การกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้างเดกซ์แทรนเนส

นางสาว สุหัทยา จิระนันทิพร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาคจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0745-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION OF *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 FOR ENHANCING DEXTRANASE PRODUCTION

Miss Suhuttaya Jiranuntipon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-0745-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้างเดกซ์แทรนเนส
โดย	นางสาว สุหัทยา จิระนันทิพร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……...……คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

……..อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

……..กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุหัทยา จิระนันทิพร : การกลายพันธุ์ Arthrobacter sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้างเดกซ์แทรนเนส. (MUTATION OF *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 FOR ENHANCING DEXTRANASE PRODUCTION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 137 หน้า. ISBN 974-13-0745-4

แบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่คัดแยกได้จากดิน จ.นนทบุรี มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ และให้แอคติวิตีเท่ากับ 2.446 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี ประกอบกับการทำ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย AG-2 นี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Arthrobacter* sp. หลังทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจำนวน 3 รอบ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลาย CU15 ซึ่งให้แอคติวิตีเท่ากับ 3.201 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการกลายพันธุ์ต่อด้วย NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-60 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 4 รอบ ได้สายพันธุ์กลาย CUN4-10 ซึ่งให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 4.530 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เชื้อนี้มีความเสถียรที่ไม่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CUN26 ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบและสาร NTG 1 รอบ พบว่าเชื้อมีความเสถียรที่ดีคือ ความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสไม่ลดลงหลังการถ่ายเชื้อครบ 30 ครั้ง เมื่อทำการปรับปรุงสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดยสายพันธุ์ CUN26 สามารถทำให้การผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นได้ 2.50 เท่า โดยจะมีแอคติวิตีเท่ากับ 6.276 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ที่ 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด โดยเอนไซม์จะมีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงกว้างคือ 5.0-9.0 เสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส และมีค่า *Km* เท่ากับ 2.796 ไมโครโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

KEY WORD: *Arthrobacter* sp. / DEXTRANASE / MUTAGENESIS / UV LIGHT / NTG

SUHUTTAYA JIRANUNTIPON : MUTATION OF *Arthrobacter* sp. STRAIN AG-2 FOR ENHANCING DEXTRANASE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS COADVISOR : SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., 137 pp. ISBN 974-13-0745-4

The bacterium AG-2 originally isolated from soil sample in Nontaburi province was capable of producing dextranase at 2.446 units/ml. The strain was classified by morphological and biochemical characteristics including 16S rRNA gene sequencing as *Arthrobacter* sp. After 3 rounds of UV exposure for 80-120 sec, a mutant strain designated CU15 was isolated that capable of producing dextranase at 3.201 unit/ml. Further treatment of cell suspension thereof with 50 μg/ml of NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) for 5-60 min at 37°C, yielded in a number of mutants with high dextranase activities after four rounds of treatment. The highest producing strain, CUN4-10, gave the dextranase activity of 4.530 units/ml. However, this organism failed to showed its stability toward dextranase production meanwhile strain CUN26, obtained 3 rounds of UV exposure and 1 round of NTG treatment respectively, was quite stable by giving approximately the same dextranase activity after 30 rounds of subculture. Under the optimal conditions for dextranase production, strain CUN26 was able to produce 6.276 units of dextranase per ml, or a 2.50-fold increase after appropiate mutation and medium optimization. Optimal conditions for dextranase activity were at 50°C, pH 6.5 in 0.05 M phosphate buffer. The enzyme produced exhibit stability to pH from 5.0 to 9.0 and to temperature up to 45°C. The enzyme had an apparent *Km* value for dextran T-2000 of 2.796 μM.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature.....

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature.....

Academic year 2000 Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนกำลังใจที่ผู้วิจัยได้รับมาตลอด อีกทั้งได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ และคำแนะนำต่างๆที่ผู้วิจัยได้รับมาตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และอาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุก ๆ ท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุน ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สุหัทยา จิระนันทิพร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……ซ
สารบัญรูป……ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ……ฒ
บทที่
1. บทนำ……1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย……31
3. ผลการทดลอง……43
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง……104
รายการอ้างอิง……114
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก……123
ภาคผนวก ข……125
ภาคผนวก ค……128
ภาคผนวก ง……134
ภาคผนวก จ……136
ประวัติผู้เขียน……137

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 แบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ……6
2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส……..10
3 อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของจีโนมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ……17
4 แสดงการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี……..29
5 การแปรผันปริมาณแอมโมเนียมและทริปโตนเริ่มต้น……...40
6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ……..45
7 ผลการศึกษาด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2……..45
8 จำนวนโคโลนีที่รอดและร้อยละการรอดของ AG-2 ภายหลังการฉายแสง
อัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร……53
9 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น AG-2 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ……55
10 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ผ่าน
การฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ……..56
11 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น AU3กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ……..58
12 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ผ่าน
การฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ……..59
13 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น
BU5กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ……61
14 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการ
ฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ……62
15 จำนวนโคโลนีที่รอด และร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. CU15 ภายหลัง
การกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร……...63
16 จำนวนโคโลนีที่รอด และร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. CU15 ภายหลัง
การกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ……65
17 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น CU15 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ

ชักนำด้วยสาร NTG 1 รอบ……...67
18 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้หลัง
จากการชักนำด้วย NTG รอบที่ 1……..69
19 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น CUN26 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ
ชักนำด้วยสาร NTG รอบที่ 2……70
20 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้หลังจาก
การชักนำด้วย NTG รอบที่ 2……71
21 จำนวนโคโลนีที่รอด และร้อยละการรอดของ CUN2-5 ภายหลังการกลายพันธุ์
ด้วย NTG 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร……72
22 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น CUN2-5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ
และชักนำด้วยสาร NTG รอบที่ 3 ……74
23 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้หลังจาก
การชักนำด้วย NTG รอบที่ 3……75
24 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์
ตั้งต้น CUN3-1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ
และชักนำด้วยสาร NTG รอบที่ 4……77
25 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้หลังจาก
การชักนำด้วย NTG รอบที่ 4……78
26 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย CUN26
และ CUN4-10ที่ได้หลังจากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG……..79
27 การหาปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp.
CUN26……81
28 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26…...83
29 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย
Arthrobacter sp. CUN26……85
30 เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีของสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์
กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเหลว Yamaguchi……85
31 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp.
CUN26……87
32 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp.

CUN26……88
33 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……..90
34 ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……...91
35 เปรียบเทียบสูตรอาหารเดิม สภาวะเดิม กับสูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง
ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……92
36 เปรียบเทียบแอคติวิตี โปรตีน และแอคติวิตีจำเพาะระหว่าง *Arthrobacter* sp. AG-2
สายพันธุ์ตั้งต้น, *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม
และ *Arthrobacter* sp. CUN26สายพันธุ์กลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง……95
37 สมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น และ
สายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่ได้จากการกลายพันธุ์ ……..103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 การเกาะของแบคทีเรียกับฟัน……..3
2 โครงสร้างของเดกซ์แทรน……..4
3 แสดงกระบวนการเกิดฟันผุ……4
4 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดฟันผุและกระบวนการเกิดฟันผุ……5
5 การเกิดทรานซิชันและทรานสเวอร์ชัน……15
6 การเกิดเฟรมชิฟมิวเทชัน……...16
7 การเกิดไทมีนไดเมอร์จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต……19
8 ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต……20
9 การซ่อมแซมแบบ Excision ในจุลินทรีย์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต……..21
10 กระบวนการ SOS repair ที่มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์……..22
11 การกลายพันธุ์เนื่องจากเบสอะนาล็อค 5-BU และ 2-AP……..23
12 ผลของกรดไนตรัสที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของเบส……..24
13 ผลของไฮดรอกซีลามีนต่อโมเลกุลของไซโตซีน……25
14 ผลของเอธิลอีเทนซัลโฟเนต หรือ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต ต่อโมเลกุลเบสกัวนีน……..25
15 โครงสร้างของ Proflavin และ Acridine orange……..26
16 การกลายพันธุ์เนื่องจากการแทรกตัวของสารเคมีในกลุ่มสารที่เข้าแทรกตัว……27
17 โครงสร้างของ NTG……28
18 ผลของ NTG ต่อเบสกัวนีน และไทมีน……28
19 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 บนอาหารแข็ง Brain heart infusion…….43
20 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ใต้กล้องจุลทรรศน์……44
21 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด……44
22 ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2……...48
23 Phylogenic tree ของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2……49
24 ผลการเพิ่มเกลือต่อความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2……50

25 แสดงการเจริญของเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร……51
26 รูปแบบการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ……..52
27 ร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ผ่านการฉายแสง UV ที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ……54
28 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ CU15 หลังการบ่มร่วมกับสาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที……64
29 ร้อยละการรอดของ CU15 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ ……66
30 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ CUN2-5 หลังการบ่มร่วมกับสาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที……73
31 รูปแบบการเจริญ และการสร้างเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……..80
32 การแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……82
33 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* .. sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส……83
34 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ CUN26……...86
35 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26……..87
36 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลายกลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……89
37 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส ……90
38 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส……91

39 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเลี้ยงสูตรเดิม สภาวะเดิม กับสูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง……93
40 เปรียบเทียบแอคติวิตี โปรตีน และแอคติวิตีจำเพาะระหว่าง *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น, *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง……96
41 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ……97
42 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส……..98
43 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26…….99
44 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ……...100
45 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก เชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……...101
46 กราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp CUN26 สายพันธุ์กลาย…….102
47 ลำดับขั้นตอนการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสาร NTG ได้สายพันธุ์กลาย CUN4-10……...107
48 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร……...128
49 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร…..…….129
50 ร้อยละการรอดของ AU3 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ…….130
51 ร้อยละการรอดของ BU5 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ…….131
52 ร้อยละการรอดของ CUN26 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ……..132

53 ร้อยละการรอดของ CUN3-1 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ……..133
54 รูปแสดงการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยการดูความสามารถในการให้บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi ที่มีการเททับด้วยเอธานอล……134
55 รูปความกว้างของบริเวณใสบนอาหารที่มีบลูเดกซ์แทรน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26……135

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
Act.	=	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
S.A.	=	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)
Protein	=	โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

สุขภาพช่องปากมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อร่างกาย เนื่องจากช่องปากเป็นแหล่งที่พบการติดเชื้อได้บ่อยที่สุดแหล่งหนึ่ง การติดเชื้อของช่องปากส่วนใหญ่มักเกิดกับฟัน การติดเชื้อนี้สามารถลุกลามไปยังบริเวณใกล้เคียง ได้แก่ ใบหน้าและคอ หรือลุกลามไกลออกไปจากแหล่งติดเชื้อเข้าสู่ภายในกะโหลกศรีษะหรือลงสู่ช่วงอก ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายกับผู้ป่วยได้ (Schuster, 1983)

ช่องปากแม้จะมีพื้นที่เล็กเมื่อเทียบกับร่างกาย แต่มีหน้าที่ที่สำคัญคือ เป็นทางนำอาหารเข้าสู่ร่างกายและทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารเพื่อให้ย่อยง่ายขึ้นก่อนการย่อยต่อที่กระเพาะและลำไส้ เนื่องจากช่องปากเป็นที่กักเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้จำนวนมาก จึงสามารถติดเชื้อและก่อโรคได้หลายชนิด เช่น แผลชนิดต่างๆ มะเร็ง ฟันผุ และโรคปริทันต์ และยังก่อปัญหาด้านกลิ่นปาก ซึ่งอาจเกิดจากในปากเอง หรือทางเดินอาหาร และทางเดินหายใจ ปัจจุบันพบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้กับช่องปากจำนวนมาก ทำความร่ำรวยให้กับผู้ผลิตมากมาย ที่รู้จักกันมากที่สุดก็คงเป็นยาสีฟัน ยาบ้วนปาก และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทำความสะอาดฟัน ได้แก่ แปรงสีฟันชนิดต่างๆ ไม้จิ้มฟัน ด้ายขัดฟัน และอื่นๆ จุดมุ่งหมายของการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ก็เพื่อ กำจัดสิ่งสกปรก ให้มีฟันที่ขาวสะอาด ไม่มีกลิ่นปาก มีเหงือกที่แข็งแรง ไม่มีโรคปริทันต์ และไม่เกิดฟันผุ โรคปริทันต์และโรคฟันผุจัดเป็นปัญหาที่สำคัญของคนทั่วไปเนื่องจากบั่นทอนสุขภาพของร่างกาย นำความเจ็บปวดมาสู่ผู้ป่วยแล้วยังทำให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจอีกด้วย

จุลินทรีย์ในช่องปาก

ตามปกติภายในช่องปากจะมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก มีทั้งแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) และไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobes) แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) สไปโรขีด (spirochete) ฟิวซิฟอร์ม แบซิไล (fusiform bacilli) แลคโตแบซิไล (lactobacilli) และสเตรปโตคอกไค (streptococci) โดยสองชนิดหลังนี้มีบทบาทที่สำคัญต่อการก่อให้เกิดฟันผุ (Burnett และ Scherp, 1962; Melville และ Russell, 1981)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อยู่ในช่องปากจะมีบทบาทเสริมหรือต้านซึ่งกันและกัน ทำให้ช่องปากคงสภาพปกติ ไม่เกิดโรค ตราบเท่าที่มีความสมดุลของปริมาณและสัดส่วนของจุลินทรีย์ในช่องปาก แต่หากมีภาวะที่ทำให้จุลินทรีย์ในช่องปากเกิดความไม่สมดุล เช่นเกิดการเจริญของแบคทีเรียตัวใดตัวหนึ่งมากกว่าปกติ จุลินทรีย์ที่ปกติไม่ก่อโรค ก็อาจทำให้เกิดโรคได้ จุลินทรีย์ในช่องปากที่มีความสำคัญในด้านนี้คือ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ ได้แก่พวกที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ (Macfarlane และคณะ, 1999)

โรคในช่องปากที่พบและเป็นปัญหามาก คือ โรคฟันผุ ซึ่งเกิดจากคราบจุลินทรีย์ (microbial plaque)

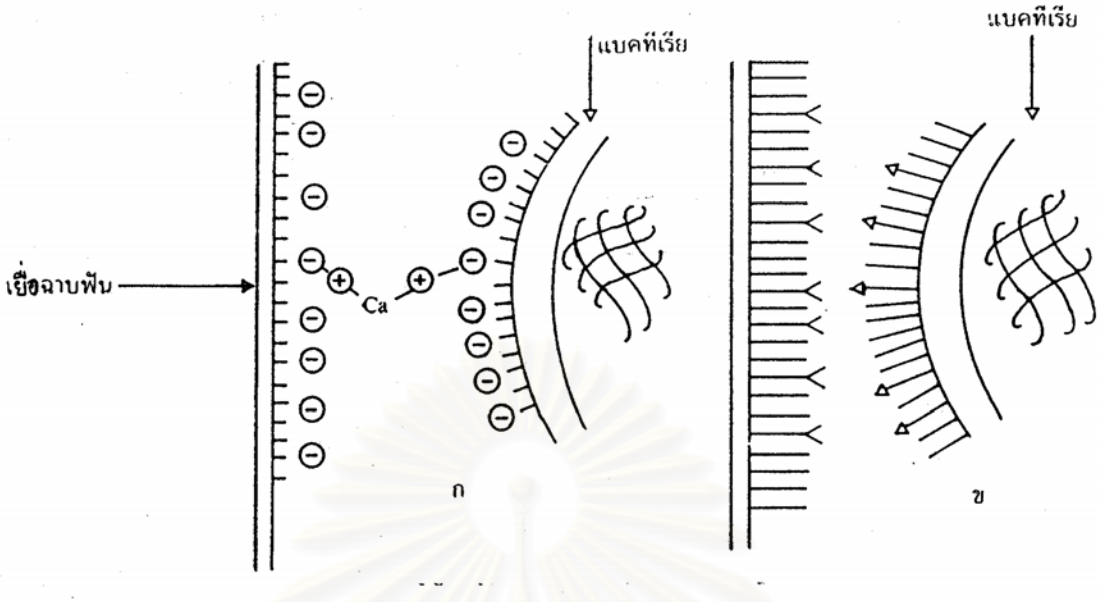
คราบจุลินทรีย์ (Noltel, 1973; Wolinsky, 1988)

หมายถึงแผ่นคราบบนผิวฟันที่มีจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ที่เหลือเป็นพวกสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ มีลักษณะ นุ่ม หนืด ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน คราบจุลินทรีย์เกิดได้ทุกๆ แห่งในปากโดยเฉพาะ บนส่วนที่แข็ง ไม่ค่อยเคลื่อนไหว ลิ้นกวาดไปไม่ถึงและทำความสะอาดไม่ได้เพียงพอ เช่นบนผิวฟัน ซอกฟัน ฟันปลอม และบนวัสดุอุดฟัน คราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นนี้จะพบว่าประกอบด้วยแบคทีเรียต่างชนิดกันไป และคราบจุลินทรีย์นี้มีแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ บางครั้งอาจเรียกว่า คราบแบคทีเรีย หรือคราบฟัน (dental plaque) ประกอบด้วยแบคทีเรีย ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญได้แก่พวก Streptococcus, Actinomyces, Neisseria และ Bacteroids นอกจากนี้ก็จะมีรา โปรโตซัว และไวรัสเล็กน้อย ในระยะเริ่มของคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือกลุ่มของ Streptococcus ซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ และเป็นสาเหตุให้เกิดฟันผุ อย่างไรก็ตามสัดส่วนของจุลินทรีย์ในคราบฟันนี้จะแตกต่างกันไปตามความเก่าและตำแหน่งของคราบจุลินทรีย์

การสร้างคราบจุลินทรีย์ (Hamada และ Slade, 1980; Gibbons และ Van Houte, 1980)

คราบจุลินทรีย์จะประกอบด้วย เยื่อฉาบฟัน แบคทีเรีย และอาหาร ที่สำคัญคือโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต แบ่งการเกิดคราบจุลินทรีย์เป็น 2 ระยะ คือ

1. การเกาะของแบคทีเรียกับฟัน โดยแบคทีเรียจะต้องมีการยึดให้คงอยู่กับฟันแล้วจึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน วิธีการเกาะของแบคทีเรียกับฟันมี 2 วิธีคือ วิธีแรกคืออาศัยอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic interaction) โดยปกติผิวของฟันที่แห้งและสะอาดจะมีประจุลบ โปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียก็จะมีประจุเป็นลบ การยึดจะต้องมีไอออนบวกเป็นสะพานซึ่งไอออนนั้นก็คือแคลเซียม (รูปที่ 1) ในการยึดให้ติดแน่นนั้นแบคทีเรียจะต้องใช้ส่วนของเซลล์ (appendages) ยื่นออกมาช่วยจับกับผิวฟันอีกแรงหนึ่งด้วย วิธีที่ 2 คือบนผิวของฟันจะมีหน่วยรับ (receptor) ซึ่งจะยึดได้พอเหมาะกับโปรตีนที่อยู่บนผิวของแบคทีเรีย เป็นแบบแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเกาะของแบคทีเรียกับฟัน ก. โดยมีแคลเซียมเป็นสะพาน, ข. โดยวิธีแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (พวงเพ็ชร เดชะประทุมวัน, 2536)

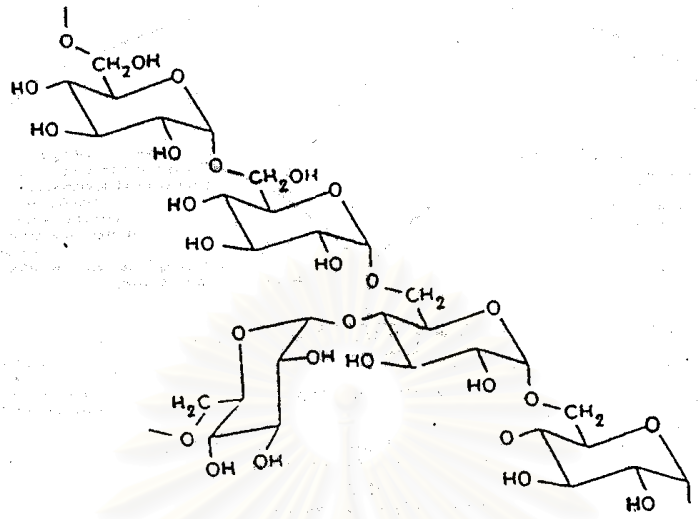
2. การแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของแบคทีเรีย และ การขยายตัวเป็นคราบจุลินทรีย์บนฟัน

ในระยะแรกแบคทีเรียจะเริ่มแบ่งตัวเรียงต่อกันเป็นเซลล์ชั้นเดียว เรียงเซลล์ต่อเซลล์ หรือมีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มเล็กๆ ซึ่งการแบ่งตัวนี้จะเกิดได้ในเวลา 2-3 ชั่วโมง แบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus จะเจริญได้ดีและเร็ว โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus mutans* แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase) หรือ เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสหรืออีกชื่อหนึ่งคือเดกซ์แทรน พร้อมกับปลดปล่อยฟรักโทสอิสระออกมาด้วย (Cole,1977; Van Houte และ Russo,1986) ดังสมการนี้

$$\text{n-Sucrose} \xrightarrow{\text{dextransucrase หรือ GTF}} [\text{D-Glucose}]_n + \text{n [Fructose]}$$

