ตารางที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้กับสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ (KY9002 และ KY9714) ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

C. glutamicum		อุณหภูมิการเจริญ (องศาเซลเซียส)					
		35	37	40	41	42	43
C304	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.54	0.53	0.45	0.41	0.33	ND
	OD_{600}max*	5.48 (24)	4.40 (33)	1.59 (13)	1.32 (10)	1.04 (19)	ND
CS204	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.54	0.54	0.40	0.39	ND	ND
	OD_{600}max *	15.03 (40)	11.84 (36)	3.04 (35)	1.35 (16)	ND	ND
CS254	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.63	0.59	0.54	0.50	0.35	0.28
	OD_{600}max *	9.94 (40)	9.64 (33)	4.54 (19)	2.70 (16)	1.14 (10)	0.68 (7)
CS255	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.46	0.53	0.45	0.43	0.37	0.27
	OD_{600}max*	6.68 (24)	8.82 (27)	2.33 (15)	2.18 (10)	1.52 (13)	0.82 (9)
CS274	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.64	0.65	0.55	0.49	0.39	0.27
	OD_{600}max*	10.18 (30)	9.62 (36)	4.42 (19)	2.16 (12)	1.37 (9)	0.56 (7)
DS50	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.60	0.64	0.52	0.48	0.24	ND
	OD_{600}max *	12.24 (24)	12.96 (18)	4.56 (15)	2.91 (10)	0.98 (17)	ND
KY9002 (Wild Type)	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.55	0.53	0.40	0.38	0.22	-
	OD_{600}max*	11.58 (18)	11.82 (18)	4.15 (23)	1.55 (16)	1 (17)	-
KY9714 (temperature-	Specific growth rate (μ_{max},h^{-1})	0.16	0.19	-	-	-	ND
Sensitive mutant)	OD_{600}max *	2.22 (21)	1.84 (21)	-	-	-	ND

หมายเหตุ: * = OD_{600} unit, ND = ไม่ได้ทำการทดลอง, - = ไม่พบการเจริญ, (ตัวเลข) = ระยะเวลาการเจริญ (ชั่วโมง) ที่ให้ค่าความขุ่นสูงสุด (OD_{600}max)

ชั่วโมง) สำหรับการเจริญของ DS50 ที่อุณหภูมิ 40 และ 41 องศาเซลเซียส (ค่า μ เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 4.56 ที่ 15 ชั่วโมงและ 2.91 ที่ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ) ดีกว่าการเจริญของ KY9002 (ค่า μ เท่ากับ 0.40 และ 0.38 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 4.15 ที่ 23 ชั่วโมงและ 1.55 ที่ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ)

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของแต่ละไอโซเลตกับ KY9714 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูตามิค เนื่องจากเป็นสายพันธุ์กลายที่ถูกพัฒนาให้สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้สูง โดยมีคุณสมบัติที่ไวต่ออุณหภูมิ (temperature-sensitive mutant) (Hirasawa *et al*., 2000) พบว่า การเจริญของทุกไอโซเลตดีกว่าการเจริญของ KY9714 โดยที่ KY9714 สามารถเจริญได้ดีที่ 35 องศาเซลเซียส (ค่า μ เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.22 ที่ 21 ชั่วโมง) และเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด (ค่า μ เท่ากับ 0.19 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 1.84 ที่ 21 ชั่วโมง)

สำหรับผลการเจริญของ *C. ammoniagenes* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ B97, CS215 และ CS224 ที่อุณหภูมิ 30 ถึงอุณหภูมิสูงสุดของแต่ละไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 17 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของทั้งสามไอโซเลต คือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่ง Jones and Collins รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *C. ammoniagenes* คือ ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แต่ก็พบการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียสได้ด้วย เมื่อศึกษาการเจริญของทั้ง 3 ไอโซเลตที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเจริญที่ลดลง แต่ก็ยังสามารถเจริญได้ แสดงให้เห็นว่าทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant) เช่นกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญของ CS215 และ CS224 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด คือ 41 องศาเซลเซียส และ B97 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด คือ 42 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสของทั้งสามไอโซเลต พบว่า CS215 มีการเจริญได้พอๆกับ B97 โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.13 และ 0.22 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.30 และ 2.12 ที่ 33 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน CS224 มีค่า μ เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 1.17 ที่ 30 ชั่วโมง

