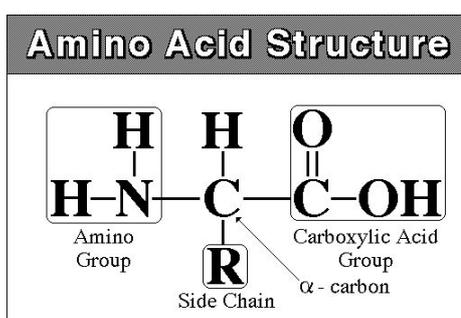


การตรวจเอกสาร

กรดอะมิโน

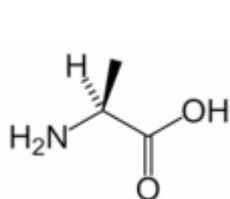
กรดอะมิโนเป็นหน่วยเดี่ยว (monomer) ของเปปไทด์ และ โปรตีน โครงสร้างทางเคมีของกรดอะมิโนประกอบด้วย หมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) ถ้าเป็นชนิด α -amino acid หมู่ $-NH_2$ และ $-COOH$ จะเกาะที่อะตอมของคาร์บอนตัวเดียวกัน และเรียกคาร์บอนตำแหน่งนี้ว่า α -carbon atom ดังแสดงในภาพที่ 1

ในธรรมชาติมีกรดอะมิโนอยู่ 20 ชนิด ซึ่งจัดเรียงตัวเป็น โปรตีนได้ไม่จำกัด แบ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) 10 ชนิด ได้แก่ ไลซีน เมทไทโอนีน ทรีโพรเฟน ทรีโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ฮิสทีดีน อาร์จินีน วาลีน และกรดอะมิโนไม่จำเป็น (non essential amino acid) อีก 10 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก กรดแอสปาดิก ซีสเตอีน เซอรีน อะลานีน ไทโรซีน โพรลีน รวมทั้งอนุพันธ์ของกรดกลูตามิก ได้แก่ กลูตามีน และอนุพันธ์ของกรดแอสปาดิก ได้แก่ แอสปาราจีน โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด แสดงดังภาพที่ 2

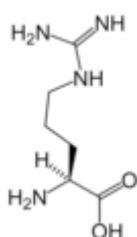


ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรดอะมิโน

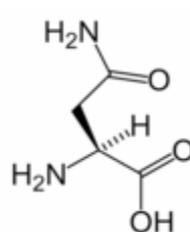
ที่มา: Anonymous (n.d.)



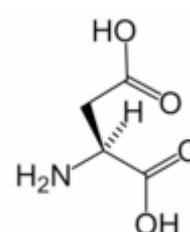
L-Alanine
(Ala / A)



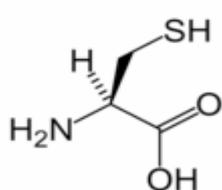
L-Arginine
(Arg / R)



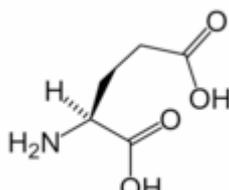
L-Asparagine
(Asn / N)



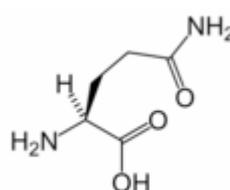
L-Aspartic acid
(Asp / D)



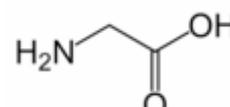
L-Cysteine
(Cys / C)



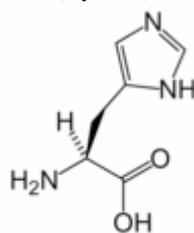
L-Glutamic acid
(Glu / E)



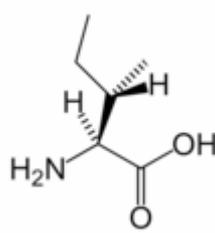
L-Glutamine
(Gln / Q)



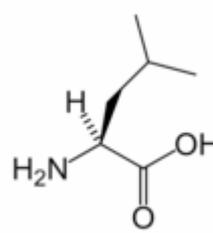
Glycine
(Gly / G)



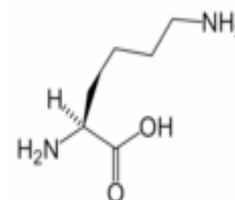
L-Histidine
(His / H)



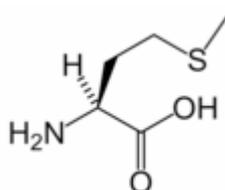
L-Isoleucine
(Ile / I)



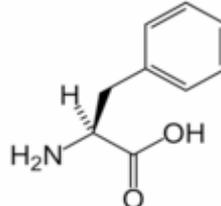
L-Leucine
(Leu / L)



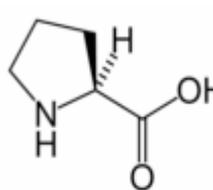
L-Lysine
(Lys / K)



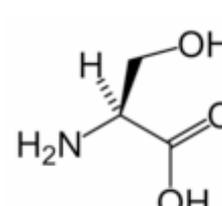
L-Methionine
(Met / M)



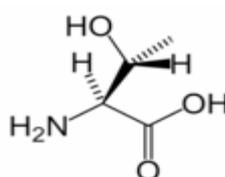
L-Phenylalanine
(Phe / F)



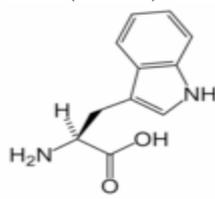
L-Proline
(Pro / P)



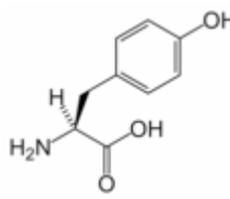
L-Serine
(Ser / S)



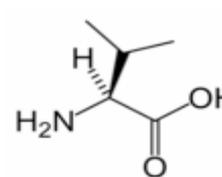
L-Threonine
(Thr / T)



L-Tryptophan
(Trp / W)



L-Tyrosine
(Tyr / Y)



L-Valine
(Val / V)

ภาพที่ 2 กรดอะมิโนชนิดต่างๆ

ที่มา: Anonymous (n.d.)

ความสำคัญของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนไม่ได้มีความสำคัญเฉพาะเป็นสารอาหารเท่านั้นยังสามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆ (ดวงพร, 2530; Leuchtenberger, 1996; Kleemann *et al.*, 1999) เช่น

1. กรดอะมิโนที่ใช้ทางด้านอาหาร

กรดอะมิโน และโปรตีนที่ถูกย่อย ส่วนใหญ่จะใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น MSG (monosodium glutamate) ใช้เป็นสารปรุงรส ไกลซีนใช้เป็นสารให้ความหวาน เป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย (bacteriostatic) ในอาหาร และสามารถใช้เป็นแอนติออกซิแดนในสาร emulsifiers แอล-ซีสเทอีน ใช้ในการทำสินค้าประเภทอบ และพาสต้า นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการเป็นสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (anti-browning agent) ของอาหาร

2. กรดอะมิโนที่ใช้ทางด้านอาหารสัตว์

ในอาหารสัตว์ที่ได้จาก ปลา ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวโพด มักจะขาดกรดอะมิโนจำพวก เมธไทโอนีน ไลซีน และทรีโอนีน จึงต้องมีการเติมกรดอะมิโนเหล่านี้ในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้น

3. กรดอะมิโนที่ใช้ทางการแพทย์

แอล-อาร์จินีน แอล-กรดแอสปาดิก และแอล-กรดกลูตามิก มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค Hyperammonemia และโรคตับ (Hepatic disorder) โปแตสเซียม หรือแมกนีเซียม แอล-แอสปาดेट ช่วยลดการเกิดหัวใจล้มเหลว และโรคตับ ซีสเทอีน ใช้ป้องกันเนื้อเยื่อจากการ oxidation หรือ inactivation และช่วยป้องกันการบาดเจ็บจากรังสี

4. กรดอะมิโนที่ใช้ทางด้านอื่นๆ

N-acyl-amino acids ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว และใช้เป็นโมโนเมอร์ของการสังเคราะห์เรซิน

การผลิตกรดอะมิโน

กระบวนการผลิตกรดอะมิโน แสดงดังตารางที่ 1 โดยทั่วไปสามารถแบ่งได้ 4 วิธี (Leuchtenberger, 1996; Kleemann *et al.*, 1999) คือ

1. การสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี (Chemical synthesis)

กระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบไม่สมมาตรโดยกระบวนการทางเคมี เช่น การผลิต ดีแอล เมทไทโอนีน และไกลซีน แต่ไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากกระบวนการที่ใช้ค่อนข้างรุนแรง มีทั้งการใช้อุณหภูมิและความดันสูง ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเสียหายได้

2. การสกัดจากวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูงโดยตรง (Extraction)

การสกัดกรดอะมิโน เช่น ซีสเทอีน ไทโรซีน โพรลีน ใช้การสกัดจากแหล่งโปรตีนธรรมชาติโดยตรง เช่น keratin feather, blood meal

3. การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ (Fermentation)

ในปัจจุบันกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์นิยมใช้ผลิตกรดอะมิโนสำคัญ เช่น กรดกลูตามิก ไลซีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีสูตรโครงสร้างเป็นวง เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งจัดเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

4. การใช้เอนไซม์ (Enzyme catalytic)

วิธีนี้เป็นการผลิตกรดอะมิโนทางชีวสังเคราะห์ที่อาศัยระบบของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นกรดอะมิโนที่ต้องการ

ตารางที่ 1 กระบวนการผลิตกรดอะมิโน และปริมาณการผลิต

ชนิด	กรดอะมิโน	กระบวนการผลิต	ปริมาณการผลิต (ตัน)
I	แอล-อะลานีน	การใช้เอนไซม์	100-1,000
	แอล-แอสปาราจีน	การสกัด	
	แอล-กลูตามีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-ฮีสทีดีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-ไอโซลิวซีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-ลิวซีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-เมทไทโอนีน	การใช้เอนไซม์	
	แอล-โปรลีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-เซอรีน	การหมัก, การสกัด	
	แอล-ไทโรซีน	การสกัด	
	แอล-วาเลีน	การใช้เอนไซม์, การหมัก	
II	แอล-อาร์จินีน	การหมัก, การสกัด	1,000-8,000
	แอล-ซีสเทอีน	Reduction of แอล-ซีสเทอีน(การสกัด)	
	แอล-ทริปโตเฟน	การหมัก	
III	แอล-ไกลซีน	การใช้เอนไซม์	100,000-800,000
	แอล-กรดแอสปาดิก	การใช้เอนไซม์	
	แอล-ทรีโอนีน	การหมัก	
	แอล-ฟีนิลอะลานีน	การหมัก	
IV	ดี แอล-เมทไทโอนีน	การสังเคราะห์ทางเคมี	800,000-
	แอล-กรดกลูตามิก	การหมัก	1,000,000
	แอล-ไลซีน	การหมัก	

ที่มา: Leuchtenberger (1996)

ตารางที่ 2 การผลิตกรดอะมิโนโดยกระบวนการหมัก

กรดอะมิโน	สายพันธุ์ที่ใช้	คุณสมบัติของสายพันธุ์	ผลผลิต(กรัมต่อลิตร)
ดีแอล-อะลานีน	<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>	ArgHx ^r	60
แอล-อะลานีน	<i>Pseudomonas</i> No.483	Wild type	17.5
แอล-อาจีซีน	<i>Serratia marcescens</i> AT428	Tranduction Canavanine ^r	50
แอล-แอสปาทิก	<i>Escherichia coli</i> K1-1023		56
แอล-กรดกลูตามิก	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Wild type	100
	<i>Brevibacterium flavum</i>		98
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>		82
แอล-กลูตามีน	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Wild type of glutamic acid producer	58
แอล-ฮีสทีดีน	<i>Serratia marcescens</i> L 120	rDNA	40
แอล-ไอโซลิวซีน	<i>B. flavum</i>	Eth ^r	30
แอล-ลิวซีน	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	Ile ⁻ Met ⁻ TA ^r	28
แอล-ไลซีน	<i>B. lactofermentum</i> AJ 1124	AEC ^r Ala ⁻ CCL ^r ML ^r FP ^s	70
	<i>B. flavum</i>	Hom ^{leaky} Thre ⁻	75
แอล-เมทไทโอนีน	<i>C. glutamicum</i> KY 9276	Thr ⁻ Eth ^r MetHx ^r	2
แอล-ออนิทิน	<i>C. glutamicum</i>	Arg ⁻	26
แอล-เฟนิลอะลานีน	<i>B. lactofermentum</i>	5MT ^r PFP ^r Dec ^r Tyr ^r Met ⁻	25
แอล-โปรลีน	<i>C. acetoacidophilum</i>	Uncharaterized mutant	108
แอล-เซอริน	<i>B. lactofermentum</i>	SG ^r	4.5
แอล-ทรีโอนีน	<i>E. coli</i> VL 344	rDNA	55
แอล-ทริปโตเฟน	<i>E. coli</i> JP 4114	rDNA	23.5
แอล-ไทโรซีน	<i>C. glutamicum</i> Pr-20	Phe ⁻ PFP ^r PAP ^r	18
		PAT ^r TyrHx ^r	
แอล-วาเลีน	<i>B. lactofermentum</i> No. 487	Ta ^r	31