เดกซ์แทรนเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของกลูโคสที่มีหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคสิดิก นอกจากนี้เดกซ์แทรนยังมีสายที่แตกแขนงออกไปจากสายหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3-ไกลโคสิดิกด้วย (รูปที่ 2) ประกอบกับน้ำหนักโมเลกุลที่สูงจึงทำให้เดกซ์แทรนละลายน้ำยากและมีลักษณะเหนียวหนืดสามารถจับกับผิวฟันได้ และลักษณะเหนียวนี้ยังทำหน้าที่เป็นกาวยึดคราบจุลินทรีย์ให้ติดกับฟันด้วย นอกจากนั้นเดกซ์แทรนเหล่านี้ยังจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารต่างๆเข้าไว้ด้วยทำให้เกิดเป็นคราบฟัน (plaques) ส่งผลให้จุลินทรีย์ต่างๆจับเกาะบนผิวฟัน

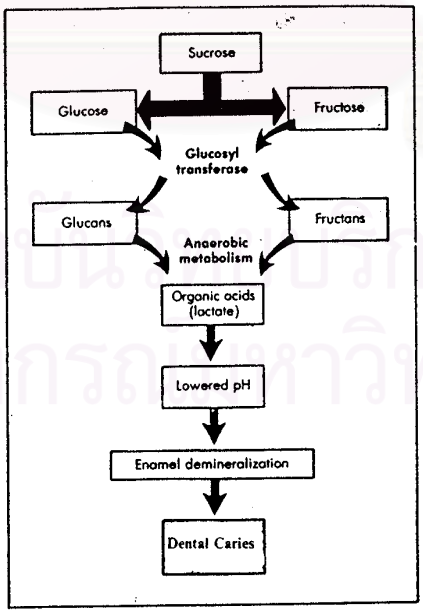
ได้เพิ่มมากขึ้น และยังเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรียนอกเหนือจากอาหารที่ได้จากภายนอก (Guggenheim, 1970)



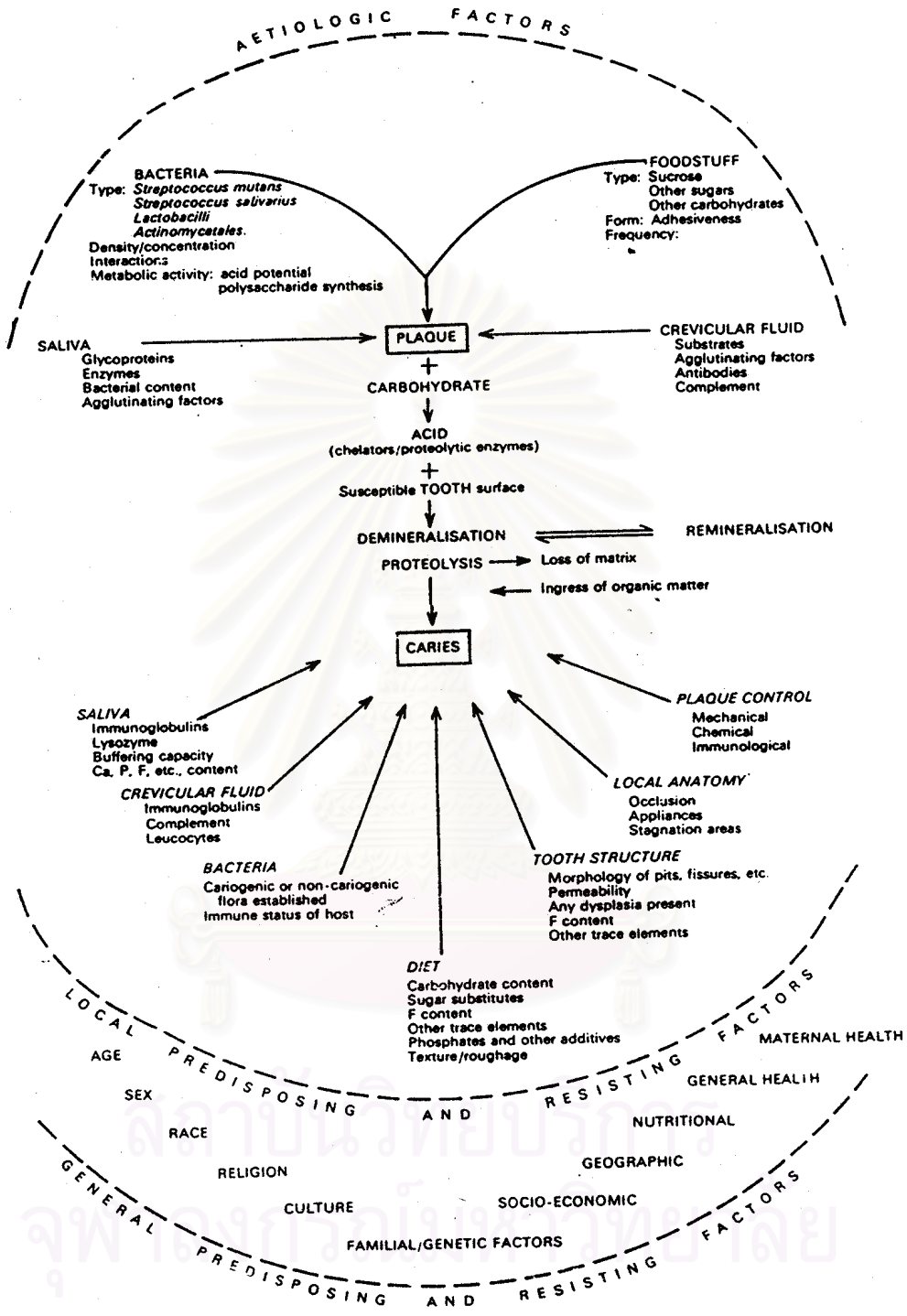
รูปที่ 2 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Glazer และ Nikaido, 1995)

คราบจุลินทรีย์และฟันผุ

ฟันผุเกิดจากคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์จะสร้างกรดอินทรีย์หลายชนิด กรดที่สำคัญคือ กรดแลคติค ซึ่งกรดนี้สามารถสลายอะพาไทต์ที่เคลือบฟันและเนื้อฟัน โดยกระบวนการ demineralization ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อฟันที่เรียกว่า ฟันผุ (รูปที่ 3 และ 4)



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการเกิดฟันผุ (Silverstone และคณะ, 1981)



รูปที่ 4 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดฟันผุและกระบวนการเกิดฟันผุ (Silverstone และคณะ, 1981)

แบคทีเรียหลายพันธุ์ในคราบจุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้เมื่อมี คาร์โบไฮเดรต จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญมาก คือ *Streptococcus mutans* และ Lactobacilli สำหรับ *Streptococcus mutans* นั้นพบว่ามีความสามารถในการผลิตกรดได้อย่างรวดเร็ว และยังสร้างเดกซ์แทรนทำให้จับกับแบคทีเรียอื่นๆได้ เดกซ์แทรนนี้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานให้แก่แบคทีเรียด้วย (McGhee และ Michalek, 1981) ความเป็นกรดของคราบจุลินทรีย์นั้นพบว่าก่อนรับประทานอาหารจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5-7 หลังจากรับประทานอาหารค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็ว และจะมีระยะหนึ่งที่จะมีค่าต่ำกว่า 5.5 ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเคลือบฟัน เรียกค่าความเป็นกรด-ด่างนี้ว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างวิกฤติ (critical pH) การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างจะมากหรือน้อยขึ้นกับอาหารที่รับประทาน ถ้าเป็นพวกน้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็ว และมีค่าต่ำมาก ทำให้เคลือบฟันอ่อนตัวและสลายออกมาได้ง่ายเรียกว่า demineralization เมื่อมีความกว้างและลึกมากขึ้นก็จะกลายเป็นฟันผุในเวลาต่อมา (Burnett และ Scherp, 1962; Schachtele, 1982)

แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้ช้าหรือเร็ว มากน้อยต่างกัน พวก Streptococci, Lactobacilli, Actinomyces และยีสต์ จะเป็นพวกที่สามารถสร้างกรดได้มาก โดยเฉพาะ Streptococci จะสร้างกรดได้มากและเร็วกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ (Loeache, 1986) ในคนที่มีอัตราการเกิดฟันผุสูงจะพบปริมาณของ *Streptococcus mutans* ในน้ำลายและในคราบจุลินทรีย์สูงกว่าในคนที่มีอัตราการเกิดฟันผุต่ำ ฟันผุในคนไม่ได้เกิดจากแบคทีเรียชนิดเดียว เป็นการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียหลายชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ (จิรพันธ์ พันธ์วุฒิกร, 2542)

แบคทีเรียชนิดพึ่งออกซิเจน	แบคทีเรียชนิดไม่พึ่งออกซิเจน
แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม	แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม
Streptococcus pyogenes	*Streptococcus* sp.
Streptococcus viridans	*Peptostreptococcus* sp.
Streptococcus mutans	*Peptostreptococcus anaerobius*
Streptococcus salivarius	*Peptostreptococcus micros*
Streptococcus milleri	*Peptococcus* sp.
Streptococcus intermedius	
Streptococcus sanguis	
Streptococcus mitis	
Streptococcus pneumoniae	
Enterococcus faecalis	

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ (จิรพันธ์ พันธ์วุฒิกร, 2542) (ต่อ)

แบคทีเรียชนิดพึ่งออกซิเจน	แบคทีเรียชนิดไม่พึ่งออกซิเจน
แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม	
Staphylococcus epidermidis	
Staphylococcus aureus	
แบคทีเรียแกรมลบรูปกลม	แบคทีเรียแกรมลบรูปกลม
Moraxella	*Veillonella paruvia*
Neisseria sp.	
แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง	แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง
Lactobacillus sp.	*Actinomyces* sp.
Corynebacterium	*Actinomyces israelii*
	Bifidobacterium sp.
	Lactobacillus sp.
	Eubacterium sp.
แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง	แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง
Klebsiella-Enterobacter sp.	*Prevotella* sp.
Escherichia coli	*Porphyromonas* sp.
Eikenella	*Bacteroides* sp.
	Fusobacterium nucleatum
	Leptotrichia buccalis
	Capnocytophaga sp.

เมื่อคนบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลเข้าไป โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสที่รู้จักกันในชื่อ น้ำตาลทราย จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและกักในคราบฟันจะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน จากนั้นปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมา เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติค และกรดโปรพิออนิค เป็นต้น ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้จะไปกัดกร่อนเคลือบฟันและผิวฟัน (demineralization) ทำให้เกิดฟันผุในที่สุด (Melville และ Russell,1981; Thytrup และ Fejerkov,1986)

สำหรับน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายนั้นมักนิยมนำมาใช้ในการปรุงอาหารชนิดต่างๆ มากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น เนื่องจากราคาถูก หาง่ายและมีรสชาดเป็นที่ถูกใจ นอกจากนี้ในประเทศไทยนั้นน้ำตาลทรายเกือบทั้งหมดได้มาจากอ้อยซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจราคาถูกในประเทศด้วย ดังนั้นจึงยังพบปัญหาของฟันผุในกลุ่มประชากรโดยตลอด

การป้องกันฟันผุ

มีหลักการสำคัญ คือ การเพิ่มความต้านทานให้กับฟัน การป้องกันการเกิดกรดในคราบฟัน และการควบคุมจุลินทรีย์ในคราบฟัน โดยวิธีการป้องกันฟันผุนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี (Macfarlane และคณะ, 1999)

1. การใช้สารฟลูออไรด์ (Wolinsky, 1988; Burnett และ Schuster, 1978) โดยมีใช้กันมานานและใช้กันอย่างแพร่หลาย มักใช้ในรูปของการเติมลงในน้ำดื่มและผสมในยาสีฟัน โดยกลไกในการลดฟันผุ คือจะช่วยเพิ่มความทนทานของเคลือบฟันต่อกรด โดยฟลูออไรด์จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซี ของไฮดรอกซีอะพาไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของฟัน เกิดเป็นฟลูออโรอะพาไทด์ที่แข็งแรงและทนต่อการละลายในกรด และฟลูออไรด์ยังมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อีนอลเลส (enolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเปลี่ยนกรดฟอสโฟกลีเซอริคเป็นฟอสโฟอีนอลไพรูเวท ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคต่อไป และยังสามารถยับยั้งการซึมของน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่มีการสังเคราะห์ไกลโคเจนภายในเซลล์ได้จึงทำให้อัตราการเกิดฟันผุลดลง การใช้ฟลูออไรด์มากเกินไปอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ ผลพิษของฟลูออไรด์มีทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง ชนิดเฉียบพลันนั้นพบน้อย อาการที่พบมักเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร โดยจะมีการระคายเคืองทางเดินอาหาร และกระเพาะอาหาร ทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดกล้ามเนื้อ และในเด็กอาจถึงแก่ชีวิตได้ สำหรับชนิดเรื้อรังนั้น จะทำให้ฟันตกกระ (fluosis) เกิดรอยด่างดำบนฟัน ฟันด้านขาดความเงางาม มีจุดขาว มีจุดเป็นกระเป็นทางบนฟัน กระดูกหยาบ กระดูกงุ้มงอ โดยเฉพาะที่หลังและขา อาจมีอาการทางประสาทร่วมด้วย

2. การใช้น้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารซับสเตรตของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส เป็นแหล่งให้ความหวาน เช่น การใช้น้ำตาล sorbitol และ xylitol (Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981) ผสมลงในอาหารและหมากฝรั่ง แต่ยังมีปัญหาในเรื่องของรสชาดและราคาแพง นอกจากนี้ยังมีการนำเอา saccharin และ cyclamate มาใช้ด้วยแต่สารทั้งสองชนิดนี้เป็นอันตรายต่อร่างกายต่อมาจึงห้ามใช้ นอกจากนี้ยังมีการนำสารพวกโปรตีน หรือกรดอะมิโนที่มีความหวานมาใช้แทนน้ำตาลทราย เช่น monellin และ aspartame (ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2540) แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้ในอุณหภูมิสูงได้เนื่องจากความร้อนจะทำลายโปรตีนซึ่งจะทำให้สูญเสียความหวานไปในที่สุด

3. การใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งที่เป็นยาปฏิชีวนะและสารสำหรับฆ่าเชื้อ การเลือกยาปฏิชีวนะที่ใช้นั้นควรเลือกยาที่ใช้ได้ผลอย่างกว้างขวาง เช่น penicillin, tetracyclin, erythromycin, cephalothin และ bacitracin เป็นต้น (Burnett และ Schuster, 1978; Melville และ Russell, 1981) แต่มีพึงระวังคือผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา เช่น การแพ้ยา หรือการดื้อยาของเชื้อ

สารฆ่าเชื้อที่ใช้กันมากคือ คลอเฮกซิดิน (chlohexidine) ที่ใช้เป็นน้ำยาบ้วนปาก (Wolinsky, 1988; Melville และ Russell, 1981) ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือคลอเฮกซิดิน

จะรวมกับผิวเซลล์ของแบคทีเรีย โดยคลอเฮกซิดีนมีประจุบวกจะจับกับฟอสเฟตของกรดไตโคอิก (teichoic acid) ของแบคทีเรียแกรมบวก และฟอสเฟตในไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ในแบคทีเรียแกรมลบ แต่ข้อเสียของคลอเฮกดีนคือมีรสขมมาก บางครั้งอาจทำให้ตุ่มรับรสผิดปกติไปหลังใช้อมบ้วนปาก และคลอเฮกซิดีนยังทำให้เกิดคราบสีบนฟัน, ลิ้น, ฟันปลอม ซึ่งจะมีสีเหลือง น้ำตาล จนถึงดำ คราบสีนี้การแปรงฟันธรรมดาไม่สามารถกำจัดออกได้หมด (พวงเพ็ชร เดชะประทุมวัน, 2536)

4. การใช้วัคซีน โดยการนำเอาเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ของเชื้อ *Streptococcus mutans* ไปทำวัคซีนและฉีดเข้าไปในร่างกายของคนและสัตว์ทดลอง เพื่อดูผลการต่อต้านฟันผุ (Montville และคณะ, 1978; Hamada และ Slade, 1980) แต่ปัญหาของการใช้วัคซีนคือ เซลล์ของเชื้อมีหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีออกมา แอนติบอดีเหล่านี้จะทำให้เกิด cross reaction กับกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบได้ (myocarditis) ซึ่งเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้

5. การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส เช่น น้ำตาลฟรักโทส และ pyridoxal-5-phosphate เป็นต้น (Bowen, 1978) แต่สารส่วนใหญ่ที่พบยังไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอและต้องใช้ในปริมาณสูง

6. การใช้สารเคลือบฟันไม่ให้เกิดการจับเกาะเบื้องต้น เช่น สเปอร์มีน (spermine) และสารพวกเลคติน (Hamada และ Slade, 1980) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถจับเกาะได้ แต่วิธีนี้ยังไม่ได้ผลที่ดีนัก

7. การใช้เดกซ์แทรนเนส (Burnett และ Scherp, 1962; Hamada และ Slade, 1980; Melville และ Russell, 1981; Schachtete, 1982) การใช้เดกซ์แทรนเนสย่อยพอลิแซคคาร์ไรด์ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเซลล์แบคทีเรียขับออกมาและลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนฟันลง ข้อดีของการนำเอนไซม์นี้มาใช้ (Barrett, 1986) คือ

- สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ละลาย และไม่ละลายน้ำได้
- ยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำได้
- มีผลต่อการทำงานและผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส
- สามารถลดการรวมตัวกันของเซลล์ *Streptococcus mutans*
- ยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์ *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง

จากเหตุผลดังกล่าว เดกซ์แทรนเนสจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการป้องกันฟันผุ

เดกซ์แทรนเนส

เป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบการเรียกชื่อเอนไซม์ว่า α-1,6-glucan-6-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.11 จัดเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) ของ

เดกซ์แทรน เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะ แอลฟา-1,6 และพันธะ แอลฟา –1,3 ที่เชื่อมหน่วยย่อยของกลูโคสในสายเดกซ์แทรน โดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะที่เชื่อมหน่วยของกลูโคสจากปลายด้านหนึ่งแล้วตัดเข้าไปทีละโมเลกุลซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบ exo- หรืออาจย่อยที่จุดใดจุดหนึ่งบนสายเดกซ์แทรนซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบ endo- ทำให้ได้สายเดกซ์แทรนที่สั้นลง รูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ย่อยได้อาจเป็นโอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสก็ได้

แหล่งที่พบเดกซ์แทรนเนสนี้ พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด และจากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ทั้งเชื้อ รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส ดังแสดงในตารางที่ 2

เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียส่วนมากจะมีปฏิกิริยาการย่อยแบบ exo- ดังนั้นสายเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส (Forgarty และ Kelly, 1984) ออกมาและมีผลทำให้ลดการเกาะติดของแบคทีเรียบนฟันลง ส่งผลให้อัตราการเกิดคราบฟันและฟันผุลดลงด้วย

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
Achromobacter sp.	Sawai และคณะ, 1974
Arthrobacter sp.	Kubo และคณะ, 1993
Arthrobacter globiformis	Iwai และคณะ, 1996
Bacillus circulan	Okami และคณะ, 1980; Okami, 1986
Bacillus megaterium	Zevenhuizen, 1968
Bacillus subtilis	Zevenhuizen, 1968
Bacteroides sp.	Staat และคณะ, 1973; Staat และ Schachtele, 1976
Bacteroides melaninogenicus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides ochraceus	Schachtele, 1975; Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides oralis	Takahashi, 1982; Wynter และคณะ, 1995
Bacteroides ovatus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides thetaiotaomicron	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bifidobacterium sp.	Kaster และ Brown, 1983
Brevibacterium sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1983
Brevibacterium fuscum	Sugiura และ Ito, 1975
Brevibacterium fuscum var dextranlyticum	Mizuno และคณะ, 1999
Capnocytophaga ochracea	Igarashi และคณะ, 1998

