การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคลซิลทรานสเฟอเรส

นางสาว จิราภรณ์ จันทรมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974 - 638 - 395 - 7

ลิขสิทธิ์บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17950132

MUTATION OF *Bacillus sp.* A11 FOR INCREASING CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ACTIVITY

Miss Jiraporn Juntarama

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974 - 638 - 395 - 7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส
โดย	นางสาว จิราภรณ์ จันทรมา
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จิราภรณ์ จันทรมา : การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคลซิลทรานสเฟอเรส (MUTATION OF *Bacillus sp.* A11 FOR INCREASING CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ACTIVITY) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ; 112 หน้า. ISBN 974 - 638 - 395 - 7

ในการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคลซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) โดยใช้แสง UV และสารเคมี NTG หาสภาวะที่เหมาะสม คือช่วงเวลาการฉายแสงได้ 80 วินาที และความเข้มข้น NTG ในช่วง 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการคัดเลือกโคโลนีขั้นปฐมภูมิ โดยวิธีวัดค่า clear zone บนอาหารแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ คัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยใช้วิธีวัด CD-TCE activity และ Dextrinizing activity ผลการทดลองพบว่าหลังการกลายพันธุ์ 4 ครั้ง ได้สายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดคือ UNUN-97 มี Dextrinizing activity และ CD-TCE activity สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.2 เท่า และ 2^2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบลักษณะรูปร่างโคโลนีของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทั้งขนาดรูปร่างลักษณะ และสี แต่เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope ลักษณะเซลล์สายพันธุ์กลายต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นคือ ความยาวต่อความกว้างของแท่งเซลล์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อเก็บเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไว้ที่ -20 °ซ เป็นเวลา 60 วัน เพื่อตรวจสอบความคงทนของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้นในการรักษาประสิทธิภาพการผลิต CGTase พบว่า สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีความคงทนสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ในการเปรียบเทียบสมบัติของ CGTase ที่สายพันธุ์กลายผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่าสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา Dextrinizing activity ของ CGTase ของทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง pH 6-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาคือ ที่อุณหภูมิ 60-65 °ซ รูปแบบโปรตีน CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส ได้โปรตีน 2 แถบ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนมีค่า 70,000 และ 45,000 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบ CGTase ในด้านความจำเพาะต่อแอนติบอดี พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ CGTase ได้เส้นตะกอน ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $1:2^5$ ทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการย่อยแป้งของ CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย ด้วย HPLC พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น β-CD

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต จิราภรณ์ จันทรมา

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C827036 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE / MUTATION / *Bacillus sp.* A11

JIRAPORN JUNTARAMA : MUTATION OF *Bacillus sp.* A11 FOR INCREASING CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ACTIVITY.THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI , Ph.D. 112 pp. ISBN 974 - 638 - 395 - 7

Mutation of *Bacillus sp.* A11 to increase CGTase activity was performed by UV exposure and NTG treatment. The optimum conditions of exposure time was 80 seconds and NTG concentration was between 5-100 μg/ml. Primary screening of colonies was the measurement of clear zone on starch containing agar . Secondary screening was by CD-TCE activity assay and Dextrinizing activity assay. After 4 times mutation using alternate treatment between UV and NTG treatment, the best mutant was the strain UNUN-97 which showed Dextrinizing activity and CD-TCE activity 2.2 and 2^2 times higher than wild type, respectively. When comparing cell morphology, *Bacillus sp.* A11 and strain UNUN-97 were not looking different by size, shape, and color when grown on agar medium. But when observed under Scanning Electron Microscope and Transmission Electron Microscope, the length to width ratio of cells of strain UNUN-97 was lower than that of wild type. When both strains were stored at -20 °C for 60 days, strain UNUN-97 was better than the wild type in the ability to keep level of CGTase production.

Properties of CGTases produced by wild type and strain UNUN-97 were compared. Optimum pH for Dextrinizing reaction was pH 6-7 and temperature was 60-65 °C for both strains. The prepared partially purified CGTases when analyzed by PAGE were not different. They demonstrated a single band on non denaturing-gel and two bands on SDS-gel. The molecular weight of the protein bands were estimated to be 70,000 (CGTase band) and 45,000 dalton (other protein). Comparison of specificity to antibody against CGTases of both strains resulted in the same antibody titer of $1:2^5$. HPLC analysis of reaction products catalyzed by CGTases of both strains indicated the same major β-CD product.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการดำเนินงานวิจัยและการหาค่าใช้จ่ายในการวิจัยด้วยดีตลอดมา ตลอดจนได้ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา มงคลกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้กรุณาให้ยืม UV Box