ที่มา: Leuchtenberger (1996)

การวิเคราะห์กรดอะมิโน

Shih (1985) ทำการวิเคราะห์กลูตามีน กรดกลูตามิก และกรดไพโรกลูตามิกจากตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้ว โดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) เลือก *o*-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol (OPA-ME) เป็นตัวทำอนุพันธ์ วิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิด Patrtilsil PXS ODS ขนาด 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ที่มี pre-column บรรจุ silica ขนาด 37-53 ไมโครเมตร และ guard column ขนาด 70 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร บรรจุ CO:PELL ODS sorbent (ขนาดอนุภาค 30-38 ไมโครเมตร) ตรวจวัดโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ใช้ sodium acetate buffer และ acetonitrile เป็นตัวเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อวิเคราะห์กรดกลูตามิก และกรดไพโรกลูตามิกจากตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้ว พบว่า เมื่อย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำให้กลูตามีนลดลง และเปลี่ยนรูปเป็นกรดไพโรกลูตามิก สำหรับการวิเคราะห์กรดกลูตามิกและกลูตามีน ใช้เวลาในการชะ 25 นาที ส่วนกรดไพโรกลูตามิกใช้ 0.1% phosphoric acid เป็นตัวชะ ใช้เวลา 15 นาที และพบว่า ที่ pH 4.2 ไม่สามารถแยกกรดอะมิโนแอสปาดิกออกจากเซอริน และแยกกรดกลูตามิกออกจากฮิสทีดิน แต่เมื่อเพิ่ม pH เป็น 5.4 สามารถแยกออกจากกันได้ และทำให้ retention time ของกรดกลูตามิก และกรดแอสปาดิกน้อยลง

Polanuer *et al.*(1992) วิเคราะห์ กลูตามีน กรดกลูตามิก และกรดไพโรกลูตามิกจากตัวอย่างน้ำหมักและตัวอย่างทางเทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ขนาด 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร บรรจุ unmodified silica (ขนาด 5 ไมโครเมตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดการ form complex กับ Cu (II) ion โดย Spectronic Model 2000 scanary spectrophotometer เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.01M SDS, 0.01M CuSO₄ และ isopropanol อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อตรวจสอบการ form complex ของกรดไพโรกลูตามิก พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร สามารถตรวจวัดได้ลดลง 5 เท่า แต่มีความสามารถในการคัดเลือกเพิ่มขึ้น สามารถตรวจวัดกลูตามีน กรดกลูตามิก และกรดไพโรกลูตามิกในรูป Cu complex ได้ทั้งหมด และจากการวิเคราะห์จากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากเชื้อ *C. glutamicum* เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแอมโมเนียซึ่งสามารถ form complex กับ Cu²⁺ คล้ายกับกรดไพโรกลูตามิก จึงแก้ไขด้วยการเติม SDS เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก พบว่า สามารถแยกกันได้ดีขึ้น ข้อดีของวิธี

นี้ คือ คอลัมน์มีความคงตัวสูง และสามารถต่อเนื่องได้ 500 ตัวอย่าง ใช้เวลาในการวัดประมาณ 10 นาที

Krause *et al.* (1995) วิเคราะห์กรดอะมิโน และไบโอจีนิกเอมีน โดยวิธี reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) เลือก dabsyl chloride เป็นตัวทำอนุพันธ์ โดยใช้คอลัมน์สะแตนเลสสตีลที่มี guard cartridge ชนิด Spherisorb ODS-2 หรือ คอลัมน์ชนิด Novapak C₁₈ ใช้เฟสเคลื่อนที่ A คือ 9 mM sodium dihydrogen phosphate 4% dimethylformamide และ 0.1-0.2% triethylamine (TEA) pH 6.55 เฟสเคลื่อนที่ B คือ 80% aqueous acetonitrile ใช้โปรแกรมเกรเดียน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย Ultraviolet-visible absorbance detectors ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ในด้านปริมาณ พบว่า ความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.25-1,250 pmol การตรวจสอบจำกัดอยู่ในช่วง 0.12-0.52 pmol และ % recovery ได้ประมาณ 98-104 % ผลกระทบของการใช้ซ้ำหลายขั้นตอนอยู่ระหว่าง 0.2-3.3% และในการวิเคราะห์ในด้านคุณภาพ พบว่า การเติม Triethylamine (TEA) ความเข้มข้น 0.16 เปอร์เซ็นต์ในเฟสเคลื่อนที่จะช่วยทำให้มีประสิทธิภาพ และสามารถแยกกรดอะมิโน และไบโอจีนิกเอมีนในรูปอนุพันธ์ dabsyl ได้ 68 ชนิดโดยใช้คอลัมน์ NovaPak C₁₈ และเติม TEA 0.16% ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 72 นาที นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้แยกกรดอะมิโน จากตัวอย่าง โปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้ว แยกกรดอะมิโน และไบโอจีนิกเอมีนจากตัวอย่างทางชีวภาพ และอาหารได้

สมใจและคณะ (2540) วิเคราะห์ปริมาณไลซีนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยวิธี paper chromatography เฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายผสมของ n-butanol: acetic acid: water ในอัตราส่วน 4: 1: 1 ตรวจสอบจุดสีโดยการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน อบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อสังเกตเห็นจุดสีม่วงที่มีค่า Rf ตรงกับสารละลายมาตรฐานไลซีน ตัดกระดาษบริเวณนั้นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในสารละลาย CuSO₄·5H₂O ในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้สีละลายออกมาทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไลซีน พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียใน genus *Bacillus* และมีความสามารถผลิตไลซีนได้ในช่วง 0.43-0.59 กรัมต่อลิตร

Oguri *et al.* (1997) พัฒนาริธีวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยวิธี High-performance capillary electrophoresis (HPCE) ร่วมกับการทำอนุพันธ์แบบออนไลน์โดยใช้ o-phthalaldehyde (OPA)/N-acetylcysteine (NAC) เป็นตัวทำอนุพันธ์แทน 1-methoxycarbonylindolizine-3,5-dicarbaldehyde (IDA) ใช้คอลัมน์ capillary tube ขนาด 75 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร ที่บรรจุ silica ตรวจสอบด้วย FP-920 fluorescence detector บัฟเฟอร์ใช้ phosphate-borate buffer pH10 พัฒนาโดยเติม β -Cyclodextrin (β -CD) จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ พบว่า ความเข้มข้นของ β -CD 15.4 mmol/l ความเข้มข้นของ OPA/NAC 2 mmol/l ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 100 mmol/l ใช้กระแสไฟฟ้า 22 kV เป็นสถานะที่เหมาะสม และจากการวิเคราะห์สารที่มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน 17 ชนิด พบว่า สามารถแยกได้ 15 ชนิด ยกเว้น แอมโมเนีย และซีสเทอีน นอกจากนั้นความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.025-1.25 mmol/l detection limit อยู่ระหว่าง 2.5-10 μ mol/l ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน ระยะเวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 11-44 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธี HPLC โดยใช้ IDA เป็นตัวทำอนุพันธ์ และการใช้เครื่อง amino acid analyzer พบว่า มีความใกล้เคียงกัน แต่วิธี HPCE นี้ไม่สามารถตรวจวัด secondary amino acid กรดอะมิโน โพรลีน ออกซีโพรลีน ได้ แต่สามารถพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ D, L amino acid ได้

Hodison *et al.* (1998) ศึกษาการแยก ระบุ และการหาปริมาณกรดอะมิโนอิสระจากตัวอย่างของใบ *Ginko biloba* และ *Hedera helix* โดยเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ 3 วิธี วิธีแรก คือวิธีการใช้ Thin layer chromatography (TLC) ใช้แผ่นเซลลูโลส เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ ใช้สารละลายผสมระหว่าง n-butanol-acetone-acetic acid-water อัตราส่วน 35: 35: 7: 23 โดยปริมาตร โดยการ run ซ้ำ 2 ครั้งในทิศทางเดียวกัน และในระยะทางที่เท่ากัน (18 เซนติเมตร) การตรวจสอบการเกิดสี โดยการพ่นด้วยสารนินไฮดรินละลาย อยู่ใน n-butanol และ acetone (1: 1) อบที่ 105-110 องศาเซลเซียส 10-15 นาที พบว่า สามารถแยก และระบุกรดอะมิโนจากใบ *Ginko biloba* คือ แอสปารากิน กลูตามีน ไกลซีน อะลานีน โพรลีน ไทโรซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และเฟลนิน อะลานีน ส่วนใบ *Hedera helix* สามารถแยก และระบุแอสปารากิน ไกลซีน โพรลีน วาลีน ไทโรซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และเฟลนินอะลานีน ได้ วิธีที่สอง คือ วิธี HPLC ซึ่งทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ phenyl-tiocarbamic และนำไปวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิด Lichrospher ODS 100-5 ยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ ใช้สารละลาย 0.15 M โซเดียมอะซิเตด pH 6.5 และ acetonitrile ความเข้มข้น 7-20 เปอร์เซ็นต์ในโปรแกรมเกรเดียน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตรวจสอบด้วย Ultraviolet-visible absorbance detectors ที่ความ

ยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า สามารถแยก และระบุกรดอะมิโน ได้คล้ายกับวิธีแรก คือ จากใบ *Ginkgo biloba* แยกได้แอสปาราจิน กลูตามีน ไกลซีน อาลานีน อะลานีน และ โปรีลีน ส่วนใบ *Hedera helix* สามารถแยก และระบุแอสปาราจิน โปรีลีน วาลีน ไทโรซีน ไอโซลิวซีน และเมทไทโอนีนได้ วิธีสุดท้าย คือ วิธี Gas chromatography-Mass spectrophotometry (GC-MS) ซึ่งทำให้เป็นอนุพันธ์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยใช้คอลัมน์ Durabond DB-5 fused-silica capillary และตัวพาเป็นแก๊สฮีเลียม เพิ่มอุณหภูมิ 80-250 องศาเซลเซียสในอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร พบว่า สามารถแยกกรดอะมิโน ได้คล้ายกับวิธีอื่น ๆ จากใบ *Ginkgo biloba* คือ แอสปาราจิน กรดกลูตามิก ไกลซีน อะลานีน โปรีลีน ไทโรซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และเฟลนิลอะลานีน ส่วนใบ *Hedera helix* สามารถแยก และระบุแอสปาราจิน ไกลซีน โปรีลีน วาลีน ไทโรซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และเฟลนิลอะลานีนได้ จากทั้ง 3 วิธีสามารถแยก และระบุกรดอะมิโน จากตัวอย่างได้ใกล้เคียงกัน และจากตัวอย่างใบ *Ginkgo biloba* และ *Hedera helix* มี โปรีลีน ในปริมาณสูง เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการสร้าง โปรตีน และการ regenerated tissue

องอาจ (2541) วิเคราะห์กรดกลูตามิก โดยกลูตามาเมตเซนเซอร์ โดยอาศัยเอนไซม์กลูตามาเมต ดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจากเซลล์ *E. coli* และใช้การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้บนแผ่นเยื่อโดยตรง ซึ่งแผ่นเยื่อที่ใช้คือ แผ่นเยื่อถนอมอาหารเอ็มเรป ซึ่งมีคุณสมบัติยอมให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผ่าน แต่ไม่ยอมให้ไฮโดรเจนไอออนซึมผ่าน นอกจากนั้นราคาถูก และหาได้ง่าย เหมาะที่จะทำ คาร์บอนไดออกไซด์อิเล็กโทรด เมื่อเปรียบเทียบกับ การหาปริมาณกลูตามาเมตโดยวิธีการวัดค่า ดูดกลืนแสง (วัดจากปฏิกิริยานินไฮดรินกับกลูตามาเมต) ซึ่งยุ่งยาก ใช้เวลานาน และยังไม่จำเพาะ ต่อกลูตามาเมต พบว่า วิธีเซนเซอร์นี้ให้การตอบสนองที่รวดเร็ว 1-2 นาที และมีอัตราการเพิ่มของ สัญญาณไฟฟ้าสูง ให้ความจำเพาะสูง แม่นยำ และสามารถวัดซ้ำ 18 ครั้งใน 6 ชั่วโมง มีอายุการใช้งาน 28 วัน

