

ตารางที่ 14 การเจริญของ *C. glutamicum* ที่แยกได้ในอาหารเหลว A2, OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิต่างๆ

Isolate	35°C			37°C			39°C			40°C			41°C			42°C			43°C			45°C		
	24h	48h	72h																					
B651	+++	+++	+++	++	++	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B677	+++	+++	+++	+	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B717	-	+	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C238	-	-	++	-	-	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C239	-	++	++	-	-	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C250	+++	+++	+++	++	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C251	+++	+++	+++	++	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C264	+++	+++	+++	++	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C271	+++	+++	+++	+	+	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C272	++	++	+++	+	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C291	+++	+++	+++	++	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C296	+++	+++	+++	++	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C301	+++	+++	+++	+++	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C304	+++	+++	+++	++	++	++	ND	ND	ND	-	+	+	ND	ND	ND	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BS6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BS13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	35°C			37°C			39°C			40°C			41°C			42°C			43°C			45°C		
	24h	48h	72h																					
C306	+	+	+	+	++	++	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C307	+	+++	+++	+	++	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS1	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS7	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS10	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS12	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS14	++	++	++	+	+	++	+	+	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS144	++	++	++	+	+	++	+	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS147	+	+	++	+	++	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS149	+	+	+++	+	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS155	+	+	++	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS162	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS168	+	++	++	+	+	+	+	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS176	+++	+++	+++	+	++	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS188	++	++	++	+	+	++	+	++	++	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS189	+	+	++	+	++	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS190	+	+	+	++	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 14 (ต่อ)

isolate	35°C			37°C			39°C			40°C			41°C			42°C			43°C			45°C		
	24h	48h	72h																					
CS191	+	++	+++	++	++	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS192	+	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DS3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DS7	+	+	+	+	+	++	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS204	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS254	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
CS255	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
CS274	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DS50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
KY 9002	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KY 9714	++	++	++	++	++	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: - = ไม่เจริญ, + = เจริญเล็กน้อย, ++ = เจริญปานกลาง, +++ = เจริญดี, ND = No determined

ตารางที่ 15 การเจริญของ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้ในอาหารเหลว A2 OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ

Isolate	35°C			37°C			39°C			40°C			41°C			42°C			43°C			45°C		
	24h	48h	72h																					
B717	-	+	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B89	++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B97	++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B101	++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS215	++	++	++	++	++	++	++	++	++	ND	ND	ND	+	++	++	++	++	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CS224	++	++	++	++	++	++	++	++	++	ND	ND	ND	+	++	++	++	++	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: - = ไม่เจริญ, + = เจริญเล็กน้อย, ++ = เจริญปานกลาง, +++ = เจริญดี, ND = No determined

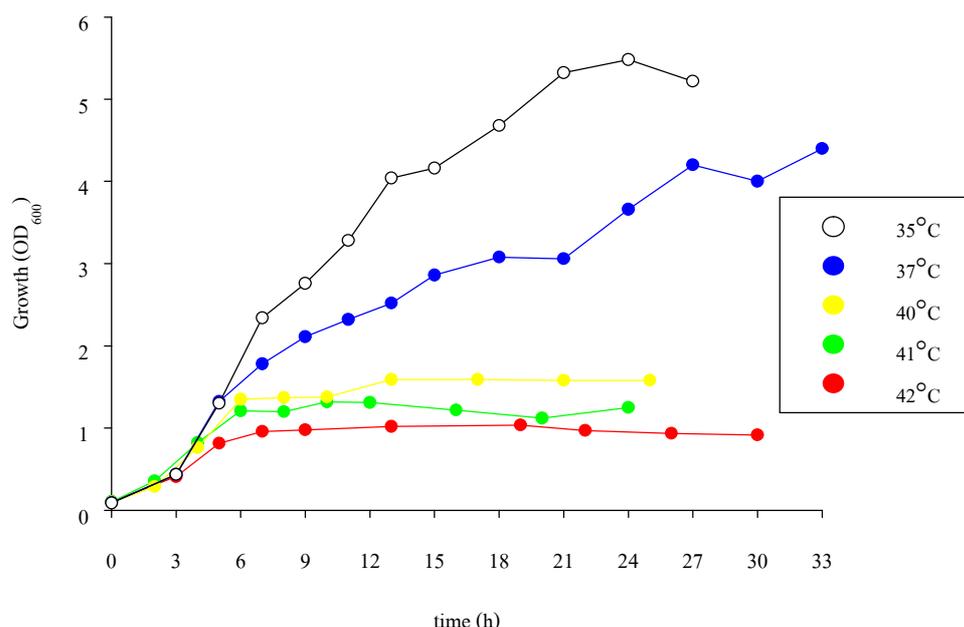
C. glutamicum C304, CS204, CS254, CS255, CS274 และ DS50 โดย *C. glutamicum* CS204 และ DS50 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด *C. glutamicum* C304 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด *C. glutamicum* CS254, CS255 และ CS274 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด ส่วน *C. ammoniagenes* มี 3 ไอโซเลต คือ B97, CS215 และ CS224 โดยทั้งหมดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกไอโซเลตที่เป็นสายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงรวมทั้งหมด 9 ไอโซเลต จึงนำทั้งหมดไปศึกษาคุณสมบัติด้านการเจริญและการสร้างกรดกลูตามิกต่อไป