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความกรุณาและคำแนะนำสำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นัยนา ชัยบุตร ที่ได้ให้ความกรุณาและคำแนะนำสำหรับการทำงานผู้ช่วยสอน จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย และฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนผู้ช่วยสอน

ขอขอบคุณ นิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีทางชีวภาพและชีวเคมีทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บุคคลากรงานบริการการศึกษา ฝ่ายทะเบียน คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรักและความเข้าใจ ในการทำงานผู้ช่วยสอน ระหว่างทำการศึกษา จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณภูวพันธ์ บุราคร ที่ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยและกำลังใจ ตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ น้องหมี และงานบริการการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องคอมพิวเตอร์ในการพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณน้า พี่จ้อย ที่เคารพรัก ที่ได้ให้ความรักและการสนับสนุนในด้านการเงิน ตลอดจนน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

บทที่ หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ. ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฑ

คำย่อ..... ณ

บทที่

1.บทนำ..... 1

2.วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ..... 17

2.2 เคมีภัณฑ์..... 18

2.3 วัสดุชีวภาพ..... 18

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย..... 19

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I..... 19

2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi..... 19

2.5 การเตรียมสารละลาย..... 20

2.5.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของ CGTase..... 20

2.5.2 สารละลายสำหรับทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG..... 21

2.5.3 สารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน..... 21

2.5.4 สารละลายสำหรับการทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 21

2.5.5 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส
แบบไม่เสียสภาพ

(Non - denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)..... 22

บทที่ หน้า

2.5.6 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส
แบบเอสดีเอส
(SDS - polyacrylamide gel electrophoresis)..... 23
2.5.7 สารละลายสำหรับการหาความจำเพาะของแอนติบอดี..... 23
2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....24
2.6.1 การเก็บรักษาระยะสั้น..... 24
2.6.2 การเก็บรักษาระยะยาว.....24
2.7 การเลี้ยงเชื้อและศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์.....24
2.7.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น..... 24
2.7.2 การเพาะและติดตามการเจริญของจุลินทรีย์.....24
2.7.3 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ 25
2.8 การชักนำ *Bacillus sp.* A11 ให้เกิดการกลายพันธุ์..... 25
2.8.1 การกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต.....25
2.8.2 การกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยสารเคมี NTG.....26
2.9 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย..... 26
2.9.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ.....26
2.9.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ.....26
2.10 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford.....27
2.11 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย High Performance Liquid
Chromatography (HPLC).....28
2.11.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน..... 28
2.11.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง.....28
2.11.3 สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC..... 28
2.12 การทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 29
2.13 การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส.....29
2.13.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ
(Non - denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)..... 29

บทที่ หน้า

2.13.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis)..... 30
2.14 การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อแอคติวิตีของ CGTase.....31
2.15 การศึกษาความเสถียรและการผลิต CGTase ของเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น.....31
2.16 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์.... 32
2.16.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Transmission Electron Microscope (TEM).....32
2.16.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM).....33
3. ผลการทดลอง
3.1 ลักษณะการเจริญและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11.....34
3.2 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมิกับขั้นทุติยภูมิ..... 34
3.3 การกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย.....42
3.3.1 การหาเวลาที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 42
3.3.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มแอคติวิตีของ CGTase สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต..... 42
3.4 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย.....48
3.4.1 การหาความเข้มข้นของสาร NTG ที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus sp.* A11 ให้เกิดการกลายพันธุ์.....48
3.4.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีแอคติวิตีของ CGTase สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG.....48
3.5 การกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย UN-317 ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต..... 54
3.6 การกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย UNU-178 ซ้ำด้วยสารเคมี NTG..... 54

บทที่ หน้า

3.7 เปรียบเทียบการเจริญและทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายกับ
สายพันธุ์ตั้งต้น.....62
3.7.1 เปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์กลาย.....62
3.7.2 ศึกษาความเสถียรและการผลิต CGTase ของเชื้อสายพันธุ์กลายที่
คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น.....62
3.8 ลักษณะรูปร่างโคโลนีของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง.....70
3.9 ลักษณะเซลล์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (SEM).....70
3.10 ลักษณะเซลล์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (TEM).....73
3.11 สภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาโดย
CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97.....73
3.11.1 ภาวะความเป็นกรด - ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ
CGTase..... 73
3.11.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ
CGTase.....73
3.12 การทำสารละลาย CGTase ที่แยกได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์
กลาย UNUN-97 ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....78
3.13 การเปรียบเทียบ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในด้านความ
จำเพาะต่อแอนติบอดี.....78
3.14 การเปรียบเทียบ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายโดย
โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส.....81
3.14.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ.....81
3.14.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส.....81
3.15 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการย่อยแป้งของ CGTase
จาก สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ด้วย HPLC 84
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....89

บทที่ หน้า

เอกสารอ้างอิง.....102
ภาคผนวก.....106
ประวัติผู้เขียน..... 112

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณสมบัติของ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ 7
2. สารก่อกลายพันธุ์และกลไกในการกลายพันธุ์ 10
3. เปรียบเทียบค่า clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 36
4. เปรียบเทียบค่า clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG 38
5. ผลการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์ *Bacillus sp.* A11 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือก ขั้นปฐมภูมิ 44
6. ค่า clear zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 45
7. ผลการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์ สายพันธุ์กลาย U-86 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือก ขั้นปฐมภูมิ 49
8. ค่า clear zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ U-86 และสายพันธุ์กลาย ที่เกิด จากการกลายพันธุ์ U-86 ด้วยสารเคมี NTG 51
9. ผลการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสง UV ที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์สายพันธุ์ กลาย UN-317 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือก ขั้นปฐมภูมิ 55
10. ค่า clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UN-317 และสายพันธุ์กลาย ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UN-317 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 56
11. ผลการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของ เซลล์สายพันธุ์กลาย UNU-178 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 59

ตารางที่ หน้า

12. ค่า clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UNU-178 และสายพันธุ์กลาย ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UNU-178 ด้วยสารเคมี NTG.....60
13. แอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 64
14. สารละลายเอนไซม์ (Crude CGTase) ที่ได้จากการเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้นและ เชื้อสายพันธุ์กลาย UNUN-97.....64
15. แอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิ -20 °ซ ที่เวลาต่างกัน 65
16. เปอร์เซนต์การลดลงของแอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่ -20 °ซ ที่เวลาต่างกัน.....66

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β- และ γ- CD ตามลำดับ....2
2. การเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทรินกับสารอื่น....3
3. อนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน....4
4. การเกิด thymine dimer และ การเกิด thymine dimer บนโมเลกุลของ DNA.. 12
5. การเกิดปรากฏการณ์ photoreactivation....12
6. การเปลี่ยนของ guanine เป็น O^6- ethylguanine เมื่อใช้ Ethylmethane sulfonate และ O^6 - ethylguanine จับคู่ base pair กับ Thymine.... 14
7. ผลของ alkylation ทำให้เกิดการดึงเบสกวานีนออก เมื่อ DNA จำลองตัว จึงเกิดการกลายพันธุ์แบบ transition หรือ transversion....14
8. ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของ CGTase ของ *Bacillus sp.* A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi ที่อุณหภูมิ 37 °ซ....35
9. ความสัมพันธ์ระหว่าง clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต....40
10. ความสัมพันธ์ระหว่าง clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยสารเคมี NTG 41
11. เปอร์เซนต์การอยู่รอด *Bacillus sp.* A11 หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต....43
12. เปอร์เซนต์การอยู่รอดของ *Bacillus sp.* A11 หลังจากถูกชักนำให้เกิดการ กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 50
13. เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้กับสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ....63
14. แอคติวิตี CGTase ของ *Bacillus sp.*A11 และสายพันธุ์กลาย เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ....67

รูปที่ หน้า

15. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิโดยการวัดความกว้างวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °ซ แล้วราดทับด้วยไอโอดีนรีเอเจนต์.....69
16. ลักษณะเซลล์ที่เจริญบนอาหารแข็ง Horikoshi เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 71
17. ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (SEM) กำลังขยาย 7,500 เท่า.....72
18. ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน Transmission Electron Microscope (TEM) กำลังขยาย 15,000 เท่า.....74
19. ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน Transmission Electron Microscope (TEM) กำลังขยาย 109,500 เท่า.....75
20. ภาวะความเป็นกรด - ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase.....76
21. ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Crude CGTase.....77
22. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CGTase โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน.....79
23. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี อิมมูโนดิฟฟิวชัน.....80
24. รูปแบบของโปรตีน แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ.....82
25. รูปแบบของโปรตีน แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส.....83
26. HPLC โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากการตกตะกอนด้วย TCE.....85
27. HPLC โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน.....87

คำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส
% = เปอร์เซนต์
rpm = จำนวนรอบต่อนาที
ml = มิลลิลิตร
μg = ไมโครกรัม
mg = มิลลิกรัม
mM = มิลลิโมลาร์
M = โมลาร์
TEMED = N′N-tetramethylethylenediamine
NTG = N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine
UV = Ultraviolet
CD = Cyclodextrin
CGTase = Cyclodextrin glycosyltransferase
s = Second