Soga and Ross (1999) พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไอออนลบชนิดอนินทรีย์ กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี capillary electrophoresis (CE) ใช้คอลัมน์ชนิด fused-silica capillary ยาว 112.5 เซนติเมตร (มีประสิทธิภาพ 104 เซนติเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร อิเล็กโทรไลต์ คือ 20 mM 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDC) และ 0.5 mM Cetyl-trimethylammonium hydroxide (CTAH) pH 12.1 ใช้กระแสไฟฟ้า -30 kV การฉีดตัวอย่างใช้เวลา 6 วินาที ที่ความดัน 50 มิลลิบาร์ ความคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ตรวจวัดโดยวิธี indirect UV

detection ด้วยเครื่อง diode-array detector ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 230 นาโนเมตร สามารถวิเคราะห์สารประกอบได้ 83 ชนิด ได้แก่ ไอออนลบชนิดอนินทรีย์ 9 ชนิด กรดอินทรีย์ 23 ชนิด กรดอะมิโน 18 ชนิด และคาร์โบไฮเดรต 32 ชนิด เมื่อวิเคราะห์สารประกอบที่สนใจ 43 ชนิด ได้แก่ ไอออนลบชนิดอนินทรีย์ 7 ชนิด กรดอินทรีย์ 5 ชนิด กรดอะมิโน 16 ชนิด และคาร์โบไฮเดรต 15 ชนิด เพื่อให้การแยกโปรตีน และวาลีนได้ดีขึ้น และสามารถแยกไลซีน ไอโซลิวซีน และฮิสทีดีนได้จึงปรับอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 15 องศาเซลเซียส ความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 20-1,000 mg/l detection limit สำหรับไอออนลบ และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 6-12 mg/l สำหรับคาร์โบไฮเดรต 23-35 mg/l ที่ความดัน 300 mbar.s ข้อดีของวิธี คือ สามารถวิเคราะห์ไอออนลบซึ่งส่วนมากเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน หรือ คาร์โบไฮเดรตได้โดยไม่ต้องทำอนุพันธ์ การเตรียมตัวอย่างน้อย electropherogram ไม่มีสิ่งรบกวน นอกจากนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการตรวจวิเคราะห์ไอออนลบ กรดอะมิโน และ คาร์โบไฮเดรตจากตัวอย่างอาหาร ยา อุตสาหกรรมเกษตร

Ivanov *et al.*(2000) วิเคราะห์กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธี high-performance capillary electrophoresis (HPCE) ตรวจวัดโดยเครื่อง refractometry ใช้ running buffer ได้แก่ 75 mM sodium dibasic phosphate pH 11 สำหรับการแยกกรดอะมิโน และ 25 mM sodium tetrahydroborate pH 8 สำหรับการแยกคาร์โบไฮเดรต ใช้ uncoated fused-silica capillary ยาว 90 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร ใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก 200 โวลต์ต่อเซนติเมตร เวลาในการแยกประมาณ 15-20 นาที พบว่า สามารถแยกกรดอะมิโนอิสระได้ 7 ชนิด ได้แก่ อาจีนีน ไลซีน ฮิสทีดีน โพรลีน ทรีปโทเฟน เฟนิลอะลานีน และเมทไทโอนีน คาร์โบไฮเดรต 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลแซคคาโรส ส่วนความเข้มข้นที่สามารถแยกได้ คือ 0.075-0.2 โมลาร์ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรงไม่ต้องทำอนุพันธ์ มีความคงตัว การเตรียมตัวอย่างน้อย และสามารถใช้บัฟเฟอร์อิเล็กโทไลต์ที่หลากหลาย

Simion *et al.* (2001) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนอิสระจากตัวอย่างพลาสมา ของคนที่เป็นโรคท้องร่วง โรคไต และโรคหัวใจในระยะต่างๆ โดยวิธี TLC เฟสคงที่ คือ แผ่น เซลลูโลส และเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่าง n-butanol-acetone-acetic acid-water อัตราส่วน 35: 35: 7: 23 โดยปริมาตร ทำซ้ำ 2 ครั้งในทิศทางเดียวกัน และในระยะทางที่เท่ากัน (7.5 เซนติเมตร) ตรวจสอบการเกิดสีโดยการพ่นด้วยสารนินไฮดรินที่ละลายอยู่ใน n-butanol และ acetone (1: 1) อบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที พบว่า สามารถแยก และ

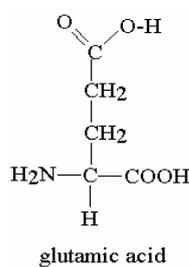
ระบุงการเปลี่ยนแปลงของอะลานีน โปรีลีน ไทโรซีน และเมทไทโอนีนได้ แต่บางชนิดก็ระบุได้เป็นกรดอะมิโนผสม 2-3 ชนิด คือ โอลีน กับฮีสทิดีน กลูตามีน กับซิทูลีน โอลีน เซอริน กับแอสปารจีน เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Shimadzu CS-9000 dual-wavelength flying-spot scanner พบว่า ในกรณีของปลาของคนที่เป็นโรคหัวใจสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรีลีน ไทโรซีน และเมทไทโอนีนที่เพิ่มขึ้นได้

สาโรจน และคณะ (2544) รายงานวิธีการวิเคราะห์กรดกลูตามิก โดยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) ซึ่งเป็นวิธีที่นำเอาจุลินทรีย์ทดสอบมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน โดยกรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (ATCC 8042) ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีกรดกลูตามิก และเติมแบคทีเรียทดสอบในปริมาณที่แน่นอน การเจริญของแบคทีเรียจะแปรผันตรงต่อปริมาณกรดกลูตามิกที่อยู่ในสภาวะการบ่มที่กำหนด วัดการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน

Lee *et al.* (2003) วิเคราะห์กรดอะมิโน โดยวิธี TLC ใช้แผ่น Kiesel gel 60 F254 เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายผสมระหว่าง phenol-water อัตราส่วน 3: 1 โดยปริมาตรและเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบ โดยการพ่นด้วยสารนินไฮดริน อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และการพ่นด้วยสาร genipin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากต้น *Gardenia jasminoides* อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า การเกิดปฏิกิริยาของ genipin (ใช้เวลา 30 นาที) ช้ากว่าการเกิดปฏิกิริยาของนินไฮดริน (ใช้เวลา 5 นาที) แต่จุดสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของนินไฮดรินจะหายไปหลังจาก 10 ชั่วโมงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีความคงตัวน้อยกว่าจุดสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของสารสกัด genipin โดยจะจุดสีที่เกิดขึ้นจะไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลามากกว่า 7 เดือน และสารบางชนิด เช่น กรด ต่าง เกลือ หรือ บัฟเฟอร์ก็มีผลต่อปฏิกิริยานินไฮดริน และไอออนบางชนิด เช่น Cu^{2+} และ Fe^{3+} ในปริมาณเล็กน้อยก็มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีของนินไฮดรินได้ แต่สารเหล่านี้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาของสาร genipin นอกจากนั้นสาร genipin เป็นสารสกัดจากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารนินไฮดรินซึ่งเป็นสารเคมีที่เหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลอง

กรดกลูตามิก

กรดกลูตามิกมีชื่อทางเคมี (chemical name) คือ (S)-2-Aminopentaedioic acid มีคุณสมบัติเป็นกรดอะมิโนชนิดมีขั้ว ปรากฏ น้ำหนักโมเลกุล 147.13 จุดหลอมเหลว (melting point) เท่ากับ 247-249 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น (density) 1.538 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_5H_9NO_4$ แสดงดังภาพที่ 3 กรดกลูตามิกสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของกรดกลูตามิก

ที่มา: Anonymous (n.d.)

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดกลูตามิก ได้แก่

1. แบคทีเรีย

Kinoshita and Tanaka (1972) รายงานว่า แบคทีเรียประมาณ 20 เพอร์เซ็นต์ เช่น *E. coli*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *M. glutamicus* เป็นต้น และแอคทิโนมัยซีทประมาณ 30 เพอร์เซ็นต์ เช่น *Streptomyces tanshiensis*, *S. cinnamonensis* ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จากคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส

Chao and Foster (1958) รายงานว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 14B22 สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ 6-13.5 มิลลิกรัมของกรดกลูตามิก (0.24-0.55 โมลของกรดกลูตามิกต่อโมลของกลูโคส) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 3 เพอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน สาร neutralizing agent ใช้ $CaCO_3$ 0.1 เพอร์เซ็นต์ และ NH_4OH ในสภาวะการจำกัดไนโตรเจน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Botsford *et al.* (1994) รายงานว่า แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ในระยะ log phase สามารถสะสมกรดกลูตามิกได้ 290-430 นาโนโมล เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ที่มีสาร osmolyte เช่น NaCl หรือ KCl หรือน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะ stationary phase ในอาหารชนิดเดียวกัน พบว่า การสะสมกรดกลูตามิกจะน้อยลง

แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตกรดกลูตามิกจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น kerosene และ light oil โดยมีรายงานว่า แบคทีเรีย *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* และ *Eschericia* ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมัน สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ โดยเฉพาะ *Corynebacterium hydrocarboclastus* นอกจากนี้แบคทีเรียประเภท n-paraffin – assimilating bacteria ได้แก่ *Brevibacterium ketoglutaricum*, *Arthrobacter roseoparaffineus* และ *Micrococcus paraffinolyticus* ก็สามารถผลิตกรดกลูตามิกจาก gaseous hydrocarbon (โดยเฉพาะ butane) ได้เช่นกัน

นอกจากนั้นยังพบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จากกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Pseudomonas ovalis* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จาก α -ketoglutarate *B. pumilis*, *B. subtilis* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จากกรดฟูมาริก และ *Brevibacterium glutaricum* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จากกรดแลคติก

จากการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดกลูตามิกในแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างกรดกลูตามิก และปล่อยออกมาในอาหาร ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ส่วนใหญ่จะสร้างกรดกลูตามิกได้ในปริมาณน้อย แต่มีแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตกรดกลูตามิก ซึ่งสามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ได้แก่ แบคทีเรียใน Genus *Corynebacterium* เช่น *C. glutamicum* เป็นต้น

2. เชื้อรา

เชื้อราประมาณ 30 เพอร์เซ็นต์ เช่น *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *Rhodotorula nigricans*, *Mucor racemosus* และ *Cephalosporium dispyri* สามารถผลิตกรดกลูตามิก

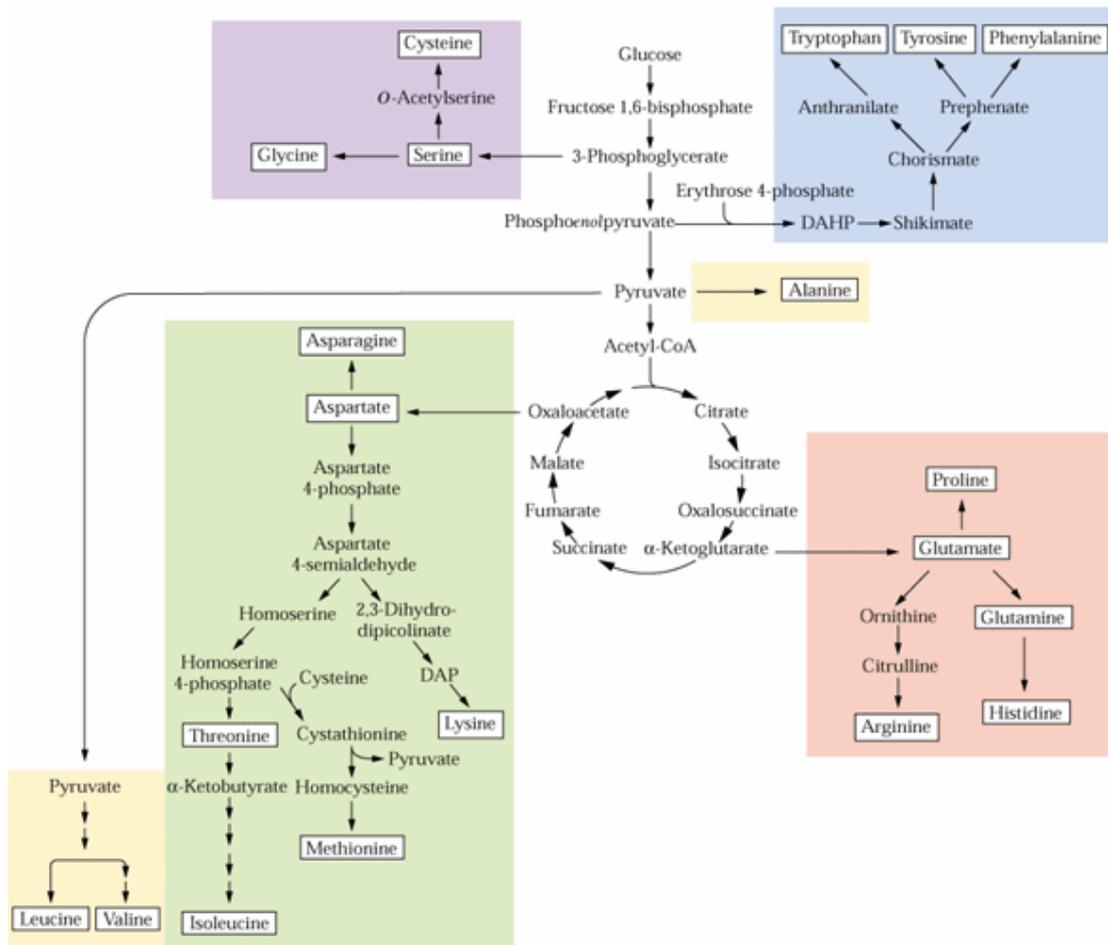
ได้จากคาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้น ยังมี *Aspergillus oryzae* ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จาก α -ketoglutarate

3. ยีสต์

Rhodotorula glutinis, *Pullular pullulans*, *Sporobolomyces salmonicolor* และ *Torula utilis* สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้จากกลูโคส (Abe and Takayama, 1972)

กลไกและการควบคุมการสังเคราะห์กรดกลูตามิก

กลไกการสังเคราะห์กรดกลูตามิกจากน้ำตาลกลูโคสเป็นกระบวนการที่ทำงานร่วมกันของ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway และ Hexose Monophosphate shunt (HMS) pathway โดยกลูโคสจะเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) เข้าสู่วัฏจักรเครบ (Kerb's cycle) แสดงดังภาพที่ 4 โดยในขั้นตอนสุดท้าย α -ketoglutarate จะเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิก โดยใช้ปฏิกิริยา reductive amination ซึ่งอาศัยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์กรดกลูตามิก



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่างๆในจุลินทรีย์
ที่มา: Anonymous (n.d.)