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Capnocytophaga sputigena	Igarashi และคณะ, 1998
Cellovibrio fulva	Forgarty และ Kelly, 1984
Cellovibrio mixtus	Wynter และคณะ, 1995
Cytophagus johnsonii	Forgarty และคณะ, 1984
Flavobacterium sp.	Koboyashi และคณะ, 1983
Fusobacterium fusiforme	Costa และคณะ, 1974
Lactobacillus sp.	Staat และคณะ, 1973; Wynter และคณะ, 1995
Prevotella oralis	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella melaninogenica	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella loescheii	Igarashi และคณะ, 1998
Pseudomonas sp.	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Pseudomonas mixta	Wynter และคณะ, 1995
Streptococcus mitis	Forgarty และคณะ, 1984
Streptococcus mutans	Igarashi และคณะ, 1992
แอคติโนมัยซีส	
Actinomyces israelii	Schachtele และคณะ, 1975
Strepromyces cinemonensis	Hattori และ Ishibashi, 1981
ยีสต์	
Lipomyces starkeyi	Webb และ Spencer, 1983; Koenig, 1989
รา	
Aspergillus sp.	Forgarty และ Kelly, 1984
Aspergillus carneus	Fukumoto และคณะ, 1971
Aspergillus luchvasis	Hattori และ Ishibashi, 1981
Aspergillus fumigatus	Hattori และ Ishibashi, 1981
Chaetomium gracile	Mizuno และคณะ, 1999
Chaetomium indicum	Wynter และคณะ, 1995
Chaetomium luteum	Wynter และคณะ, 1995
Chaetomium thermophilum var *coprophilum*	Wynter และคณะ, 1995
Chaetomium thermophilum var *thermophilum*	Wynter และคณะ, 1995

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนส (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Chaetomium virescens	Wynter และคณะ, 1995
Fusarium moniliforme	Simonson และ Liberta, 1975
Gibberella fukuroi	Hattori และ Ishibashi, 1981
Hamicola grisea	Hattori และ Ishibashi, 1981
Paecilomyces lilacinus	Charles และ Farrell, 1957
Penicillium aculeatum	Madhu และ Prabhu, 1985
Penicillium funiculosum	Chaiet และคณะ, 1970; Kosaric และคณะ, 1973
Penicillium lilacinum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Penicillium luteum	Fukumoto, 1971
Penicillium minioluteum	Mizuno และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Penicillium roquefortii	Hattori และ Ishibashi, 1981
Penicillium verruculosum	Whetley และ Moo-Young, 1977
Spicaria sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1973
Sporotichum asteroides	Hottari และ Ishibashi, 1981
Verticellium sp.	Tchuchiya และคณะ, 1952

การนำเดกซ์แทรนเนสมาประยุกต์ใช้

ในปี 1969 Leach ได้รายงานไว้ว่าในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 มีการนำเดกซ์แทรนมาใช้เป็น blood plasma extender โดยสายเดกซ์แทรนทั้งหมดนี้เป็นหน่วยของกลูโคสเรียงต่อกัน และเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 เป็นส่วนมาก โดยเดกซ์แทรนนี้ได้มาจาก *Leuconostoc mesenteroides* โดยเชื้อนี้จะสร้างเดกซ์แทรนขึ้นจากซูโครสและเดกซ์แทรนที่ได้นี้มีคุณสมบัติคล้ายกับเดกซ์แทรนที่เชื้อในกลุ่ม Streptococcus สร้างขึ้นในช่องปาก แต่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะนำมาใช้เป็นพลาสมาสังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงเริ่มมีการวิจัยค้นคว้าเพื่อจะลดขนาดของเดกซ์แทรนลงมาให้มีขนาดพอเหมาะที่จะนำไปใช้ โดยเอนไซม์ที่ใช้ได้มาจากเชื้อราหลายชนิด โดยเฉพาะจาก Penicillium และ Aspergillus ต่อมาภายหลังจึงมีการนำเดกซ์แทรนเนสมาประยุกต์ใช้ในด้านทันตสาธารณสุข และนำมาใช้แก้ปัญหาในอุตสาหกรรมน้ำตาล ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตน้ำตาลสูงขึ้น (Tilbury, 1971; Jolly และ Prakash, 1987)

การนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในการป้องกันการเกิดคราบฟัน

Fitzgerald และคณะ (1968) ได้ทำการศึกษาผลของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium funiculosum* ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ โดยเติมเดกซ์แทรนเนสลงในอาหารและน้ำดื่ม อาหารที่ใช้เลี้ยงจะมีซูโครสอยู่มาก พบว่าการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปในน้ำดื่มเพียงอย่างเดียวจะลดการเกิดฟันผุได้น้อยกว่าการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปทั้งในน้ำและอาหาร

Block และคณะ (1969) ได้ศึกษาผลการป้องกันและรักษาการเกิดคราบฟันและฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ของเดกซ์แทรนเนส พบว่าในการป้องกันนั้น สัตว์ทดลองที่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบฟันลดลงและไม่มีฟันผุเลย ในขณะที่สัตว์ทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบฟันมากและเกิดฟันผุมาก ในด้านการรักษาเมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสสูงเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสลงในน้ำให้สัตว์ทดลองกิน พบว่าภายในเวลา 2 วันคราบฟันจะถูกขจัดไปหมดและอัตราการเกิดคราบฟันลดลงด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 1969 Leach พบว่าราส่วนมากสร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในสภาวะที่มีการสร้างเดกซ์แทรนเนส ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการแพ้ จึงได้เริ่มมีการนำเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียมาใช้แทน

Schachtele และคณะ (1975) ได้รายงานว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *Actinomyces isrelii* และ *Bacteroides ochraceus* สามารถช่วยลดการยึดเกาะของ *Streptococcus mutans* บนแท่งแก้วลงได้ 80%

นอกจากนี้ในประเทศญี่ปุ่นมีการเติมเดกซ์แทรนเนสลงในยาสีฟัน เพื่อใช้ลดคราบฟันและป้องกันฟันผุ ออกจำหน่ายแล้ว

ถึงแม้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสจะมีหลายชนิดก็ตาม แต่เอนไซม์ที่เหมาะสมในการใช้ขจัดคราบฟัน รวมถึงป้องกันการเกิดคราบฟันและฟันผุในช่องปากนั้นควรจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับสภาวะช่องปากของคนด้วย เช่น สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นได้ และทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้สูงเนื่องจากอาหารที่รับประทานเข้าไปมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ที่นำมาใช้น่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่ทนเค็มได้ด้วย

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติโดยเฉพาะแบคทีเรีย ตามปกติแล้วจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้ค่อนข้างต่ำ แบคทีเรียที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ก็เช่นกัน ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจะต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปมักทำการเลือกอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีนี้จะถูกจำกัดโดยความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน (gene) ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรม นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตแล้ว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังเป็นสิ่งที่

จำเป็นและมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกด้วย กล่าวคือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้หากมีลักษณะพันธุกรรมตามที่ต้องการก็จะทำให้กระบวนการผลิตและผลผลิตเป็นไปตามที่วางไว้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในธรรมชาติมักต้องมีการปรับปรุงเพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ (strain improvement) ของจุลินทรีย์นั้นแบ่งเป็นวิธีการหลัก 3 วิธี (Baltz, 1986) คือ

1. การกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวก ใช้ความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงน้อย อาศัยเทคนิคที่ง่ายและมีราคาถูก ประสิทธิภาพของการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และความถูกต้องในการคัดเลือกเชื้อ แต่มักให้ผลแบบสุ่ม ต้องมีการคัดเลือกเป็นจำนวนมาก

2. Genetic recombination เป็นวิธีที่ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทั้งทางพันธุกรรมและสรีรวิทยาของเชื้อ รวมถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษาด้วย เช่น วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ในแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ หรือในแบคทีเรีย เช่นวิธี transformation, conjugation และ transduction

3. Gene cloning เป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน เป็นการปรับปรุงระดับพันธุกรรม ที่ต้องอาศัยความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้ออย่างลึกซึ้ง เป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก เทคนิคต่างๆมีความซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในการเปลี่ยนแปลงบริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณที่เกาะของไรโบโซม หรือการลดหรือจำกัดเอนไซม์ที่มีส่วนในการยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เป็นต้น

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนี้สามารถจะถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังอีกชั่วอายุหนึ่ง โดยการกลายพันธุ์แบ่งออกได้เป็น 2 ระดับ (Snustad และ Simmons, 2000) คือ

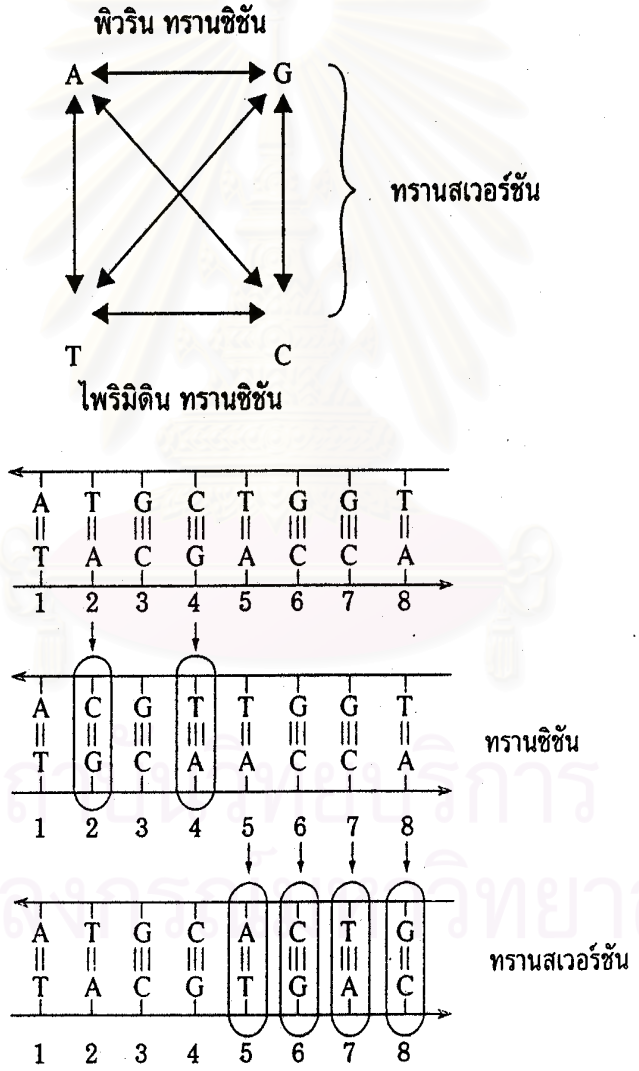
1. การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation) คือการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม หรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

2. การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ ซึ่งรวมถึงการแทนที่กันของคู่เบสและการเพิ่มหรือขาดหายไปของคู่เบสซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ในระดับของยีนในคู่เบสเดียวกันของดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

2.1 การแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) คือการแทนที่คู่เบสในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

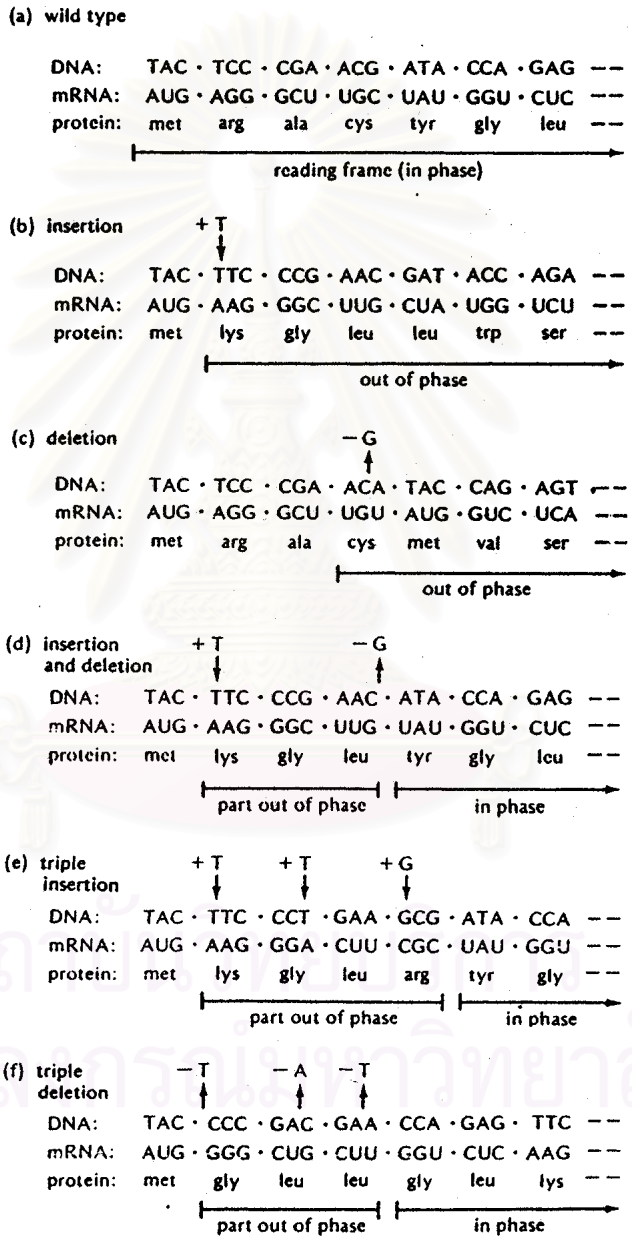
2.1.1 ทรานซิชัน (transition) คือการแทนที่เบสพวกพิวรีนชนิดหนึ่งด้วยเบสพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง หรือ การแทนที่เบสพวกไพริมิดีนชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง เช่น คู่เบส A-T ถูกแทนที่ด้วย G-C หรือคู่เบส C-G ถูกแทนที่ด้วย T-A

2.1.2 ทรานสเวอร์ชัน (transversion) คือการแทนที่เบสพวกพิวรีนด้วยเบสพวกไพริมิดีน หรือเบสพวกไพริมิดีนถูกแทนที่ด้วยเบสพวกพิวรีน เช่น คู่เบส A-T ถูกแทนที่ด้วย C-G หรือคู่เบส A-T ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส T-A เป็นต้น (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การเกิดทรานซิชันและทรานสเวอร์ชัน (Strickberger, 1985)

2.2 เฟรมชิฟท์ มิวเทชัน (frameshift mutation) คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากมีการสูญเสียนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า หรือ การที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า หรือมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ทำให้กรอบการอ่านรหัสพันธุกรรม (reading frame) เปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การเกิดเฟรมชิฟมิวเทชัน (Strickberger, 1985)

การเกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Snustad และ Simmons, 2000) คือ

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจาก รังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเทาโทเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป และในยีนแต่ละตำแหน่งก็แตกต่างกันด้วย อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ในธรรมชาติค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของจีโนมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Strickberger, 1985)

1 สิ่งมีชีวิตและลักษณะ	2 การกลายพันธุ์ต่อจีโนมต่อชั่วอายุ
Bacteriophage T2 (virus)	
Host range	3×10^{-9}
Lysis inhibition	1×10^{-8}
Escherichia coli (bacterium)	
Streptomycin resistance	4×10^{-10}
Streptomycin dependence	1×10^{-9}
Resistance to phage T1	3×10^{-9}
Lactose fermentation	2×10^{-7}
Salmonella typhimurium (bacterium)	
Tryptophan independence	5×10^{-8}
Chlamydomonas reinhardi (algae)	
Streptomycin resistance	1×10^{-6}
Neurospora crassa (fungus)	
Adenine independence	4×10^{-8}
Inositol independence	8×10^{-8}
Zea mays (corn)	
Shrunken seeds	1×10^{-6}
Purple seeds	1×10^{-5}
Drosophila melanogaster (fruit fly)	
Electrophoretic variants	4×10^{-6}
White eye	4×10^{-5}

ตารางที่ 3 อัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของจีโนมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Strickberger, 1985) (ต่อ)

3 สิ่งมีชีวิตและลักษณะ	การกลายพันธุ์ต่อจีโนมต่อชั่วอายุ
Yellow body	1×10^{-4}
Mus musculus (mouse)	
Brown coat	8×10^{-6}
Piebald coat	3×10^{-5}
Homo sapiens (human)	
Huntingtons' chorea	1×10^{-6}
Aniridia (absence of iris)	5×10^{-6}
Retinoblastoma (tumor of retina)	1×10^{-5}
Hemophilia A	3×10^{-5}
Achondroplasia (dwarfness)	$4\text{-}8\times10^{-5}$
Neurofibromatosis (tumor of never tissue)	2×10^{-4}

2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งสิ่งก่อกลายพันธุ์มีดังนี้

2.1 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutation) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ

ก. อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าเกิดยีนด้อยที่ทำให้เกิดการตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกัน (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543, Weaver และ Hedrick, 1997)

ข. รังสี เป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ รังสีแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

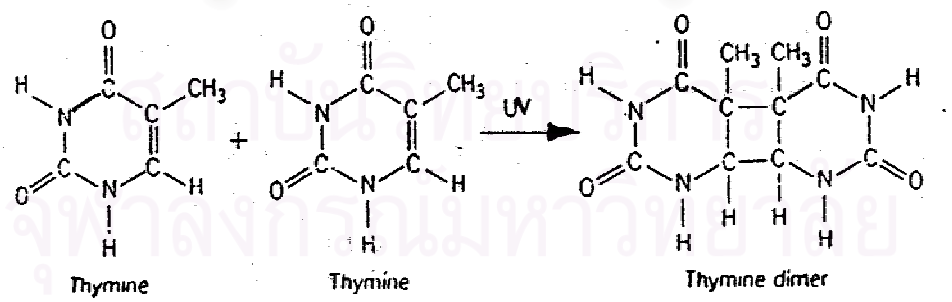
1. รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ แกมมา อัลฟา เบตา อิเล็กตรอน นิวตรอน โปรตอน และอนุภาคอื่นๆที่มีการเคลื่อนที่เร็ว รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง โดยรังสีเหล่านี้จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ และทำให้อิเล็กตรอนที่เรียงตัวอยู่วงนอกสุด ในโครงสร้างอะตอมหลุดออกไป จะทำให้ได้ไอออนที่มีประจุบวกขึ้นอิเล็กตรอนที่หลุดออกมานี้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูง จะชนกับอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจากอะตอมอื่น เมื่อพลังงานของอิเล็กตรอนเหล่านี้ลดลง อิเล็กตรอนอิสระเหล่านี้จะไปเกาะกับอะตอมอื่นทำให้เกิดไอออนที่มีประจุลบขึ้นมา ดังนั้นจึงมีไอออนทั้งประจุบวกและลบเกิดขึ้นในขณะที่รังสีผ่านไป จะทำให้เกิดกลุ่มของไอออนที่มีประจุบวกและลบ ไอออนเหล่านี้ต้องเกิดปฏิกิริยาเคมีเพื่อให้ประจุเป็นกลาง เพื่อโครงสร้างอะตอมจะได้คงที่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นนี้จะมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น คือทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ได้ โดย

บริเวณที่แตกหัก คือตำแหน่ง phosphodiester backbone เป็นบริเวณที่จับกันระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตของสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (Fantini, 1975)

การแตกหักของสายดีเอ็นเอระหว่างที่อาบรังสี และการต่อกันใหม่ของดีเอ็นเอที่แตกหักอาจต่อกันในลักษณะสลับข้าง สลับตำแหน่ง หรืออาจเกิดจากการขาดหายไป ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสายดีเอ็นเอนั้น จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน เช่น รังสีเอกซ์ จะกระตุ้นให้เกิดการผิดปกติในสายดีเอ็นเอในบริเวณที่มีออกซิเจนสูงๆ เพราะว่าออกซิเจนจะทำให้โมเลกุลของน้ำที่ผ่านการอาบรังสี เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ได้แก่ H_2O_2 และ HO_2 ทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอซึ่งมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น

2. รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) แสงสีขาว (visible light) รังสีอินฟาเรด และคลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น รังสีกลุ่มนี้มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำกว่าประเภทแรก

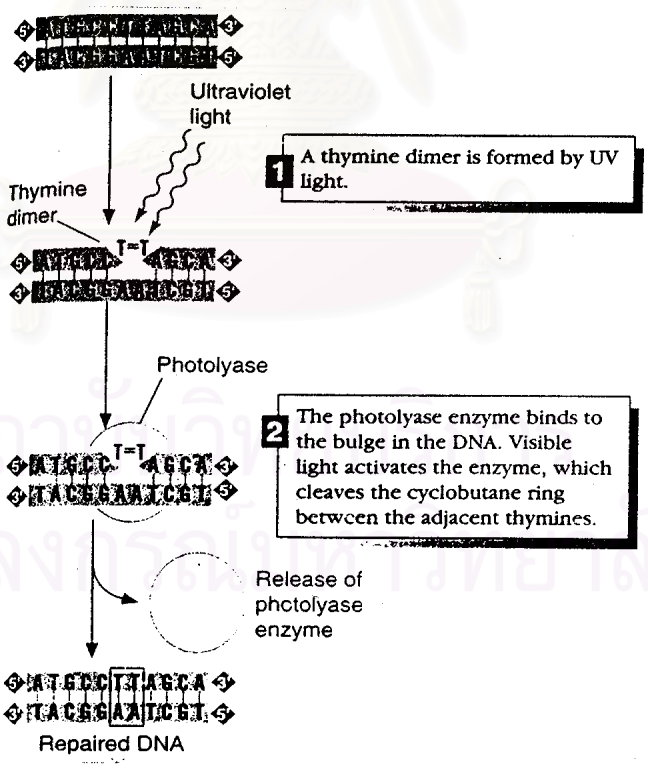
แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) เป็นแสงชนิดไม่แตกตัวและเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดจากการที่ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตเข้าไปโดยตรง ที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 254-260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซึมไว้นี้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสพวกพิวรีน และไพริมิดีน โดยเฉพาะในกลุ่มเบสไพริมิดีนจะมีการเปลี่ยนแปลงง่ายกว่าพิวรีน โดยจะมีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายเดียวกันของโมเลกุลดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกัน ทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ขึ้น (Russel,1996) (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 การเกิดไทมีนไดเมอร์จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Snustad และคณะ, 1997)