ตารางที่ 17 การเจริญของ *C. ammoniagenes* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้จำนวน 3 ไอโซเลต ในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

C. ammoniagenes		อุณหภูมิการเจริญ (องศาเซลเซียส)					
		30	35	37	40	41	42
B97	Specific growth rate(μ, h^{-1})	0.22	0.46	0.48	0.46	0.29	0.27
	OD_{600}max*	2.12 (33)	2.68 (26)	1.92 (13)	2.29 (11)	2.57 (18)	2.19 (16)
CS215	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.13	0.39	0.33	0.20	0.19	-
	OD_{600}max*	2.29 (33)	3.65 (26)	3.81 (23)	1.38 (18)	0.70 (13)	-
CS224	Specific growth rate (μ, h^{-1})	0.16	0.35	0.33	0.25	0.23	-
	OD_{600}max*	1.17 (30)	2.97 (10)	2.12 (13)	0.75 (13)	0.50 (11)	-

หมายเหตุ: * = OD_{600} unit, ND = ไม่ได้ทำการทดลอง, - = ไม่พบการเจริญ, (ตัวเลข) = ระยะเวลาการเจริญ (ชั่วโมง) ที่ให้ค่าความขุ่นสูงสุด (OD_{600}max)

เมื่อพิจารณาการเจริญที่อุณหภูมิที่มีการเจริญดี คือ 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า CS215 มีการเจริญได้ดีกว่า CS224 และ B97 โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.39 และ 0.33 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 3.65 ที่ 26 ชั่วโมง และ 3.81 ที่ 23 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน CS224 มีค่า μ เท่ากับ 0.35 และ 0.33 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.97 ที่ 10 ชั่วโมง และ 2.12 ที่ 13 ชั่วโมง ตามลำดับ และ B97 มีค่า μ เท่ากับ 0.46 และ 0.48 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.68 ที่ 26 ชั่วโมง และ 1.92 ที่ 13 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเจริญที่อุณหภูมิสูง ที่ 40-41 องศาเซลเซียส พบว่า B97 มีการเจริญได้ดีกว่า CS215 และ CS224 โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.46 และ 0.29 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.29 ที่ 16 ชั่วโมง และ 2.57 ที่ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน CS215 มีค่า μ เท่ากับ 0.20 และ 0.19 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 1.38 ที่ 18 ชั่วโมง และ 0.70 ที่ 13 ชั่วโมง ตามลำดับ และ CS224 มีค่า μ เท่ากับ 0.25 และ 0.23 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 0.75 ที่ 13 ชั่วโมงและ 0.50 ที่ 11 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พบว่า มีเพียง B97 เท่านั้นที่มีการเจริญ โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.27 ต่อชั่วโมง และค่า OD_{600}max เท่ากับ 2.19 ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 16 ชั่วโมง ส่วน CS215 และ CS224 ไม่พบการเจริญ (ค่า OD_{600}max เท่ากับ 0.39 ที่ 14 ชั่วโมง และ 0.37 ที่ 11 ชั่วโมง ตามลำดับ)

ผลการตรวจสอบกรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยตรวจระดับความเข้มของ spot ของกรดกลูตามิคเทียบกับ spot ของกรดกลูตามิคมาตรฐาน 0.5 ไมโครกรัม แสดงดังตารางที่ 18 สรุปได้ว่า ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่มากที่สุดที่ตรวจพบจากการเจริญของแต่ละไอโซเลตต่างกัน จากการเจริญที่อุณหภูมิที่ต่างกัน ดังนี้ ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบจากการเจริญของ C304 ที่ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบจากการเจริญของ CS204 ที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบจากการเจริญของ CS254, CS255 และ CS274 ที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม และระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบจากการเจริญของ DS50 ที่ 40-42 องศาเซลเซียส มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม แต่รายงานส่วนมาก

ตารางที่ 18 ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคบน paper chromatogram ของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

