รหัสโครงการ SUT1-104-50-12-95

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

(The Characterization of Thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* Strains)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-50-12-95

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

(The Characterization of Thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* Strains)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนพัฒนาศักยภาพอาจารย์รุ่นใหม่จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof.Dr. Kazunobu Matsushita แห่งมหาวิทยาลัยยามากูจิ ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร.สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบริษัท Kyowa Hakko ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ท้ายนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ที่ทนอุณหภูมิสูง ได้แก่ สายพันธุ์ I2L Y6 และ Y30 ที่ได้รับการอนุเคราะห์สายพันธุ์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาพบว่า อุณหภูมิสูงสุดที่ I2L Y6 และ Y30 ยังสามารถเจริญได้ดีคือ 38 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ I2L เจริญและผลิตกรดกลูตามิค ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Y6 และ Y30 การแสดงออกของเอนไซม์ SOD และ catalase ของ I2L Y6 และ Y30 ไม่มีความแตกต่างกันทั้งที่อุณหภูมิ 35 และ 38 องศาเซลเซียส และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อก็ไม่ส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์ SOD และ catalase ในเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ อย่างไรก็ดีพบว่าปริมาณ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นที่อุณหภูมิ 35 และ 38 องศาเซลเซียส ของเชื้อ I2L มีปริมาณน้อยกว่า Y6 และ Y30 จึงมีความเป็นไปได้ว่า ปริมาณ ROS ที่มากจะเป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลต่อระดับความสามารถในการเจริญของเชื้อ Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิสูง

ผลจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า หากเซลล์สร้าง ROS ออกมาได้น้อยที่อุณหภูมิสูง จะทำให้เชื้อมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้ดี การควบคุมระดับการสร้าง ROS ของเซลล์จึงเป็นหนทางหนึ่งที่อาจนำไปสู่การพัฒนาเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ต่อไป

คำสำคัญ: *Corynebacterium glutamicum*, Thermotolerant, L–glutamic acid

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Thermotolerant strains of *Corynebacterium glutamicum*, I2L, Y6, and Y30, obtained from Faculty of Science, Kasetsart University were used to study their thermotolerant characters.

The I2L, Y6, and Y30 are able to grow at maximum temperature of 38°C. The growth and glutamic acid production at 38°C of I2L are highest compare to Y6 and Y30. The expression of enzymes SOD and catalase of I2L, Y6, and Y30 are no significantly different at both 35°C and 38°C.

The activities of SOD and catalase among I2L, Y6, and Y30 are not effect by the changes of temperature. However, ROS production at 35°C and 38°C of I2L is lower than Y6 and Y30. The toxicity of ROS within the cells of Y6 and Y30 could defect the growth of these two strains at high temperature.

The results of this study suggest that high temperature resistant of *C. glutamicum* is due to the decreasing of ROS production within the cells. The manipulation of SOD and catalase expression of *C. glutamicum* strains to lower ROS level of the cells may help to improve thermotolerant ability of this bacterium.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Thermotolerant, L–glutamic acid

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอเขตของการวิจัย..... 2

1.4 การทบทวนวรรณกรรม..... 3

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย..... 7

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 9

2.1 เชื้อจุลินทรีย์..... 9

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ..... 9

2.3 การวัดปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิคที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ..... 10

2.4 การแยก cytoplasm ของเซลล์..... 12

2.5 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry..... 12

2.6 การทำ Native–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native–PAGE)..... 13

2.7 การทำ activity staining..... 14

การทำ activity stain ของเอนไซม์ catalase..... 14

การทำ activity stain ของเอนไซม์ SOD..... 14

2.8 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS)..... 15

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย..... 16

3.1 การเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L Y6 และ Y30..... 16

3.2 การผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L Y6 และ Y30..... 18

3.3 การสร้างเอนไซม์ catalse และ SOD ของเชื้อ *C. glutamicum*

สายพันธุ์ I2L Y6 และ Y30..... 20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 การผลิต reactive oxygen species (ROS) ของเชื้อ *C. glutamicum*

สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30..... 21

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 25

บรรณานุกรม..... 27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 การผลิตกรดอะมิโนกลูตาเมตโดยกระบวนการ microbial fermentation ในระดับอุตสาหกรรม..... 3

รูปที่ 1.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ *Corynebacterium glutamicum*..... 5

รูปที่ 3.1 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ I2L, Y6, Y30 และ *C. glutamicum* KY9002 ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C ในอาหารเหลว glucose minimum..... 17

รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบการสร้างกรดกลูตามิคของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C ในอาหาร glucose minimum 19

รูปที่ 3.3 แสดง activity staining ของเอนไซม์ catalase และ เอนไซม์ SOD ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ KY9002, I2L, Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C 21

รูปที่ 3.4 กราฟแท่งแสดงการสร้าง ROS ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ KY9002, I2L, Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C 23

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประโยชน์ของกรดอะมิโนมีอยู่ด้วยกันหลายทาง เช่น นำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ และสัตว์, เครื่องปรุงรส หรือเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการทำเครื่องสำอางค์ ยารักษาโรค และยาฆ่าแมลง เป็นต้น ดังนั้นการผลิตกรดอะมิโนจึงเป็นอุตสาหกรรมแขนงหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ การพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนเกิดขึ้นครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น โดยการค้นพบว่ากรดอะมิโนกลูตามิค (glutamic acid) เป็นสารประกอบที่ทำให้ *คอนบุ* (สาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่คนญี่ปุ่นนิยมนำมาทำน้ำซุบ) มีรสชาติกลมกล่อม จากการค้นพบนี้ทำให้ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ได้ริเริ่มอุตสาหกรรมการผลิตกรดกลูตามิคขึ้นเป็นครั้งแรกโดยใช้กระบวนการทางเคมี ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะให้สารแปลกปลอมจำพวก racemic acid ปนเปื้อนมากับผลผลิต การผลิตจึงไม่ได้ประสิทธิภาพ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ด้วยเหตุนี้จึงได้เกิดการวิจัยเพื่อหาทางเลือกอื่นที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูตามิค

ประมาณปี ค.ศ. 1950 นักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้รายงานการค้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดกลูตามิคออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสและแอมโมเนีย กลุ่มนักวิจัยได้ตั้งชื่อแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Micrococcus glutamicus* ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Corynebacterium glutamicum* จากการค้นพบในครั้งนั้นทำให้มีการใช้ *C. glutamicum* ในการผลิตกรดกลูตามิคแทนวิธีการทางเคมีแบบเดิม โดยบริษัทแรกที่นำเชื้อตัวนี้มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมคือ บริษัท Kyowa Hakko ประเทศญี่ปุ่น ปัจจุบันนี้ *C. glutamicum* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมการผลิตกรดกลูตามิค รวมไปถึงกรดอะมิโนที่สำคัญชนิดอื่น ๆ เช่น ไลซีน จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่า *C. glutamicum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มี

ความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโน ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มทั่วโลกสนใจที่จะศึกษาเชื้อชนิดนี้กันอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะนำความรู้ที่ได้มาใช้พัฒนาสายพันธุ์ และขั้นตอนการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ของการทนอุณหภูมิต่อการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ catalase ในเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

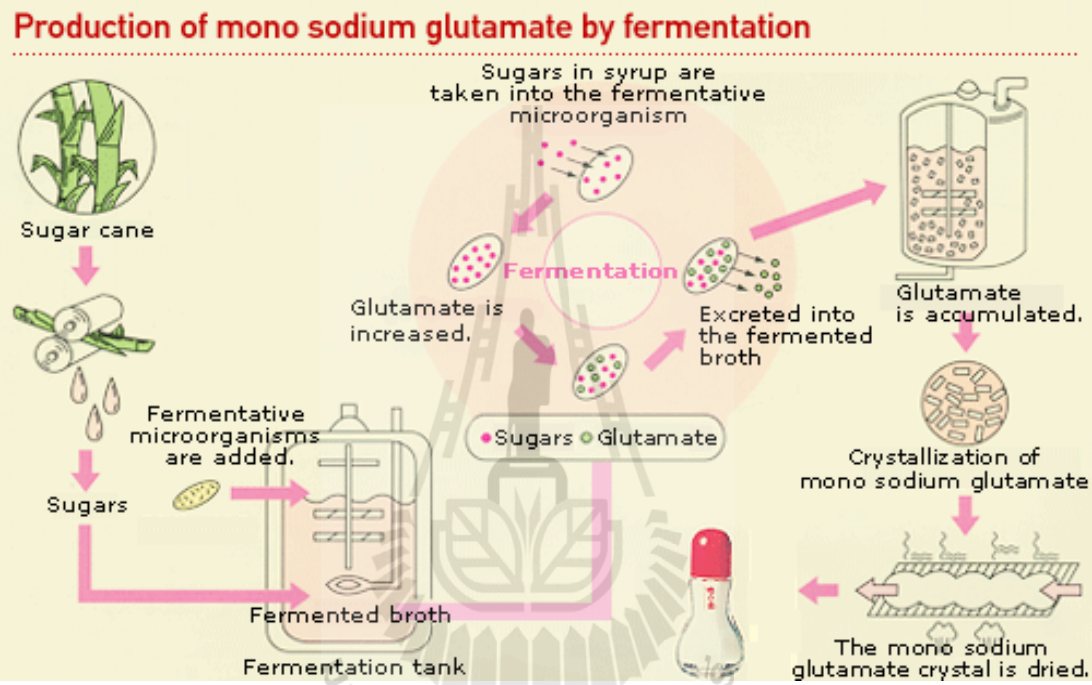
ขอบเขตของการวิจัย

1. ตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง และนำมาเปรียบเทียบกับ wild type สายพันธุ์ KY9002
2. ศึกษาการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง และนำมาเปรียบเทียบกับ wild type สายพันธุ์ KY9002

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

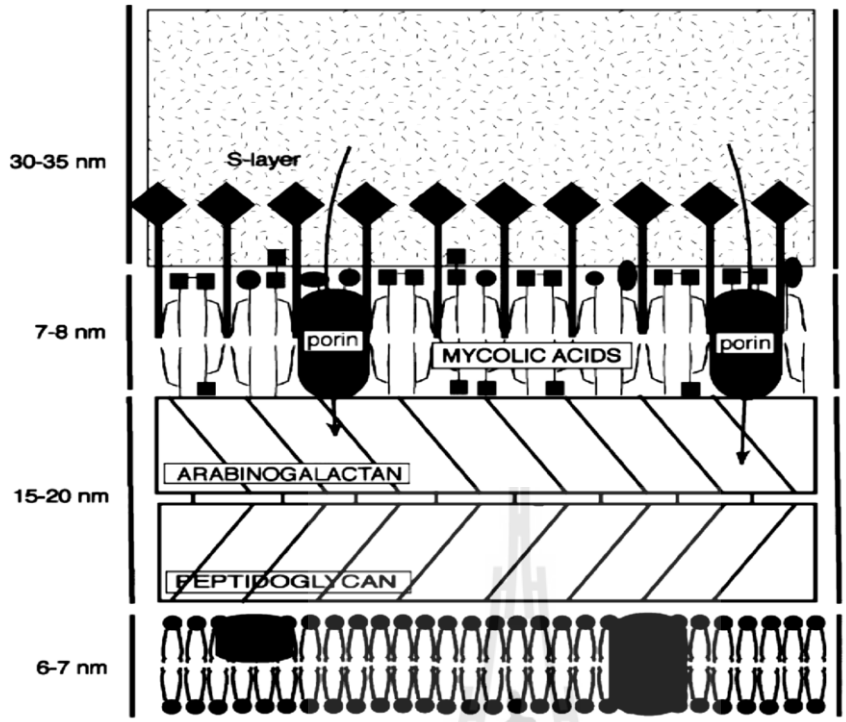
ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโนนิยมใช้กระบวนการหมัก (fermentation) โดยเชื้อจุลินทรีย์ (รูปที่ 1.1) เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีทางเคมี



รูปที่ 1.1 การผลิตกรดอะมิโนกลูตาเมตโดยกระบวนการ microbial fermentation ในระดับอุตสาหกรรม (Ault, 2004)

แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดอะมิโนในแฟมิลี่แอสพาติกและกลูตามิคส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี่ Corynebacteriaceae ได้แก่ *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium calcunae*, *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium falvum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium divaricarium*, *Brevibacterium thiogenitalis* และ *Microbacterium ammoniaphilum* (Abe, Takayama, & Kinoshita, 1967) แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันหลายด้าน เช่น ชนิดของเบส guanine และ cytosine ที่เป็นองค์ประกอบในยีโนมมีอยู่ในปริมาณสูง (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาใกล้เคียงกัน สมาชิกในแฟมิลี่ Corynebacteriaceae มีลักษณะเด่นที่เหมือนกันคือ มีผนังเซลล์ที่แข็งแรง ประกอบไปด้วยชั้นของ peptidoglycan หนา เหมือนแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และมีชั้นของ mycolic acid ล้อมรอบชั้นของ peptidoglycan อยู่อีกกชั้นหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น ๆ (Abe et al., 1967) จากสมาชิกทั้งหมดในแฟมิลี่นี้ มีแบคทีเรียอยู่สามสายพันธุ์ที่สามารถใช้กระบวนการหมักในการผลิตกรดอะมิโนได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *C. glutamicum*, *B. lactofermentum* และ *B. flavum* ภายหลังจากที่มีการศึกษาพบว่า ลำดับเบสบนยีโนมของเชื้อทั้งสามนี้มีความเหมือนกันเกือบ 100 เปอเซ็นต์ จึงทำให้เกิดการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านี้ใหม่โดยยุบรวมให้เชื้อทั้งสามนี้เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ภายใต้ชื่อ *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita, 1986; Liebl, Ehrmann, Ludwig, & Schleifer, 1991)