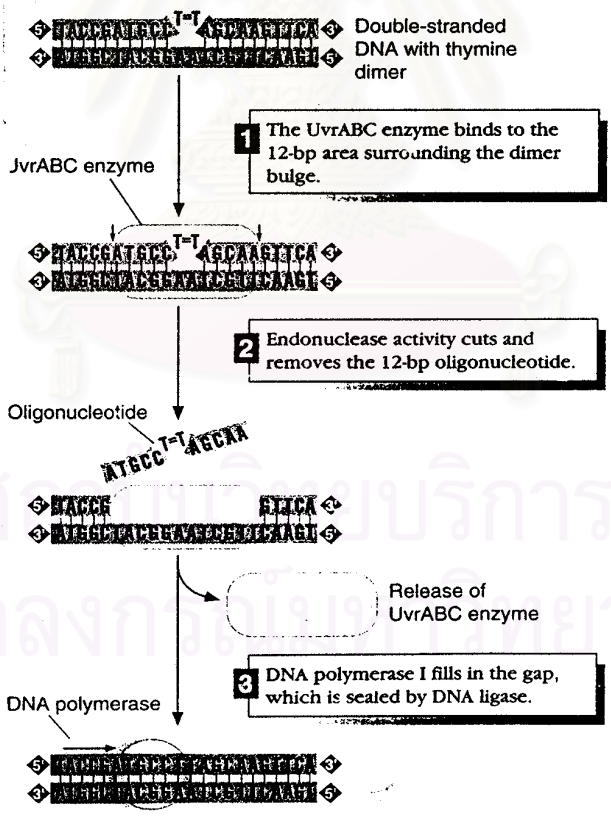
การเกิดไทมีนไดเมอร์ จะทำให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดินีนของสายพอลินิวคลีโอไทด์ตรงข้ามได้ มีผลทำให้เกิดทรานซิชันได้ เช่น คู่เบส T-A ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส C-G นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer) ได้และมีผลก่อให้เกิดการกลายพันธุ์คือ จะเกิดปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโน (NH_2) ออกจากโมเลกุลของไซโตซีนในไซโตซีนไดเมอร์ (deamination of cytosine dimer) จะทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer) ซึ่งจะมีปฏิกิริยาเหมือนไทมีนไดเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดการทรานซิชันได้

กลไกที่ทำให้เกิดไดเมอร์กลับคืนสู่สภาพปกติได้ คือ light dependent repair หรือ Photoreactivation โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอคติเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นี้จะทำงานเมื่อมีแสง visible light (ช่วงความยาวคลื่น 320-370 นาโนเมตร) โดยการทำงานจะเริ่มจากเอนไซม์นี้จะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์ และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสง visible light ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายพันธะโควาเลนท์ระหว่างไดเมอร์ให้ขาดออกจากกัน ดังนั้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ควรทดลองภายใต้ไฟสีเหลือง และบ่มเลี้ยงในที่มืดเพื่อป้องกันการซ่อมแซมแบบ photoreactivation (Snustad และคณะ, 1997) (รูปที่ 8)



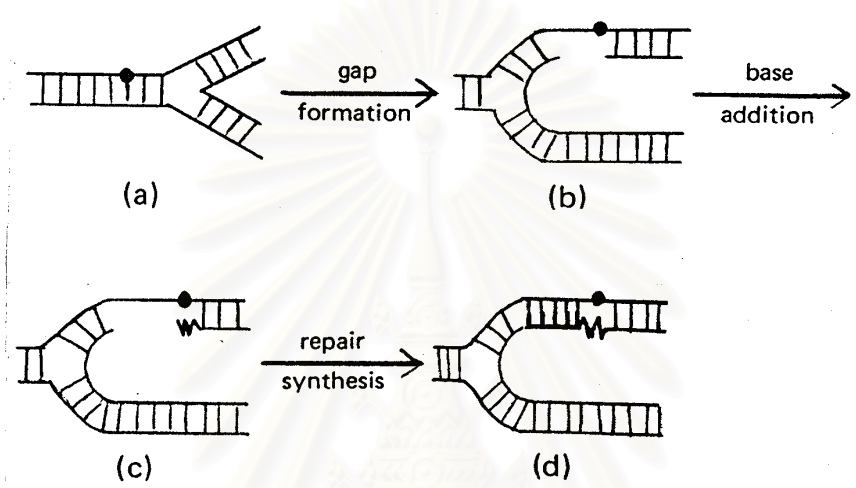
รูปที่ 8 ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Alan และคณะ, 1999)

การซ่อมแซมซึ่งยังผลให้เกิดการกลายพันธุ์ลดลงอีกวิธี คือ การซ่อมแซมแบบ excision repair หรือ dark repair ซึ่งเป็นการซ่อมแซมโดยจะมีการตัดส่วนดีเอ็นเอที่เสียหาย หรือที่ผิดปกติออกไปโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ และจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องเข้าไปแทน มีหลายแบบด้วยกันแต่ที่จะกล่าวถึงคือ การซ่อมแซมโมเลกุลที่เสียหายจากรังสีอัลตราไวโอเลต (UV damage repair) ในกรณีที่ไม่มีการซ่อมแซมโดยวิธี photoreactivation การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์นั้นจะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์ endonuclease ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย 3 ชนิดคือ A, B และ C excinuclease โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์ และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไดเมอร์ จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเฮลิเคส 2 (Helicase II) ทำหน้าที่แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย 12 เบสนั้นออกมา ซึ่งชิ้นส่วนนี้จะถูกย่อยสลายไปในที่สุด ต่อจากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส 1 (DNA polymerase I) และเอนไซม์ไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมเบสที่ถูกต้องตรงบริเวณที่เกิดช่องว่างให้สมบูรณ์ (Russel, 1996) (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การซ่อมแซมแบบ Excision ในจุลินทรีย์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (Alan และคณะ, 1999)

อีกกรณีหนึ่งในการซ่อมแซม คือ การเกิดความผิดพลาดในการซ่อมแซมไทมีนไดเมอร์ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์คือ กระบวนการ SOS repair เป็นการซ่อมแซมที่เกิดขึ้นหลังจากมีการแยกสายพอลินิวคลีโอไทด์ขณะที่มีการจำลองตัวเอง เมื่อมีการอ่านรหัสมาถึงบริเวณนี้ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะนำเบสมาเติมในส่วนที่ขาดหรือผิดปกติไปแบบสุ่ม และใช้สายดีเอ็นเอที่ซ่อมแซมแล้วเป็นแม่แบบต่อไป ดังนั้นการซ่อมแซมแบบนี้มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น (Snustad และ Simmons, 2000) (รูปที่10)

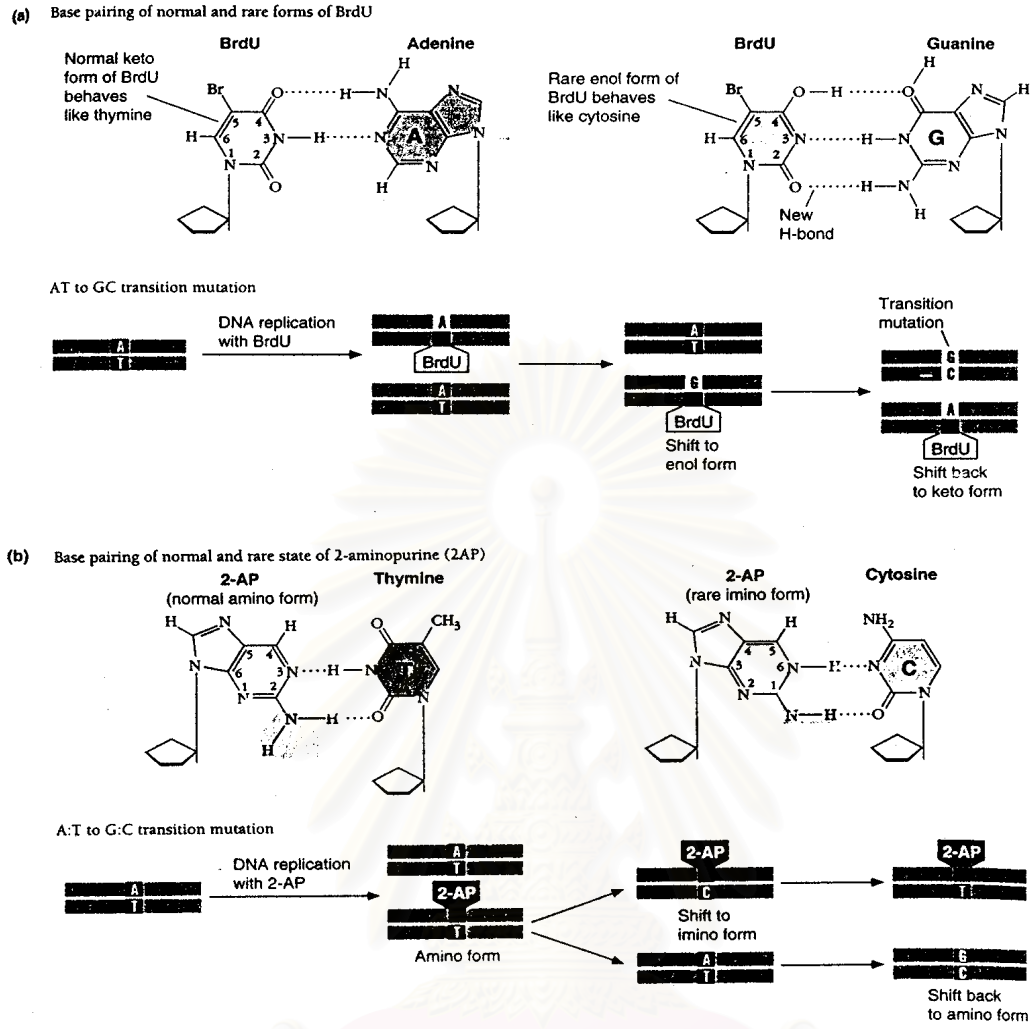


รูปที่ 10 กระบวนการ SOS repair ที่มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Goodenough, 1978)

2.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์เป็นสารเคมี (chemical mutagen) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (Russel,1996) ได้แก่

1. สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆของดีเอ็นเอ (base analogues) สารเคมีเหล่านี้จะเข้าแทนที่เบสของดีเอ็นเอในระหว่างที่มีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่ง ทำให้โมเลกุลที่ได้ใหม่ของดีเอ็นเอแตกต่างไปจากเดิม ได้แก่

ก. สาร 5-โบรโมยูราซิล (5-bromouracil หรือ 5BU) จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสไทมีน และสามารถเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนตำแหน่งไฮโดรเจนอะตอม (tautomeric shift) หรือเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอม (ionization) ได้เหมือนกับเบสไทมีน ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้แล้ว แทนที่จะจับคู่เบสอะดินีนตามปกติ ก็สามารถจับคู่กับเบสกัวนีนได้ ซึ่งมีผลทำให้เกิดทรานซิชัน (รูปที่ 11a)



รูปที่ 11 การกลายพันธุ์เนื่องจากเบสอะนาล็อก 5-BU และ 2-AP (Alan และคณะ, 1999)

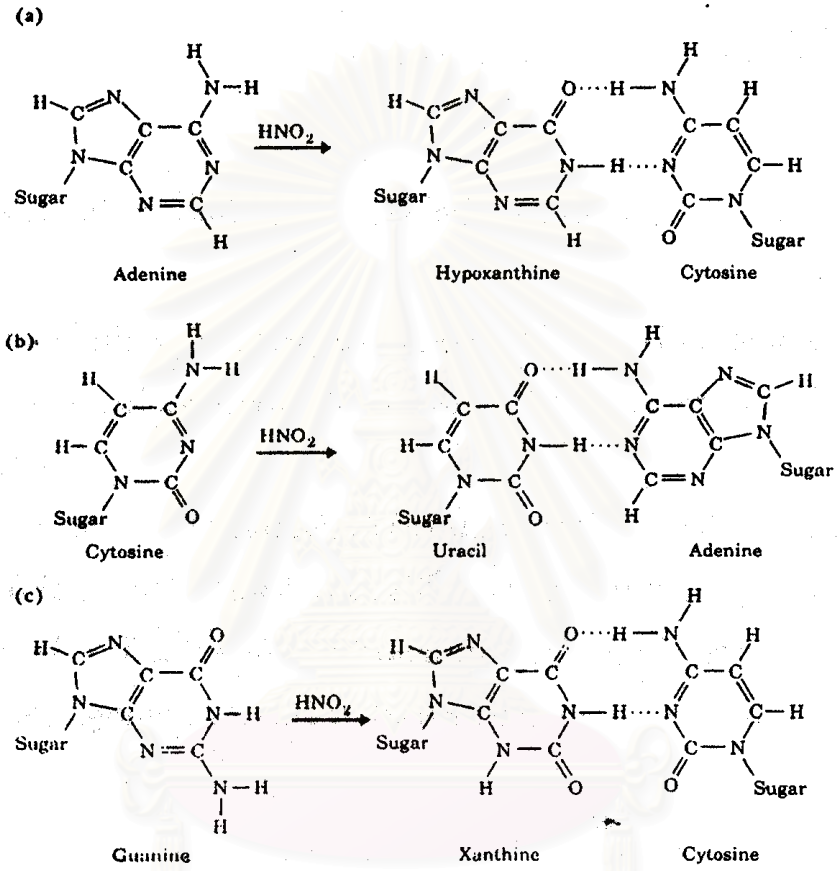
(a) เบสอะนาล็อค 5-BU (b) เบสอะนาล็อค 2-AP

ข. สาร 2-อะมิโนพิวรีน (2-aminopurine หรือ 2AP) มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสอะดินีน ระหว่างที่มีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถเข้าแทนที่อะดินีนได้และแทนที่จะจับคู่กับเบสไทมีน จะไปจับคู่กับเบสไซโตซินได้ด้วย ถ้าสาร 2-อะมิโนพิวรีนจับคู่เบสไทมีนตั้งแต่แรก เมื่อมีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ สาร 2-อะมิโนพิวรีนสามารถจับคู่กับเบสไซโตซินได้ จึงมีผลทำให้เกิดทรานซิชันได้ (รูปที่ 11b)

2. สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส

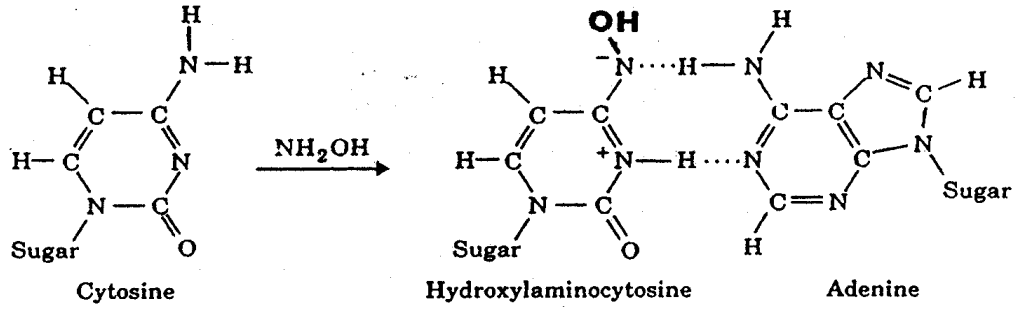
ก. กรดไนตรัส (nitrous acid :HNO_2) จะทำหน้าที่ดึงหมู่อะมิโน (deamination) ออกจากโมเลกุลของเบสอะดินีน ไซโตซีน และกัวนีน ทำให้เบสอะดินีนเปลี่ยนเป็นไฮโปแซนทีน

(hypoxanthine) ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโตซีนได้ เบสไซโตซีนจะเปลี่ยนเป็นยูราซิล (uracil) ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสอะดินีนได้ และเบสกัวนีนเปลี่ยนเป็นแซนทีน (xanthine) ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโตซีนได้ (รูปที่ 12) ดังนั้นเมื่อเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบ ทรานซิชัน



รูปที่ 12 ผลของกรดไนตรัสที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของเบส (Russel, 1996)

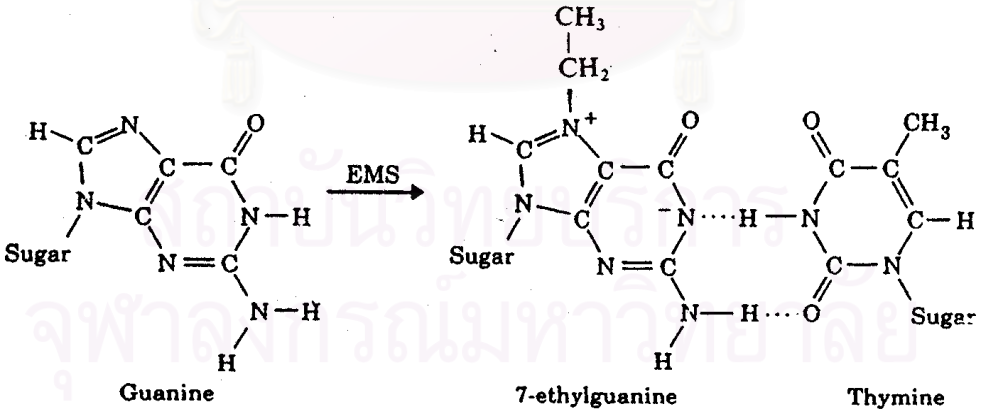
ข. สารไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine) และสารที่ให้หมู่ไฮดรอกซี (OH) โดยสารไฮดรอกซีลามีนจะทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับหมู่อะมิโน (NH_2) ของเบสไซโตซีน เปลี่ยนเป็นสารไฮดรอกซิลอะมิโนไซโตซีนซึ่งสามารถจับคู่กับเบสอะดินีนได้เมื่อเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบ ทรานซิชัน (รูปที่ 13) (Russel, 1996)



รูปที่ 13 ผลของไฮดรอกซีลามีนต่อโมเลกุลของไซโตซีน (Snustad และ Simmons, 2000)

ค. สารกลุ่มที่มีหมู่อัลคิล (alkylating agent) ได้แก่ สารไนโตรเจนมัสตาร์ด (nitrogen mustard) เอธิลอีเธนซัลโฟเนต (ethyl ethansulfonate: EES) และเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate: EMS)

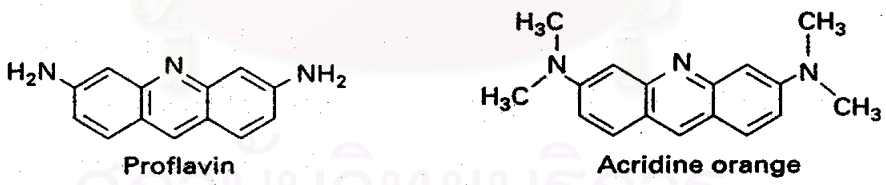
- เอธิลอีเธนซัลโฟเนต และเอธิลมีเทนซัลโฟเนต จะทำหน้าที่เติมหมู่เอธิลให้กับโมเลกุลของเบสกัวนีน ทำให้มีโครงสร้างคล้ายกับเบสอะดีนีน ซึ่งมีผลทำให้การจับคู่เบสผิดปกติ คือแทนที่จะจับคู่กับเบสไซโตซีน ก็จะไปจับกับเบสไทมีนแทน (รูปที่ 14) เมื่อเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบ ทรานซิชัน (Snustad และ Simmons, 2000)