Genus *Corynebacterium*

แบคทีเรีย *Corynebacterium*

แบคทีเรีย *Corynebacterium* สามารถจัดหมวดหมู่ ได้ดังนี้

Superkingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Actinobacteria
Subclass	: Actinobacteridae
Order	: Actinomycetales
Suborder	: Corynebacterineae
Family	: Corynebacteriaceae
Genus	: <i>Corynebacterium</i>

ลักษณะโดยทั่วไปของ *Corynebacterium*

เซลล์ติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์มีรูปร่างท่อนตรง (straight rod) ท่อนโค้ง (slightly curved rod) หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic shaped) ปลายเซลล์อาจโป่งออกคล้ายกระบอง การเรียงตัวของเซลล์มีลักษณะคล้ายรั้ว ขนานกัน (palisade cell) หรือเป็นรูปตัววี เนื่องจากมีการแบ่งตัวแบบ snapping ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็นพวก aerobe หรือ facultative anaerobe มีผนังเซลล์ที่หนา (thick cell walls) ภายในเซลล์สะสมโวลูทีนเกรนูล (volutin granule หรือ metachromatic granule) เมื่อย้อมด้วยสี methylene blue จะติดสีม่วงแดง ทดสอบกะตะเลสให้ผลบวก สปีชีส์ส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดจากกลูโคส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ได้ สปีชีส์ส่วนใหญ่ต้องการไบโอติน วิตามิน กรดอะมิโน พิวรีน และไพริมิดีนในการเจริญ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส มี % G+C ประมาณ 51-70 เปอร์เซนต์ (Jones and Collins, 1984)

Genus *Corynebacterium* กลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิก

ใน Genus *Corynebacterium* สปีชีส์ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ในปริมาณสูง มี 4 สปีชีส์ ดังนี้

1. *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*)

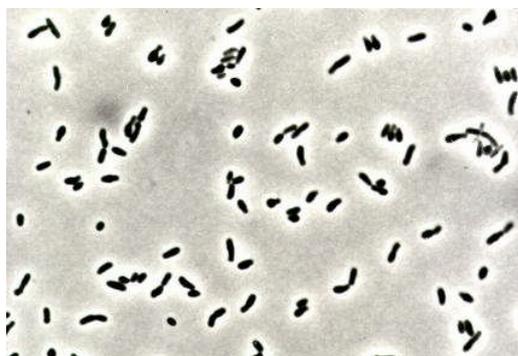
พบครั้งแรกในปี 1957 โดย Dr. Kinoshita เดิมให้ชื่อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ว่า *Micrococcus glutamicus* แต่เมื่อมีการศึกษาทางด้าน taxonomy ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในกลุ่มของ coryneform bacteria และผู้เชี่ยวชาญทางด้านดิเอ็นเอสสนับสนุนว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ควรอยู่ใน genus *Corynebacterium* ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น *Corynebacterium glutamicum*

1.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *C. glutamicum*

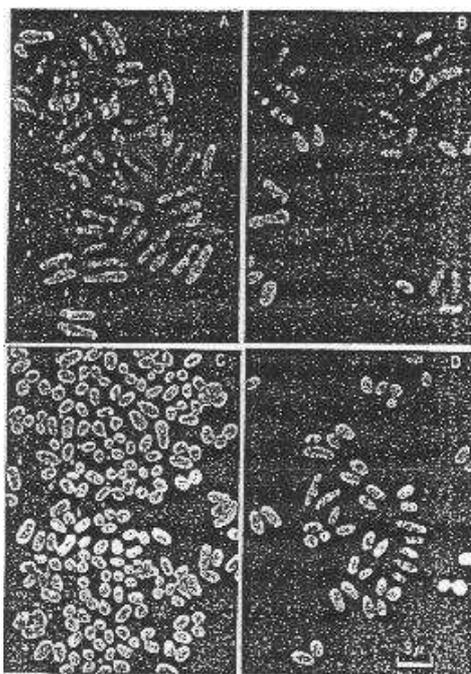
ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้นคล้ายกระบอง แสดงดังภาพที่ 5 มีขนาด 0.7-1.0 x 1.0-3.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยว คู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ในระยะ lag phase จะยาวแต่ในระยะ mid-late log phase เซลล์จะสั้นมากจนเกือบกลม แสดงดังภาพที่ 6 ลักษณะ โคโลนีบน nutrient agar มีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีเหลืองซีดถึงเหลือง ลักษณะ โคโลนีบน tellurite medium มีสีเทาเกือบดำ ในอาหารเหลวมีลักษณะขุ่นและตกตะกอนปานกลาง เป็น aerobic และ facultatively anaerobic อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 25-37 องศาเซลเซียส ที่ 42 องศาเซลเซียสมีการเจริญเล็กน้อย ทุกสายพันธุ์ต้องการ ไบโอดีน และ อาจต้องการ ไทมีนและหรือ *p*-amino-benzoic acid ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP, น้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตส พบสายของกรดไขมันโครลิก สายสั้นๆ menaquinone หลัก คือ MK-9(H₂) สายกรดไขมันที่เป็น nonhydroxylated สายหลัก คือ C_{16:0} และ C_{18:1} % G+C content เท่ากับ 55-57.7 mol% Type strain ได้แก่ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032^T ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดกลูตามิกในปริมาณมากในสภาวะที่มีอากาศ

1.2 แหล่งที่พบ

แหล่งที่พบ *C. glutamicum* ครั้งแรก คือ ตัวอย่างดินที่เก็บจากสวนสัตว์ Ueno ในโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น โดย Dr. Udaka และ Dr. Kinoshita ในปี 1957 และดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลนก (Eggeling and Sahm, 2001) สามารถแยกได้จากดิน มูลสัตว์ ผัก และผลไม้ (Keddie and Jones, 1981) หรือ activated sludge (He *et al.*, 2002)



ภาพที่ 5 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *C. glutamicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา: Anonymous (n.d.)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ *C. glutamicum* ตลอดการเจริญ
ภาพ A แสดงรูปร่างของเซลล์ในระยะ lag phase (2 ชั่วโมง)
ภาพ B แสดงรูปร่างของเซลล์ในระยะ log phase (5 ชั่วโมง)
ภาพ C แสดงรูปร่างของเซลล์ในระยะ late log phase (10 ชั่วโมง)
ภาพ D แสดงรูปร่างของเซลล์ในระยะ stationary phase (24 ชั่วโมง)
ที่มา: Abe and Takayama (1972)

1.3 การนำไปใช้ประโยชน์

การนำจุลินทรีย์ *C. glutamicum* สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การผลิตกรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิก ไลซีน กลูตามีน วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน โพรลีน ไทโรซีน เมทไทโอนีน เซอลีน ทรีโอนีน เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 3 (Kinoshita and Tanaka., 1972; Abe and Takayama., 1972; Soda *et al.*, 1983; Crueger and Creuger, 1990; Eggeling and Sahm, 1999; Leuchtenberger *et al.*, 2005)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ผลิตโดย *C. glutamicum*

Amino acid	Strain/mutant	Titer (g/l)	Estimated yield (g/100g sucrose)
L-Lysine HCl	<i>C. glutamicum</i> B6	100	40-50
L-Tryptophan	<i>C. glutamicum</i> KY9218/pIK 9960	58	20-25
L-Histidine	<i>C. glutamicum</i> F81/pCH 99	23	15-20
L-valine	<i>C. glutamicum</i> VR3	99	30-40

ที่มา: Leuchtenberger *et al.* (2005)

การใช้เซลล์ *C. glutamicum* ที่เหลือจากกระบวนการหมักไลซีนเป็น lead biosorption โดยการใช้ protonated biomass จะสามารถจับกับ Pb^{2+} ได้ ที่ pH 5 โดยที่ Pb^{2+} ไม่ตกตะกอน สามารถจับได้ 2.74 มิลลิโมลต่อกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ sorbent ตัวอื่น พบว่า *C. glutamicum* ใช้เป็น biosorbent ได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ยกเว้น *Mucor rouxii* นอกจากนั้นยังมีประสิทธิภาพดีกว่า commercial ion exchange resin (Dulite GI-73) ซึ่งมีราคาแพง (Choi and Yun, 2004)

นอกจากจะใช้ในการผลิตกรดอะมิโนแล้ว *C. glutamicum* สามารถใช้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับการตรวจสอบยูเรีย โดยใช้ *C. glutamicum* 2 สายพันธุ์ (617 และ ATCC 13032) ตรึงอยู่ใน calcium alginate 4 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ ammonia gas-sensing electrode เป็น

ไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจสอบยูเรีย โดยเซนเซอร์ที่ใช้สายพันธุ์ *C. glutamicum* 617 และเซนเซอร์ที่ใช้สายพันธุ์ *C. glutamicum* ATCC 13032 มีการตอบสนองเร็ว สามารถใช้ได้นานประมาณ 20-40 วัน เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบยูเรียในตัวอย่างปัสสาวะระหว่างเซนเซอร์กับเครื่อง Auto-analyzer พบว่าสามารถตรวจสอบได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (Lei *et al.*, 1995) หรือใช้เป็นจุลินทรีย์ตรวจสอบ โดยใช้เซลล์ *C. glutamicum* CCRC 12512 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้ Sodium phytate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส เป็น bioindicator ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ phytase ได้ (Chen, 1998)

การผลิตน้ำตาลทรีฮาโลสโดยใช้การ expression ของ *ots* gene (ยีนที่ทำหน้าที่เปลี่ยน glucose-6-phosphate เป็นน้ำตาลทรีฮาโลสจาก *E. coli* ซึ่งถูกถ่ายถอดเข้าไปใน *C. glutamicum* $\Delta treS$ มีผลให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิตน้ำตาลทรีฮาโลสได้ 5-6 เท่า (Padilla *et al.*, 2004) หรือการผลิตกรดอินทรีย์โดยใช้ *C. glutamicum* ผลิตกรดแลกติกและกรดซัคซินิก โดยเลี้ยงใน BT medium ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน และมีการเติมสารไบคาร์บอเนตเพื่อช่วยเพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสทำให้มีอัตราการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย การเติม bicarbonate ยังมีผลให้มีการผลิตกรดซัคซินิกเพิ่มขึ้น แต่มีผลให้การผลิตกรดแลกติกลดลง ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์แห้ง 60 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 42.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กรดซัคซินิกได้ 11.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และการผลิตกรดอินทรีย์สามารถใช้ระบบรีไซเคิลเซลล์ได้อย่างน้อยที่สุด 360 ชั่วโมง (Okino *et al.*, 2005) การผลิต bioflocculant โดยใช้ *C. glutamicum* CCTCC M201005 ผลิต polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 ซึ่งสามารถลดสีในของเสียจากโมลาส เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียกับ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้ C/N ratio เท่ากับ 20:1 และใช้อัตราการให้อากาศต่ำ จะให้ flocculating activity 520 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (He *et al.*, 2004) หรือ การศึกษาเมทาบอลิซึมของ vanillate ถูกควบคุมโดย *vanABK* operon ในแบคทีเรีย *C. glutamicum* ซึ่งสามารถใช้ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยลิกนิน เช่น ferulate vanillate และ protocatechuate เป็นแหล่งคาร์บอน โดยในการศึกษาคั้งนี้ในเป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *C. glutamicum* สำหรับการผลิต vanillin ได้ (Merkens *et al.*, 2005)

2. *Corynebacterium callunae*

2.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *C. callunae*

ติดสีแกรมบวก รูปร่างค่อนข้างสั้น พบ metachromatic granules การเจริญบน NA มีเจริญปานกลาง ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP, น้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตส พบสายของกรดไมโครลิก สายสั้นๆ isoprenoid quinone หลัก คือ MK-9(H₂) สายกรดไขมันที่เป็น nonhydroxylated สายหลัก คือ C_{16:0} และ C_{18:1} %G+C content เท่ากับ 51.2 mol% Type strain ได้แก่ *C. callunae* ATCC 15991 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดกลูตามิกในปริมาณมาก ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

2.2 แหล่งที่พบ

ต้นพืช ซึ่งเป็นไม้เตี้ยชนิดหนึ่ง ขึ้นตามทุ่ง และไม่มีรายงานว่าเป็น phytopathogenic (Jones and Collins, 1984)

2.3 การนำไปใช้ประโยชน์

การนำจุลินทรีย์ *C. callunae* ไปใช้ประโยชน์ เช่น การผลิตกรดกลูตามิก (Abe and Takayama, 1972) การผลิต Glucose-1-phosphate (Weinhaeusel *et al.*, 1994)