C. glutamicum เป็น soil bacterium พบได้ทั่วไปในดิน ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้าง endospore และไม่ก่อโรค (Abe et al., 1967; Kazuhiko & Komagata, 1972) มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป เนื่องจากมีชั้นของ mycolic acid (รูปที่ 1.2) ล้อมรอบชั้น peptidoglycan อยู่ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีความทนทานต่อ lysozyme มากกว่าเชื้อแกรมบวกชนิดอื่น



รูปที่ 1.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ *Corynebacterium glutamicum* (Eggeling, Krumbach, & Sahm, 2001)

มีรายงานว่าคุณสมบัติจำเพาะของผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้เป็นอุปสรรคหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโน รายงานการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการทน lysozyme ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติไวต่อ lysozyme มากกว่าสายพันธุ์ปกติ และสามารถปล่อยกรดกลูตามิคออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น (Hirasawa, Wachi, & Nagai, 2001) *C. glutamicum* ต้องการไบโอตินในการเจริญ (Marrakchi, Bardou, Lanéelle, & Daffé, 2008) จากการศึกษาพบว่าเมื่อจำกัดปริมาณของไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไบโอตินเป็นสารอาหารที่สำคัญในกระบวนสร้างกรดไขมันซึ่งนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในชั้น mycolic acid ของผนังเซลล์ ดังนั้นในสภาพที่เซลล์ขาดไบโอตินจึงส่งผลให้กรดกลูตามิคที่ผลิตขึ้นในเซลล์ถูกปล่อยออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น

เนื่องจากผนังเซลล์ในส่วนของชั้น mycolic acid ไม่สมบูรณ์ แข็งแรง เหมือนเซลล์ปกติที่ได้รับไบโอติน เพียงพอ (Bona & Moser, 1997; Gutmann, Hoischen, & Krämer, 1992)

การศึกษากลไกการสร้างกรดกลูตามิคในเชื้อแบคทีเรีย *C. glutamicum* และแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ในปริมาณมากพบว่า เซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้มีการสร้างเอนไซม์ α–ketoglutarate dehydrogenase ออกมาน้อยกว่าปกติ ทำให้ α–ketoglutarate ที่เกิดขึ้นในวัฏจักรของ Kreb เปลี่ยนแปลงไปเป็น succinyl–CoA และ succinate ได้น้อยลง หากมีการสะสมของ α–ketoglutarate ในส่วนนี้มาก ๆ จะทำให้วัฏจักรของ Kreb ดำเนินไปไม่ได้ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการ metabolism ของเซลล์ แบคทีเรียเหล่านี้จึงต้องมีกระบวนการที่ช่วยในการลดการสะสม ของ α–ketoglutarate โดยเปลี่ยนแปลงเส้นทางการเกิด metabolism ของ α–ketoglutarate ให้ผ่านไปทางการสร้างกรดกลูตามิค เพื่อให้ α–ketoglutarate ลดลง และ วัฏจักรของ Kreb ดำเนินต่อไปได้ จึงพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดกลูตามิคขึ้นภายในเซลล์ได้เป็นปริมาณมาก (Demain, 1972; Hermann, 2003) การสร้างกรดกลูตามิคปริมาณมาก ๆ ภายในเซลล์ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้มีศักยภาพที่อาจนำมาใช้ในการผลิตกรดอะมิโนที่เป็นอนุพันธ์ของ Aspatate ซึ่งต้องใช้กรดกลูตามิคเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ metabolism ภายในเซลล์ แบคทีเรียกรดกลูตามิคจึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตกรดอะมิโนสำคัญชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรม เช่น lysine, methionine, threonine และ isoleucine

เนื่องจากกระบวนการสร้างกรดกลูตามิคในเซลล์เป็นส่วนที่มีความสัมพันธ์กับเมทาบอลิซึม และกระบวนการหายใจ (respiratory chain) เพื่อสร้างพลังงานให้กับเซลล์ในรูป ATP แต่ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการสร้างพลังงานของ *C. glutamicum* ยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษากระบวนการเหล่านี้จึงเป็นส่วนสำคัญที่สามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ได้ต่อไป

ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่า *C. glutamicum* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดอะมิโน ดังนั้นความรู้ความเข้าใจที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อชนิดนี้จึงเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถนำไปใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ ให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะมิโนเพิ่มมากขึ้น

กระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์เกิดจากการเคลื่อนที่ของโปรตอนกับอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับเมทาบอลิซึมและการสร้างกรดอะมิโนภายในเซลล์ และการสร้างพลังงานในลักษณะนี้ของเซลล์จะมีการปล่อย reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide radicles ออกมาด้วยเสมอ ซึ่งเราทราบกันดีอยู่แล้วว่า ROS จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถทำลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ได้ ซึ่งถ้ามีในปริมาณมากก็จะส่งผลให้เซลล์ตายได้ในที่สุด อย่างไรก็ดี *C. glutamicum* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase ออกมาสลาย ROS ให้เป็น H_2O กับ O_2 ซึ่งไม่เป็นพิษกับเซลล์ โดยเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ออกมาได้ดี จะสามารถทนต่อสภาวะที่ส่งผลให้เซลล์เกิดความเครียด เช่น สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ๆ ได้ดี ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในสภาวะเหล่านี้ได้ดีขึ้น และอาจส่งผลให้เซลล์สามารถสร้างกรดอะมิโนและปล่อยออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น

ดังนั้น การศึกษากระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ ทำให้เราสามารถนำความรู้เบื้องต้นที่ได้รับจากการศึกษานี้ไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *C. glutamicum* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะมิโนต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดกลูตามิคในระดับอุตสาหกรรม
2. เป็นองค์ความรู้สำหรับทำการวิจัยในหัวข้อที่เกี่ยวข้องต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานรัฐบาล/เอกชน/รัฐวิสาหกิจ มหาวิทยาลัย สถาบันวิจัยต่าง ๆ ที่สนใจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรีย *C. glutamicum* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ กับสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง คือ *C. glutamicum* KY9002 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์มาจาก บริษัท Kyowa Hakko ประเทศญี่ปุ่น

สำหรับสายพันธุ์ทนอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ I2L, Y6 และ Y30 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์มาจาก ผศ.ดร.สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินคือ Lysogeny Broth (LB) และอาหาร glucose minimum โดย LB มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ tryptone 10, yeast extract 5 และ NaCl 10 สำหรับ glucose minimum medium มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ glucose 10, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 3, NH_4Cl 3, urea 2, $MgSO_4-7H_2O$ 0.5, $FeSO_4-7H_2O$ 0.01, $MnSO_4-7H_2O$ 0.001, casamino acid 0.5, thiamin-HCl 0.001, biotin 0.00003 และ metal mixture 1 ml การเตรียม metal mixture ทำโดยละลาย $FeSO_4-7H_2O$ 0.990 g, $ZnSO_4-7H_2O$ 0.880 g, $CuSO_4-5H_2O$ 0.393 g, $MnCl_2-4H_2O$ 0.072 g, $Na_2B_4O_7-10H_2O$ 0.088 g และ $(NH_4)_6Mo_7O_2-4H_2O$ 0.037 g ในน้ำ 1 ลิตร เมื่อต้องการเตรียมอาหารแข็ง จะทำการเติม agar 1.5% ลงไปในส่วนผสม อาหารที่ใช้เก็บสายพันธุ์เชื้อระหว่างการทดลองจะใช้ LB agar และ/หรือ

