

รายงานวิจัย



เรื่อง

การปรับปรุงสายพันธุ์และปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มขนาดการผลิตแบคทีเรีย  
สังเคราะห์แสงทนเค็มเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารเลี้ยงปลากดเหลือง  
Strain Improvement and Factor Affecting Scale-Up for Production of  
Halotolerant Photosynthetic Bacteria and Its Application in  
*Mystus nemurus* Cuv. & Val.

โดย

พูนสุข ประเสริฐสรรพ  
วุฒิพร. พรหมขุนทอง  
ฉวีวรรณ มลิวัลย์

๖๒๐

เลขหมู่.....	QR98๔5 พ73 ๘๕๕
Bib Key.....	236387
...../...../.....	...../...../.....

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## บทคัดย่อ

จากการเปรียบเทียบการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม 5 สายพันธุ์ ในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต พบว่าสายพันธุ์ ES16 ผลิตได้สูงสุด เชื่อสามารถใช้กลูโคสสำหรับการเจริญและการผลิต ALA ได้ดีกว่ามาเลต และเทียบเคียงเชื่อได้เป็น *Rhodobacter sphaeroides* ES16 เมื่อชักนำเชื่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) และรังสียูวี พบว่าสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 สามารถผลิต ALA ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิต ALA ภายในเซลล์ เพิ่มขึ้น 5.2 เท่า และ 5.1 เท่า (2.78 และ 2.73 ไมโครโมลต่อกรัมเซลล์) ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื่อ 24 ชั่วโมง และการผลิต ALA ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น 1.5 เท่าและ 2.2 เท่า (43.75 และ 60.42 ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื่อ 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (0.54 ไมโครโมลต่อกรัมเซลล์ และ 27.91 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) เมื่อนำสายพันธุ์ N20 มาเลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-กลูโคส (GG) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสูตรอาหาร MGY (ประกอบด้วยกลูตาเมต กลูโคส เกลือ และ ยีสต์สกัด) พบว่าสูตรอาหาร MGY เชื่อสะสม ALA ได้สูงกว่า (2.70 และ 2.54 ไมโครโมลต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ) แต่ผลิต ALA ภายนอกเซลล์ได้ต่ำกว่าการใช้สูตร GG เล็กน้อย (40.94 และ 44.87 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ *R. sphaeroides* N20 พบว่า มีโปรตีน 46.22% คาร์โบไฮเดรต 41.00% ไขมัน 0.14% เถ้า 11.63% และเยื่อใย 0.22% (น้ำหนักแห้ง) และมีการสะสม ALA ภายในเซลล์ 1.92 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ (น้ำหนักแห้ง) เมื่อประยุกต์ใช้เซลล์ *R. sphaeroides* N20 ที่มีการสะสม ALA ภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับการใช้ ALA ทางการค้าในการเลี้ยงปลาเกล็ดเหลือง *Mystus nemurus* พบว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงและ ALA ทางการค้าไม่มีผลต่อการเร่งการเจริญของปลา สำหรับการใส่เซลล์ ปริมาณ 0.5 % ให้ผลในการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดสูงสุด ( $4.04 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) ในขณะที่ ALA ทางการค้าที่เคลือบอาหารในปริมาณ 19.2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้ปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงสุด ( $6.50 \times 10^4$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) เมื่อวิเคราะห์ผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (ไตเตอร์) พบว่าทุกสูตรอาหารให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



## Abstract

Comparison on 5-aminolevulinic acid (ALA) production from 5 strains of halotolerant photosynthetic bacteria under aerobic-dark condition in glutamate-malate medium revealed that the isolate ES16 gave the highest value. The strain could utilize glucose for growth and ALA production better than using malate. The isolate was identified to be *Rhodobacter sphaeroides* ES16. Induction mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and ultraviolet (UV), revealed that the mutants N20 and U7 produced ALA higher than the other strains. Their intracellular ALA concentration increased 5.2 and 5.1 folds (2.78 and 2.73  $\mu\text{M/g}$  cell respectively) after 24 h cultivation. Extracellular ALA production increased 1.5 and 2.2 folds (43.75 and 60.42  $\mu\text{M}$ ) respectively after 72 h cultivation, in comparison to the wild type strain (0.54  $\mu\text{M/g}$  cell and 27.91  $\mu\text{M}$ , respectively). Cultivation of the mutant N20 in glutamate-glucose (GG) medium compared with MGY medium (containing glutamate, glucose, NaCl and yeast extract) gave higher intracellular ALA concentration (2.70 and 2.54  $\mu\text{mol/g}$  cell, respectively) but slightly lower extracellular ALA production (40.94 and 44.87  $\mu\text{M}$ , respectively) than GG medium. Cell component of *R. sphaeroides* 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 1.92  $\mu\text{g/g}$  cell (dry weight). Application of the cells of *R. sphaeroides* N20 containing intracellular ALA compared with the commercial ALA for cultivation of *Mystus nemurus* revealed that no effect on growth but using 0.5% cell gave the increase of red blood cell ( $4.04 \times 10^6$  cell/ $\text{mm}^3$ ) and using 19.2 mg/1 kg commercial ALA gave the highest white blood cell ( $6.50 \times 10^4$  cell/ $\text{mm}^3$ ). Analysis result of specific immunostimulant (titer) revealed that every formular gave no significant results.