3. *Corynebacterium ammoniagenes* (*Brevibacterium ammoniagenes*)

เดิมแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกจัดอยู่ใน genus *Brevibacterium* แต่จากผลการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา ทางด้านกายภาพ ทางด้านเคมีและชีวเคมี แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *Brevibacterium ammoniagenes* ควรถูกจัดอยู่ใน genus *Corynebacterium* ให้ชื่อว่า *Corynebacterium ammoniagenes* (Jones and Collins, 1984)

3.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *C. ammoniagenes*

ติดสีแกรมบวก ลักษณะเซลล์ที่อายุน้อย (ไม่เกิน 24 ชั่วโมง) รูปร่างเป็นท่อน ไม้แน่นอน ปลายกลม ความยาวประมาณ 1-4.5 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.6-1.2 ไมโครเมตร การเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยว หรือคู่ บางเซลล์เรียงตัวเป็นรูปตัววี ลักษณะเซลล์ที่อายุมาก (ประมาณ 7 วัน) รูปร่างเป็นท่อนสั้นกว่า แต่ยังพบลักษณะตัววีอยู่ ไม่ติดสีของ acid-fast ไม่สร้าง

สปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีบน PYE agar ลักษณะกลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีเทาถึงขาว สีไข่มุก หรือสีเหลือง เป็น facultatively anaerobic แต่เจริญได้ดีกว่าเมื่อมีอากาศ ผลคะตะเลสเป็นบวก เจริญในอาหารที่มีเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส พบการเจริญที่ 5, 10 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 7-8.5 มันงเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP พบสายของกรดไมโครลิกที่มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง C₃₂-C₃₆ menaquinone หลัก คือ MK-9(H₂) %G+C เท่ากับ 53.7-55.8 mol% มีรายงานว่าไม่ทำให้เกิดโรคในกระต่าย และหนูตะเภา แต่เป็นสาเหตุให้เกิดอาการแพ้ฝุ่นผ้าอ้อมในทารก Type strain ได้แก่ *C. ammoniagenes* ATCC 6871; NCTC 2398; NCIB 8143

3.2 แหล่งที่พบ

อุจจาระทารก ของเสียจากเล้าหมู (Jones and Collins, 1984) บนพื้นผิวของ red smear cheese (Starber *et al.*, 1997) และบนพื้นผิวของ smear-ripened cheese จากนมวัวและนมแพะ (Bockelman and Seyler, 2001)

3.3 การนำไปใช้ประโยชน์

การนำจุลินทรีย์ *C. ammoniagenes* ไปใช้ประโยชน์ เช่น การผลิตกรดกลูตามิก (Abe and Takayama, 1972) นอกจากนั้นยังสามารถนำไปผลิตนิวคลีโอไทด์ เช่น การพัฒนาวิธีการผลิตนิวคลีโอไทด์ inosine 5'-monophosphate (5'-IMP) โดยใช้ 2 ขั้นตอน คือ การผลิต inosine จาก *C. ammoniagenes* KY13761 และเปลี่ยนเป็น 5'-IMP โดยใช้เอนไซม์ guanosine/inosine kinase (GIKase) จาก recombinant *E. coli* MC1000 (pIK75) ซึ่งเอนไซม์นี้จะเปลี่ยน inosine เป็น 5'-IMP โดยปฏิกิริยา phosphorylation โดยจะมีการสะสมของ 5'-IMP ปริมาณ 91 mM ภายใน 12 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยา (Mori *et al.*, 1997) หรือการพัฒนาการผลิต 5'-guanylic acid (5'-GMP) โดยใช้ *C. ammoniagenes* ร่วมกับ self-Cloned *E. coli* ซึ่งการผลิต GMP โดยตรงทำได้ยาก จึงใช้วิธีการผลิต XMP และใช้เอนไซม์เปลี่ยนไปเป็น GMP แทนโดยใช้เอนไซม์ GMP syntase ซึ่งต้องใช้ ATP ในการทำปฏิกิริยาคด้วย ดังนั้นจึงใช้ *C. ammoniagenes* เพื่อช่วยในการ regenerate ATP และผลิตเอนไซม์ GMP synthase ร่วมกับ self Cloned *E. coli* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ GMP syntase ได้สูง (Fujio *et al.*, 1999) หรือการผลิตไรโบฟลาวินโดยใช้ *C. ammoniagenes* KY13628/pFM76 ซึ่ง

พลาสมิด pFM76 มีขึ้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ไรโบฟลาวิน ซึ่งมีความสามารถผลิตไรโบฟลาวินได้เพิ่มขึ้น 17 เท่า โดยการผลิตไรโบฟลาวินในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน pH 7 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที การให้อากาศ 2 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตไรโบฟลาวินได้สูงสุด 15.3 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมกลูโคส 2 ครั้ง (Koizumi *et al.*, 2000a) หรือ การพัฒนาการผลิต GDP-fructose (oligosaccharides), fucosylated oligosaccharides และ Lewis X (stage-embryonic antigen) โดยใช้ *C. ammoniagenes* ร่วมกับ recombinant *E. coli* ที่มีการ expression ของ GDP-Fuc biosynthetic gene โดยในขั้นแรกใช้ *C. ammoniagenes* เพื่อเปลี่ยน GMP เป็น GTP และหลังจากนั้นใช้ recombinant *E. coli* เพื่อเปลี่ยน GTP เป็น GDP-fructose และเป็น Lewis X (Koizumi *et al.*, 2000b) และสามารถใช้ *C. ammoniagenes* เป็นหัวเชื้อร่วมกับจุลินทรีย์อีก 4 ชนิดซึ่งได้แก่ *D. hansenii*, *B. linens*, *A. nicotianae* และ *S. sciuri* ในการผลิต Tilsit cheese ripening โดยจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดจะทำหน้าที่ต่างๆ เช่น *D. hansenii*, *B. linens* และ *A. nicotianae* ให้สีและกลิ่น *C. ammoniagenes* ใช้สำหรับ complete smear layer และ *S. sciuri* เป็น proteolytic bacteria ช่วยการการหมัก เป็นต้น (Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001)

4. *Corynebacterium efficiens*

แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เมื่อก่อนใช้ชื่อว่า *Corynebacterium thermoaminogenes* แต่การศึกษาทางด้านชีวเคมี และด้านวิวัฒนาการ (phylogenetic studies) โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์นี้อยู่ใน genus *Corynebacterium* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. glutamicum* และ *C. callunae* จากผลข้อมูลจากลำดับเบสของ 16S rDNA และการศึกษา DNA-DNA relatedness สามารถจัดให้เป็นสายพันธุ์ใหม่ใน genus *Corynebacterium* โดยให้ชื่อว่า *Corynebacterium efficiens* (Fudou *et al.*, 2002)

4.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *C. efficiens*

ติดสีแกรมบวก เป็นท่อน รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดกว้าง 0.8-1.1 ไมโครเมตร ความยาว 1.0-4.5 ไมโครเมตร บางเซลล์เรียงตัวในลักษณะรูปตัววี ไม่พบลักษณะ rod-coccus cycle หรือ ไมซีเลียม เซลล์ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงบน Nutrient agar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ มันวาว สีเหลือง ขนาด 2-3 มิลลิเมตร เป็น aerobic และ

facultatively anaerobic เป็น chemo-organotrophic thermotolerant bacteria อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส สามารถเจริญที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญที่ 47 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 7-10 ไม่เจริญที่ pH ต่ำกว่า 6.5 เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ NaCl 10 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียสและให้กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาพให้อากาศ ผันเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP, น้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตส กรดไขมันหลักคือ hexadecanoic acid ($C_{16:0}$, 39-45 เปอร์เซ็นต์) และ octadecanoic acid ($C_{18:1\omega 9}$, 45-48 เปอร์เซ็นต์) และมี octadecanoic acid ($C_{18:0}$, 0.8-1.5 เปอร์เซ็นต์) เล็กน้อย พบกรดไมโครลิกสายสั้นๆ menaquinone หลัก คือ MK-9 (H_2) G+C content เท่ากับ 59.5 mol% Type strain ได้แก่ *Corynebacterium efficiens* YS-314

4.2 แหล่งที่พบ

Fudou *et al.* (2002) รายงานว่า สามารถแยกแบคทีเรีย *C. efficiens* ได้จากหัวของหัวหอม และตัวอย่างดินที่จังหวัดคานากาว่า ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CM2 medium บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีอากาศ

4.3 การนำไปใช้ประโยชน์

การนำจุลินทรีย์ *Corynebacterium efficiens* ไปใช้ประโยชน์ เช่น การผลิตกรดกลูตามิกได้มากกว่า 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาพให้อากาศ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ (Fudou *et al.*, 2002)

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

วิธีการแยกเชื้อที่ได้นั้นควรเริ่มต้นด้วยการแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่สำคัญคือ ดิน ซึ่งอุดมสมบูรณ์ไปด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยพยายามเลือกแหล่งดินที่มีแนวโน้มที่จะมีจุลินทรีย์ที่ต้องการอยู่ด้วย นำมาผสมน้ำเจือจางให้พอเหมาะ เพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม และใช้วิธีต่างๆ ในการทดสอบคุณสมบัติหรือลักษณะเฉพาะที่ต้องการ แต่ในกรณีที่ไม่สามารถใช้คุณสมบัติหรือลักษณะที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือกได้ ก็อาจใช้วิธีสุ่มแยกจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม ซึ่งมี

แนวโน้มนำสูงว่าจะมีคุณสมบัติที่ต้องการออกมาก่อน แล้วจึงนำไปทดสอบภายหลัง (Stanbury *et al.* 1994)

1. วิธีการแยกเชื้อ โดยใช้คุณสมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก

1.1 Enrichment liquid culture

เป็นเทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลว ซึ่งเติมสารจำเพาะบางอย่างที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น การเติมสารปฏิชีวนะ หรือ ลีซอม ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ แต่ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในอาหาร และอาจมีผลให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญขึ้นมาแทน ดังนั้นการแยกเชื้อโดยใช้วิธีนี้นิยมถ่ายเชื้อจาก enriched culture ลงไปในอาหารใหม่ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนเดิมซ้ำอีกหลายๆครั้ง โดยที่การถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนั้นจะต้องเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งเป็นช่วงที่มีจุลินทรีย์ที่ต้องการอยู่เป็นจำนวนมาก

Stevenson *et al.* (2000) พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective medium) สำหรับคัดแยกแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* โดยการใช้อาหาร *H. pylori* special peptone agar (HPSPA) เป็นพื้นฐาน (basal medium) หลังจากนั้น เติมยาปฏิชีวนะ vancomycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร amphotericin B 5 มิลลิกรัมต่อลิตร cofsulodin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร polymyxin B 62,000 IU/l trimethoprim 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sulfamethoxazole 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารดังกล่าวสามารถคัดแยก *H. pylori* จากตัวอย่างเนื้อวัว เนื้อควายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Aquilanti *et al.* (2004) สามารถแยกแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. จากตัวอย่างดิน 35 ตัวอย่างในอิตาลี โดยเปรียบเทียบวิธีคัดแยก 3 วิธี ได้แก่ วิธี streak ตัวอย่างดินที่ความเข้มข้นเหมาะสมลงบนอาหาร Brown N-free medium วิธี enrichment ใน Winogradsky solution 7-14 วัน หลังจากนั้น streak บน Brown agar และวิธีการใช้ soil agar ร่วมกับการเพาะเมล็ดดินบน manitol agar โดยตรง พบว่าวิธีการใช้ soil agar ร่วมกับการเพาะเมล็ดดินบน manitol agar โดยตรงให้ประสิทธิภาพดีที่สุด

1.2 การใช้อาหารแข็ง (solidifying medium)

การแยกเชื้อโดยใช้อาหารแข็งนิยมใช้ในการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ โดยเดิมลับเสทของเอนไซม์ชนิดที่ต้องการลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การแยกเชื้อวิธีนี้เป็นเพียงการแยกเชื้อเบื้องต้นเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการเท่านั้น ถ้าต้องการคัดเลือกเชื้อทำให้ผลผลิตสูง จะต้องนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบในขั้นต่อไป

Teodoro and Martins (2000) สามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่สามารถสร้างเอนไซม์ α -amylase ที่คงตัวที่อุณหภูมิสูง จากตัวอย่างดิน โดยเกลี่ยตัวอย่างดินที่ละลายในน้ำกลั่นลงบนอาหาร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 2 วัน ย้ายโคโลนีที่เจริญลงบนอาหารที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 2 วัน เลือกลโคโลนีที่มีวงใสกว้างที่เกิดจากการราดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร

Ilyina (2003) ทำการแยกแบคทีเรียซึ่งสามารถย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากดินที่ปนเปื้อน โดยใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมัน petroleum น้ำมันดีเซล และส่วนที่เหลือจากการสันดาปของน้ำมัน petroleum เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแยกได้ 82 สายพันธุ์จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อน 7 ตัวอย่าง จาก Mexico ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Providencia* sp. และ *Citrobacter* sp.