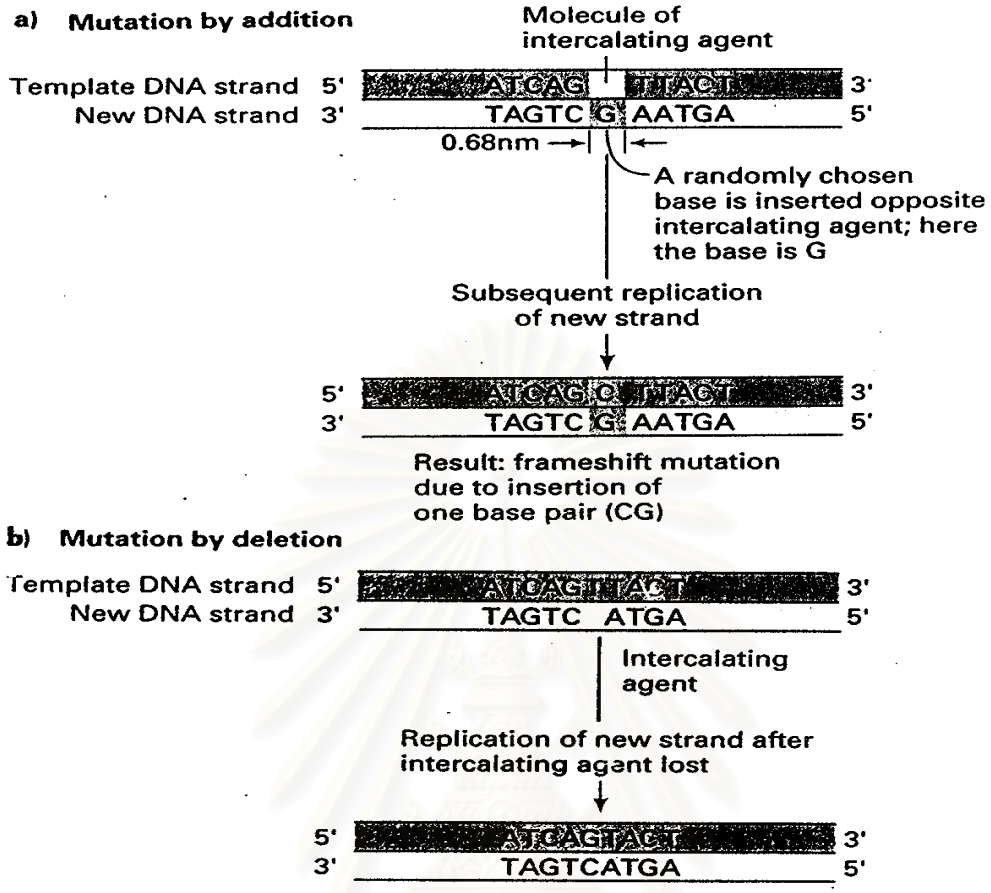
รูปที่ 14 ผลของเอธิลอีเทนซัลโฟเนต หรือ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต ต่อโมเลกุลเบสกัวนีน (Gardner และคณะ, 1981)

สารเคมีเหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการดึงเบสพวกพิวรีน (depurination) จากสายพอลินิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดช่องว่างของเบสตรงตำแหน่งนั้น เมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ตำแหน่งของเบสบนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่ตรงกับตำแหน่งที่ พิวรีนถูกดึงออกไป จะมีเบสชนิดใดชนิดหนึ่งเข้ามาแทนที่ตรงตำแหน่งนี้ได้ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสได้ทั้งแบบทรานซิชัน และทรานเวอร์ชัน (Weaver และ Hedrick, 1997)

- สารเคมีที่ทำให้เกิดการเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ สีย้อมต่างๆ (acridine dye) เช่น โพรฟลาวิน (proflavin) และ อะคริดิน ออเรนจ์ (acridine orange) ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยที่โมเลกุลของโพรฟลาวิน จะสามารถสอดแทรกเข้าไปอยู่ในระหว่างเบสในสายดีเอ็นเอ เมื่อเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอ จะทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่เข้าคู่กับสายพอลินิวคลีโอไทด์ที่มีโมเลกุลของโพรฟลาวินแทรกอยู่ มีเบสเพิ่มขึ้นมาอีก 1 เบส ดังรูป 16a หรืออาจทำให้ตำแหน่งที่โพรฟลาวินสอดแทรกอยู่นั้นมีเบสหลุดออกมาได้ ดังรูป16b ดังนั้นสารโพรฟลาวินจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยทำให้เกิดการเพิ่มหรือการขาดหายของเบสในสายดีเอ็นเอ (รูปที่ 15 และ 16) ส่วนสารอะคริดินออเรนจ์จะมีผลต่อโมเลกุลของดีเอ็นเอระหว่างที่มีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยขณะที่มีการเข้าคู่กันของสายพอลินิวคลีโอไทด์จะกระตุ้นให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของสายพอลินิวคลีโอไทด์ที่ต่างตำแหน่งกัน หรือเกิดอันอีควอลครอสซิงโอเวอร์ (unequal crossing over) ทำให้สายดีเอ็นเอสายหนึ่งมีเบสหายไป 1 เบส และอีกสายหนึ่งมีเบสเพิ่มขึ้นมา 1 เบส (Peter, 1999)

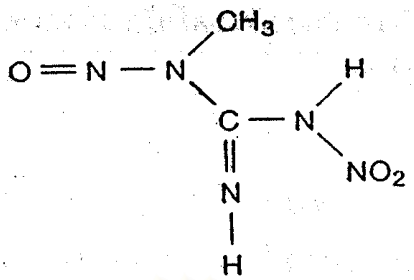


รูปที่ 15 โครงสร้างของ Proflavin และ Acridine orange (Peter, 1999)



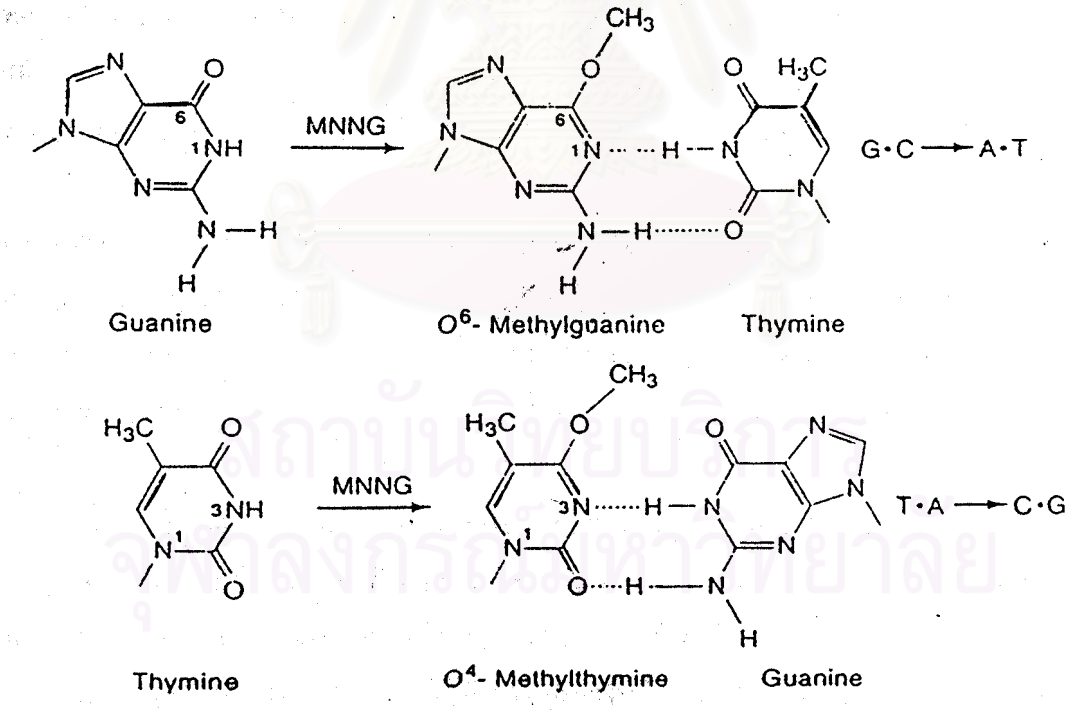
รูปที่ 16 การกลายพันธุ์เนื่องจากการแทรกตัวของสารเคมีในกลุ่มสารที่เข้าแทรกตัว (intarcalating agent) (Peter, 1999)

สารเคมีที่นิยมใช้ก่อการกลายพันธุ์ คือ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG, MNNG, NG) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากปฏิกิริยา nitrosation ของ methylnitroguanidine มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 147.10 ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 118 ^{O}ซ จุดเดือดที่ 123.5 ^{O}ซ โครงสร้างของ NTG แสดงดังรูปที่ 17 NTG สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6.0-9.0 แต่มีความเสถียรในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด NTG จะแตกตัวเป็น nitrous acid ในสภาวะที่เป็นกรด และแตกตัวเป็น diazomethane (CH_2N_2) ในสภาวะที่เป็นด่าง (Mendel และ Greenberg, 1960)



รูปที่ 17 โครงสร้างของ NTG (Mendel และ Greenberg, 1960; นิภาพร ศิริเพ็ญ, 2542)

NTG จะทำปฏิกิริยาโดยการเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสแต่ละชนิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจน เช่น ตำแหน่ง O^6 ของเบสกัวนีน และตำแหน่ง O^4 ของเบสไทมีน มีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิด และมีผลทางอ้อมทำให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอผิดไป เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ผลของ NTG ต่อเบสกัวนีน และไทมีน (สุวรรณา นพพรพันธุ์, 2538)

ตัวอย่างการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี

จุลินทรีย์	วิธีที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย		
Streptococcus lactis	UV	Kalra และคณะ, 1973
Streptococcus zooepidemicus NH-131	UV+NTG	Akasaka และคณะ, 1989
Pseudomonas amyloderamosa SB15	NTG	Fujita และคณะ, 1990
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	NTG	Annous และ Blaschek, 1991
Aerococcus viridans CCM 2452	UV	Suchova และคณะ, 1992
Pseudomonas amyloderamosa SB15	UV+NTG	Wu และคณะ, 1993
Bacillus megaterium B6	UV+NTG	Ray และ Nanda, 1996
Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246	UV	Park และคณะ, 1996
Streptococcus equi ATCC 6580	NTG	Kim และคณะ, 1996
Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246	UV+NTG	นิภาพร ศิริเพ็ญ, 2542
แอคติโนมัยซีส		
Streptomyces fradiae NRRL 2702	UV+NTG	Lee และ Rho, 1999
ยีสต์		
Lipomyces starkeyi	EMS	Kim และ Day, 1995
รา		
Aspergillus niger NCIM-616	UV+NTG	Rasouli และ Kulkarni, 1994
Aspergillus niger (G-IV-10)	UV+NTG	Jan และ Anna, 1997
Penicillium chrysogenum	UV+NTG	โชตนา ประมวลวัลลิกุล, 2534
Penicillium sp. 61	UV+NTG	สุวรรณา นพพรพันธุ์, 2538

Shah และคณะ (1986) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ คือ US-1 ที่มีความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 100-110 เปอร์เซ็นต์

Ray และ Nanda (1996) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus megaterium* B6 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG ได้สายพันธุ์กลาย UN12 ที่สามารถผลิต เบตา-อะไมเลส ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 4.5 เท่า

Lee และ Rho (1999) ได้ทำการคัดเลือก *Streptomyces fradiae* สายพันธุ์กลายและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไทโรซีน โดยนำ *S. fradiae* NRRL 2702 มาทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG และ แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ *S. fradiae* MNU20 ที่สามารถผลิตไทโรซีนได้สูงขึ้น 14 เท่า

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการปรับปรุงเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต และสาร NTG คัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มมากขึ้น โดยมีความเสถียรทางพันธุกรรมเพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A. และ รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A และ รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A

3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co, Ltd., Japan และ รุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation, Japan

5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท ISSCO, U.S.A

6. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A

7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan และ รุ่น W 760 Memmert, Germany

8. เครื่องชั่ง รุ่น PB3002 และ รุ่น L2000P บริษัท Sartorius, U.S.A

9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KS-3000P บริษัท Kubota, Japan

10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น H-103N บริษัท Kokusan, Japan

11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigerate centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan

12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A

13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A

14. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร G30T8 30W บริษัท Sankyo Denki, Japan

15. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) บริษัท Gerhardt, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนจากเชื้อรา *Pennicillium* sp. เกรดอุตสาหกรรม
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
4. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) บริษัท May & Baker, England
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
6. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, U.S.A
7. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
8. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Difco, USA.
9. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco, USA.
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
12. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2HPO_4) บริษัท May & Baker, England
13. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรท ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Merck, Germany
14. ซีลีเนียม (Se) บริษัท Fluka , Singapore
15. บอริกแอซิด (H_3BO_3) บริษัท Merck, Germany
16. เมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ (C.I. 13020) บริษัท Merck, Germany
17. เมทธิลลีนบลู ($C_{16}H_{18}CIN_3S$) บริษัท Fluka , Singapore
18. เมทธิลออเรนจ์ [$(CH_3)_2NC_6H_4N{:}NC_6H_4SO_3Na$] บริษัท BDH Chemical, England
19. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, Germany
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
21. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) บริษัท Fluka , Singapore
22. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2 SO_4$] บริษัท May & Baker, England
23. แอมโมเนียมไนเตรท [$(NH_4) NO_3$] บริษัท J.T. Baker, U.S.A
24. เอธานอล (Ethanol) กรมสรรพมิต, ประเทศไทย
25. เอน-เมทิล-เอน-ไนโตร-เอน-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, $C_2H_5N_5O_3$)บริษัท Nagalai Tesque Inc., Japan

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆเป็นเคมีภัณฑ์เกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน จ.นนทบุรี โดย ณฐินี** (ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

1.1 ทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscrope) โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมีด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอพีไอ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.2 จำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ โดยนาถชวา (2543)

2. การเก็บและการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Arthrobacter sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่แยกจากดินจังหวัดนนทบุรี (ณฐินี, 2540)

2.2 อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงโดยใช้อาหาร Brain heart infusion (BHI)

2.3 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ขีดแบคทีเรีย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{O}ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2.4 การเลี้ยงแบคทีเรียให้สามารถเจริญได้ที่ เกลือ NaCl 3 %

ปลูกเชื้อจากข้อ 2.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่ไม่มีการเติม NaCl (เกลือ 0%) 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) พร้อมให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณ 10 %ลงไปในอาหารเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่เติม NaCl 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิม หลังจาก 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อปริมาณ 10% ลงไปในอาหารเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่เติม NaCl 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดิม ทำการถ่ายเชื้อไปเรื่อยๆ โดยมีการเพิ่มความเข้มข้นของ

NaCl ครั้งละ 0.5 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งถึง 3 % นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ สารละลายที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส ตามวิธีข้อ 3.2

2.5 การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วรูปชมพู่

2.5.1 เตรียมเชื้อตั้งต้น

ปลูกเชื้อจากข้อ 2.3 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พร้อมให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในกึ่งกลางระยะทวีคูณ (mid-log phase) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เป็น 0.60 แล้วใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

2.5.2 เลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับขวดเขย่า

ปลูกเชื้อตั้งต้นจากข้อ 2.5.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ) พร้อมการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (Growth)

โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปิเปตต์น้ำหมักปริมาตร 20 มล. ที่ได้จากข้อ 2.5.2 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เซลล์ที่ได้ใส่ลงกระทงอะลูมินั่มฟอยล์ (aluminium foil) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 ^{O}ซ ชั่งน้ำหนักแห้งแล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ส่วนสารละลายที่ผ่านการปั่นแยกเซลล์นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส

3.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย

นำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) 0.9 มล. (ประกอบด้วย โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 จำนวน 0.7 มล. ผสมกับเดกซ์แทรนที-2000 0.625%

(น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นสับสเตรท 0.2 มล. โดยเติมส่วนน้ำใสตัวอย่าง 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 ^{O}ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเนลสัน (nelson reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์ที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสตามวิธีในข้อ 3.3

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเดกซ์แทรนที-2000 แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำตัวอย่าง 1 มล. มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

คำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ ทำโดยนำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมล.) หารด้วยปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมล.) ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น หน่วย (unit) ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl (Bremner, 1970; โศภนา อิงควิวัฒน์, 2528; วิศิษฐพร เผื่อนพิภพ, 2529)

ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 0.1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask แล้วเติมส่วนผสมของสารเร่งปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข) 0.6 กรัม และกรดกำมะถันเข้มข้น 3 มล. นำไปย่อยด้วยความร้อนจนสารละลายใส ไม่มีสี (ประมาณ 45-60 นาที) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นลงไป 20 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล. ในขวดวัดปริมาตร นำสารละลายนี้มา 10 มล.ใส่ลงในขวดกลั่น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มล. และเติมกลั่น 150 มล. แล้วนำไปกลั่นด้วยชุดกลั่น Kjeldahl โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุสารละลายกรดบอริก 2 % (ภาคผนวก ข) 10 มล. และสารละลายอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข) 2-3 หยด เป็นภาชนะรองรับของเหลวที่กลั่นได้ ทำการกลั่นจนได้ของเหลวปริมาตรประมาณ 50 มล. แล้วนำของเหลวที่กลั่นได้ไปไตเตรตด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น 0.01 นอร์มอล (ภาคผนวก ข) โดยที่จุดยุติสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

การคำนวณ

$$\text{ไนโตรเจน (\%)} = \frac{(V_1 - V_2)\, N \times 0.014 \times 100 \times D}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มล.)

V_2 = ปริมาตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไตเตรต blank (มล.)

N = นอร์มอลลิตี้ (Normality) ของกรดกำมะถันที่ใช้

D = ค่าความเจือจาง (ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 5)

Blank คือน้ำกลั่นปลอดประจุ 10 มล.ใส่ใน Kjeldahl flask แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง

4. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

4.1.1 เลี้ยง *Arthrobacter* sp.สายพันธุ์ AG-2 ตามวิธีข้อ 2.5.1 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในกึ่งกลางระยะทวีคูณ ที่เวลา 15 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ช่วง 10^{6}-10^{7} เซลล์ต่อมล.

4.1.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 10 มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) กวนตลอด

4.1.3 นำเซลล์แขวนลอยไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 30 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลาที่ระยะเวลาให้การฉายแสงต่างๆกัน

4.1.4 กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30^{O}ซ เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

4.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณร้อยละการรอด

4.1.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 5

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

4.2.1 เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ตามวิธีข้อ 2.5.1 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางระยะทวีคูณ ที่เวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ ล้างเซลล์ด้วยด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้แขวนลอยอยู่ใน ทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^{6}-10^{7} เซลล์ต่อมล.

4.2.2 นำสารละลาย NTG ใน ทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 แล้วเติมลงในหลอดที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 0-60 นาทีเก็บตัวอย่างเซลล์ทุกๆ 10 นาที

4.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

4.2.4 กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. ที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

4.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณร้อยละการรอด

4.2.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 5

5. การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์

5.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

คัดเลือกเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.1.6 และ 4.2.6 ที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0-0.1% สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ 0-50% สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG (Miller, 1972; Fantini, 1975)

5.1.1 เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่มีเดกซ์แทรน 0.5% เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน

5.1.2 ราดทับด้วยเอธานอล 95% ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณใสเป็นเครื่องชี้บ่งการสร้างเดกซ์แทรนเนส เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสกับสายพันธุ์ตั้งต้น

5.1.3 คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมาคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ

5.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

5.2.1 นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{O}ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5.2.2 ปิเปตต์หัวเชื้อตั้งต้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสในหลอดทดลองปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

5.2.3 นำน้ำหมักที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน

5.2.4 คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

6. การทดสอบความเสถียรในการสร้างเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสตามข้อ 2.5.1 และ 2.5.2 วิเคราะห์การปริมาณเดกซ์แทรนเนสด้วยวิธี

Samogyi- Nelson โดยใช้สายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสอย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

7. การศึกษาปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์กลาย

เลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่มีการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเป็น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

8. ศึกษาหาชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

8.1.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

นำเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเหลวที่ได้จากข้อ 7 ที่มีเดกซ์แทรน 10 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ชนิดอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดจากยีสต์, สารสกัดจากเนื้อ, พอลิเปปโตน และ ทริปโตน ชนิดอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเทรต, โซเดียมไนเทรต และ โพแทสเซียมไนเทรต เมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เท่ากันคือ 0.1089% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนส และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์

8.1.2 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

จากข้อ 8.1.1 เลือกใช้ทริปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส ได้ทดลองหาปริมาณการใช้และการผสมที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้จากข้อ 8.1.1 แต่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมและทริปโตนเริ่มต้นเป็นดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การแปรผันปริมาณ แอมโมเนียมและทริปโตนเริ่มต้น

แอมโมเนียมซัลเฟต (%)* / ทริปโตน (%)*	0 (0 กรัมต่อลิตร)	25 (0.272 กรัมต่อลิตร)	50 (0.545 กรัมต่อลิตร)	75 (0.817 กรัมต่อลิตร)	100 (1.089 กรัมต่อลิตร)
100 (1.089 กรัมต่อลิตร)	100:0	100:25	100:50	100:75	100:100
75 (0.817 กรัมต่อลิตร)	75:0	75:25	75:50	75:75	75:100
50 (0.545 กรัมต่อลิตร)	50:0	50:25	50:50	50:75	50:100
25 (0.272 กรัมต่อลิตร)	25:0	25:25	25:50	25:75	25:100
0 (0 กรัมต่อลิตร)	0:0	0:25	0:50	0:75	0:100

* <u>หมายเหตุ</u> % ของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (100 % ไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 1.089 กรัมต่อลิตร)

แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

9. **ศึกษาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส**

นำเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้จากข้อ 8.1.2 มาทำการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 % ตามลำดับ แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

10. **ศึกษาปัจจัยทางกายภาพบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย**

10.1 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

โดยนำเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้จากข้อ 9 มาทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 – 10.0 แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

10.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เมื่อทราบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 9 และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากข้อ 10.1 แล้ว มาทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อโดย ทำการเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 37, 40 ^{O}ซ และอุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) ที่มีความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที อายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