C. glutamicum	ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ)					
	35°C	37°C	40°C	41°C	42°C	43°C
C304	-	++(33)	-	-	-	ND
CS204	++(40)	++(36)	+(35)	-	ND	ND
CS254	+(40)	+++(30)	+++(24)	++(24)	+(24)	+(23)
CS255	+(27)	+++(36)	+++(24)	++(24)	++(30)	++(23)
CS274	+(33)	+++(36)	+++(24)	++(24)	++(30)	++(23)
DS50	+(27)	+(27)	+++(24)	+++(24)	+++(23)	ND
KY9002	+(27)	++(27)	++(31)	-	-	-
KY9714 (lysozyme-sensitive mutant)	+++(27)	++(27)	-	-	-	ND

หมายเหตุ: ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบระดับความเข้มกับกรดกลูตามิคมาตรฐาน 0.5 ไมโครกรัม, - = ตรวจไม่พบกรดกลูตามิค, + = ความเข้มของกรดกลูตามิคน้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม, ++ = ความเข้มของกรดกลูตามิคเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม, +++ = ความเข้มของกรดกลูตามิคมากกว่า 0.5 ไมโครกรัม, ND = ไม่ได้ทำการทดลอง

รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูตามิค คือ 30-35 องศาเซลเซียส (Kinoshita and Tanaka, 1972) และรายงานของ Jyothi *et al*. (2005) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูตามิคจากแบคทีเรีย *Brevibacterium divaricatum* MTCC 1529 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนที่เหลือจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตกรดกลูตามิคได้สูงที่สุด (3.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ อุณหภูมิ 20, 40 และ 10 องศาเซลเซียส โดยผลิตได้ 2.05, 1.99 และ 1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มกรดกลูตามิคจากการเจริญของทั้ง 6 ไอโซเลต กับ KY9714 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิค พบว่าที่ 35 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจาก KY9714 (มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม) มากกว่าระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากทุกไอโซเลต เนื่องจาก KY9714 เป็นสายพันธุ์กลายที่มีโครงสร้างของผนังเซลล์บาง จึงมีคุณสมบัติไวต่ออุณหภูมิและไลโซไซม (Hirasawa *et al*., 2000) มีผลให้กรดกลูตามิคถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ง่ายกว่าเซลล์ปกติ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เท่ากับ 37 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญของ KY9714 พบว่า ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ KY9714 ลดลง (น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม) และไม่พบกรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่มีการเจริญ

เมื่อพิจารณาระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบจากการเจริญที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ พบว่า ที่ 35 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ CS204 เพียงไอโซเลตเดียว (เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม) ที่เข้มมากกว่าระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ KY9002 (น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม) และที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ CS254, CS255 และ CS274 (มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม) เข้มมากกว่าระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ KY9002 (เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม) ส่วนไอโซเลตที่เหลือมีระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ KY9002 และเมื่อพิจารณาระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่อุณหภูมิสูง พบว่า ที่ 40 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ CS254, CS255, CS274 และ DS50 มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม และมากกว่าระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ KY9002 (เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม) และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส มีเพียงสี่ไอโซเลตนี้เท่านั้นที่ยังตรวจพบกรดกลูตามิคจากการเจริญ แม้ว่าระดับความเข้มของกรด

กลูตามิคจากสามไอโซเลต คือ CS254, CS255 และ CS274 จะลดลงก็ตาม ส่วนระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญของ DS50 พบว่า เท่าเดิม คือ มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม เมื่อพิจารณาระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียสของ CS254, CS255 และ CS274 รวมทั้ง KY9002 พบว่า ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่ทั้งสองอุณหภูมิเท่ากัน (สำหรับระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจาก CS254, CS255 และ CS274 มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม และระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจาก KY9002 เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม) แต่การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส (ค่า OD_{600} ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.64, 8.40, 9.62 และ 10.11 ตามลำดับ) มากกว่าที่ 40 องศาเซลเซียส (เท่ากับ 4.29, 2.16, 3.97 และ 3.83 ตามลำดับ) ประมาณสองถึงสี่เท่า และเมื่อพิจารณาระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียสกับที่อุณหภูมิสูง (40-42 องศาเซลเซียส) ของ DS50 พบว่า ระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส (น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัม) น้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม) แต่การเจริญที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส (ค่า OD_{600} ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 12.15 และ 12.33 ตามลำดับ) มากกว่าที่อุณหภูมิสูง (เท่ากับ 4.29, 2.54 และ 0.74 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้น มีผลต่อการปลดปล่อยกรดกลูตามิคของ CS254, CS255, CS274 และ DS50 รวมทั้ง KY9002 ถึงแม้ว่า การเจริญในอุณหภูมิสูงจะลดลงก็ตาม หรือที่อุณหภูมิสูง เซลล์มีการเจริญได้ไม่ดี มีจำนวนเซลล์ที่ตายมาก ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มของกรดกลูตามิคที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากเซลล์ที่ตายแล้วซึ่งมีสภาพทางสรีรวิทยาของผนังเซลล์ที่เปลี่ยนไป ทำให้กรดกลูตามิคภายในเซลล์เหล่านั้นปลดปล่อยออกมาได้ง่ายกว่า

ส่วนผลการตรวจสอบกรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *C. ammoniagenes* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ เมื่อเจริญในอาหารเหลว A2 pH เริ่มต้น 7.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า จากการทดลองไม่พบกรดกลูตามิคในทุกอุณหภูมิของการเจริญ ซึ่งเคยมีรายงานว่า สปีชีส์นี้สามารถผลิตกรดกลูตามิคได้ (Abe and Takayama., 1972) อาจเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่เหมาะสมสำหรับการปลดปล่อยกรดกลูตามิคของสปีชีส์นี้ เพราะการปลดปล่อยกรดกลูตามิคต้องอาศัยปัจจัยที่เหมาะสมหลายประการร่วมกัน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ pH อุณหภูมิ เป็นต้น (Kinoshita and Tanaka., 1972; Crueger and Crueger, 1990)

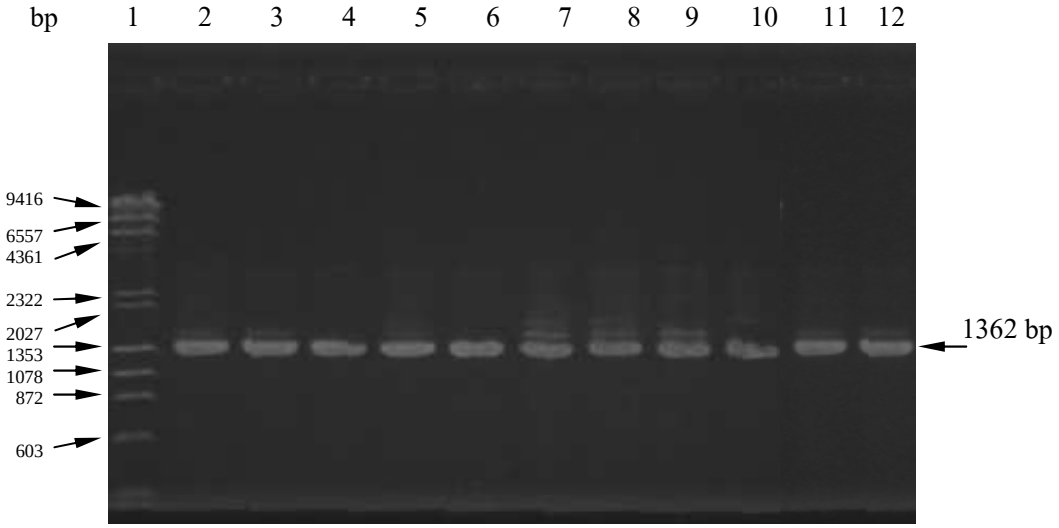
นอกจากในการทดลองนี้จะตรวจพบ spot ของกรดกลูตามิคแล้ว ยังตรวจพบ spot ของกรดอะมิโนชนิดอื่นอีกด้วย เมื่อวัดค่า Rf ของ spot ดังกล่าว พบว่า ค่า Rf เท่ากับ 0.57 ซึ่งมีค่า

ใกล้เคียงกับค่า Rf ของกรดอะมิโนอะลานีน สอดคล้องกับรายงานของ Kinoshita and Tanaka. (1972) ว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. glutamicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไบโอตินในปริมาณสูง (25 ไมโครกรัมต่อลิตร) จะมีผลให้พบอะลานีนในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่ากรดกลูตามิค แต่ภายในเซลล์จะพบปริมาณกรดกลูตามิคมากกว่าอะลานีน