Nutrient agar (NA) ที่มีส่วนประกอบ (% w/v) ดังนี้ peptone 0.5, beef extract 0.3, NaCl 0.5 และ agar 1.5 สำหรับอาหารที่ใช้สำหรับวัดการเจริญและทดสอบการสร้างกรดกลูตามิคคือ glucose minimum

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส หรือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองนั้น ๆ

2.3 การวัดปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิคที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

เตรียมเชื้อตั้งต้น (pre-culture) โดย ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่จะทดสอบ 1 ถึง 2 โคโลนีจากจานอาหาร LB ที่อายุไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลงในหลอดอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการจะวัดการผลิตกรดกลูตามิค พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) นาน 18 ถึง 20 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มล. ถ่ายลงใน flask ขนาด 500 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว glucose minimum 100 มล. นำ flask ไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่จะใช้ในการทดสอบการสร้างกรดกลูตามิคของเชื้อนั้น ๆ จนเชื้อเจริญถึงช่วง early stationary phase ใช้ micro-pipette ดูดสารละลายของเชื้อประมาณ 500 ถึง 1000 มล. ลงไปใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วประมาณ 3000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ มาทดสอบหาปริมาณกรดกลูตามิคโดยใช้ชุดทดสอบ YAMASA L-glutamate assay kit II (Cosmo Bio Co. Ltd., Japan) โดยชุดทดสอบนี้จะใช้เอนไซม์ L-glutamate oxidase ที่มีความจำเพาะกับ L-glutamic acid กล่าวอย่างง่าย ๆ คือ ชุดทดสอบนี้ จะตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น จากกระบวนการเปลี่ยน L-glutamic acid ไปเป็น α-ketoglutaric acid โดยการทำงานของเอนไซม์ L-glutamate oxidase (สมการ 1) ซึ่ง H_2O_2 ที่เกิดขึ้น จะไปออกซิไดซ์ N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, sodium salt (DAOS) และ

4–aminoantipyrin (4–AA) ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ peroxidase ร่วมด้วย เกิดเป็น สารประกอบสีฟ้า–น้ำเงิน ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยประมาณ (สมการ 2)

สมการ 1

$$\text{L–glutamate} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{L–glutamate oxidase}} \alpha\text{ ketoglutaric acid} + NH_3 + H_2O_2$$

สมการ 2

$$H_2O_2 + \text{DAOS} + \text{4–AA} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Oxidized condensation products}$$

(Blue color) (λmax 593 nm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.4 การแยก cytoplasm ของเซลล์

เลี้ยงเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียใน flask ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล. บรรจุอยู่ ที่อุณหภูมิทดสอบ พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm จนเซลล์เจริญถึงระยะ early stationary แยกเซลล์แบคทีเรียที่ระยะ early stationary ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm นาน 5 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วนำเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วมาละลายใน 20 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.5 โดยใช้ KPB ปริมาตร 2.5 มล. ต่อเซลล์เปียกน้ำหนัก 1 กรัม หลังจากนั้น ให้เติม lysozyme ลงไปในสารละลายเซลล์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ lysozyme เป็น 0.5 มก. ต่อ สารละลายเซลล์ 1 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 1 ชั่วโมง

นำสารละลายเซลล์ที่บ่มด้วย lysozyme มาทำให้แตกโดยการนำไปผ่านเครื่อง French pressure cells press ที่แรงดัน 25000 psi สองรอบ เมื่อเซลล์แตก จะสังเกตเห็นสารละลายเซลล์ใสขึ้น แยกกากตะกอนเซลล์ออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ทิ้งตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงโดยใช้ความเร็วรอบ 40000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 60 นาที ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์จะเป็นตะกอนตกอยู่ที่ก้นหลอด และส่วนใสด้านบนจะเป็นส่วนของ cytoplasm

2.5 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry

เตรียมสารลายโปรตีนที่ต้องการจะวัด พร้อมกับสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเตรียมโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเป็น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัม ตามลำดับ เติมสารละลายที่มีส่วนผสมของ สารละลาย 2%Na_2CO_3+0.5% SDS ใน 0.1 M

NaOH กับ สารละลาย 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% potassium sodium tartrate อัตราส่วน 50:1 ปริมาตร 2 มล. ลงในสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายโปรตีนที่จะวัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 10 นาที เติมสารละลาย Folin–Phenol ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ลงไป ในปริมาตร 0.2 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV–Vis spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ต้องการวัดมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน

2.6 การทำ Native–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native–PAGE)

การเตรียม Native gel

เจลชนิดนี้จะแบ่งส่วนประกอบของเนื้อเจลออกเป็นสองส่วน แต่ละส่วนมีความเข้มข้นของเจลต่างกัน ได้แก่ ส่วนล่าง (separating gel) ที่มีเปอเซ็นต์เจลความเข้มข้นสูงกว่าเจลส่วนบน (stacking gel) ส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมเจล polyacrylamide เป็นดังตาราง

ส่วนประกอบ	**3% Stacking gel**	**10% Separating gel**
25% Acrylamide–0.6% Bisacrylamide	0.36 ml	3.2 ml
0.5 M Tris–HCl, pH 6.8	0.75 ml	–
1.5 M Tris–HCl, pH 8.8	–	2.0 ml
10% Ammonium persulphate (APS)	20 µl	54 µl
TEMED	3 µl	14 µl
Distilled water	1.84 ml	2.7 ml
Total	**3 ml**	**8 ml**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทำ Gel electrophoresis

ผสมตัวอย่างโปรตีนกับ sample buffer (0.05% Bromophenol blue; 0.5 M Tris–HCl pH 6.8) ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ปิเปตตัวอย่างโปรตีนที่ผสม sample buffer แล้ว ลงไปในช่องใส่ตัวอย่างที่อยู่ในส่วนของ stacking gel ใช้บัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ 0.05 M Tris–HCl และ 0.37 M glycine ในการทำ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟที่ 10–15 mA จนกระทั่งสี bromophenol blue ที่ผสมไว้ในตัวอย่างเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งที่ห่างจากขอบล่างของเจล ประมาณ 2 ซม. จึงหยุด

2.7 การทำ activity staining

เป็นการนำตัวอย่างโปรตีนในรูปธรรมชาติไปทำ Native–PAGE แล้วนำมาย้อมด้วยสารเคมีที่จำเพาะกับการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการจะตรวจสอบ

การทำ activity stainของเอนไซม์ catalase

หลังจากทำ Native–PAGE เสร็จแล้ว ให้นำเจลไปแช่ในสารละลาย 50 mM KPB pH 7.0 ที่มี 0.02% Horseradish peroxidase ผสมอยู่ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หลังจากนั้นให้เติม 30% H_2O_2 ผสมลงไป แล้วนำไปบ่มต่อประมาณ 10 นาที เมื่อครบเวลาให้นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นให้นำเจลไปแช่ใน 0.05% *O*–dianisidine จะสังเกตเห็นบริเวณใสในตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ catalase ส่วนบริเวณที่ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ catalase จะเห็นเป็นสีส้ม–แดง

การทำ activity stainของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

หลังจากทำ Native–PAGE เสร็จแล้ว ให้นำเจลไปแช่ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ 0.025% Nitroblue tetrazolium chloride และ 0.01% Riboflavin นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นให้เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วนำเจลมาแช่ใน 1% TEMED นำไปบ่มบริเวณที่มีแสงสว่าง

จนเจลเปลี่ยนเป็นสีฟ้า แล้วจึงเท 1% TEMED ทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น บริเวณที่ใส ไม่เปลี่ยนเป็นสีฟ้า คือ บริเวณที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ SOD

2.8 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS)

เพาะเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่มี fluorescence probe 2',7'–dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) ความเข้มข้น 2 μM ผสมอยู่ นำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการตรวจสอบการสร้าง ROS พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเซลล์เจริญถึงช่วง early stationary ก็ให้ทำการเก็บเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วมาละลายใน 0.5 M Tris–HCl (pH 7.0) โดยใช้ 0.5 M Tris–HCl (pH 7.0) ปริมาตร 6 มล. ต่อเซลล์เปียกน้ำหนัก 1 กรัม หลังจากนั้น ให้เติม lysozyme ลงไปในสารละลายเซลล์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ lysozyme เป็น 0.5 มก. ต่อ สารละลายเซลล์ 1 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ที่บ่มด้วย lysozyme มาทำให้แตกโดยการนำไปผ่านเครื่อง French pressure cells press ที่แรงดัน 25000 psi สองรอบ แยกกากตะกอนเซลล์ออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสด้านบนมาวัดปริมาณ ROS โดยวัดหาปริมาณ fluorescence probe ที่ทำปฏิกิริยากับ ROS ภายในเซลล์แล้วจะเรืองแสงออกมา การวัดหาความเข้มของแสง fluorescence ทำที่ 25°C โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดที่ความยาวคลื่นแสง emission 524 nm และ excitation 504 nm

บทที่ 3

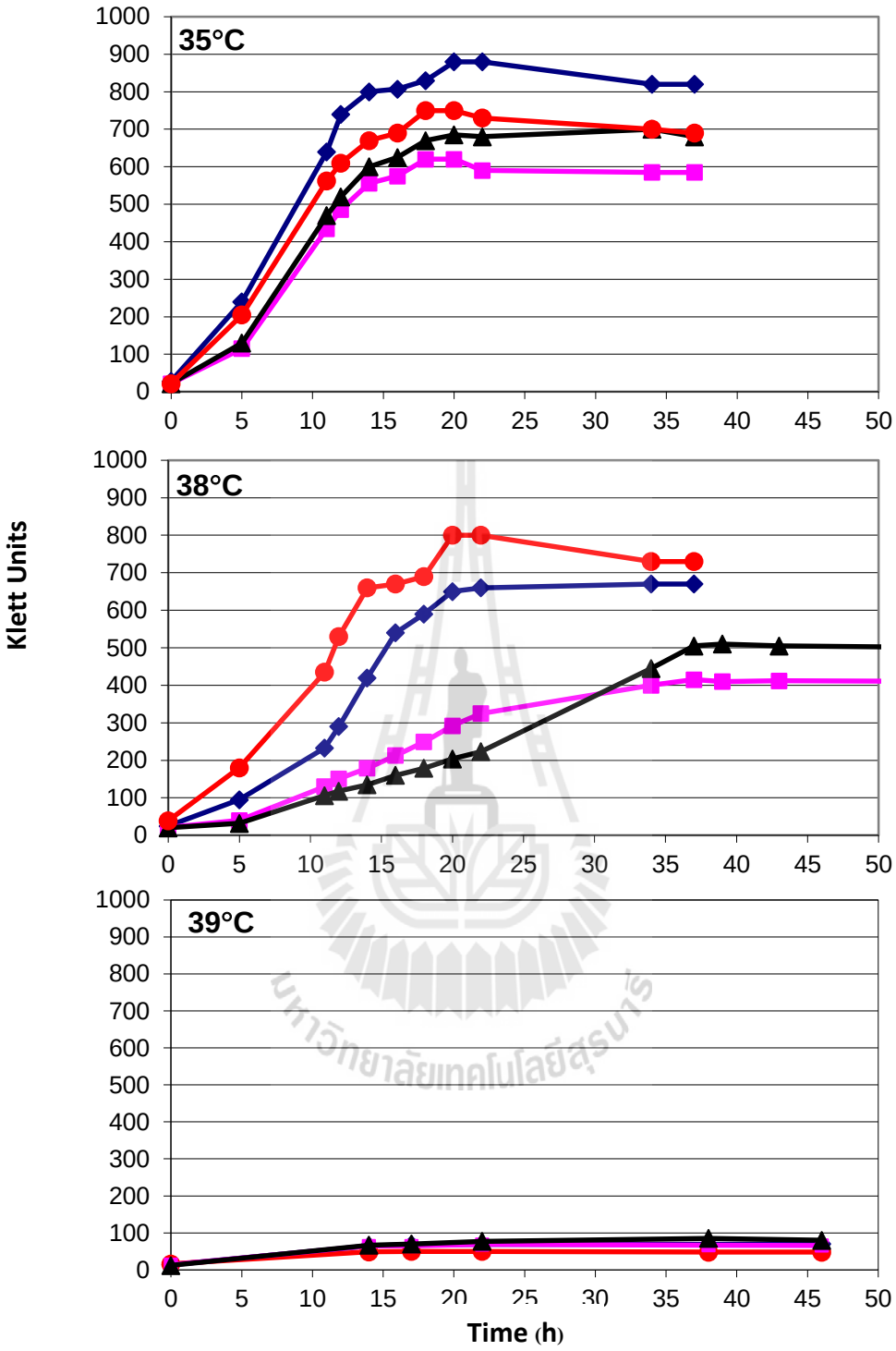
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30

นำเชื้อกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูงของ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30 มาวัดการเจริญเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ wild type *C. glutamicum* KY9002 โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงใน flask ขนาด 500 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล. นำไปบ่มอุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บเชื้อมาวัดความขุ่นที่ชั่วโมงต่าง ๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.1