10.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 โดยทำการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ที่มีอายุหัวเชื้อ 12 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

11. **ศึกษาสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์กลาย**

11.1 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังนี้

- อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0-6.0
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-8.0
- ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทนบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0-9.0

ที่อุณหภูมิ 40 ^{O}ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2

11.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีการแปรผันของอุณหภูมิที่ใช้เป็น 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 ^{O}ซ บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2

11.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์

บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างต่างๆ ดังนี้

- อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0-6.0
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-8.0
- ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทนบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0-9.0

โดยบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ และทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2

11.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 ^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที และทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2

11.5 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 % เป็นเวลา 30 นาที และทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2

11.6 การหาค่า Km ของเอนไซม์

ทำการแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรทที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 1.875 % ของเดกซ์แทรนที-2000 โดยบ่มเอนไซม์กับสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทต่างๆกัน เป็นเวลา 15 นาที ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2 แล้วนำมาเขียนกราฟในรูปของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ระหว่าง 1/V และ 1/[S] หาค่าจุดตัดแกน X นำไปคำนวณค่า *Km* ของเดกซ์แทรนเนส

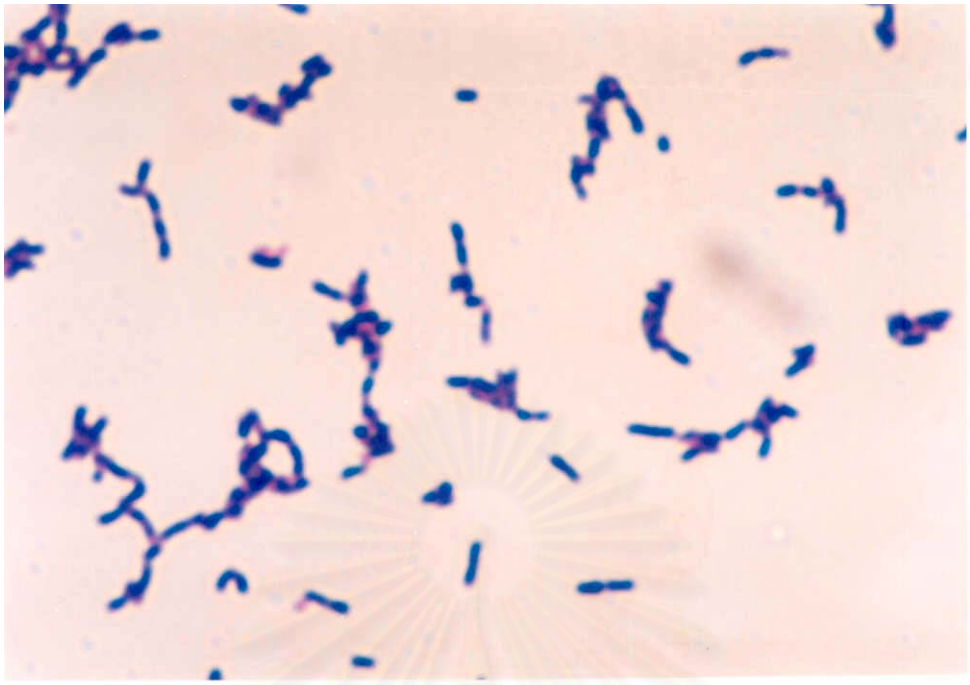
บทที่ 3

ผลการทดลอง

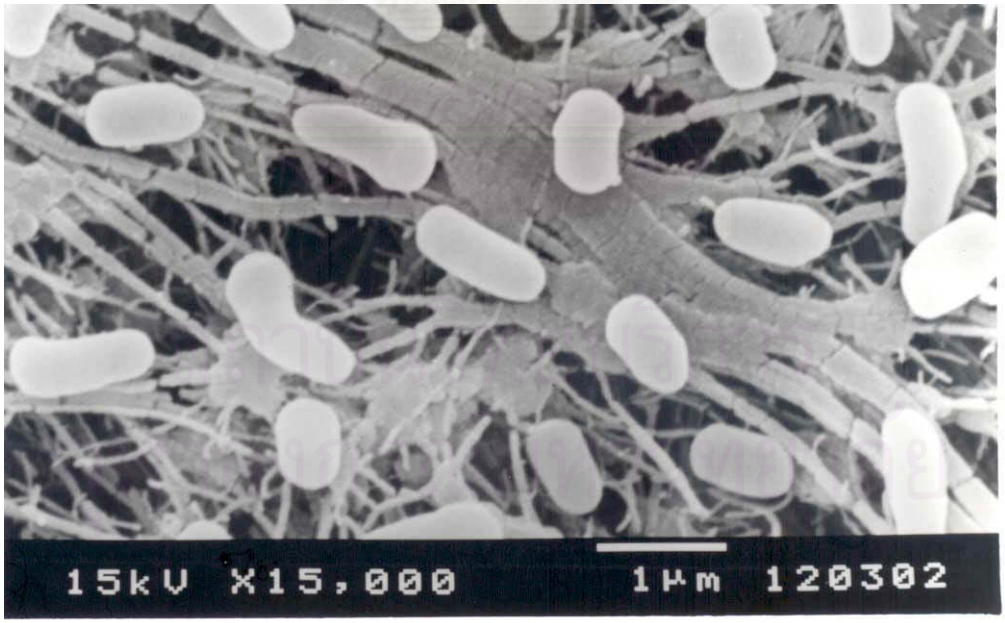
1. การจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่คัดแยกได้จากดิน จ. นนทบุรี

จากการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่คัดแยกได้โดยณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Brain heart infusion (BHI) (ภาคผนวก ก) มีรูปร่างกลม สีขาว และทึบแสง ดังแสดงในรูปที่ 19 เมื่อทำการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 มีลักษณะเป็นแท่ง ติดสีกรัมบวก ดังแสดงในรูปที่ 20 และเมื่อศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscrope) พบว่าเชื้อมีรูปร่างไม่แน่นอน เป็นได้ทั้งแท่งสั้นและยาว ผิวเรียบ มีขนาดประมาณ 1-2 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 21 ส่วนลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนกทางอนุกรมวิธานคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลการศึกษาทางชีวเคมี ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6 และ 7

รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 บนอาหารแข็ง Brain heart infusion (BHI)



รูปที่ 20 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000)



รูปที่ 21 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscrope)

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตเห็น
<u>ลักษณะของเซลล์</u>	
การติดสีกรัม	กรัมบวก
รูปร่างของเซลล์	แท่ง
การติดสี acid-fast	ไม่ติดสี
การสร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์
<u>ลักษณะของโคโลนี</u>	
รูปร่าง	กลม
สี	ขาว
ขนาด	เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มม.
การผ่านของแสง	ทึบแสง
ลักษณะขอบ	ขอบเรียบ

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 วิเคราะห์ด้วยระบบจัดจำแนกจุลินทรีย์ เอพีไอ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการศึกษาด้านชีวเคมี
การสร้างกรดที่ได้จากการหมัก:	
กลีเซอรอล (glycerol)	-
อิริไตรทอล (erythritol)	-
ดี-อะราบิโนส (D-arabinose)	-
แอล-อะราบิโนส (L-arabinose)	-
ไรโบส (ribose)	-
ดี-ไซโลส (D-xylose)	-
แอล-ไซโลส (L-xylose)	-
อะโดนิทอล (adonitol)	-
เบตา-เมธิล-ดี-ไซโลไซด์ (β-methyl-D-xyloside)	-
กาแลคโตส (galactose)	-
ดี-กลูโคส (D-glucose)	-
ดี-ฟรักโทส (D-fructose)	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 (ต่อ1)

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการศึกษาด้านชีวเคมี
การสร้างกรดที่ได้จากการหมัก :	
ดี-แมนโนส (D-mannose)	-
แอล-ซอร์โบส (L-sorbose)	-
แรมโนส (rhamnose)	-
ดัลซิทอล (dulcitol)	-
อิโนซิทอล (inositol)	-
แมนนิทอล (mannitol)	-
ซอร์บิทอล (sorbitol)	-
แอลฟา-เมทธิล-ดี-แมนโนไซด์ (α-methyl-D-mannoside)	-
แอลฟา-เมทธิล-ดี-กลูโคไซด์ ((α-methyl-D-glucoside)	-
เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามีน (N-acetyl-glucosamine)	-
เอมิลดาลีน (amyedaline)	-
อาร์บิวทีน (arbutine)	-
เอสคูลิน (esculin)	+
ซาลิซีน (salicine)	-
เซลโลไบโอส (cellobiose)	-
มอลโทส (maltose)	-
แลคโทส (lactose)	-
เมลิไบโอส (melibiose)	-
ซูโครส (sucrose)	+
ทรีฮาโลส (trehalose)	-
อินนูลิน (inuline)	+
เมเลไซโทส (melezitose	-
ดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose)	+
แป้ง (starch)	-
ไกลโคเจน (glycogen)	-
ไซลิทอล (xylitol)	-
เบตา-เจนติโอไบโอส (β-gentiobiose)	-
ดี-ทูราโนส (D-turanose)	-
ดี-ไลโซส (D-lyxose)	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาด้านชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 (ต่อ2)

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการศึกษาด้านชีวเคมี
การสร้างกรดที่ได้จากการหมัก :	
ดี- ทากาโทส (D-tagatose)	-
ดี-ฟูโคส (D-fucose)	-
แอล-ฟูโคส (L-fucose)	-
ดี-อะราบิโนส (D-arabinose)	-
แอล-อะราบิโนส (L-arabinose)	-
กลูโคเนท (gluconate)	-
2-คีโต-กลูโคเนท (2-keto-gluconate)	-
5-คีโต-กลูโคเนท (5-keto-gluconate)	-

หมายเหตุ : + คือมีการสร้างกรดได้ ; - คือไม่สามารถสร้างกรดได้

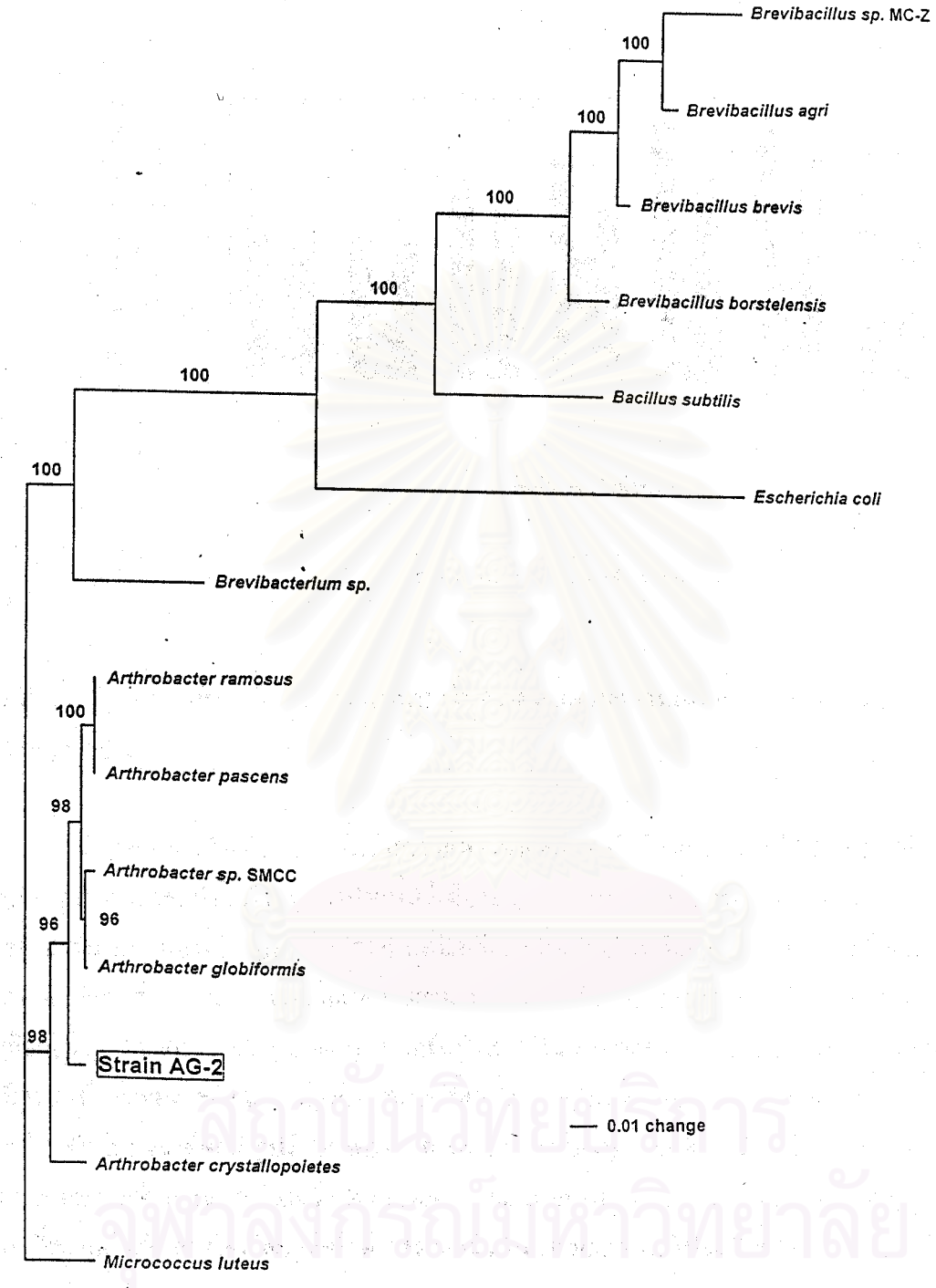
จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 โดยนาถชวา (2543) พบว่า ยีน 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีขนาดประมาณ 1.48 กิโลเบส (Kb) และมีลำดับเบสดังรูปที่ 22

หลังจากนำลำดับเบสของ16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 เปรียบเทียบกับ16เอส ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีฐานข้อมูลของ Gen Bank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 คล้ายกับลำดับเบส 16 เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Arthrobacter globiformis, A. pascens* และ *A. ramosus* โดยมีความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 98 % จากนั้นนำลำดับ16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในสกุลต่างๆมาทำ alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTALX และสร้าง Phylogenic Tree โดยโปรแกรม PAUP* (Swofford, D.L. 2000. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other method). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.) ดังแสดงในรูปที่ 23

ดังนั้น จากผลการศึกษาด้านชีวเคมีและทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 เป็นแบคทีเรียในสกุล Arthrobacter

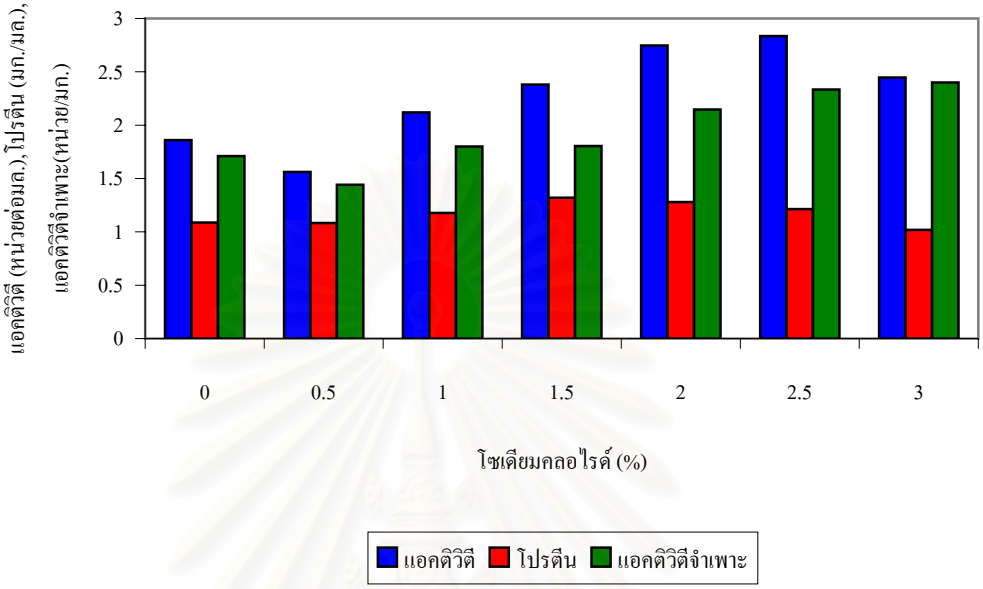
AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG GATGAACGCT GGCGGCGTGC
TTAACACATG CAAGTCGAAC GATGATCCGG TGCTTGCACC
GGTGATTAGT GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGAGTAACC
TGCCCTTGAC TCTGGGATAA GCCTGGGAAA CTGGGTCTAA
TACCGGATAT GACCTTCCAT CGCATGGTGG TTGGTGGAAA
GCTTTTGTGG TTTTGGATGG ACTCGCGGCC TATCAGCTTG
TTGGTGAGGT AATGGCTTAC CAAGGCGACG ACGGGTAGCC
GGCCTGAGAG GGTGACCGGC CACACTGGGA CTGAGACACG
GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA
CAATGGGCGC AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGAGGGA
TGACGGCCTT CGGGTTGTAA ACCTCTTTCA GTAGGGAAGA
AGCGAAAGTG ACGGTACCTG CAGAAGAAGC GCCGGCTAAC
TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG GCGCAAGCGT
TATCCGATTA TTGGCGTAAA GAGCTCGTAG GCGGTTTGTC
GCGTCTGCCG TGAAAGTCCG GGGCTCAACT CCGGATCTGC
GGTGGGTACG GGCAGACTAG AGTGATGTAG GGGAGACTGG
AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGCAGA TATCAGGAGG
AACACCGATG GCGAAGGCAG GTCTCTGGGC ATTAACTGAC
GCTGAGGAGC GAAAGCATGG GGAGCGAACA GGATTAGATA
CCCTGGTAGT CCATGCCGTA AACGTTGGGC ACTAGGTGTG
GGGGACATTC CACGTTTTCC GCGCCGTAGC TAACGCATTA
AGTGCCCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GCTAAAACTC
AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG CGGAGCATGC
GGATTAATTC GATGCAACGC GAAGAACCTT ACCAAGGCTT
GACATGGACC GGACCGCCGC AGAAATGTGG TTTCCCCTTT
GGGGCTGGTT TACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG
TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC
CCTCGTTCTA TGTTGCCAGC ACGTGATGGT GGGGACTCAT
AGGAGACTGC CGGGGTCAAC TCGGAGGAAG GTGGGGACGA
CGTCAAATCA TCATGCCCCT TATGTCTTGG GCTTCACGCA
TGCTACAATG GCCGGTACAA AGGGTTGCGA TACTGTGAGG
TGGAGCTAAT CCCAAAAAGC CGGTCTCAGT TCGGATTGGG
GTCTGCAACT CGACCCCATG AAGTCGGAGT CGCTAGTAAT
CGCAGATCAG CAACGCTGCG GTGAATACGT TCCCGGGCCT
TGTACACACC GCCCGTCAAG TCACGAAAGT TGGTAACACC
CGAAGCCGGT GGCCTAACCC CTGTGGGAGG GAGCCGTCGA
AGGTGGGACT GGCGATTGGG ACTAAGTCGT AACAAGGTAA
CC

รูปที่ 22 ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2



รูปที่ 23 Phytogenic tree ของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

2 การศึกษาผลของการเพิ่มโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2



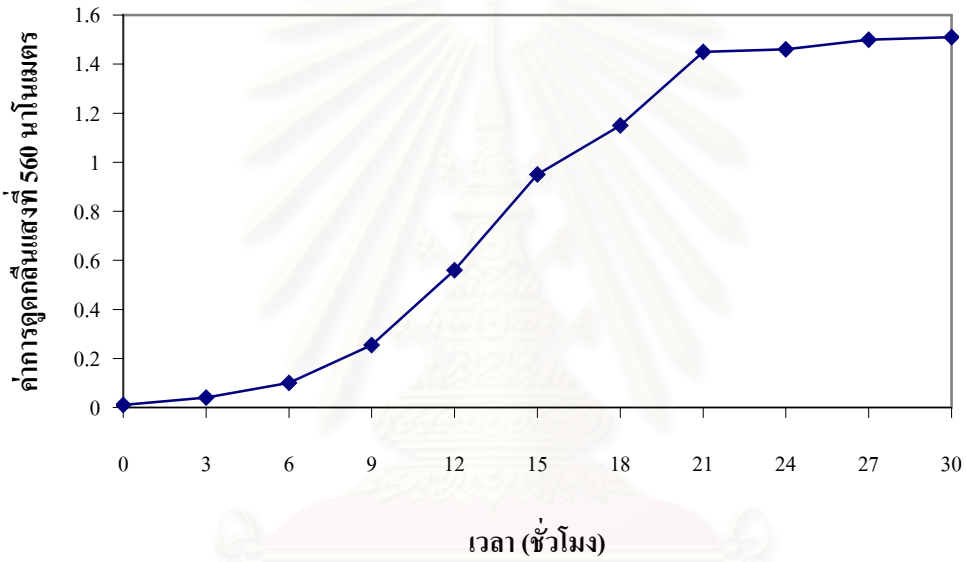
รูปที่ 24 ผลการเพิ่มเกลือต่อความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

