รายงานวิจัย

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย และการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลานิลแดง

Factors Affecting Production of Aminolevulinic Acid from Mutant Strain of Halotolerant Photosynthetic Bacteria and the Application in Cultivation of Nile Tilapia

โดย

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์

วุฒิพร พรหมขุนทอง

ฉวีวรรณ มลิวัลย์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2548

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย *Rhodobacter sphaeroides* N20 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต (GM) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรกลูตาเมต-กลูโคส (GG) ที่สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารกลูตาเมต-กลูโคสสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงกว่า (43.5 และ 31.06 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) และเมื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ในสูตรอาหาร GG พบว่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และการเติมกลูตาเมต 4 กรัมต่อลิตรและกรดมาลิก 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารกลูตาเมต-กลูโคส เชื้อมีการผลิต ALA ได้สูงสุดเท่ากับ 67.81 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงในสูตรอาหารเกรดวิเคราะห์และเกรดทางการค้าต่างๆ พบว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารเกรดทางการค้า MGSY (ประกอบด้วยผงชูรส กลูโคส เกลือ และยีสต์สกัด) เชื้อสะสม ALA ภายในเซลล์ได้สูงกว่าเล็กน้อย (2.70 และ 2.54 ไมโครโมลต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ) แต่ผลิต ALA ภายนอกเซลล์ ได้ต่ำกว่าการใช้สูตรอาหารเกรดวิเคราะห์ GG เล็กน้อย (40.94 และ 44.87 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) ความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ คือ กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ เกลือ 3.0%และยีสต์สกัด 1.5% โดยปราศจากการเติมผงชูรส จึงเป็นอาหารสูตร GSY จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ *R. sphearoides* N20 พบว่า มีโปรตีน 46.22 คาร์โบไฮเดรต 41.00 ไขมัน 0.14 เถ้า 11.63 เยื่อใย 0.22% (น้ำหนักแห้ง) เชื้อมีการสะสม ALA ภายในเซลล์ 1.26 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ (น้ำหนักแห้ง) เมื่อประยุกต์ใช้เซลล์ *R.sphaeroides* N20 ที่มีการสะสม ALA ภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับการใช้ ALA ทางการค้า ในการเลี้ยงปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus* Linn.) แปลงเพศ พบว่า การใช้เซลล์ปริมาณ 0.2% ให้ผลทั้งการกระตุ้นการเจริญและภูมิคุ้มกันดีที่สุดโดยให้ผลที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักปลา (60.05%) อัตราการเจริญจำเพาะ (1.12 %/วัน) ปริมาณเม็ดเลือดขาว (4.02×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) สูงกว่าการใช้ ALA ทางการค้า เข้มข้น 0.0025% (51.18%, 0.98%/วัน และ 3.89×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ) และ 0.025% (49.39%, 0.96%/วัน และ 3.92×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ) ในขณะที่การใช้ ALA ทางการค้า เข้มข้น 0.025% ให้ปริมาณเม็ดเลือดแดง (1.97×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) สูงกว่าการใช้เซลล์ 0.2% (1.89×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และ ALA ทางการค้า 0.0025% (1.78×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (ไตเตอร์) พบว่า สูตรที่ได้รับเซลล์ 0.2% และ ALA ทางการค้า 0.0025% ให้ค่าไตเตอร์ ($\log_{10}$) (-3.11 และ -3.16) สูงกว่าสูตรที่ได้รับ ALA ทางการค้า 0.025% (-2.91) สูตรที่ได้รับเซลล์ 2.0% (-2.26) และสูตรควบคุม (-1.61) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Abstracts

Cultivation of the photosynthetic bacterial mutant strain *Rhodobacter sphaeroides* N20 under aerobic-dark at 37°C condition in glutamate-malate (GM) medium compared with using glutamate-glucose (GG) medium revealed that the strain cultivated in GG medium gave higher value of ALA (43.5 and 31.06 μM, respectively). Studies on factors affecting ALA production in GG medium revealed that the initial pH at 6.5 and addition of 4 g/l glutamate and 1 g/L malic acid gave the maximum ALA production of 67.81 μM. Comparison on cultivation in analytical grade medium and commercial grade medium revealed that MGSY medium (containing monosodium glutamate, glucose, NaCl and yeast extract) gave higher intracellular ALA concentration (2.70 and 2.54 μmol/g cell, respectively) but slightly lower extracellular ALA production than GG medium(40.94 and 44.87 μM, respectively). Optimum concentration of MGSY component were 50 mM glucose, 3% salt and 1.5% yeast extract, salt without monosodium glutamate addition, so called GSY medium. Cell component of *Rhodobacter spheroides* N20 consisted of 46.22% protein, 41.00% carbohydrate, 0.14% fat, 11.63% ash and 0.22% fiber (dry weight basis). The accumulation of intracellular ALA was 1.26 μg/g cell (dry weight). Application of the cells of *R. sphaeroides* N20 containing intracellular ALA compared with using the commercial ALA for cultivation of sex-reverse nile tillapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) revealed that using 0.2% cells gave the best results for growth stimulant and inmunostimulant. The weight gain (60.05%), specific growth rate (1.12%/day) and amount of white blood cell (4.02 $x10^4$ cells/mm^3) were higher than using commercial ALA at the concentration of 0.0025% (51.18%, 0.98%day and $3.89x10^4$ cells/mm^3, respectively) and 0.025% (49.39%, 0.96%/day and $3.92x10^4$ cells/mm^3). On the other hand, using commercial ALA at 0.025% gave higher red blood cells ($1.97x10^6$ cells/mm^3) than using 0.2% bacterial cells ($1.89x10^6$ cells/mm^3) and 0.0025% commercial ALA ($1.78x10^6$ cells/mm^3), respectively. Evaluation on specific immunostimulant (titer) revealed that using 0.2% bacterial cells and 0.0025% commercial ALA gave significant ($p<0.05$) higher titer (log_{10}) (-3.11 and -3.16, respectively) than using 0.025% commercial ALA (-2.91), 2.0% bacterial cells (-2.26) and control (-1.61), respectively.