จากภาพ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 35°C เชื้อ I2L, Y6 และ Y30 เจริญได้ดีใกล้เคียงกับ wild type KY9002 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 38°C พบว่าเชื้อ I2L เจริญได้ดีกว่า wild type ส่วนเชื้อ Y6 และ Y30 เจริญได้ใกล้เคียงกัน และ เจริญแย่กว่า wild type อย่างไรก็ดี เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 39°C เชื้อสายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30 รวมถึง wild type เจริญขึ้นมาได้เพียงเล็กน้อยและให้ค่า Klett สูงสุดใกล้เคียงกับ 100 ซึ่งเป็นปริมาณความขุ่นของเซลล์ที่ต่ำมาก

การทดลองนี้สรุปได้ว่า เชื้อ I2L, Y6 และ Y30 สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 35°C ได้ใกล้เคียงกับ wild type แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 38°C wild type *C. glutamicum* เจริญได้ลดลง ในขณะที่ I2L ยังเจริญได้ดีและดีกว่า wild type อย่างไรก็ดีเชื้อทุกสายพันธุ์รวมถึง wild type เจริญได้ต่ำมาก ๆ ที่อุณหภูมิ 39°C ดังนั้น เชื้อสายพันธุ์ I2L เท่านั้น ที่มีคุณสมบัติการทนอุณหภูมิ



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ I2L (●), Y6 (■), Y30 (▲) และ *C. glutamicum* KY9002 (◆)ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C ในอาหารเหลว glucose minimum ปริมาตร 100 มล.

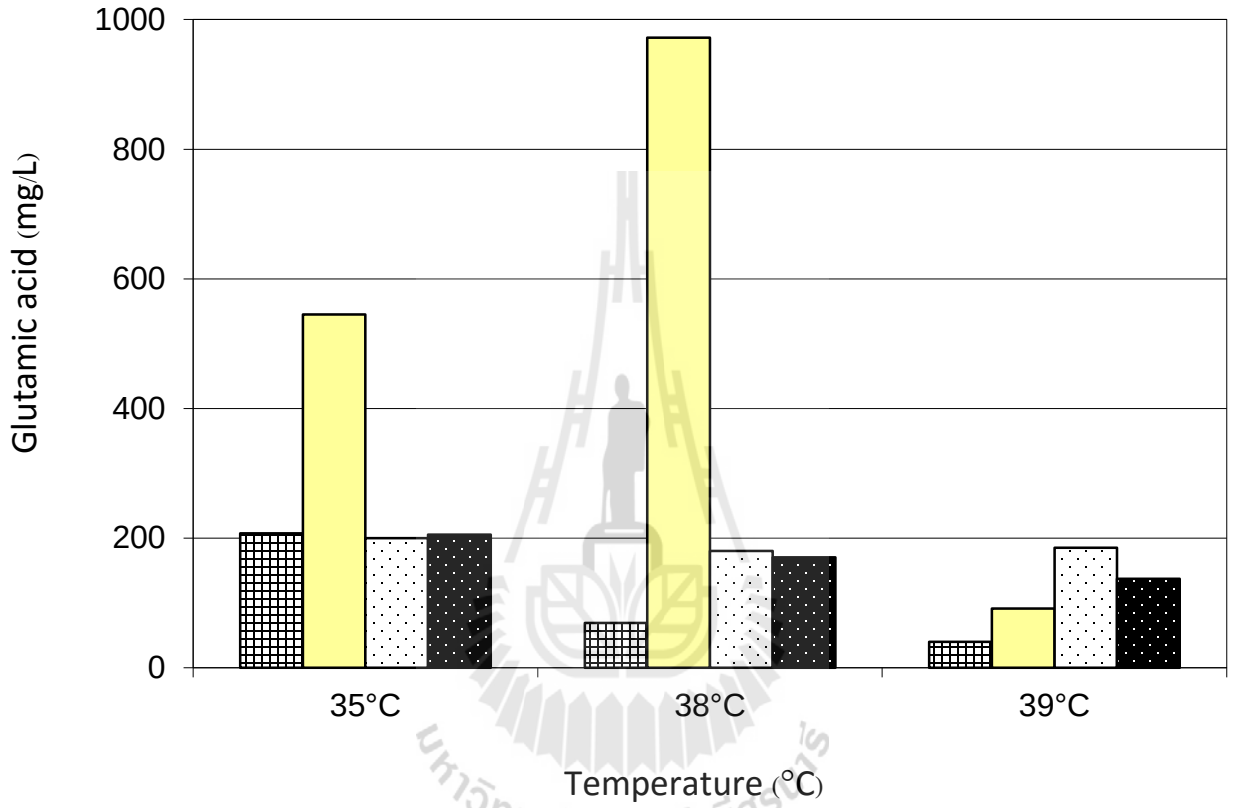
3.2 การผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30

การเปรียบเทียบการสร้างกรดกลูตามิคของ wild type *C. glutamicum* KY9002 กับ เชื้อ I2L, Y6 และ Y30 ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงระหว่าง late log ถึง early stationary ให้ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดปริมาณของกรดกลูตามิคที่เชื้อสร้างและปล่อยออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลอง (รูปที่ 3.2) แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจาก 35°C เป็น 38°C และ 39°C การผลิต glutamic acid ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ wild type จะลดลงเรื่อย ๆ ตรงข้ามกับเชื้อ I2L ที่การสร้างกรดกลูตามิคจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 35°C ไปเป็น 38°C อย่างไรก็ดีเมื่อเลี้ยงเชื้อ I2L ที่อุณหภูมิ 39°C จะทำให้เชื้อผลิตกรดกลูตามิคได้ลดลง สำหรับ เชื้อ Y6 และ Y30 นั้น พบว่า การสร้างกรดกลูตามิคที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C มีค่าใกล้เคียงกัน ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ wild type ของ *C. glutamicum* ผลิตกรดกลูตามิคได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนเชื้อสายพันธุ์ I2L สามารถสร้างกรดกลูตามิคออกมาได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 38°C และแม้ว่าที่อุณหภูมิ 35°C เชื้อ I2L สร้างกรดกลูตามิคออกมาได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 38°C แต่ปริมาณการสร้างกรดกลูตามิคของ I2L ที่อุณหภูมิ 35°C ก็ยังสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น แม้การสร้างกรดกลูตามิคของ Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C จะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก รวมทั้งปริมาณของกรดกลูตามิคที่เชื้อสร้างออกมาก็ไม่ได้สูงมาก แต่หากนำไปเทียบกับ wild type จะเห็น

ว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้น คือ 38°C และ 39°C เชื้อ Y6 และ Y30 สร้างกรดกลูตามิคออกมาได้สูงกว่า wild type และที่อุณหภูมิ 39°C เชื้อ Y6 และ Y30 ยังสร้างกรดกลูตามิคได้มากที่สุดอีกด้วย



