

เชิดชาย บุรรมย์ : การผลิตแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม (Production of Nutrient Sources for *Rhizobium*)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรวิทย์ รอดทอง, 202 หน้า

ISBN 974-533-026-4

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่วและช่วยตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งเป็นประโยชน์มากด้านธาตุอาหารไนโตรเจนกับพืชอาศัย ปัจจุบันมีการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการปลูกพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ต้องการแมนนิทอลและกลีเซอรอล เป็นแหล่งอาหารหลักและไม่สามารถใช้ทั้งกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียโดยทั่วไปนำไปใช้ได้ง่าย และซูโครส ซึ่งแมนนิทอลและกลีเซอรอลมีมูลค่าสูงกว่ากลูโคสประมาณ 12-20 เท่า ทำให้มีต้นทุนสูงในการผลิตหัวเชื้อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากวัตถุดิบมูลค่าต่ำ ได้แก่ แป้ง และซูโครส โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ เพื่อนำไปเลี้ยงไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อได้ จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 147 ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและ 15 สายพันธุ์จากแหล่งเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ด้านความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากแป้งและซูโครส พบว่ายีสต์ที่ให้ชื่อว่าไอโซเลท KAY1 ซึ่งแยกได้จากผลกระเจียบสด สามารถย่อยแป้งได้ดีและสามารถผลิตแมนนิทอลสะสมภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดคือ 1.2-1.5 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงยีสต์นั้นในอาหารที่มีแป้งชนิดใดชนิดหนึ่งคือ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า หรือแป้งข้าวกล้อง ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบ การให้ความร้อนต่อเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแป้ง ช่วยส่งเสริมความสามารถในการผลิตแมนนิทอล ให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 1.2 เท่า ยีสต์ไอโซเลท PUY4 ซึ่งแยกได้จากผลพุทราสุก มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 14 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบ และเมื่อนำไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า คือ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* spp. THA 5 มาเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 พบว่าเชื้อไรโซเบียมทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้จำนวนเซลล์ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหารเลี้ยงไรโซเบียมที่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบ พบว่ากลีเซอรอลที่เตรียมจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท PUY4 สามารถส่งเสริมการเจริญของไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีเช่นเดียวกัน และให้ผลทำนองเดียวกับอาหารเลี้ยงไรโซเบียมที่เตรียมโดยใช้กลีเซอรอลและแมนนิทอลที่ผลิตเป็นการค้า และจากการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของยีสต์ พบว่ายีสต์ไอโซเลท KAY1 และ PUY4 จัดอยู่ในสกุล *Rhodotorula* และ *Pichia* ตามลำดับ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

CHARDCHAI BUROM : PRODUCTION OF NUTRIENT SOURCES FOR
RHIZOBIUM

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, PH.D., 202 PP.

ISBN 974-533-026-4

Rhizobia are the effective nitrogen fixation bacteria in symbiosis with legumes. Rhizobial inoculants are currently produced for growing several economic legumes. The utilization of carbon compounds by rhizobia varied with their species and strains. Most slow-growing rhizobia cannot use the simple sugar, glucose, as well as sucrose. Mannitol and glycerol are mainly used for the cultivation of these slow-growing rhizobia. Prices of the carbohydrate compounds are about 12-20 times more expensive than glucose. Consequently, the production of these legume inoculants is costly. This study was aimed to produce glycerol and mannitol for *Rhizobium* cultivation by microbial conversion of cheap substrates such as starch and sucrose. The production cost of rhizobial inoculants might be reduced. A total of 147 yeasts isolated from natural sources and 15 yeast type strains were screened for their glycerol and mannitol production capabilities. It was found that the yeast isolate KAY1 isolated from rozelle fruit could utilized starch, and was proved to be the highest accumulation of mannitol in its cell when cultured in the medium containing 2% of either cassava starch, rice starch, or Khao-klong starch. The maximum yield of mannitol was 1.2-1.5 grams of mannitol per litre of cultured medium of yeast. When the yeast cells were heated at 45°C for 20 min, the production of mannitol in yeast cells was increased 1.2 times higher than untreated cells. The yeast isolate PUY4 isolated from Phut-sa (*Zizyphus jujuba* Lamk) fruit could produce glycerol detected in its broth culture at the concentration of 14 grams of glycerol per litre of cultured medium. When cultured two slow-growing rhizobium strains, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Bradyrhizobium* spp. THA 5, in the medium containing mannitol prepared from KAY1 cells. The good growth of about 10⁸ cells/ml of the two strains of *Bradyrhizobium* was obtained. When cultured the two Bradyrhizobial strains in the medium containing glycerol prepared from cultured medium of isolate PUY4, their growth was also enhanced. The similar results were achieved when the same compositions of rhizobial media were prepared using either commercial glycerol and mannitol. Yeast isolates KAY1 and PUY4 were identified as belonging to genera *Rhodotorula* and *Pichia*, respectively.

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....