สรุปผลการศึกษาคุณสมบัติทางด้านการเจริญและการสร้างกรดกลูตามิคของ *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลต คือ *C. glutamicum* C304, CS204, CS254, CS255, CS274 และ DS50 และ *C. ammoniagenes* B97, CS215 และ CS224 พบว่าไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านการเจริญ คือ *C. glutamicum* CS254, CS255 และ CS274 โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงสุด (ค่า μ เท่ากับ 0.28, 0.27 และ 0.27 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และค่า OD_{600}max เท่ากับ 0.68 ที่ 7 ชั่วโมง, 0.82 ที่ 9 ชั่วโมงและ 0.56 ที่ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ) และไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านการสร้างกรดกลูตามิค คือ *C. glutamicum* DS50 โดยตรวจพบระดับความเข้มของกรดกลูตามิคจากการเจริญมากกว่า 0.5 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส สำหรับการเจริญของ *C. ammoniagenes* พบว่า *C. ammoniagenes* B97 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุดเท่ากับ 42 องศาเซลเซียส ส่วนการสร้างกรดกลูตามิคของ *C. ammoniagenes* ทั้ง 3 ไอโซเลตไม่พบกรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเจริญ

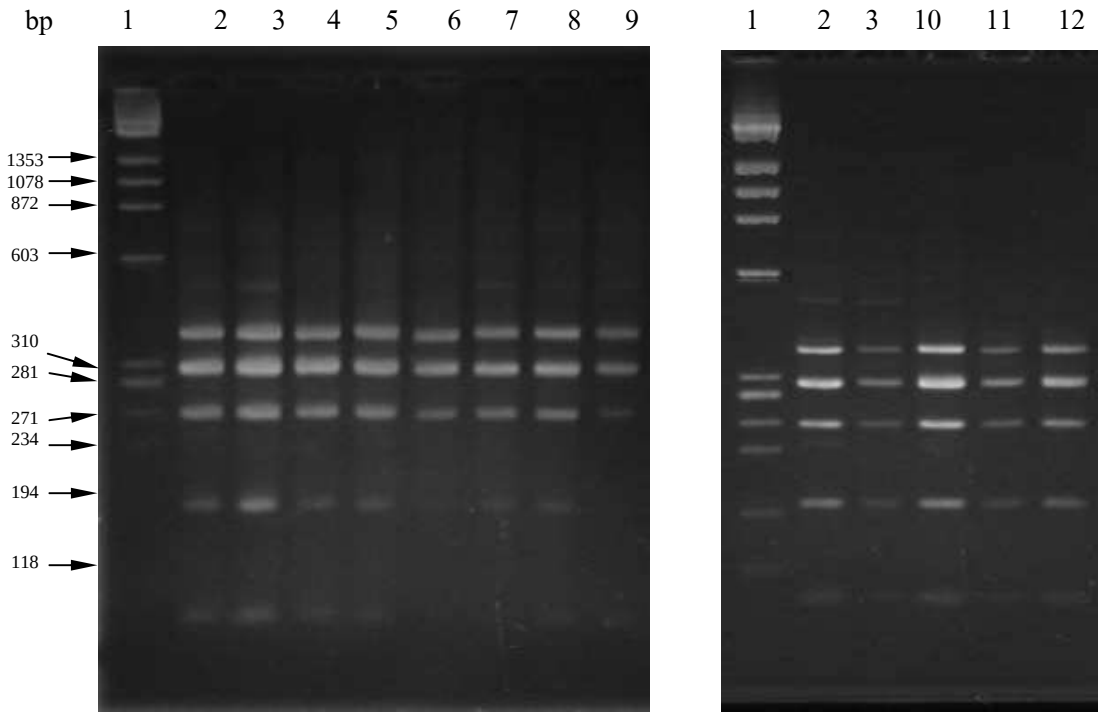
5. <u>ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิค</u>

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) ในการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคที่แยกได้ทั้งสองสปีชีส์ โดยในการทดลองนี้ใช้ *C. glutamicum* จำนวน 6 ไอโซเลต คือ C304, CS204, CS254, CS255, CS274, DS50 และ *C. ammoniagenes* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ B97, CS215 และ CS224 รวมทั้งสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ คือ *C. glutamicum* KY9002 และ KY9714 (temperature-sensitive mutant) ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ นำมาเพิ่มจำนวนส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC TCAG-3') และ 1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาด 1362 bp ดังภาพที่ 35