เนื่องจากการในช่องปากนั้นมีสภาวะต่างๆมากมายทั้งนี้ขึ้นกับการบริโภคอาหารด้วย เดกซ์แทรนเนสที่จะนำไปใช้ในช่องปากนั้นจึงต้องมีความสามารถในการทนสภาวะในช่องปากได้ ซึ่งความสามารถในการทำงานได้ในช่องปากที่มีเกลืออยู่นั้นเป็นสิ่งสำคัญ เพราะอาหารที่บริโภคนั้นมักจะมีเกลืออยู่ด้วยเสมอ จึงทดลองความสามารถในการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนเนสเมื่อมีเกลืออยู่ด้วย โดยเลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกันจาก 0-3 % ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 2.4 จะได้ผลดังรูปที่ 24 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดยเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 จะให้แอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3 % ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเกลือ 3 %

3 ศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

3.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก)

เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 25

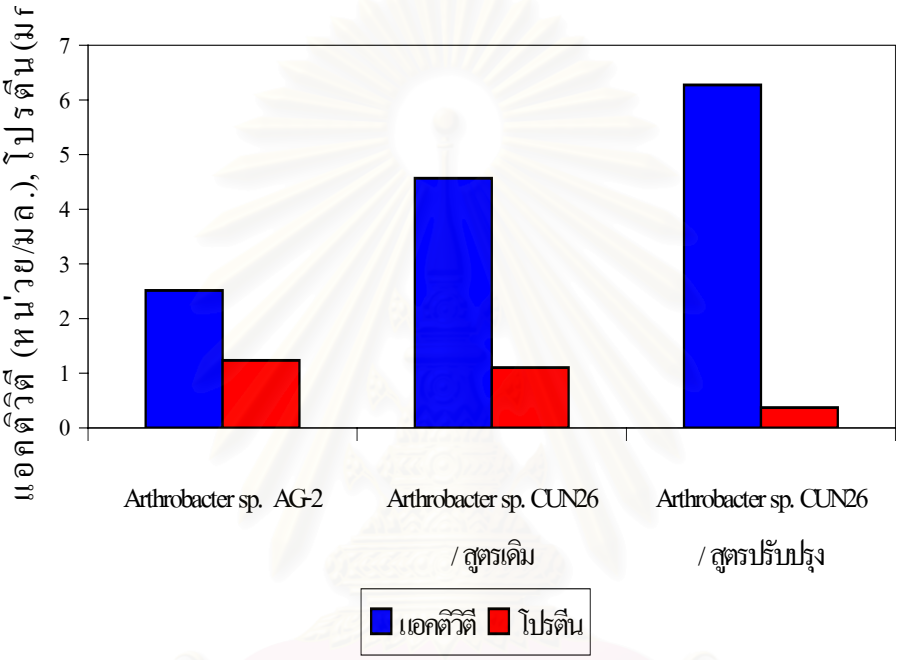


รูปที่ 25 แสดงการเจริญของเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร

พบว่าการเจริญของเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 จะมีกึ่งกลางระยะทวีคูณ (mid log phase) อยู่ที่ชั่วโมงที่ 15 ซึ่งเป็นระยะการเจริญที่เหมาะสมในการนำไปกลายพันธุ์

3.2 ศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) โดยใช้อายุหัวเชื้อ 15 ชั่วโมง ปริมาณ 10 % ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญ, แอคติวิตี, โปรตีน และ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 26 รูปแบบการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนเนสของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2

พบว่าแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะจะเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 9 และในชั่วโมงที่ 36 เชื้อจะมีการสร้างแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด จากนั้นจะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 26

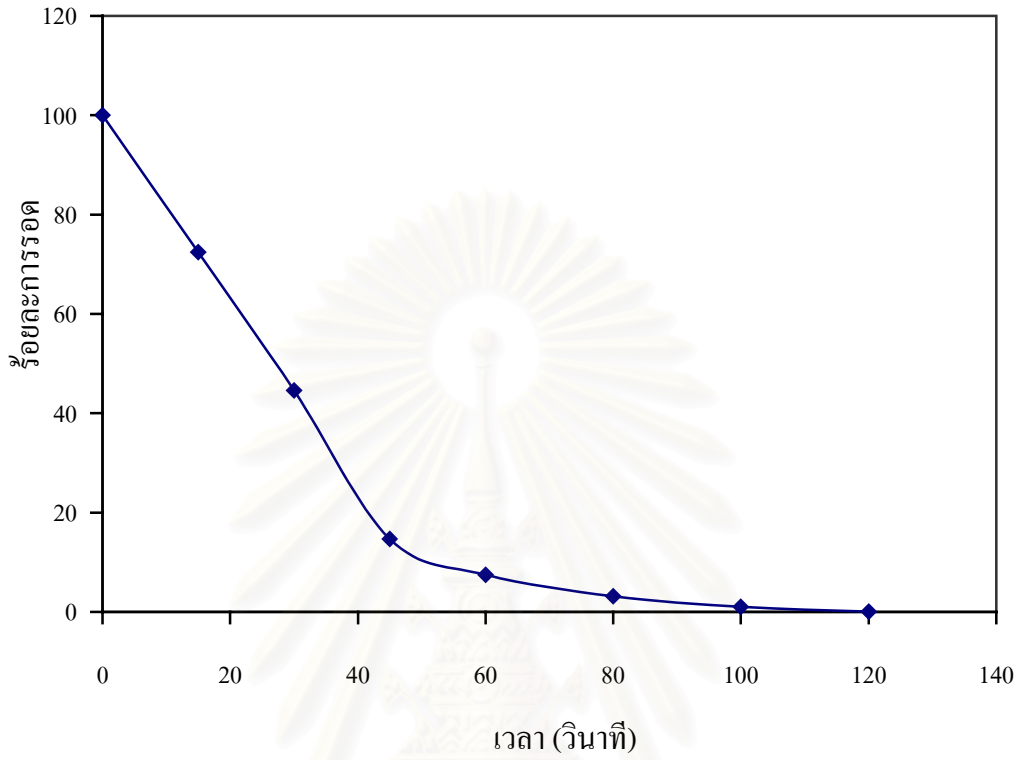
4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

4.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ AG-2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 1

ทำการชักนำการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 15 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ และดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4.1 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอดแล้วคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังตารางที่ 8 และรูปที่ 27 ทำการนับโคโลนีในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งตรงกับผลที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 80-120 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 3.19-0.06

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีที่รอดและร้อยละการรอดของ AG-2 ภายหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร

เวลา (วินาที)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมล.)	ร้อยละการรอด
0	6.2×10^{8}	100
15	5.1×10^{8}	82.46
30	4.5×10^{8}	72.58
45	9.09×10^{7}	14.67
60	4.65×10^{7}	7.50
80	1.98×10^{7}	3.19
100	6.2×10^{6}	1.00
120	3.72×10^{5}	0.06



รูปที่ 27 ร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่ผ่านการฉายแสง UV ที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.1 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 ที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในช่วงเวลา 80-120 วินาที มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูการให้บริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (ดังรูป ง1 ภาคผนวก ง) ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 287 สายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 ได้จำนวน 20 สายพันธุ์ มาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ในจำนวนนั้นมีสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ *Arthrobacter* sp. AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
AU3	3.635	1.453	2.502	49.34	8.83
AU5	3.542	1.424	2.487	44.81	8.18
AU13	3.175	1.280	2.480	29.80	7.87
AU15	2.975	1.333	2.349	21.63	2.17
AG-2	2.446	1.064	2.299	-	-

4.1.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิจากข้อ 4.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความเสถียรต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้แสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
AU3	3.635	2.502	3.055	2.485	15.96	0.68
AU5	3.542	2.487	2.962	2.296	16.37	7.68
AU13	3.175	2.480	2.185	1.868	31.18	24.68
AU15	2.975	2.349	2.165	1.835	27.24	21.88
AG-2	2.446	2.299	2.434	2.287	0.49	0.52

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าหลังจากการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง สายพันธุ์ AU3 ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลงคิดเป็นร้อยละ 15.96 ขณะที่ AU5, AU13 และ AU15 ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลงคิดเป็นร้อยละ 16.37, 31.18 และ 27.24 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งของสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ AU3 และ AU5 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 คิดเป็นร้อยละ 25.51 และ 21.69 ขณะที่ในกรณีของแอคติวิตีจำเพาะนั้นสายพันธุ์ AU3 มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 คิดเป็นร้อยละ 8.658

ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ AU3 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2

นำเชื้อ *Arthrobacter* sp. AU3 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี 3.055 หน่วยต่อมล. แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 2.485 หน่วยต่อมก. มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-120 วินาที ที่ให้อัตราการรอดชีวิตร้อยละ 5-0.07 (ภาคผนวก ค) แล้วนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาเลี้ยงในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) และบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2.1 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงได้เพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อ *Arthrobacter* sp. AU3 ที่ผ่านการฉายแสง UV ในช่วงเวลา 60-120 วินาที มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูการให้บริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นนี้ทั้งหมด 255 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AU3 ได้ 19 สายพันธุ์ แล้วทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ในจำนวนนี้ปรากฏมีสายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ที่ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น AU3 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ *Arthrobacter* sp AU3		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ *Arthrobacter* sp AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
BU3	2.537	1.299	1.953	10.59	1.83	31.25	49.88
BU5	2.870	1.245	2.305	25.11	20.18	48.47	76.90
BU13	2.303	1.237	1.862	0.39	-2.92	19.14	42.90
BU15	2.459	1.211	2.031	7.19	5.89	27.21	55.87
BU18	2.583	1.308	1.975	12.60	2.97	33.63	51.57
BU20	2.860	1.863	1.535	24.67	-19.97	47.96	17.81
BU25	2.303	1.265	1.821	0.39	-5.06	19.14	39.75
BU33	2.390	1.925	1.242	4.18	-35.25	23.64	-4.68
BU36	2.362	1.233	1.916	2.96	-0.14	22.19	47.05
BU40	2.322	1.203	1.930	1.22	0.63	20.12	48.12
AU3	2.294	1.196	1.918			18.68	47.20
AG-2	1.933	1.484	1.303				

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ AU3

4.2.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิจากการทดลองข้อ 4.2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่เพื่อตรวจสอบความเสถียรต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น AU3

ตารางที่ 12 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 รอบ

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
BU3	2.537	1.953	1.927	1.570	24.04	19.61
BU5	2.870	2.305	2.466	2.188	14.08	5.08
BU15	2.459	2.031	1.768	1.960	28.10	3.50
BU18	2.583	1.975	2.208	1.839	14.52	6.89
BU40	2.322	1.930	1.120	1.249	51.77	35.28
AU3	2.294	1.918	1.834	1.626	20.05	15.22
AG-2	1.933	1.303	1.914	1.296	0.98	0.54

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้ลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ โดยสายพันธุ์ BU3, BU5, BU15, BU18 และ BU40 ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีลดลงคิดเป็นร้อยละ 24.04, 14.08, 28.10, 14.52 และ 51.77 ตามลำดับ ดังตารางที่ 12 ทั้งนี้สายพันธุ์ BU5 และ BU15 สามารถให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AU3 คิดเป็นร้อยละ 34.46 และ 20.39 เมื่อคิดแอคติวิตีจำเพาะสายพันธุ์ BU5 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AU3 คิดเป็นร้อยละ 34.56

ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ BU5 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 3

นำ *Arthrobacter* sp. BU5 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Arthrobacter* sp. AU3 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.466 หน่วยต่อมล. และมี แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.188 หน่วยต่อมก. มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 80-140 วินาที ซึ่งให้อัตราการรอดร้อยละ 5.33-0.031 (ภาคผนวก ค) แล้วนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตมาเลี้ยงในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) นำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.3.1 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้น ปฐมภูมิและทุติยภูมิ

เมื่อนำเชื้อ *Arthrobacter* sp. BU5 ที่ผ่านการฉายแสง UV ในช่วงเวลา 80-140 วินาที มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูการให้บริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 255 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ BU5 ได้จำนวน 13 สายพันธุ์มาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น BU5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ BU5		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CU2	2.790	1.093	2.553	3.03	-1.66	23.67	18.03
CU15	3.245	1.043	3.111	19.83	19.84	43.84	43.83
CU16	3.055	1.096	2.787	12.81	7.36	35.42	28.85
CU22	3.107	1.077	2.885	14.73	11.12	37.72	33.38
CU29	2.872	1.107	2.594	6.06	-0.08	27.30	19.93
CU44	2.988	1.131	2.642	10.34	1.77	32.45	22.15
CU48	2.722	1.221	2.229	0.52	-14.12	20.66	3.05
BU5	2.708	1.043	2.596			20.04	20.01
AG-2	2.256	1.043	2.163				

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ BU5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิจากข้อ 4.3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวอีกครั้งเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้แสดงไว้ในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CU15	3.245	3.111	3.201	2.991	1.26	3.86
CU16	3.055	2.787	3.014	2.679	1.34	3.88
CU22	3.107	2.885	2.716	2.802	12.58	2.88
CU44	2.988	2.642	2.850	2.426	4.62	8.18
BU5	2.708	2.596	2.492	2.386	7.98	8.09
AG-2	2.256	2.163	2.237	2.158	0.84	0.23

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้นั้นลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ โดยสายพันธุ์ CU15, CU16, CU22 และ CU44 หลังการถ่ายเชื้อจำนวน 5 ครั้ง ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ลดลงคิดเป็นร้อยละ 1.26, 1.34, 12.58 และ 4.62 ตามลำดับ แต่สายพันธุ์กลายทั้ง 4 ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น BU5 คิดเป็นร้อยละ 28.57, 20.95, 9.26 และ 14.37 ตามลำดับ โดยแอคติวิตีจำเพาะ สายพันธุ์ CU15 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น BU5 คิดเป็นร้อยละ 25.36

ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ CU15 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

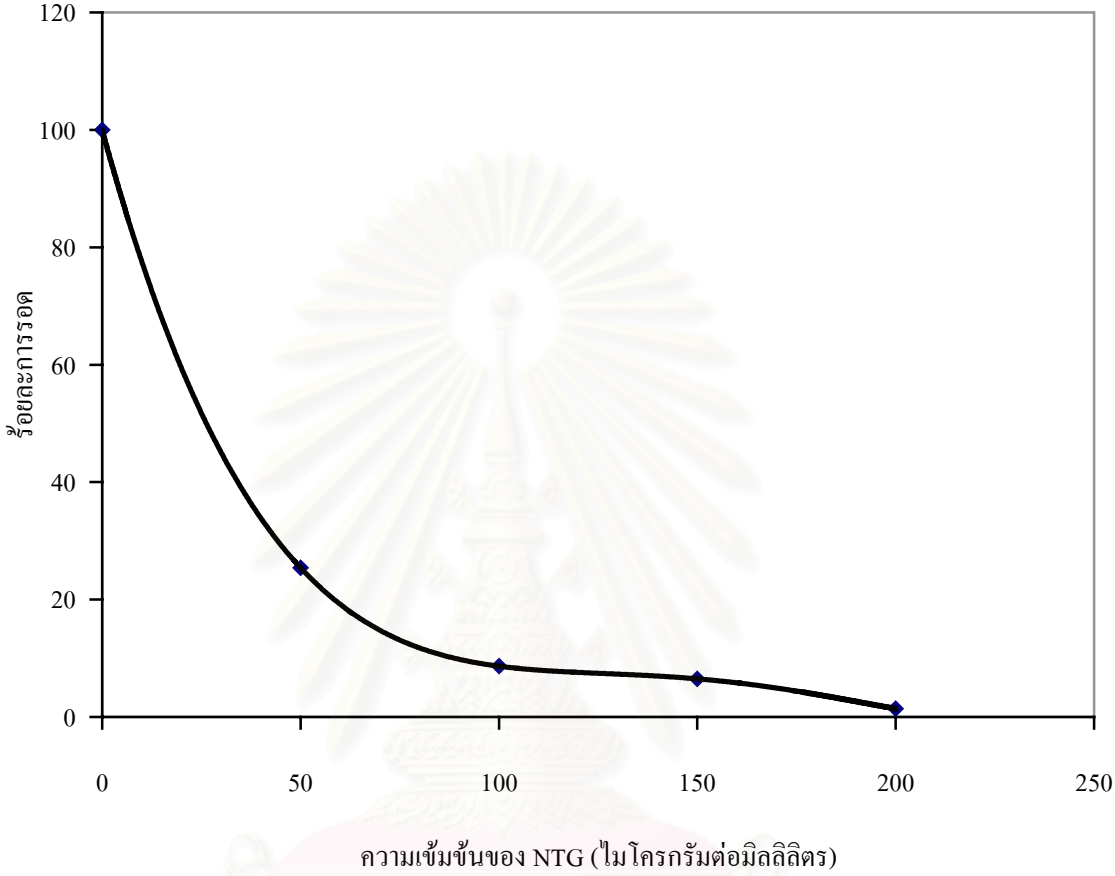
5. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CU15

เนื่องจากผลการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในทั้ง 3 รอบที่ผ่านมา สายพันธุ์กลายให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ไม่คงที่ ซึ่งมักพบในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต การทดลองต่อไปจึงทำการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้สาร NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้เดกซ์แทรนเนสสูงสุด ซึ่งทำโดยนำเชื้อสายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CU15 ที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 3.201 หน่วยต่อมล. มากลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50-200 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์นำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญและคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังตารางที่ 15 และรูปที่ 28

ตารางที่ 15 จำนวนโคโลนีที่รอดและร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. CU15 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมล.)	ร้อยละการรอด
0	38×10^{8}	100
50	94×10^{7}	25.41
100	32×10^{7}	8.65
150	24×10^{7}	6.49
200	52×10^{6}	1.41

จากที่มีรายงานของ Miller (1972) กล่าวว่า ภาวะที่การกลายพันธุ์ที่ให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0-50 เป็นช่วงที่ทำให้เกิดกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วทำการแปรผันเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับ NTG ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดต่อไป



รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ CU15 หลังการบ่มร่วมกับสาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

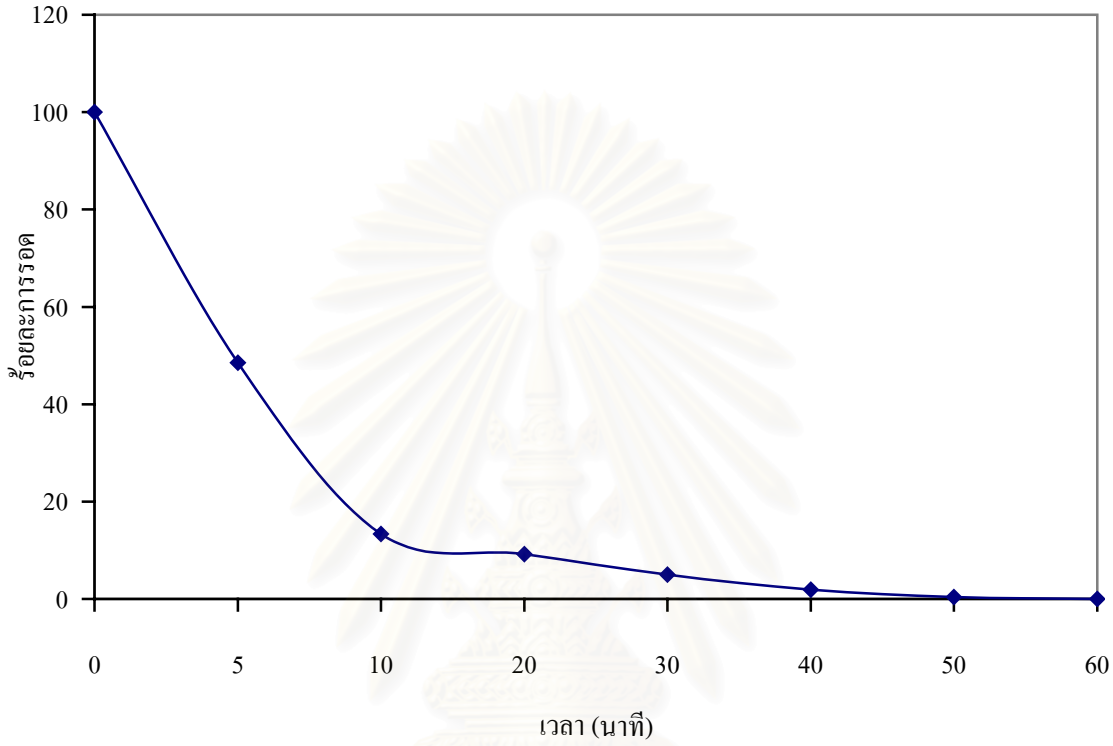
5.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CU15 ด้วย NTG รอบที่ 1

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CU15 ด้วย NTG เพื่อให้ได้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงระหว่าง 0-50 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่าหากคงปริมาณ NTG ไว้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วบ่มเชื้ออยู่ในช่วงระหว่าง 10-60 นาที ที่ 37 ^{o}ซ จะให้อัตราการรอดของเชื้ออยู่ในช่วง 13.38-0.01 ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ต้องการ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 29