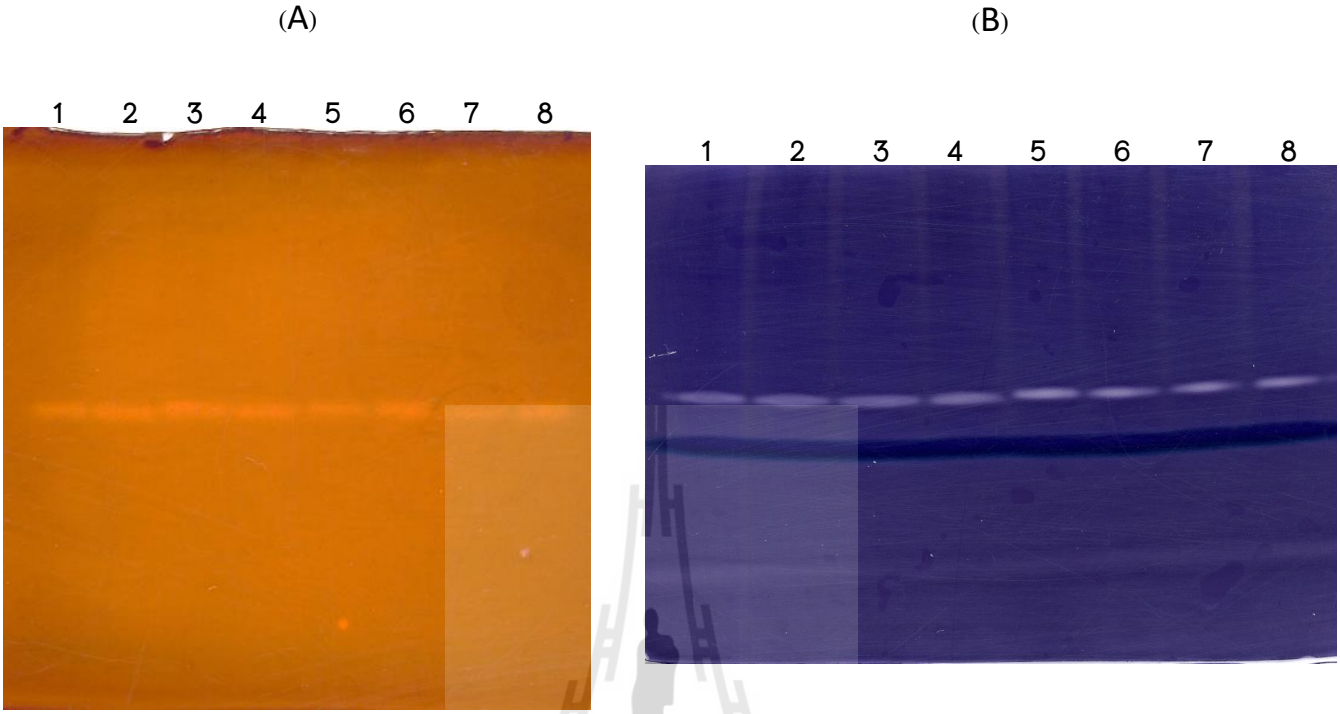
รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบการสร้างกรดกลูตามิค ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35°C, 38°C และ 39°C จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดย ▦ แสดงการสร้างglutamic acid ของสายพันธุ์ KY9002 (wild type), ▭ แสดงการสร้างglutamic acid ของสายพันธุ์ I2L, ▩ แสดงการสร้างglutamic acid ของสายพันธุ์ Y6, ▪ แสดงการสร้างglutamic acid ของสายพันธุ์ Y30

3.3 การสร้างเอนไซม์ catalase และ SOD ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30

เอนไซม์ catalase และ SOD เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม aerobes เนื่องจากเอนไซม์สองชนิดนี้จะไปลดปริมาณ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหายใจระดับเซลล์โดยใช้ออกซิเจน โดยไปทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ROS ให้เป็น น้ำ กับ ออกซิเจน ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์

การเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ catalase และ SOD ของเชื้อ wild type *C. glutamicum* KY9002 กับ เชื้อ I2L, Y6 และ Y30 ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงระหว่าง late log ถึง early stationary ให้ทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดเอาส่วน cytoplasm ของเซลล์ออกมาวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Catalase และ SOD ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จัดเป็น cytosolic enzymes

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.3 แสดง activity staining ของเอนไซม์ catalase (A) และ เอนไซม์ SOD (B) ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ KY9002, I2L, Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C

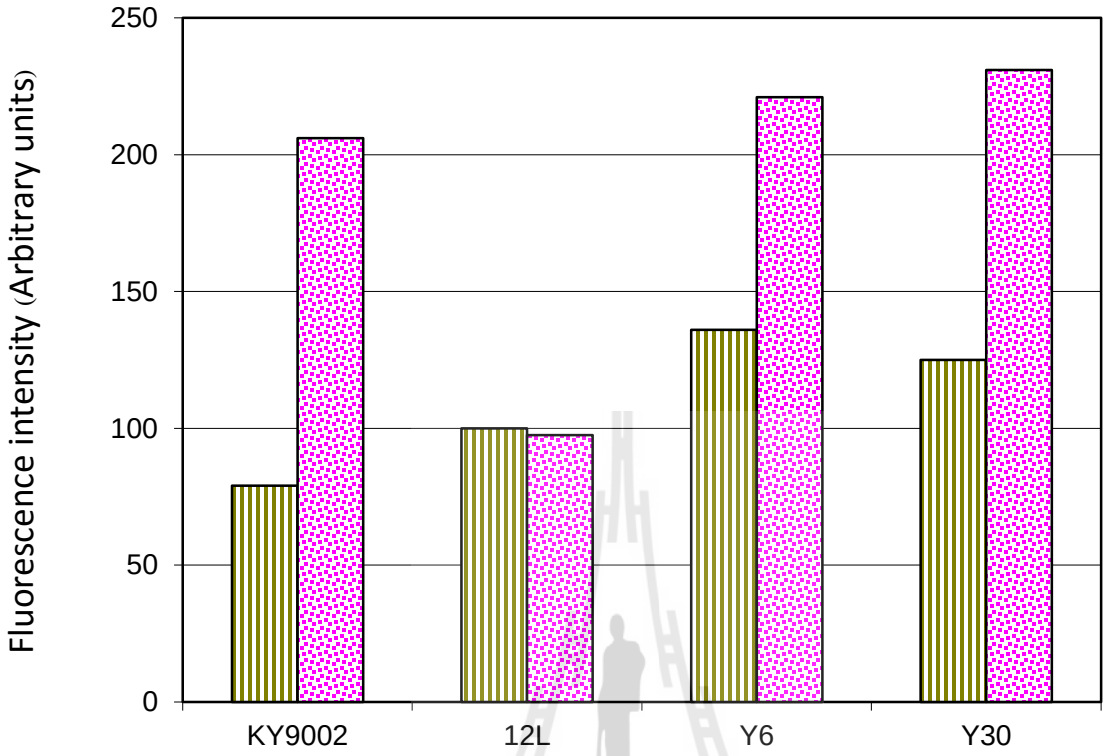
(1 คือ KY9002 เลี้ยงที่ 35°C; 2 คือ KY9002 เลี้ยงที่ 38°C; 3 คือ I2L เลี้ยงที่ 35°C; 4 คือ I2L เลี้ยงที่ 38°C; 5 คือ Y6 เลี้ยงที่ 35°C; 6 คือ Y6 เลี้ยงที่ 38°C; 7 คือ Y30 เลี้ยงที่ 35°C; 8 คือ Y30 เลี้ยงที่ 38°C)

