bourke, SL., and Kohn, J. 2003. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:447-466.

- Crumplin, G. C. and Smith, J. T. 1975. Nalidixic Acid: an Antibacterial Paradox. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8(3):251-261.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi, A., and Yamanaka, S. 2002. *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic acid-producing species from soil and vegetables. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1127-1131.
- Herman, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology* 104:155-172.
- Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. 1957. Taxonomical study of glutamic acid accumulating bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 3:193-205.
- Kinoshita, S., Takayama, S., and Akita, S. 1958. Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 22:176-185.
- Lane, DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley p:115-175.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:1-8.
- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O., and Matsushita, K. 2004. Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:187-193.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., and Maniatis, T. 1986. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Smith, RP., Louis, CA., Kruszyna, R., and Kruszyna, H. 1991. Acute neurotoxicity of sodium azide and nitric oxide. *Fundamental and Applied Toxicology* 17:120-127.
- Takano, H., Shimizu, A., Shibosawa, R., Sasaki, R., Iwagaki, S., Minagawa, O., Yamanaka, K., Miwa, K., Beppu, T., and Ueda, K. 2008. Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:127-134.
- Tateno, T., Okada, Y., Tsuchidate, T., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A. 2009. Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase and lysine decarboxylase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:115-121.
- Tokuma, F., Uyama, H., and Kobayashi, S. 2004. Polymerization of polyfunctional macromolecules: synthesis of a new class of high molecular weight poly(amino acid)s by oxidative coupling of phenol-containing precursor polymers. *Biomacromolecules* 5:977-983.
- Udaka, S. 1960. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *Journal of Bacteriology* 79:754-755.

US Department of Energy. 2004. Top value added chemicals from biomass, volume I-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. T. Werpy and G. Petersen, the Pacific Northwest National Laboratory (PNNL).

Zheng, P., Liu, M., Liu, X-d., Du, Q-y., Ni, Y., and Sun, Z-h. 2012. Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1035-1043.