ภาพที่ 35 PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA บน agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ เลนที่ 1: λ*Hind*III +ϕX174 *Hae*III marker; เลนที่ 2: *C. glutamicum* KY9002; เลนที่ 3: *C. glutamicum* KY9714; เลนที่ 4: *C. glutamicum* CS254; เลนที่ 5: *C. glutamicum* CS255; เลนที่ 6: *C. glutamicum* CS274; เลนที่ 7: *C. glutamicum* DS50; เลนที่ 8: *C. glutamicum* CS204; เลนที่ 9: *C. glutamicum* C304; เลนที่ 10: *C. ammoniagenes* B97; เลนที่ 11: *C. ammoniagenes* CS215; เลนที่ 12: *C. ammoniagenes* CS224

PCR product ที่ได้นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hha*I (GCG/C) และ *Hae*III (GG/CC) ซึ่งเป็นชนิดที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของ 16S rDNA จากผลการทดลอง พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I ของ *C. glutamicum* รวมทั้งสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ (KY9002 และ KY9714) (ภาพที่ 36 (A)) ไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. ammoniagenes* (ภาพที่ 36 (B) เลนที่ 10-12) และเมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสปีชีส์ (*C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes*) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน โดยแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ของทั้งสองสปีชีส์มีจำนวน 5 แถบ และมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวเท่ากัน ดังนี้ แถบของดีเอ็นเอที่มีความยาวน้อยกว่า 118 bp จำนวน 1แถบ มีความยาวอยู่ในช่วง 194-234 bp จำนวน 1 แถบ มีความยาวประมาณ 271 bp จำนวน 1 แถบ มีความยาวอยู่ในช่วง 281-310 bp จำนวน 1 แถบ และมีความยาวอยู่ในช่วง 310-603 bp

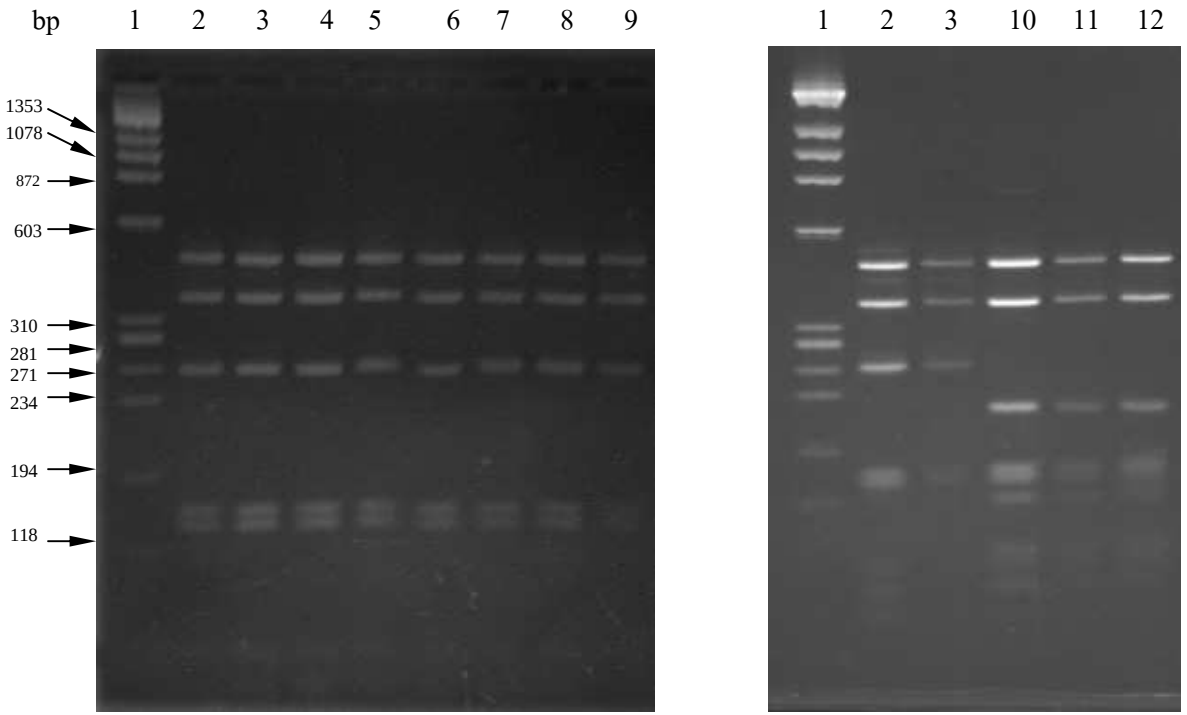


ภาพที่ 36 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Hha*I ของ *C. glutamicum* (A) และ *C. ammoniagenes* (B) บน agarose gel 3 เปอร์เซ็นต์ เลนที่ 1: λ*Hind*III +ϕX174 *Hae*III marker; เลนที่ 2: *C. glutamicum* KY9002; เลนที่ 3: *C. glutamicum* KY9714; เลนที่ 4: *C. glutamicum* CS254; เลนที่ 5: *C. glutamicum* CS255; เลนที่ 6: *C. glutamicum* CS274; เลนที่ 7: *C. glutamicum* DS50; เลนที่ 8: *C. glutamicum* CS204; เลนที่ 9: *C. glutamicum* C304; เลนที่ 10: *C. ammoniagenes* B97; เลนที่ 11: *C. ammoniagenes* CS215; เลนที่ 12: *C. ammoniagenes* CS224

จำนวน 1 แถบจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ของทั้งสองสปีชีส์ที่ไม่มีความแตกต่างกันนี้ สามารถสรุปได้ว่า การตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้

เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III ของ *C. glutamicum* รวมทั้งสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ (KY9002 และ KY9714) (ภาพที่ 37 (A)) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. ammoniagenes* (ภาพที่ 37 (B) เลนที่ 10-12) แต่เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองสปีชีส์ (*C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes*) พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. ammoniagenes* มีแถบของดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ มี polymorphism มากกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. glutamicum* ที่มีจำนวน 5 แถบ โดยแถบของดีเอ็นเอของทั้งสองสปีชีส์ที่มีความยาวเท่ากัน มีจำนวน 4 แถบ คือ มีความยาวอยู่ในช่วง 118-194 bp จำนวน 2 แถบและมีความยาวอยู่ในช่วง 310-603 bp จำนวน 2 แถบ และแถบของดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกัน คือ แถบของดีเอ็นเอของ *C. ammoniagenes* มีความยาวอยู่ในช่วง 194-234 bp จำนวน 1 แถบ และมีความยาวอยู่ในช่วง 118-194 bp จำนวน 1 แถบ ส่วนแถบของดีเอ็นเอของ *C. glutamicum* มีความยาวประมาณ 271 bp จำนวน 1 แถบ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ของทั้งสองสปีชีส์ที่มีความแตกต่างกันนี้ สามารถสรุปได้ว่า การตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III สามารถจำแนกความแตกต่างของ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้

จากผลของการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ARDRA สามารถสรุปได้ว่า การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิค คือ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้ จึงสามารถนำไปเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจสอบ และจัดจำแนกแบคทีเรียทั้งสองสปีชีส์นี้ แต่อย่างไรก็ตามการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับที่ต่ำกว่าสปีชีส์ได้ ซึ่งการที่จะจำแนกความแตกต่างได้หรือไม่นั้น จำเป็นต้องอาศัยการเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมกับกลุ่มของแบคทีเรียนั้นๆ ด้วย (Heyndrickx *et al*., 1996; Ranjard *et al*., 2000)



ภาพที่ 37 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัด 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Hae*III ของ *C. glutamicum* (A) และ *C. ammoniagenes* (B) บน agarose gel 3 เปอร์เซ็นต์ เลนที่ 1: λ*Hind*III +ϕX174 *Hae*III marker; เลนที่ 2: *C. glutamicum* KY9002; เลนที่ 3: *C. glutamicum* KY9714; เลนที่ 4: *C. glutamicum* CS254; เลนที่ 5: *C. glutamicum* CS255; เลนที่ 6: *C. glutamicum* CS274; เลนที่ 7: *C. glutamicum* DS50; เลนที่ 8: *C. glutamicum* CS204; เลนที่ 9: *C. glutamicum* C304; เลนที่ 10: *C. ammoniagenes* B97; เลนที่ 11: *C. ammoniagenes* CS215; เลนที่ 12: *C. ammoniagenes* CS224