4. การศึกษาคุณสมบัติทางด้านการเจริญ และการสร้างกรดกลูตามิกของแบคทีเรีย

Corynebacterium สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรีย *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง ด้วยการสังเกตการเจริญโดยเปรียบเทียบกับความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น ที่อุณหภูมิของการเจริญตั้งแต่ 35-45 องศาเซลเซียส สามารถคัดเลือก *C. glutamicum* ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ *C. glutamicum* C304, CS204, CS254, CS255, CS274 และ DS50 และ *C. ammoniagenes* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *C. ammoniagenes* B97, CS215 และ CS224 จึงนำไอโซเลตทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญของแต่ละไอโซเลต (ตั้งแต่ 40-43 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านการเจริญ และการสร้างกรดกลูตามิก โดยตรวจสอบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี paper chromatography (ภาคผนวก ข) วัตถุประสงค์ค่า Rf ของกรดกลูตามิก เท่ากับ 0.50 ซึ่งจากการทดลองทั้งหมด พบว่า ในอาหารเหลว A2 และชั่วโมงที่ 0 สามารถตรวจพบระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกได้เช่นกัน อาจเนื่องจากในอาหารเหลว A2 มี yeast extract ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอน และไนโตรเจนอยู่ด้วย (นงลักษณ์และปรีชา, 2544) ดังนั้นจึงให้ระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกที่พบในอาหารเหลว A2 นี้เป็นเกณฑ์เทียบ เพื่อตรวจสอบว่า ระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกในอาหารเพิ่มขึ้นหรือไม่ตลอดช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อ และทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกที่ชั่วโมงสุดท้าย (ระยะ stationary phase) ของการเลี้ยงเชื้อกับระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกมาตรฐาน 0.5 ไมโครกรัม เพื่อเปรียบเทียบว่า ที่ชั่วโมงสุดท้ายมีระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกในอาหารมากกว่า เท่ากับ หรือน้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม

การเจริญของ *C. glutamicum* C304 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 ที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส ผลแสดงดังภาพที่ 12 พบว่า C304 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.54 ต่อชั่วโมง และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุด (OD_{600max}) เท่ากับ 5.48 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง การเจริญได้ช้ารองลงมา คือ ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.53 ต่อชั่วโมง และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุด (OD_{600max}) เท่ากับ 4.40 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 33 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่ามีการเจริญลดลง คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่า μ เท่ากับ 0.45 ต่อชั่วโมง ค่า OD_{600max} เท่ากับ 1.59 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 13 ชั่วโมง การเจริญที่ 41 องศาเซลเซียส มีค่า μ เท่ากับ 0.41 ต่อชั่วโมง ค่า OD_{600max} เท่ากับ 1.32 ที่ 10 ชั่วโมง และการเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส มีค่า μ เท่ากับ 0.33 ต่อชั่วโมง ค่า OD_{600max} เท่ากับ 1.04 ที่ 19 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 การเจริญของ *C. glutamicum* C304 ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เหย้าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการตรวจสอบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเจริญที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส ของ *C. glutamicum* C304 ดังภาพที่ 13 พบว่า การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่สามารถตรวจพบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จากการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเริ่มตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 21 ซึ่งเป็นระยะ log