

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	47
ผลและวิจารณ์	59
สรุปและข้อเสนอแนะ	144
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	151
ภาคผนวก	163
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	164
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	173
ภาคผนวก ค ลักษณะของตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่เก็บเพื่อแยกแบคทีเรีย	
<i>Corynebacterium</i>	176
ภาคผนวก ง สูตรคำนวณ	196
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	198

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กระบวนการผลิตกรดอะมิโน และปริมาณการผลิต	8
2	การผลิตกรดอะมิโนโดยกระบวนการหมัก	9
3	ตัวอย่างของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ผลิตโดย <i>C. glutamicum</i>	23
4	ชนิดของตัวอย่าง สถานที่เก็บ รหัส และจำนวนของไอโซเลต ที่มีลักษณะ และสีของโคโลนีใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Corynebacterium</i>	61
5	ชนิดของตัวอย่าง และลักษณะโคโลนีของ <i>C. glutamicum</i> ที่แยกได้	74
6	ชนิดของตัวอย่าง และลักษณะโคโลนีของ <i>C. ammoniagenes</i> ที่แยกได้	75
7	การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของไอโซเลตที่แยกได้กับ <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	84
8	การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของ 5 ไอโซเลตที่แยกได้กับ <i>C. efficiens</i> YS-314 ^T และ <i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T	89
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูลของทั้ง 58 ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่าง	90
10	คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ <i>C. glutamicum</i> ทั้ง 41 ไอโซเลตที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	94
11	สมบัติทางชีวเคมีของ <i>C. ammoniagenes</i> ที่แยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ <i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T	96
12	คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ <i>C. ammoniagenes</i> ทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ <i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T	97
13	สมบัติทางชีวเคมีบางประการที่มีความแตกต่างกันระหว่าง <i>C. glutamicum</i> และ <i>C. ammoniagenes</i> ที่แยกได้	99
14	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> ที่แยกได้ ในอาหารเหลว A2, OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ	101

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> ที่แยกได้ ในอาหารเหลว A2, OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ	104
16	เปรียบเทียบการเจริญของ <i>C. glutamicum</i> สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้กับสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ (KY9002 และ KY9714) ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	132
17	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้จำนวน 3 ไอโซเลต ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	134
18	ระดับความเข้มของกรดกลูตามิกบน paper chromatogram ของ <i>C. glutamicum</i> สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	136
19	คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ <i>C. glutamicum</i> และ <i>C. ammoniagenes</i> ที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T และ <i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T	146
20	ชนิด แหล่งเก็บตัวอย่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>C. glutamicum</i> สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้	148
21	ชนิด แหล่งเก็บตัวอย่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>C. ammoniagenes</i> สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้	149
ตารางผนวกที่		
ก	วัน สถานที่ ชนิด และลักษณะของตัวอย่างที่เก็บ	177
จ1	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> C304 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	199

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
จ2	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS204 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	200
จ3	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS254 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	201
จ4	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS255 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	202
จ5	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS274 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	203
จ6	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> DS50 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	204
จ7	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> KY9002 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	205
จ8	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> KY9714 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	206
จ9	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> B97 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	207
จ10	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> CS215 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	208

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ11 การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> CS224 ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติก 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที OD ₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	209

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของกรดอะมิโน	4
2	กรดอะมิโนชนิดต่างๆ	5
3	สูตร โครงสร้างของกรดกลูตามิก	16
4	การสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆในจุลินทรีย์	19
5	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย <i>C. glutamicum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	22
6	การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ <i>C. glutamicum</i> ตลอดการเจริญ	22
7	ลักษณะโคโลนีของ <i>C. glutamicum</i> CS255 (A) และ <i>C. ammoniagenes</i> B97 (B) บนอาหารแข็ง A1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง และขนาดของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) ของ <i>C. glutamicum</i> CS255 (C) และ <i>C. ammoniagenes</i> B97 (D)	77
8	ขั้นตอนการแยก คัดเลือก และจัดจำแนกแบคทีเรีย <i>Corynebacterium</i> กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิก	78
9	ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง D2 ที่มีการเติม nalidixic acid และ NaN_3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน (A) ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ต้องการ (ลูกศรชี้) (B)	79
10	ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการติดสีแกรมบวกของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Corynebacterium</i> ที่เจริญบนอาหารแข็ง A1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)	80
11	การจำแนกแบคทีเรีย <i>C. glutamicum</i> , <i>C. ammoniagenes</i> , <i>C. callunae</i> และ <i>C. efficiens</i> เบื้องต้น โดยใช้สมบัติทางชีวเคมี	82
12	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> C304 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	106
13	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> C304 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	107
14	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS204 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> CS204 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	110
16	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS254 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	111
17	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> CS254 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	112
18	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS255 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	113
19	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> CS255 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	114
20	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> CS274 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	116
21	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> CS274 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	117
22	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> DS50 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	118
23	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> DS50 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	119
24	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> KY9002 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	121

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> KY9002 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	122
26	การเจริญของ <i>C. glutamicum</i> KY9714 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	123
27	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. glutamicum</i> KY9714 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	124
28	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> B97 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	125
29	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. ammoniagenes</i> B97 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	126
30	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> CS215 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	127
31	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. ammoniagenes</i> CS215 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	128
32	การเจริญของ <i>C. ammoniagenes</i> CS224 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	129
33	โครมาโตแกรมแสดงระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกของ <i>C. ammoniagenes</i> CS224 เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ	130
34	PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของ 16S rDNA บน agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์	140
35	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ <i>HhaI</i> ของ <i>C. glutamicum</i> (A) และ <i>C. ammoniagenes</i> (B) บน agarose gel 3 เปอร์เซ็นต์	141

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 36 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Hae*III ของ *C. glutamicum* (A) และ *C. ammoniagenes* (B) บน agarose gel 3 เปอร์เซ็นต์ 143