Kiiskinen *et al.* (2004) ทำการแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ laccase ชนิดใหม่ จากดอกไม้ ท่อนซุง เศษสน ไม้ต้น โอ๊กหรือขยะที่มีการย่อยสลายในประเทศฟินแลนด์ โดยใช้อาหาร MEA และ PDA ที่เติม chloramphenical และ chloro-tetracycline เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเติม benomyl เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยไม้ นอกจากนี้ยังมีการเติม indicator ที่แตกต่างกัน ได้แก่ RBBR และ Poly R-478 โดยเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ จะทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นไม่มีสี สาร guaiacol โดยเชื้อราจะสร้างวงสีแดงน้ำตาล และ tannic acid โดยเชื้อรา จะสร้างวงสีน้ำตาลเข้ม ผลการทดสอบ พบว่า การใช้สาร RBBR หรือ Poly R-478 หรือ guaiacol เป็น indicator สามารถตรวจสอบเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ laccase ได้ดีกว่าการใช้ tannic acid และเชื้อราที่แยกได้ เช่น *Peniophora* sp., *Mucor* sp., *Tricoderma* sp. เป็นต้น

2. วิธีการแยกเชื้อโดยไม่ได้ใช้คุณสมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก

การสร้างผลผลิตบางชนิดของจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ให้เป็นประโยชน์ในการแยกเชื้อได้โดยตรง ดังนั้นการแยกจุลินทรีย์พวกนี้ต้องเริ่มจากการสุ่มแยกจุลินทรีย์กลุ่มที่มีแนวโน้มว่าจะสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ออกมาก่อน แล้วจึงนำไปทดสอบว่าสร้างสารที่ต้องการหรือไม่ โดยใช้ ออกโซโทรฟ (auxotroph) ที่ต้องการสารนั้นๆเป็นเชื้อทดสอบ ตัวอย่างเช่น การแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ สารส่งเสริมการเจริญ เช่น กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

Udaka (1960) รายงานว่า ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกโดยวิธี bioautographic technique ใช้แบคทีเรียทดสอบ *Leuconostoc mesenteroides* สายพันธุ์ P-60 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้องการกรดกลูตามิกในการเจริญ โดยเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่นำมาทดสอบบนอาหารแข็งเมื่อมีการเจริญ ฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต แล้วเททับด้วยอาหารแข็งที่มีสายพันธุ์ทดสอบ สังเกตการเจริญของสายพันธุ์ทดสอบรอบๆ โคลโลนีของแบคทีเรีนั้นๆ หลังจากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคสและยูเรีย เป็นเวลา 2 วัน พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างกรดกลูตามิกได้ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สร้างกรดกลูตามิกได้ในปริมาณสูง (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งภายหลังได้ทำการจัดจำแนกเป็น *Micrococcus glutamicus* (*Corynebacterium glutamicum*)

Stanbury *et al.* (1994) รายงานว่า ปี 1976 Daoust ได้อธิบายวิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ใน Genus *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* และ *Corynebacterium* โดยใช้อาหารแข็งซึ่งมีสารประกอบที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ เช่น ไซโคลเฮกซอไมด์ (Cycloheximide) เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย ในการสุ่มแยกชั้นแรก หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่มีจุลินทรีย์อยู่ประมาณ 30-50 โคลโลนีไปทำ replica plate บนอาหารแข็งที่สามารถส่งเสริมการผลิตกรดอะมิโนได้ บ่มไว้ 2-3 วัน เพื่อให้เจริญขึ้นมาเป็น โคลโลนีจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต แล้วเททับ (overlay) ด้วยอาหารแข็งที่มีจุลินทรีย์ออกโซโทรฟที่ต้องการกรดอะมิโนผสมอยู่ด้วย บ่มไว้ประมาณ 1 วัน ถ้าจุลินทรีย์ชนิดใดผลิตกรดอะมิโนที่ต้องการได้ ก็จะมีการเจริญของออกโซโทรฟเกิดขึ้นเป็นรัศมีอยู่รอบๆ โคลโลนีของจุลินทรีย์ชนิดนั้น หลังจากนั้นแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะมิโนที่ต้องการได้จาก โคลโลนีจานเพาะเชื้อเดิม (original plate) ที่ใช้เป็นต้นแบบในการทำ replica plate นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่ผลิตได้ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตกรดอะมิโนสูงต่อไป

Osmanoglu *et al.* (2001) ทำการแยกแบคทีเรียใน genus *Pediococcus* ที่สร้างสาร Pediocin P ซึ่งเป็น antimicrobial ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* และ *Listeria* เป็นต้น จากไส้กรอกที่บรรจุในสุญญากาศ โดยการแยกใช้วิธีนำน้ำที่ได้จากตัวอย่างมา pour plate บน TGE agar บ่ม 35 องศาเซลเซียส 1 คืน เมื่อโคโลนีขึ้น เททับด้วยอาหาร TGE soft agar ที่มี *L. plantarum* NCDO 955 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทดสอบ นำไปบ่ม 35 องศาเซลเซียส 1 คืน เลือกโคโลนีที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ทดสอบได้ โดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี จากการทดสอบ พบว่า แบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร pediocin P คือ *Pediococcus pentosaceus* Pep1

จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (Thermotolerant microorganisms)

หมายถึงจุลินทรีย์พวกที่มีการเจริญที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) อยู่ในช่วงปานกลาง (mesophile) แต่ก็มีความสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงได้

1. ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีก็เพิ่มขึ้น และเพิ่มเป็น 2 เท่าในทุกๆ 10 องศาเซลเซียส ดังนั้น เซลล์จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีขีดจำกัด สำหรับโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน เป็นต้น อุณหภูมิที่สูงทำให้โมเลกุลเหล่านั้นไม่ทำงาน และเสียสภาพ สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่พวก thermophiles อุณหภูมิสูงเป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ไรโบโซมสลายตัว เอนไซม์ต่างๆ เสียสภาพอย่างถาวร และทำให้สาย DNA แตกออก ส่วนกลไกของการทนอุณหภูมิ (Thermotolerance) นั้นยังไม่เป็นที่ชัดเจน (Waites *et al.* 2001)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อความมีชีวิตรอดแตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในแต่ละองศาเซลเซียสเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะมีผลต่อการถูกทำลาย และเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปเกี่ยวข้องกับน้ำภายในเซลล์ อุณหภูมิสูงสุดในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกจำกัด โดยความเป็นประโยชน์ของน้ำภายใน

เซลล์ และการเพิ่มความเป็นกรดในสภาพแวดล้อมมีผลทำให้การทนอุณหภูมิลดลง ดังนั้นปฏิกิริยาเหล่านี้จึงถูกจำกัด โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในแต่ละองศาเซลเซียส เพราะ โปรตีน กรดนิวคลีอิก และ โมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดอื่นๆจะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูง จึงคาดว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ต้องมีกลไกพิเศษในการช่วยให้มีชีวิตรอดซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญ 3 ประการ คือ ความเสถียรของตัวเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของไขมันภายในเซลล์ การสร้างองค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบซึ่งเสียสภาพธรรมชาติเพราะความร้อน โดยมีกลไกสั่งให้สร้างขึ้นมาอย่างรวดเร็ว และ ประการสุดท้ายที่สำคัญ เชื่อว่าการที่จุลินทรีย์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้นั้นมีมาแต่เดิมอยู่ก่อนและเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง โดยการถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวผ่านโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ซับซ้อนภายในเซลล์เป็นตัวละครสำคัญ และยังคงว่ากลไกของปฏิกิริยาอาจมีมากกว่าหนึ่งชนิด จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื่อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังพบว่า การปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นต้นเหตุให้เกิดการเพิ่มแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง โดยเฉพาะในบริเวณที่มีความร้อนเนื่องจากกรรมวิธีการแปรรูปผลผลิต และจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่พบโดยทั่วไป ไม่ใช่เชื้อที่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคแก่มนุษย์ (ศิริพรรณ 2533)

จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงมีข้อดีหลายประการ เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง การย่อยสลายของสารอินทรีย์จะเกิดได้เร็วขึ้น เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และจากการที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงจะทำให้สามารถลดต้นทุนในการหล่อเย็นในระบบถังหมักขนาดใหญ่ได้

2. การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง

Nishio *et al.* (2003) เปรียบเทียบการวิเคราะห์ลำดับจีโนมของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการทนต่ออุณหภูมิในแบคทีเรีย *C. efficiens* ซึ่งเกิดจากการที่ *C. efficiens* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรีย *C. glutamicum* ไม่สามารถเจริญได้ จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของ GC content ของทั้งสองสปีชีส์ โดยก่อนหน้านี้นี้พบว่า GC content ของ *C. efficiens* สูงกว่า *C. glutamicum* 5 เปอร์เซ็นต์ (Fudou *et al.*, 2002) แต่จากการวิเคราะห์จีโนม พบว่า GC content ของ *C. efficiens* สูงกว่า *C. glutamicum* ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ โดย *C. efficiens* มี %GC content 63.4 เปอร์เซ็นต์ และ *C. glutamicum* มี % GC content 53.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบ codon usage ของ *C. efficiens* กับ *C. glutamicum* พบว่าใน *C. efficiens* จะมีการใช้ CTC (ลิวซีน) CTG (ลิวซีน) มากกว่า หรือ GCC (อะลานีน) GAC (กรดแอสปาดิก) ก็เช่นกัน มีโคดอน 13 โคดอนที่มีการใช้น้อยใน *C. glutamicum* แต่มีการใช้มากใน

C. efficiens เช่น GGG (ไกลซีน) และ CGC (อาร์จินีน) ส่วนองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ code ให้โปรตีนใน *C. efficiens* มีการใช้ไกลซีน และอาร์จินีน ทำให้มี GC content สูง และเมื่อวิเคราะห์ Biased amino acid substitution ใน Orthologous genes พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญ 3 ชนิดคือ ไกลซีนเปลี่ยนเป็นอาร์จินีน เซอรีนเปลี่ยนเป็นอะลานีน และเซอรีนเปลี่ยนเป็นทรีโอนีน ที่จะมีผลทำให้เพิ่ม GC content ใน *C. efficiens* ได้

3. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง

Kaewchi and Prasertsan (2002) รายงานว่า แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus subtilis* WD 90, *Bacillus subtilis* SM 29 และ *Enterobacter agglomerans* SM 38 สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงซึ่งสามารถผลิตโพลีเมอร์ที่มีกิจกรรมการตกตะกอนสูงได้ และเมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์ไปบำบัดน้ำทิ้งในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สามารถดลสีของน้ำทิ้งจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีเหลืองอ่อน แต่ไม่สามารถแยกน้ำมัน และตกตะกอนของแข็งได้

Onishi *et al.* (2003) รายงานว่า แบคทีเรีย *C. glutamicum* AHP-3 สายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูง สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LPG1 ประกอบด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7.0 สามารถผลิตไลซีนได้ 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสใน 30 ชั่วโมง

การจัดจำแนกแบคทีเรีย

คุณสมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

1. Phenetic classification (Atlas, 1997; Black, 1999)

1.1 Cellular characteristics

1.1.1 Morphology ขนาด และรูปร่างของเซลล์ รวมถึง ลักษณะการเรียงตัว การเคลื่อนที่โดยแฟลเจลลาหรือพิไล การสร้างสปอร์ และการสร้างแคปซูล ใช้ในการจัดจำแนกเบื้องต้นในระดับจิ้นัส

การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบ saprophytic coryneform bacteria จำเป็นต้องใช้การสังเกตในหลายช่วงเวลา เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถมีการเปลี่ยนแปลงได้ตลอดการเจริญ เช่น nocardioform bacteria บางชนิดพบการสร้างไมซีเลียมด้วย ปัจจัยที่สำคัญต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปัจจัยหนึ่งคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนิยมใช้อาหาร EYGA (ประกอบด้วย กลูโคส วิตามิน B12 yeast extract และแร่ธาตุต่างๆ) ในการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ saprophytic coryneform bacteria (Keddie and Jones, 1981)

1.1.2 Staining reaction การติดสีแกรมบวก แกรมลบ และ acid-fast ใช้สำหรับการจำแนกในระดับ division

1.2 Growth and Nutritional characteristics

ลักษณะที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในอาหารแข็ง และอาหารเหลว ลักษณะของโคโลนี การสร้างเม็ดสี และแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รูปแบบของกระบวนการเมทาบอลิซึม เช่น autotroph, heterotroph, fermentative และ respiratory เป็นต้น ใช้สำหรับจำแนกข้อแตกต่างในระดับจิ้นัส และสปีชีส์

1.3 Physiological characteristics

ช่วงอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ความต้องการออกซิเจน ความต้องการเกลือ การทนต่อแรงดันออสโมติก ความไว และการทนต่อสารปฏิชีวนะใช้สำหรับจำแนกข้อแตกต่างในระดับจิ้นัส และสปีชีส์

1.4 Biochemical characteristics

ส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ โมเลกุลของ RNA ไรโบโซม เม็ดสี แอนติเจน การทดสอบทางชีวเคมี ใช้สำหรับจำแนกข้อแตกต่างในระดับจีโนส และสปีชีส์

การตรวจสอบองค์ประกอบของผนังเซลล์สามารถตรวจสอบได้โดย การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall analysis) โดยการวิเคราะห์ใช้โครมาโตกราฟี และการวิเคราะห์กรดไมโครลิก (mycolic acid analysis) ซึ่งกรดไมโครลิกจะพบเฉพาะในกลุ่ม coryneform bacteria ที่มีผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-diaminopimelic acid น้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตส โดยการวิเคราะห์ใช้ TLC (Keddie and Jones, 1981)

1.5 Serological characteristics

ลักษณะเกี่ยวกับปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรีย เช่น slide agglutination และ fluorescent-labeled antibodies ใช้สำหรับจำแนกข้อแตกต่างในระดับสายพันธุ์ และบางสปีชีส์ได้

1.6 Phage typing

ฟาจของแบคทีเรีย (bacteriophage) มีคุณสมบัติจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด สามารถมาใช้ในการระบุ และจำแนกข้อแตกต่างในระดับสายพันธุ์ได้

สำหรับฟาจในแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิก เช่น ฟาจ *Brev.Ap.* จำเพาะต่อ *Brevibacterium lactofermentum* 2256 ฟาจบางชนิดจำเพาะต่อแบคทีเรียที่หลากหลาย เช่น ฟาจ *Brev. P-4* จำเพาะต่อ *Brevibacterium lactofermentum* 2256 และ *Brevibacterium flavum* 2247 เป็นต้น (Hongo *et al.*, 1972)

2. Molecular based classification (Ingraham and Ingraham, 2000)

การศึกษาแบคทีเรียในระดับโมเลกุลเพื่อหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆเช่น

2.1 % G+C content

ภายในดีเอ็นเอจะมีการจับคู่ของ nitrogenous base (G คู่กับ C และ A คู่กับ T) จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของดีเอ็นเอเหล่านั้นๆ การตรวจสอบการจับคู่ของ G-C จะใช้โมเลกุลของ G+C ดังนั้นถ้า %G+C ในดีเอ็นเอเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีการจับคู่ของ G กับ C 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 60 เปอร์เซ็นต์เป็นการจับคู่ของ A กับ T

% G+C จะมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพเพราะ G และ C จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ (A และ T จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ) % G+C สูงหมายความว่า ดีเอ็นเอ 2 สายจะจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่มาก ทำให้สายดีเอ็นเอจับกันแน่นมากขึ้นยากต่อการแยก โดยความร้อน มีผลให้ค่า T_m (อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน) สูงขึ้น การตรวจสอบ % G+C สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันจะมีค่า % G+C เหมือนกัน แต่อย่างไรก็ตาม % G+C ที่เท่ากันไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่า สิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดมีความใกล้ชิดกัน เพราะ % G+C ไม่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในการ code DNA เช่น คน และ *B. subtilis* มี % G+C ใกล้เคียงกัน จึงมีวิธีการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธีอื่น เช่น DNA hybridization

2.2 DNA-DNA hybridization

ใช้หลักการการจับคู่ของสายดีเอ็นเอชั้นแรก ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว จากนั้นทำให้เย็นลง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง 2 สายจะกลับมาจับคู่กันอีกครั้ง เมื่อมีสายดีเอ็นเอจากแหล่งต่างๆผสมกัน การจับคู่จะจับในตำแหน่งที่มีความเหมือนกัน (hybrid molecule) ดังนั้นปริมาณการจับคู่ของสายดีเอ็นเอจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความเหมือนของ sequence ในสายดีเอ็นเอจากแหล่ง 2 แหล่ง แต่วิธี DNA hybridization ก็มีข้อจำกัด เช่น การทำ DNA hybridization เปรียบเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิต 2 สิ่งมีชีวิต บอกได้ว่า สิ่งมีชีวิตหนึ่งมีความใกล้ชิดกับอีกหนึ่งอย่างไร แต่การตรวจสอบความใกล้เคียงกันของกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจะต้องทำ DNA hybridization เป็นจำนวนมาก

2.3 Sequence of base in DNA

การเปรียบเทียบลำดับเบสจากดีเอ็นเอเป็นวิธีทาง taxonomy ที่คิดว่าดีที่สุดในจำนวนเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีจำนวนมาก (ใน *E. coli* มี 4.5 ล้านเบส และคนมี 3 พันล้านเบส) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีการหาลำดับเบสจากยีน rRNA และลำดับเบสจากยีนที่ code ให้โปรตีนแทน

2.3.1 Ribosomal RNA genes นักวิทยาศาสตร์ต้องการหาลำดับเบสของ RNA ที่จำเพาะเจาะจง ในชนิดของ RNA ทั้งสามชนิด นักวิทยาศาสตร์สนใจการหาลำดับเบสจาก ribosomal RNA (rRNA) ในไรโบโซมซึ่งมีหลายชนิด โดย rRNA ที่นิยมใช้ คือ Small subunit ribosomal RNA (ssu rRNA) การหาลำดับเบสของ ssu rRNA เพื่อตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างสิ่งมีชีวิต มีพื้นฐานมาจากข้อสรุปที่ว่าสิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้เคียงกันมากพอที่จะมีดีเอ็นเอคล้ายกันมาก แต่ก็ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ในแบคทีเรียทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่ลำดับของนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก ซึ่งหมายความว่า แม้ว่าสิ่งมีชีวิตสองชนิดจะมีความใกล้เคียงกันน้อย และไม่ีดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่ก็ยังมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน rRNA คล้ายกัน

เหตุผลสำหรับการเลือก 16S rRNA มาใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีดังนี้

1. RNA จัดเป็นโมเลกุลที่มีมานานแล้ว
2. หน้าที่ของ RNA ไม่เปลี่ยนแปลง/คงที่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน
3. พบ RNA ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด
4. โมเลกุลของ 16S rRNA มีขนาดปานกลาง และมีความเหมาะสมในทางปฏิบัติ ส่วนข้อมูลที่ได้จาก 5S rRNA มีน้อยเกินไป (120 bp) และข้อมูลที่ได้จาก 23S rRNA มีมากพอ แต่ในทางปฏิบัติทำได้ยากกว่าการใช้ 16S rRNA
5. โมเลกุลมีส่วนของบริเวณ conserved และ variation ซึ่งทำให้เหมาะสมต่อการทำ alignment

ในปัจจุบันมีการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (Automated sequencer) โดยอาศัยหลักการ dideoxy chain terminating method ของ Sanger คือ การใช้สาร 2', 3' dideoxynucleotide (ddNTP) ที่มีการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์สีต่างกัน ซึ่งสาร ddNTP นี้มีปลาย 3' ที่ขาดหมู่ hydroxy ทำให้ DNA polymerase I ไม่สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อไปได้ เมื่อจบปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ขึ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่ได้จากปฏิกิริยานั้นจะมี

ขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับว่าจะหยุดการสังเคราะห์ที่เบสตัวใดในสายนั้น นอกจากนี้ซันดีเอ็นเอที่มีการหยุดสังเคราะห์ที่เบสแต่ละตัวจะมีสี่ฟลูออเรสเซนต์ที่ติดคลากแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อซันดีเอ็นเอสายสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมาที่เครื่องตรวจจับที่เป็นระบบเลเซอร์จะจับความยาวช่วงคลื่นของสีเรืองแสงแต่ละตัวที่เปล่งออกมา บันทึกผลที่ออกมาว่าซันดีเอ็นเอนั้นมีปลายเป็นเบสตัวใด และทำการตรวจจับซันถัดมาเรื่อยๆ เมื่อจบการทำอิเล็กโทรโฟริซิสก็สามารถอ่านข้อมูลของลำดับเบสได้ (Prescott *et al.*, 1999) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบลำดับเบส และแก้ไขให้ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม DNASIS V3.7 นำลำดับเบสในส่วนของ variable ความยาวประมาณ 550 เบสไปใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA จากฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn (Basic Local Alignment Search Tools) หรือ FASTA สำหรับฐานข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบ เช่น GenBank (จัดการโดย National Center for Biotechnology Information; USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) EMBL (จัดการโดย European Bioinformatics Institute; UK) และ DDBJ (จัดการโดย Center for Information Biology in Mishima; Japan) (<http://www.ddbi.nig.ac.jp/Welcome.html>) เป็นต้น (Saccone and Pesole, 2003) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับฐานข้อมูล เพื่อใช้ในการระบุสิ่งมีชีวิต ต้องมีลำดับเบสของ 16S rRNA ที่เหมือนกันมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ (ต่างกันน้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์) จึงจะสามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นได้ (Madigan *et al.*, 2003)

2.3.2 Protein-encoding genes การหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่ให้โปรตีน เพราะโปรตีนบางชนิด เช่น RNA polymerase และ proton-translocating ATPase เป็นต้น ทำหน้าที่เหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด การหาลำดับเบสจากยีนที่ให้โปรตีนสามารถให้ข้อมูลได้เช่นเดียวกับการหาลำดับเบสจาก rRNA

Place *et al.* (2003) ศึกษาคุณสมบัติของไอโซเลต 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากผิวหน้าของ ripened semi-hard cheeses โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี การทนต่อสารปฏิชีวนะ และการศึกษาทางด้านโมเลกุลโดยศึกษา % GC content การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนของเซลล์ การทำ DNA-DNA hybridization และการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA และ *hsp 60 gene* จากผลการศึกษาคุณสมบัติทั้งหมดพบว่า ทั้งสองไอโซเลตมีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *S. equorum*^T และ *S. xylosum* เป็นต้น จึงสรุปได้ว่าสามารถจัดจำแนกทั้งสองไอโซเลตเป็น subspecies ใหม่ใน genus *Staphylococcus* โดยให้ชื่อว่า *Staphylococcus subsp. linens*.

Navarro *et al.* (2004) ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ Rhizobia ที่ทำให้เกิดปมในพืช *Pachyrhizus* sp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยศึกษาความแตกต่างด้านฟีโนไทป์ เช่น การใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน การทนต่อสารปฏิชีวนะ การเกิดปมในพืช เป็นต้น การวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ด้วยวิธี SDS-PAGE การวิเคราะห์ lipopolysaccharide profile และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA (TP-RAPD) ใช้ primer คือ 859F และ 1522R ซึ่งจากผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดปมทั้งหมดมีความหลากหลายทางชีววิทยาสูง และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสจาก 16S rRNA และบริเวณ ITS พบว่าอยู่ใน genus *Bradyrhizobium*

Dixit *et al.* (2005) ศึกษาคุณสมบัติของไอโซเลต RKD ที่แยกได้จากลำไส้ปลาเน่า ซึ่งสามารถสร้างสารพิษโบทูลินัมได้ โดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนา มีรูปร่างแบบท่อน มีการสร้างสปอร์อยู่บริเวณค่อนไปทางปลายเซลล์ หรือปลายเซลล์ ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ pH 7 สามารถใช้แหล่งคาร์บอน และสามารถหมักน้ำตาลได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลไรโบส ราฟิโนส เป็นต้น สามารถทนสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น แอมพิซิลิน เพนนิซิลิน จี เป็นต้น พบ meso-DAP เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ มี phosphotidyl ethanolamine เป็นฟอสโฟลิปิดหลัก และสามารถสร้างสารพิษโบทูลินัมกลุ่มบีได้ ซึ่งมีสองสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษได้คือ *C. botulinum* และ *C. tetani* จากผลของการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี พบว่า ไอโซเลต RKD มีความแตกต่างจาก *C. botulinum* และ *C. tetani* แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่า ไอโซเลต RKD มีความใกล้เคียงกับ *Clostridium tetani* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์

เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบ และจัดจำแนกแบคทีเรีย

เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบ และจัดจำแนกแบคทีเรีย (Stackebrandt and Lang, 1998; Muyzer, 1999; Ranjard *et al.*, 2000) เช่น

1. Low Molecular Weight RNA fingerprinting เป็นเทคนิคที่ตรวจสอบทางตรง โดยสกัด RNA จากตัวอย่าง ซึ่งใช้ 5S rRNA และ tRNA และแยกโดยใช้ high-resolution polyarylamide gel

electrophoresis ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือ ไม่มีความผิดพลาดจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวน แต่ข้อมูลที่ได้จากวิธีนี้น้อยเนื่องจากใช้เพียง 5S rRNA (131 nucleotides) และ tRNA (96 nucleotides)

2. Restriction Endonuclease Analysis (REA) เป็นเทคนิคที่ใช้เปรียบเทียบรูปแบบของโครโมโซมที่สกัดได้แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกโดยใช้ electrophoresis แต่มีข้อเสียคือจะได้รูปแบบของโครโมโซมจำนวนมาก และอาจได้รูปแบบของพลาสมิดมาด้วย

Merrigan *et al.*(1999) ใช้วิธี Restriction endonuclease (REA) ในการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่ก่อโรคที่แยกได้จากโรงพยาบาลหลายแห่งในอเมริกาใต้ โดยการตัดดีเอ็นเอของไอโซเลตที่แยกได้ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบที่ได้จากการตัดกับข้อมูล REA group library ที่ได้จากอเมริกาเหนือ และยุโรป พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่มีรูปแบบการตัดตรงกับรูปแบบ REA group ที่ได้จากอเมริกาเหนือ และยุโรป

3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้แก้ไขเทคนิค REA โดยหลังจากตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว hybridize ด้วย probe ที่ติดฉลาก ทำให้จำนวนแถบที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยลง สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างได้

Mirhendi *et al.*(2005) ระบุและจำแนกความแตกต่างของยีสต์ *Malassezia* sp. สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี PCR-RFLP ในการเพิ่มจำนวนส่วนของ 26S rDNA และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *CfoI* และ *BstFI* ซึ่งสามารถระบุ และจำแนกความแตกต่างของทั้ง 11 สายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังสามารถระบุ และจำแนกความแตกต่างของ 13 clinical isolates ได้ด้วย โดยสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ ITS1 sequencing และเทคนิค PCR-RFLP นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการระบุสายพันธุ์ของ *Malassezia* sp. หรือใกล้เคียงได้

Waltenbury *et al.* (2005) ใช้วิธี Random amplification polymorphism DNA (RAPD) ในการหาความสัมพันธ์ของ *Anthiobacillus ferrooxidans* ที่แยกได้จาก acid mine drainage (AMD) 3 แหล่ง ทั้งสิ้น 12 สายพันธุ์ โดยใช้ primer สายสั้นๆ (10 นิวคลีโอไทด์) 20 ชนิดในการเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอ เปรียบเทียบรูปแบบของแถบที่เกิดขึ้น และความแตกต่างของรูปแบบที่เกิดขึ้นจากแต่ละ primer พบว่า มี primer 13 ชนิดที่ให้รูปแบบหลากหลาย การเปรียบเทียบรูปแบบแถบที่เกิดขึ้นจากวิธี RAPD อาศัยพื้นฐานของว่ามีหรือไม่มีแถบ สามารถเปรียบเทียบความหลากหลาย

ของสายพันธุ์โดยใช้ Jaccard's coefficient และ UPGMA ซึ่งแบ่ง *A. ferroxidans* ได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ เทคนิค PCR-RAPD เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และรวดเร็วในการหาความสัมพันธ์ของ *A. ferroxidans* ในแต่ละสายพันธุ์ได้

4. Terminal-RFLP (T-RFLP) เป็นเทคนิคที่ประยุกต์จากเทคนิค RFLP โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ส่วนปลายที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Rademaker *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อเริ่มต้นในการทำ smear ripened Tilsit cheeses ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยใช้วิธี T-RFLP ซึ่งติดฉลาก primer ด้วย FAM หลังจากทำการเพิ่มจำนวนแล้ว ชิ้นส่วนจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *CfoI* และการเปรียบเทียบผลของ T-RFLP อาศัยการเปรียบเทียบ peak ที่เกิดจาก electropherogram กับ standard พบว่า เทคนิค T-RFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความหลากหลายของเชื้อเริ่มต้นในการทำชีสได้ นอกจากนั้นยังสามารถจำแนกเชื้อที่เพิ่มมาจากสิ่งแวดล้อมซึ่งไม่พบจากวิธีการแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย

5. Ribotyping เป็นการ ใช้ rRNA-based probe สำหรับ RFLP จากลำดับเบสของ rRNA ที่พบในจุลินทรีย์

Suihko *et al.* (2005) ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง และสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงที่แยกได้จากกระบวนการย่อยกระดาษ โดยตรวจสอบคุณสมบัติทางพันธุกรรมด้วยวิธี ribotyping โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PvuII* ตัดจีโนมของแบคทีเรียแล้วถ่ายใส่ในลอนเมมเบรน ทำการ hybridization ด้วย DNA probe พบว่า ribotype ของแบคทีเรียชนิดเจริญที่อุณหภูมิปานกลางซึ่งอยู่ใน genus *Clostridium* สามารถจำแนกได้เป็น 20 ribotypes และ ribotype ของแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงซึ่งอยู่ใน genus *Thermoanaerobacterium* สามารถจำแนกได้ 18 ribotypes ซึ่งแสดงว่ามีความหลากหลายภายในจีนัสทั้งสอง และมีแนวโน้มที่จะพบสปีชีส์ใหม่ นอกจากนั้นสามารถนำเทคนิคนี้เป็นเครื่องมือในการจำแนกแบคทีเรีย Clostridia ได้

6. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และ Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) เทคนิค DGGE เป็นเทคนิคที่ใช้แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกัน แต่มี

ลำดับเบสต่างกัน ใช้การแยก amplicon บน polyacrylamide gel ที่มี linear gradient of DNA denaturing agent ส่วนเทคนิค TGGE เป็นเทคนิคที่ใช้ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ในการแยก

Clerck *et al.* (2004) ศึกษาคุณสมบัติทางโมเลกุลของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเจลาติน ซึ่งจะมีผลต่อความปลอดภัย และคุณภาพของเจลาติน จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่ปนเปื้อนเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างสปอร์ และการใช้วิธี DGGE ของการทำ PCR ในส่วนของ 16S rDNA บริเวณ V9 และ V6-V8 มีความเหมาะสมกว่าบริเวณ V1 หรือ V3 จากการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากแถบของ DGGE พบว่าแบคทีเรียอยู่ใน genus *Bacillus* และ genus *Brevibacillus* ซึ่งเทคนิค DGGE นี้เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเจลาติน แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้จะแยกได้เฉพาะแบคทีเรียที่เป็น dominant เท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการ enrichment ตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะก่อน

7. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) เป็นเทคนิคที่ใช้การเพิ่มจำนวนส่วนของ 16S ribosomal DNA โดยเทคนิค PCR หลังจากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนที่ถูกตัด ด้วย agarose gel electrophoresis ข้อดีของเทคนิคนี้คือ ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องการความชำนาญพิเศษ ข้อจำกัด คือ การเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการประยุกต์ใช้เทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรีย

การใช้เทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Ranjard *et al.*, 2000) และเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ และจัดจำแนกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในระดับจนถึงสปีชีส์ (Heyndrickx *et al.*, 1996; Alevs *et al.*, 2002) นอกจากนี้เทคนิค ARDRA ยังเป็นเทคนิคที่ง่าย และใช้เวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมง (Vanechoutte *et al.*, 1995) จึงสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย

Vaneechoutte *et al.* (1995) ทำการจำแนกแบคทีเรียที่เรียกอโรคโนใน genus *Corynebacterium* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *AluI*, *CfoI* และ *RsaI* สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ เช่น *C. accolens*, *C. afermentans* subsp. *afermentans*, *C. afermentans* subsp. *lipophilum*, *C. amycolatum*, *C. cystitidis*, *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. minutissimum*, *C. pilosum*, *C. urealyticum*, *C. renale*, *C. pseudotuberculosis*, *C. striatum* และ *C. xerosis* แต่บางสปีชีส์หรือบางสายพันธุ์ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ เช่น *C. pseudodiphtheriae* และ *C. propinquum*, *C. jeikelum* genomospecies A และ genomospecies C เป็นต้น

Heyndrickx *et al.* (1996) ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกใน genus *Bacillus* และ *Paenibacillus* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *HaeIII*, *DpnII*, *RsaI*, *BfaI* และ *Tru 9I* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ของ genus *Bacillus* ได้แก่ *B. circulans*, *B. subtilis* และ *B. lautus* และในระดับสปีชีส์ของ genus *Paenibacillus* ได้แก่ *P. azotofixans*, *P. durum*, *P. macerans*, *P. polymyxa* และ *P. validus* และทำการจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบใน genus *Alcaligenes* และ *Bordetella* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *HaeIII*, *HhaI*, *AluI*, *TaqI* และ *Bst UI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ของ genus *Alcaligenes* ได้แก่ *A. faecalis*, *A. piechaudii* และ *A. xylosoxidans* และการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับ subspecies ของ *A. xylosoxidans* คือ subsp. *denitrificans* และ subsp. *xylosoxidans* ได้ นอกจากนั้นการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดยังสามารถจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ของ genus *Bordetella* ได้แก่ *B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* และ *B. pertussis*

Jeanthon *et al.* (1999) ทำการจัดจำแนกเมทาโนเจนในกลุ่ม hyperthermophilic methanococci โดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *HaeIII*, *HhaI*, *BstUI* และ *MspI* สามารถจำแนกความแตกต่างของไอโซเลตที่แยกจากทะเลลึกได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 4 สปีชีส์ ยกเว้น *Methanococcus jannaschii* และ *Methanococcus fervens* ซึ่งสองสปีชีส์นี้สามารถจำแนกความแตกต่างได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *HhaI*, *BstUI* และ *MspI*

Ventura *et al.*, (2001) ทำการจำแนกแบคทีเรียใน genus *Bifidobacterium* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Sau3A* และ *BamHI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3A* สามารถจำแนกความแตกต่างของ *B. bifidum*, *B. breve*,

B. catenulatum, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum*, และ *B. pullorum* ยกเว้น *B. adolescentis* และ *B. coryneforme*, *B. animalis* และ *B. pseudocatenulatum* ซึ่งทั้ง 4 สปีชีส์นี้ สามารถจำแนกความแตกต่างได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แต่การตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของ *B. suis* และ *B. longum* ได้

Jang *et al.* (2002) ทำการจำแนกแบคทีเรียใน genus *Weissella* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Mn*II, *Mse*I และ *Bce*AI สามารถจำแนกความแตกต่างของ *Weissella* ทั้ง 10 สปีชีส์ได้ในระดับสปีชีส์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Mn*II สามารถจำแนกความแตกต่างของ *W. halotolerans* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ การตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I สามารถจำแนกความแตกต่างของ *W. hanii* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ และการตัดด้วยเอนไซม์ *Bce*AI สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 3 สปีชีส์ คือ *W. hellenica*, *W. paramesenteroides* และ *W. thailandensis* และรูปแบบจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Mn*II และ *Mse*I สามารถจำแนกความแตกต่างของ *W. confusa*, *W. minor*, *W. viridescens*, *W. kandleri* และ *W. kimchii* ได้

Alevs *et al.* (2002) ทำการจำแนกแบคทีเรียใน genus *Brevibacterium* ได้แก่ *B. linens*, *B. casei*, *B. iodium*, *B. epidermidis*, *B. vitarumen*, *B. liquefaciens* และ *B. lactofermentum* และ genus ใกล้เคียง คือ *C. glutamicum* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด ได้แก่ *Mbo*I, *Taq*I, *Nci*I และ *Sma*I สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในระดับจีโนมถึงสปีชีส์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo*I สามารถจำแนกความแตกต่างของ *B. liquefaciens* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ การตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I หรือ *Nci*I สามารถจำแนกความแตกต่างของ *B. vitarumen* และ *B. lactofermentum* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ และการตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I สามารถจำแนกความแตกต่างของ *B. lactofermentum* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ แต่การตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของบางสปีชีส์ได้ ได้แก่ *B. casei* และ *B. linens* genotype B, *B. iodium* และ *B. epidermidis*, *B. lactofermentum* และ *C. glutamicum*

Kurabachew *et al.* (2003) ได้ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacteria* จำนวน 13 สปีชีส์โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *Cfo*I, *Hae*III, *Rsa*I, *Msp*I และ *Taq*I สามารถจำแนกความแตกต่างได้ดังนี้ การตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG และ *M. africanum* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *M. tuberculosis*

complex ได้ และไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของ *M. tuberculosis* ได้ ส่วนอีก 9 สปีชีส์ ได้แก่ *M. fortuitum*, *M. avium intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. terae* และ *M. simiae* ซึ่งการตัดด้วยเอนไซม์ *CfoI* สามารถแยกความแตกต่างได้ทั้งหมด แต่การตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้เพียง 7 สปีชีส์ ยกเว้น *M. terae* และ *M. kansasii* การตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 7 สปีชีส์ ยกเว้น *M. fortuitum* และ *M. avium intracellulare* การตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 7 สปีชีส์ ยกเว้น *M. fortuitum* และ *M. scrofulaceum* และการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 7 สปีชีส์ ยกเว้น *M. fortuitum* และ *M. avium intracellulare*

Aquilanii *et al.* (2004) ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระใน family *Azotobacteraceae* ได้แก่ genus *Azomonas* และ genus *Azotobacter* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *RsaI*, *HhaI*, *HpaII*, *FnuDI* และ *AluI* สามารถจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียใน family นี้ได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HhaI* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ทั้ง 8 สปีชีส์ ได้แก่ *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *Azorhizophilus paspali*, *A. macrocytogenes*, *A. agilis* และ *A. insignis* การตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII* สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 6 สปีชีส์ ยกเว้น *A. chroococcum* และ *A. beijerinckii* การตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* สามารถจำแนกความแตกต่างของ *A. agilis* และ *A. insignis* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ การตัดด้วยเอนไซม์ *FnuDI* สามารถจำแนกความแตกต่างของ *A. armeniacus* และ *A. insignis* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ และการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* สามารถจำแนกความแตกต่างของ *A. armeniacus* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดยังสามารถจำแนกความแตกต่างของ genus อื่นๆ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ได้แก่ genus *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azorhizophilus*, *Sinorhizobium* และ *Rhizobium* ในระดับจีโนมถึงสปีชีส์ได้ ยกเว้น genus *Agrobacterium* ที่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับจีโนมเท่านั้น