ผลการทดลองในรูปที่ 3.3 แสดงให้เห็นว่า การทำงานของเอนไซม์ catalase และ SOD ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ wild type ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C ไม่แตกต่างจาก I2L, Y6 และ Y30 นอกจากนี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สองตัวนี้ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C ก็ไม่แตกต่างกัน

3.4 การผลิต reactive oxygen species (ROS) ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ I2L, Y6 และ Y30

การเปรียบเทียบการสร้าง ROS ของเชื้อ wild type *C. glutamicum* KY9002 กับ เชื้อ I2L, Y6 และ Y30 ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร glucose minimum ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงระหว่าง late log ถึง early stationary ให้ทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาวัดปริมาณ ROS

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.4 กราฟแท่งแสดงการสร้าง ROS ของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ KY9002, I2L, Y6 และ Y30 ที่อุณหภูมิ 35°C (▥) และ 38°C (▩)

ผลการทดลองการวัดปริมาณการสร้าง ROS ในรูปที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณการสร้าง ROS ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 35°C เป็น 38°C ยกเว้น I2L ที่การสร้าง ROS ที่อุณหภูมิ 35°C และ 38°C ไม่แตกต่างกันมากนัก จุดที่น่าสังเกตคือ ที่อุณหภูมิสูง 38°C I2L สร้าง ROS ออกมาน้อยกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ที่อุณหภูมิ 38°C นี้ เชื้อสายพันธุ์อื่นสร้าง ROS ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ออกมาสะสมในปริมาณมาก ทำให้เชื้อเหล่านี้เจริญได้ไม่ดีเท่ากับ I2L ที่อุณหภูมิดังกล่าว

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่า ปริมาณการสร้าง ROS มีผลต่อความสามารถในการเจริญของเชื้อ *C. glutamicum* อุณหภูมิต่าง ๆ โดยเชื้อที่สร้าง ROS ออกมามากจะเจริญได้แย่กว่าเชื้อที่สร้าง ROS ออกมาน้อย และปริมาณการเกิดของ ROS ภายในเซลล์ดูจะไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกกรมการทำงานของเอนไซม์ catalase และ SOD เนื่องจากกิจกกรมการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ไม่มีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จึงเป็นไปได้ว่าการสร้าง ROS ในเซลล์ที่แตกต่างกันน่าจะมาจากเหตุผลที่ว่าเชื้อต่างสายพันธุ์กันเหล่านี้ใช้กระบวนการ metabolism โดยเฉพาะกระบวนการ aerobic respiration ในเซลล์ที่ต่างกันส่งผลให้มีการสร้าง ROS ออกมาไม่เท่ากัน

การทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิคของเชื้อดูจะไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้าง ROS ของเซลล์ ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์น่าจะมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับความสามารถในการเจริญและการทนอุณหภูมิของเชื้อ *C. glutamicum* มากกว่า อย่างไรก็ดีหากเชื้อเจริญได้มากขึ้นก็น่าจะส่งผลให้ปริมาณการสร้างกรดกลูตามิคโดยรวมเพิ่มขึ้นด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนอุณหภูมิของเชื้อ *C. glutamicum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ว่ามีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ catalase เอนไซม์ SOD รวมไปถึงการสร้าง ROS ของเซลล์หรือไม่ โดยเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถเจริญได้ดีจนถึงอุณหภูมิ 38°C เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 39°C เชื้อเจริญขึ้นมาได้น้อยมาก ทำให้ปริมาณเซลล์ไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ catalase เอนไซม์ SOD และวัดการสร้าง ROS การทดลองทั้งสามนี้จึงทดสอบได้ถึงแค่อุณหภูมิ 38°C สำหรับการวัดปริมาณกรดกลูตามิค สามารถทำที่อุณหภูมิ 39°C ได้ เนื่องจากการทดลองนี้นำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบไม่ได้ใช้ส่วนที่เป็นตัวเซลล์ ผลที่ได้จากการทดลองนี้พอสรุปได้ว่า ปริมาณการสร้าง ROS ส่งผลต่อความสามารถในการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อที่มีการสร้าง ROS ออกมาน้อย จะเจริญได้ดีกว่าเชื้อที่สร้าง ROS ออกมามาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการควบคุมให้ปริมาณการสร้าง ROS ของเซลล์น้อยลง อาจจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้มากขึ้น โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น

แนวทางหนึ่งที่จะช่วยไปลดปริมาณการสร้าง ROS ภายในเซลล์คือการไปเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย ROS ภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์ SOD และ catalase ดังนั้นการทำการกลายพันธุ์เชื้อ *C. glutamicum* ให้มีการผลิตเอนไซม์สองตัวนี้ออกมามากขึ้นกว่าเดิม โดยไปเพิ่มจำนวนยีนที่สร้างเอนไซม์เหล่านี้ภายในเซลล์ให้มีการแสดงออกสูงขึ้น ก็น่าจะเป็นหนทางหนึ่งที่จะไปลดปริมาณของ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้น และส่งผลให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเดิม และเมื่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ปริมาณการสร้างกรดกลูตามิคโดยรวมก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย ความรู้จากการทดลองนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อาจนำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *C. glutamicum* ให้ผลิตกรดอะมิโน ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ที่อุณหภูมิสูง

บรรณานุกรม

Abe, S., Takayama, K.-I., & Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology, 13*(3), 279-301.

Ault, A. (2004). The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of chemical education, 81*(3), 347.

Eggeling, L., Krumbach, K., & Sahm, H. (2001). L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *Journal of molecular microbiology and biotechnology, 3*(1), 67-68.

Hirasawa, T., Wachi, M., & Nagai, K. (2001). L-Glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* ltsA mutant strains. *BMC biotechnology, 1*(1), 9.

Kazuhiko, Y., & Komagata, K. (1972). Taxonomic studies on coryneform bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology, 18*(6), 417-431.

Kinoshita, S. (1986). Glutamic acid bacteria. *Biotechnology Series. 1986.*

บรรณานุกรม (ต่อ)

Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., & Schleifer, K. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T,“ *Brevibacterium flavum*” DSM 20411,“ *Brevibacterium lactofermentum*” DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and Their Distinction by rRNA Gene Restriction Patterns. *International journal of systematic bacteriology, 41*(2), 255-260.

Marrakchi, H., Bardou, F., Lanéelle, M., & Daffé, M. (2008). A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthesis. *The mycobacterial cell envelope*, 41-62.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี