

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การแยกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกจากตัวอย่างดิน มูลสัตว์ปีก และมูลสัตว์ปีกปนดินในประเทศไทย โดยการ enrichment ในอาหารเหลว D2 ร่วมกับการเติมสาร nalidixic acid และ NaN_3 พบว่า ชนิดของตัวอย่างที่สามารถแยก *C. glutamicum* ได้มากที่สุด คือ มูลไก่ปนดิน คิดเป็น 44.6 เปอร์เซ็นต์ และ *C. ammoniagenes* แยกได้จากมูลนกมากที่สุด คิดเป็น 5.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาแหล่งเก็บตัวอย่างที่สามารถแยกทั้งสองสปีชีส์ได้มากที่สุด คือ ฟาร์มไก่หลวงสุวรรณวาท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และลักษณะตัวอย่างที่สามารถแยกทั้งสองสปีชีส์ได้ มีลักษณะแห้ง เป็นก้อน มีสีขาว เหลือง น้ำตาลจนถึงดำ มีเศษใบไม้ ขั้วเปลือกปน

เมื่อทำการคัดเลือกในขั้นแรก โดยใช้ลักษณะ และสีของโคโลนี พบว่า สามารถแยก ไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร สีครีม หรือสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้จำนวน 2,067 ไอโซเลต หลังจากนั้นคัดเลือกในขั้นที่สอง โดยใช้ลักษณะของเซลล์ และการติดสีแกรม คือ ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่แน่นอน ไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่รูปตัววี และเป็นกลุ่มเรียงตัวกันคล้ายรั้ว พบว่า ไอโซเลตที่มีลักษณะเซลล์ดังกล่าวมีจำนวน 695 โคโลนี เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี และวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่า สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิกได้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *C. glutamicum* จำนวน 41 ไอโซเลต คือ B651, B677, BS6, BS13, C238, C239, C250, C251, C264, C271, C272, C291, C296, C301, C304, C306, C307, CS1, CS7, CS10, CS12, CS14, CS144, CS147, CS149, CS155, CS162, CS168, CS176, CS188, CS189, CS190, CS191, CS192, CS204, CS254, CS255, CS274, DS3, DS7 และ DS50 (คิดเป็น 5.90 เปอร์เซ็นต์) และ *C. ammoniagenes* จำนวน 6 ไอโซเลต คือ B89, B97, B101, B717, CS215 และ CS224 (คิดเป็น 0.86 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้เทคนิค ARDRA ในการจำแนกความแตกต่างของ *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิกที่คัดแยกได้ทั้งสองสปีชีส์ คือ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ *HhaI* ของทั้งสองสปีชีส์ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วย

เอนไซม์ *HaeIII* มีความแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่า การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ของแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิก คือ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้ แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียทั้งสองสปีชีส์ พบว่า ลักษณะโคโลนีของทั้งสองสปีชีส์บนอาหารแข็ง A1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีคล้ายกัน โดยสีของ *C. glutamicum* มีสีเหลือง ส่วนสีของ *C. ammoniagenes* มีสีครีมเหลือง และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ขนาดเซลล์ของ *C. glutamicum* มีขนาดใหญ่กว่า *C. ammoniagenes* เล็กน้อย

จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถสรุปคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* แสดงดังตารางที่ 19 โดย *C. glutamicum* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH 6.0 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยเจลาติน เคซีน และเอสคูลิน สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ริดิวซ์ในเตรต สร้างกรดจากกลูโคส ฟรุกโตส แมนโนส และซูโครส ไม่สร้างกรดจากไซโลส แรมโนส กาแลกโตส แลคโตส ราฟิโนส และแป้ง และสมบัติทางชีวเคมีที่พบความหลากหลาย คือ การทดสอบ MR การสร้างกรดจากอะราบิโนส มอลโตส ซาลิซิน และเด็กทรีน สำหรับ *C. ammoniagenes* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH 6.0 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบ MR ให้ผลลบ สร้างกรดจากฟรุกโตส และแมนโนส ไม่สร้างกรดจากไซโลส แรมโนส อะราบิโนส แลคโตส ราฟิโนส ซาลิซิน และแป้ง และสมบัติทางชีวเคมีที่พบความหลากหลายได้ คือ การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การสร้างกรดจากกาแลกโตส มอลโตส ซูโครส และเด็กทรีน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปเพิ่มเติมในฐานข้อมูลให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เพื่อใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ทั้งสองได้

ตารางที่ 19 คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ *C. glutamicum* ATCC 13032^T และ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T

Characteristics	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T *	<i>C. glutamicum</i> จากการวิจัยครั้งนี้	<i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T *	<i>C. ammoniagenes</i> จากการวิจัยครั้งนี้
Hydrolysis of:				
Gelatin	-	-	-	-
Esculin	-	-	ND	-
Urease	+	+	+	v
Acid from:				
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	-	v	ND	-
Xylose	-	-	ND	-
Rhamnose	-	-	ND	-
Fructose	+	+	ND	+
Galactose	-	-	ND	v
Mannose	+	+	ND	+
Lactose	-	-	ND	-
Maltose	+	v	ND	v
Sucrose	+	+	ND	v
Raffinose	-	-	ND	-
Salicin	-	v	ND	-
Dextrin	-	v	ND	v
Starch	-	-	ND	-
Methyl red	+	v	ND	-
Casein digestion	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+
Growth:				
at pH 6.0	+	+	ND	+
at 45°C	-	-	ND	-
at 30% glucose	+	+	ND	+
Assimilation of:				
Lactic acid	+	+	ND	+
Succinic acid	+	+	ND	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก (positive), - = ให้ผลลบ (negative), v = variable character, ND = No data

ที่มา: * Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2 และ Fodou *et al*, 2002

ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรีย *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 9 ไอโซเลต แบ่งเป็น *C. glutamicum* จำนวน 6 ไอโซเลต คือ *C. glutamicum* C304, CS204, CS254, CS255, CS274 และ DS50 และ *C. ammoniagenes* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ *C. ammoniagenes* B97, CS215 และ CS224 โดยทุก

ไอโซเลตแยกได้จากมูลสัตว์ปีก หรือมูลสัตว์ปีกปนดิน และเกือบทั้งหมดแยกได้จากแหล่งเก็บตัวอย่างในกรุงเทพฯ สำหรับลักษณะของโคโลนีของทั้งสองสปีชีส์มีสีของโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยสีของ *C. glutamicum* มีสีเหลือง ส่วน *C. ammoniagenes* มีสีออกครีม หรือเหลืองครีม และนอกจากนั้น *C. glutamicum* มีขนาดของเซลล์ (0.8-1.1x1.7-2.2 ไมครอน) ใหญ่กว่า *C. ammoniagenes* (0.9x1.1-1.7 ไมครอน) เล็กน้อย รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 20 และ 21 นอกจากนี้ยังพบว่า มี *C. glutamicum* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง 4 ไอโซเลตที่มีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T ดังนี้ CS254, CS255 และ DS50 สร้างกรดจากซาลิซิน และ CS274 สร้างกรดจากซาลิซิน และไม่สร้างกรดจากมอลโตส ส่วน *C. ammoniagenes* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูง พบว่า มีเพียง B97 เท่านั้นที่แตกต่างจากอีก 2 ไอโซเลต โดยสร้างกรดจากซูโครส และมอลโตสได้

การศึกษาคุณสมบัติของการเจริญ และการสร้างกรดกลูตามิกของ *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ ทั้ง 9 ไอโซเลต ในอาหารเหลว A2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร pH เริ่มต้น 7.4 เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 35 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ในแต่ละไอโซเลต (ตั้งแต่ 41-43 องศาเซลเซียส) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของทุกไอโซเลต อยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิของการเจริญสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส มีการเจริญลดลง โดยไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านการเจริญ ได้แก่ *C. glutamicum* CS254, CS255 และ CS274 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด คือ 43 องศาเซลเซียส (ค่า μ เท่ากับ 0.28, 0.27 และ 0.27 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่า OD₆₀₀max เท่ากับ 0.68 ที่ 7 ชั่วโมง, 0.82 ที่ 9 ชั่วโมง และ 0.56 ที่ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ) สำหรับการเจริญของ *C. ammoniagenes* พบว่า *C. ammoniagenes* B97 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด คือ 42 องศาเซลเซียส (ค่า μ เท่ากับ 0.27 ต่อชั่วโมง และมีค่า OD₆₀₀max เท่ากับ 2.19 ที่ 16 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาการสร้างกรดกลูตามิก พบว่า แต่ละไอโซเลตสามารถตรวจพบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับที่ต่างกัน จากการเจริญที่อุณหภูมิที่ต่างกัน โดยส่วนใหญ่ตรวจพบได้มากที่สุดจากการเจริญที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิการเจริญสูงขึ้น ระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื่อน้อยลง ซึ่งไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านการสร้างกรดกลูตามิก คือ *C. glutamicum* DS50 โดยตรวจพบระดับความเข้มข้นของกรดกลูตามิกจากการเจริญที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส มากกว่า 0.5 ไมโครกรัม สำหรับ *C. ammoniagenes* ตรวจไม่พบกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 20 ชนิด แหล่งเก็บตัวอย่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่อนุกรมวิธานที่แยกได้

<i>C. glutamicum</i>	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่ง	ลักษณะของโคโลนี*	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์*
<i>C. glutamicum</i> C304	มูลไก่	ไม่มีการบันทึก	กกลม นูน ขอบเรียบ สี เหลือง เส้นผ่านศูนย์กลาง ของโคโลนี 1-2 มิลลิเมตร	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนไม่แน่นอน (irregular rod) ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มี ขนาด 0.8-1.1x1.7-2.2 ไมครอน ลักษณะ การเรียงตัว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่รูปตัววี และเป็นกลุ่มเรียงตัวกันคล้ายรั้ว
<i>C. glutamicum</i> CS204	มูลไก่พันธุ์ไทยบาร์ปนดิน	ฟาร์มไก่หลวงสุวรรณ ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน		
<i>C. glutamicum</i> CS254	มูลไก่ชนพันธุ์ไทยปนดิน	กรุงเทพฯ		
<i>C. glutamicum</i> CS255	มูลไก่ชนพันธุ์ไทยปนดิน	กรุงเทพฯ		
<i>C. glutamicum</i> CS274	มูลไก่ชนพันธุ์ไทยปนดิน	กรุงเทพฯ		
<i>C. glutamicum</i> DS50	มูลเป็ดเทศปนดิน	กรุงเทพฯ		

หมายเหตุ : * เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง A1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

ตารางที่ 21 ชนิด แหล่งเก็บตัวอย่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. ammoniagenes* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่แยกได้

<i>C. ammoniagenes</i>	ชนิดของตัวอย่างที่พบ	แหล่งที่พบ	ลักษณะของโคโลนี*	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์*
<i>C. ammoniagenes</i> B97	มูลนกกระทา	ฟาร์มไก่หลวงสุวรรณ ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม หรือ สีเหลืองครีม เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 1-2 มิลลิเมตร	แกรมบวกรูปร่างเป็นท่อนไม่แน่นอน (irregular rod) ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีขนาด 0.9x1.1-1.7 ไมครอน ลักษณะการเรียงตัว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่รูปตัววี และเป็นกลุ่มเรียงตัวกันคล้ายรั้ว
<i>C. ammoniagenes</i> CS215	มูลไก่พันธุ์เบตงปนดิน			
<i>C. ammoniagenes</i> CS224	มูลไก่พันธุ์เบตงปนดิน			

หมายเหตุ : * เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง A1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

ผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ คือ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือก และจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิกทั้งสองสปีชีส์ คือ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้ เช่น ชนิด แหล่งของตัวอย่างที่สามารถแยกได้ วิธีการคัดเลือก และสมบัติทางสรีรวิทยา และทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนก หรือสมบัติทางชีวเคมีที่มีความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกัน เป็นต้น นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* สามารถนำไปเพิ่มเติมในฐานข้อมูล เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์นี้ได้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ สามารถแยก และรวบรวมแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิกได้ในจำนวนน้อย จึงน่าจะมีการแยก และรวบรวมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ให้มากขึ้น เพื่อการศึกษาในด้านความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ และเป็นการเพิ่ม โอกาสในการพบสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้มากขึ้น สำหรับแบคทีเรีย *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้นั้น อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตกรดกลูตามิก ซึ่งจะช่วยลดการใช้ระบบหล่อเย็น และสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการปรับปรุงสายพันธุ์ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูตามิก หรือกรดอะมิโนอื่นๆให้สูงขึ้นได้ต่อไป