ตารางที่ 16 จำนวนโคโลนีที่รอด และร้อยละการรอดของ *Arthrobacter* sp. CU15 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมิลิลิตร)	ร้อยละการรอด
0	68×10^{8}	100
5	33×10^{8}	48.53
10	91×10^{7}	13.38
20	83×10^{7}	12.21
30	34×10^{7}	5.00
40	12.8×10^{7}	1.88
50	28×10^{6}	0.41
60	10×10^{5}	0.01

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 ร้อยละการรอดของ CU15 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มล. ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเดกซ์แทรนเนสหลังการกลายพันธุ์ CU15 ด้วย NTG

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CU15 ด้วยสาร NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูการให้บริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อทั้งหมด 150 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ CU15 ได้จำนวน 26 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 11 สายพันธุ์ที่ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น CU15 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG 1 รอบ

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ CU15		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN1	4.214	1.061	3.972	6.12	15.94	37.04	40.70
CUN4	4.120	1.099	3.749	3.75	9.43	33.98	32.80
CUN5	4.276	1.144	3.738	7.68	9.11	39.06	32.41
CUN8	4.382	1.195	3.667	10.35	7.03	42.50	29.90
CUN9	4.687	1.133	4.137	18.03	20.75	52.43	46.55
CUN11	4.220	1.099	3.840	6.27	12.08	37.24	36.03
CUN12	4.239	1.125	3.768	6.75	9.98	37.85	33.48
CUN14	4.288	1.131	3.791	7.98	10.65	39.45	34.29
CUN26	4.923	1.195	4.120	23.97	20.25	60.10	45.94
CUN31	4.108	1.128	3.642	3.45	6.30	33.59	29.01
CUN37	4.139	1.075	3.850	4.23	12.38	34.60	36.38
CU15	3.971	1.159	3.426			29.14	21.36
AG-2	3.075	1.089	2.823				

สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CU15

5.1.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในขั้นทุติยภูมิ แล้วหาปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้เทียบกับปริมาณที่ได้ก่อนการถ่ายเชื้อ

ตารางที่ 18 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายที่ได้หลังจากการชักนำด้วย NTG รอบที่ 1

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN1	4.214	3.972	3.747	3.511	11.08	11.61
CUN9	4.687	4.137	4.563	3.574	2.65	13.61
CUN11	4.220	3.840	3.461	2.878	17.99	25.05
CUN26	4.923	4.120	4.793	4.045	2.64	1.82
CUN37	4.139	3.850	2.471	2.538	40.30	34.08
CU15	3.971	3.426	3.871	3.185	2.51	7.03
AG-2	3.075	2.823	3.047	2.801	0.91	0.78

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 5 สายพันธุ์คือ CUN1, CUN9, CUN11, CUN26 และ CUN37มีเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีลดลงคิดเป็นร้อยละ 11.08, 2.65, 17.99, 2.64 และ 40.30 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18 ทั้งนี้สายพันธุ์ CUN9 และ CUN26 สามารถให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CU15 คิดเป็นร้อยละ 17.88 และ 23.82 ตามลำดับ โดยแอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ CUN26 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CU15 คิดเป็นร้อยละ 27

ดังนั้นจึงนำ CUN26 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

นำเชื้อ *Arthrobacter* sp. CUN26 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 4.793 หน่วยต่อมล. มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.045 หน่วยต่อมก. มา กลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTGนาน 10-80 นาที ที่ 37 ^{O}ซ จะทำให้อัตราการรอดของเชื้ออยู่ในช่วงต่ำกว่า 25 % (ภาคผนวก ค) ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ต้องการ นำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG มาเลี้ยงในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5.2.1 **การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเดกซ์แทรนเนสหลังการกลายพันธุ์** *Arthrobacter* sp. **CUN26 ด้วย NTG**

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้น ปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN26 ด้วยสาร NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูขนาดบริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 100 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสที่มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ CUN26 ได้จำนวน 18 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น CUN26 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG รอบที่ 2

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ CUN26		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN2-5	4.538	1.117	4.063	27.01	33.66	99.21	77.63
CUN2-7	4.183	1.261	3.317	17.07	9.57	83.63	45.61
CUN2-21	3.641	1.192	3.055	1.90	0.99	59.83	34.21
CUN2-23	3.785	1.099	3.444	5.93	13.53	66.16	50.88
CUN26	3.573	1.157	3.088			56.85	32.90
AG-2	2.278	1.003	2.271				

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CUN26

5.2.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 4 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้

ตารางที่ 20 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังจากการชักนำด้วย NTG รอบที่ 2

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN2-5	4.538	4.063	4.270	3.905	5.91	3.89
CUN2-7	4.183	3.317	4.084	2.818	2.37	15.04
CUN2-21	3.641	3.055	3.236	2.284	11.12	25.24
CUN2-23	3.785	3.444	3.542	2.928	6.42	14.98
CUN26	3.573	3.088	3.484	2.986	2.49	3.30
AG-2	2.278	2.271	2.256	2.257	0.97	0.62

* หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

จากผลในตารางที่ 20 พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์คือ CUN2-5, CUN2-7, CUN2-21 และ CUN2-23 ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีลดลงคิดเป็นร้อยละ 5.91, 2.37, 11.12 และ 6.42 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง สายพันธุ์ CUN2-5 และ CUN2-7 ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN26 คิดเป็นร้อยละ 22.56 และ 17.22 ตามลำดับ เมื่อคิดแอคติวิตีจำเพาะสายพันธุ์ CUN2-5 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN26 คิดเป็นร้อยละ 30.78

ดังนั้นจึงนำ CUN2-5 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

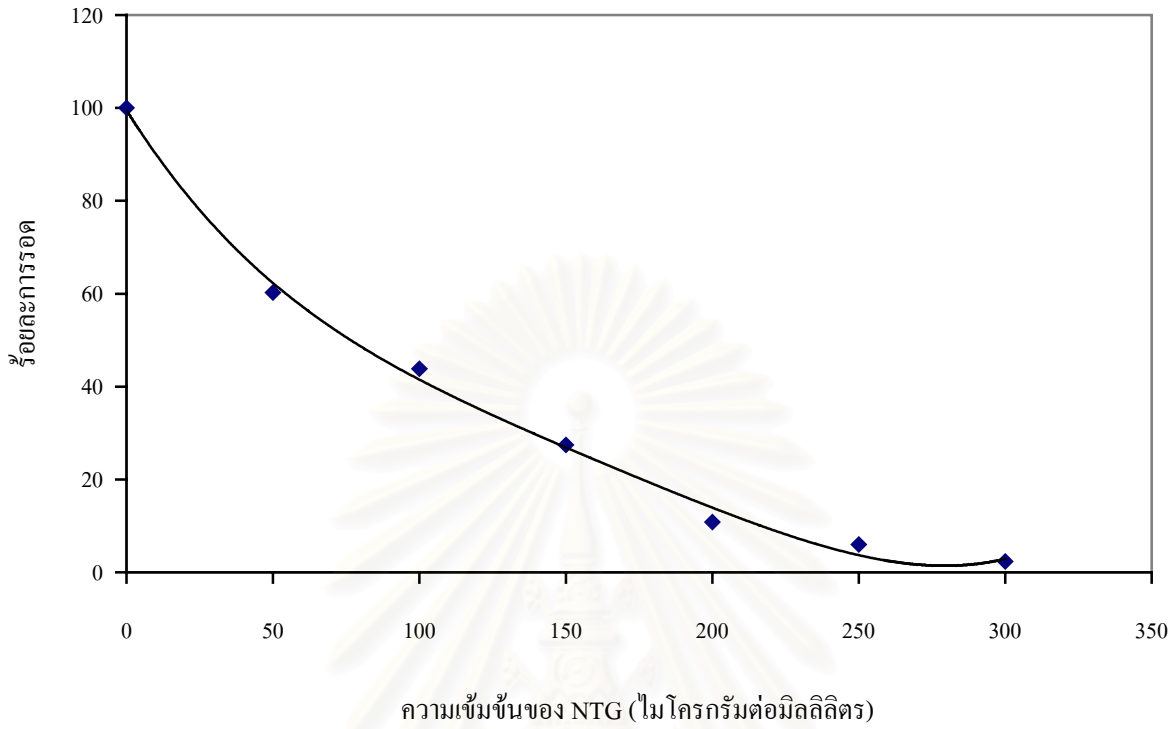
5.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN2-5

จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในรอบที่ผ่านมา การใช้สารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 0-80 นาทีนั้น พบว่าเชื้อจะให้อัตราการรอดอยู่ในขอบเขตที่ต้องการนั้นต้องใช้เวลานาน เพื่อยืดระยะเวลาการกลายพันธุ์ให้สั้นลงโดยทำการแปรผันความเข้มข้นของ NTG อีกครั้ง เพื่อหาความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมกับการกลายพันธุ์ CUN2-5 มากลายพันธุ์ต่อด้วยสารเคมี NTG โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50-300 ไมโครกรัมต่อมล. ภายใต้สภาวะเดียวกันกับข้างต้น นับจำนวนโคโลนีและคำนวณร้อยละการรอด ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 30

ตารางที่ 21 จำนวนโคโลนีที่รอด และร้อยละการรอดของ CUN2-5 ภายหลังการกลายพันธุ์ด้วย NTG 0-300 ไมโครกรัมต่อมล.

ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เซลล์ต่อมล.)	ร้อยละการรอด
0	36.5×10^8	100
50	22×10^8	60.27
100	16×10^8	43.84
150	10×10^8	27.40
200	39.5×10^7	10.82
250	22×10^7	6.03
300	85×10^6	2.33

จากรายงานของ Miller (1972) ที่รายงานว่า ภาวะการกลายพันธุ์ที่ให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0-50 เป็นช่วงที่ทำให้เกิดกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด ในที่นี้คือความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมล. แต่ในการทดลองจะคงความเข้มข้น NTG ที่ 150 ไมโครกรัมต่อมล.แล้วแปรผันเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับ NTG เพื่อหาเวลาที่ให้การกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด



รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเชื้อ CUN2-5 หลังการบ่มร่วมกับสาร NTG ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-300 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที

ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN2-5 นั้นได้ทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งนี้ด้วย

5.3.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเดกซ์แทรนเนสหลังการกลายพันธุ์ CUN2-5 ด้วย NTG

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN2-5 ด้วย NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูขนาดของบริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 150 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ CUN2-5 ได้จำนวน 28 สายพันธุ์ มาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ได้สายพันธุ์กลาย 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น CUN2-5 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG รอบที่ 3

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ CUN2-5		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN3-1	4.482	1.035	4.330	6.35	15.90	71.46	104.05
CUN3-8	4.258	1.083	3.932	1.04	5.25	62.89	85.30
CUN3-15	4.245	0.981	4.327	0.74	15.81	62.40	103.91
CUN3-17	4.320	1.003	4.307	2.52	15.28	65.26	102.97
CUN3-23	4.090	0.957	4.274	-2.94	14.40	56.47	101.41
CUN2-5	4.214	1.128	3.736			61.21	76.06
CUN26	3.922	1.185	3.310			50.07	55.98
AG-2	2.614	1.232	2.122				

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CUN2-5

5.3.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

เลือกสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังจากการชักนำด้วย NTG รอบที่ 3

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN3-1	4.482	4.330	4.134	3.882	7.76	10.35
CUN3-15	4.245	4.327	3.541	3.594	16.58	16.94
CUN3-17	4.320	4.307	3.069	2.795	28.96	35.11
CUN3-23	4.090	4.274	3.859	3.591	5.65	15.99
CUN2-5	4.214	3.736	3.691	3.441	12.41	7.90
CUN26	3.922	3.310	3.687	3.134	5.99	5.32
AG-2	2.614	2.122	2.595	2.119	0.73	0.14

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าแอคติวิตีของเดกซแทรนเนสที่ได้นั้นลดลงจากก่อนการถ่ายเชื้อ โดยสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์คือ CUN3-1, CUN3-15, CUN3-17 และ CUN3-23 ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีลดลงคิดเป็นร้อยละ 7.76, 16.58, 28.96 และ 5.65 ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ CUN3-1 และ CUN3-23 ยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN2-5 คิดเป็นร้อยละ 12.00 และ 4.55 ตามลำดับ เมื่อคิดแอคติวิตีจำเพาะ สายพันธุ์ CUN3-1 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN2-5 คิดเป็นร้อยละ 12.82

ดังนั้นจึงนำ CUN3-1 ไปทำการกลายพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น

5.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 4

นำเชื้อ *Arthrobacter* sp. CUN3-1 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุดเท่ากับ 4.134 หน่วยต่อมล. มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.882 หน่วยต่อมก. มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTGนาน 10-60 นาที ที่ 37 ^{O}ซ จะให้อัตราการรอดอยู่ในช่วง 16.18-2.19 % (ภาคผนวก ค) นำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{O}ซ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5.4.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเดกซ์แทรนเนสหลังการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN3-1 ด้วย NTG

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มขึ้นในขั้น ปฐมภูมิและทุติยภูมิ

หลังการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN3-1 ด้วย NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยดูการให้บริเวณใสบนอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิทั้งหมด 120 สายพันธุ์ เลือกสายพันธุ์ที่มีความกว้างของบริเวณใสขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ CUN3-1 ได้จำนวน 8 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไปโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์ตั้งต้น CUN3-1 กับสายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และชักนำด้วย NTG รอบที่ 4

สายพันธุ์				ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ CUN3-1		ร้อยละการเพิ่มเทียบกับ AG-2	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN4-10	4.487	1.080	4.155	20.71	14.81	96.37	94.89
CUN4-29	3.934	1.085	3.626	5.84	0.19	72.17	70.08
CUN3-1	3.717	1.027	3.619			62.67	69.75
CUN2-5	3.518	1.121	3.138			53.96	47.19
CUN26	3.385	1.063	3.184			48.12	49.34
AG-2	2.285	1.072	2.132				

หมายเหตุ : สายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ CUN3-1

5.4.2 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ที่ผ่านการทดสอบขั้นทุติยภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อการผลิตอีกครั้ง หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบในขั้นทุติยภูมิ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น วัดปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ ดังตารางที่ 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ต่างๆที่ได้หลังจากการชักนำด้วย NTG รอบที่ 4

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ*		หลังถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN4-10	4.487	4.155	4.530	4.226	+0.96	+1.71
CUN4-29	3.934	3.626	2.932	2.542	25.47	29.90
CUN3-1	3.717	3.619	3.605	3.514	3.01	2.90
CUN2-5	3.518	3.138	3.014	2.856	14.33	8.99
CUN26	3.382	3.184	3.352	3.202	0.71	+0.57
AG-2	2.285	2.132	2.267	2.117	0.79	0.70

*หมายถึงค่าที่ได้จากปริมาณเดกซ์แทรนเนสในขั้นต้น

พบว่าสายพันธุ์กลาย CUN4-29 ให้เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีลดลงคิดเป็นร้อยละ 25.47 ส่วนสายพันธุ์ CUN4-10 หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้งมีการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 0.96 อีกทั้งยังสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN3-1 คิดเป็นร้อยละ 25.66 และเมื่อคิดแอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ CUN4-10 มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น CUN3-1 คิดเป็นร้อยละ 20.26

จากผลการทดลองในตารางที่ 25 จะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN4-10 และ *Arthrobacter* sp. CUN26 หลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง กลับมีแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงนำเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 2 นี้มาทดสอบความเสถียรอีกครั้ง โดยการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 26

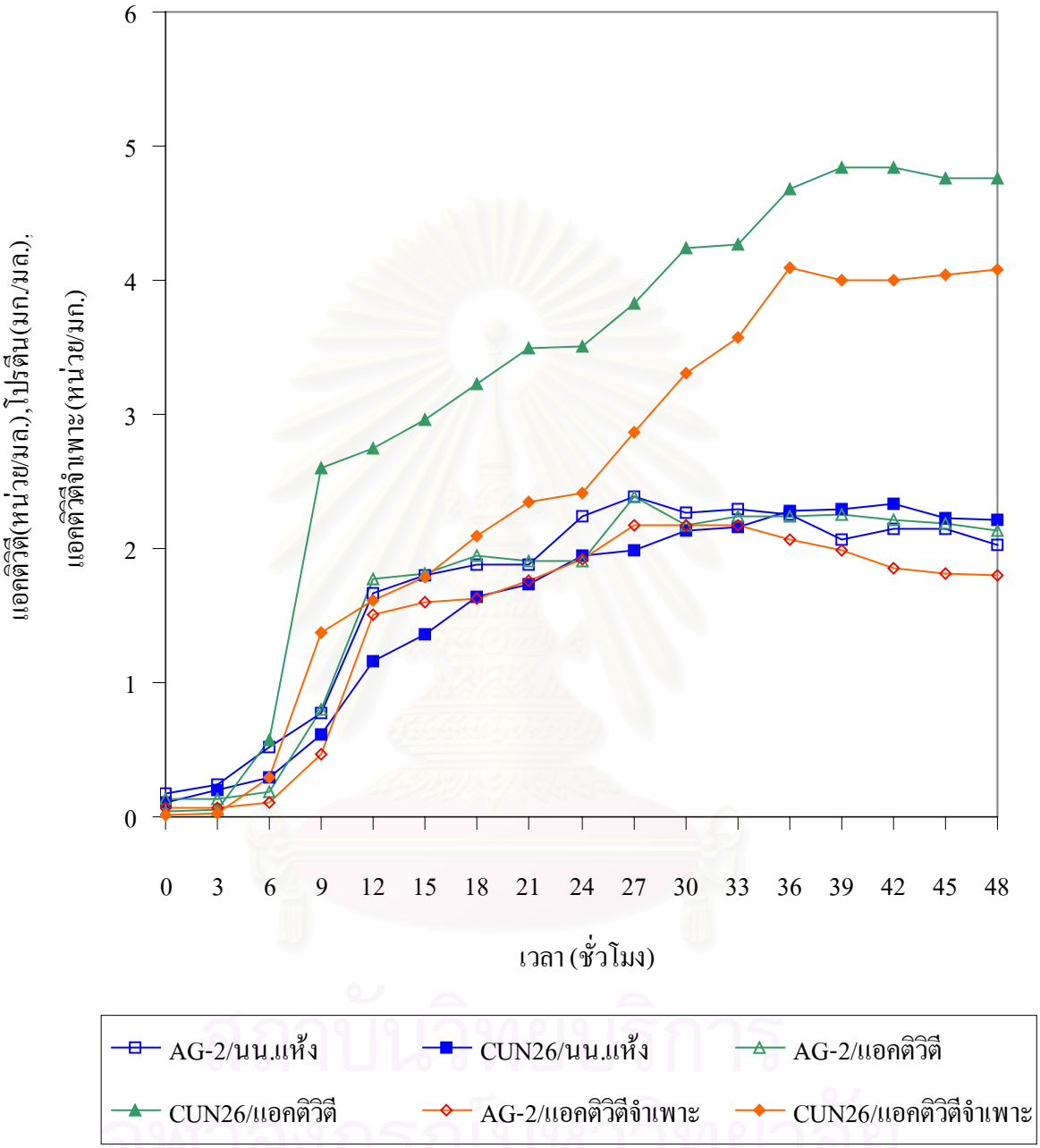
ตารางที่ 26 การทดสอบความเสถียรในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย CUN26 และ CUN4-10 ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG

สายพันธุ์	ก่อนถ่ายเชื้อ		หลังถ่ายเชื้อ		ร้อยละการลดลง	
	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
CUN4-10	4.487	4.155	3.261	3.472	27.32	16.44
CUN26	3.382	3.184	3.403	3.252	+0.62	+2.14
AG-2	2.285	2.132	2.265	2.111	0.88	0.98

หลังการถ่ายเชื้อครบ 30 ครั้ง พบว่าเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีที่ได้จากสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 มีความเสถียรที่ดีกว่า *Arthrobacter* sp. CUN4-10 โดยสายพันธุ์กลาย CUN4-10 หลังจากการถ่ายเชื้อครบ 30 ครั้งมีร้อยละการลดลงเท่ากับ 27.32 ในขณะที่ สายพันธุ์ CUN26 หลังการถ่ายเชื้อครบ 30 ครั้งมีร้อยละการเพิ่มขึ้นเป็น 0.62 ซึ่งจะเห็นว่าสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 มีความเสถียรที่ดี และเมื่อดูรูปในภาคผนวก ง รูป ง2 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yamaguchi ที่มีบลูเดกซ์แทรน (Blue dextran) 0.5 % หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะเห็นว่าสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 มี แอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

6. รูปแบบการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2

เลี้ยง *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) โดยใช้อายุหัวเชื้อ 15 ชั่วโมง ปริมาณ 10 % ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่างๆ แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญ, แอคติวิตี, โปรตีน และ แอคติวิตีจำเพาะ แสดงผลดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 รูปแบบการเจริญ และการสร้างเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

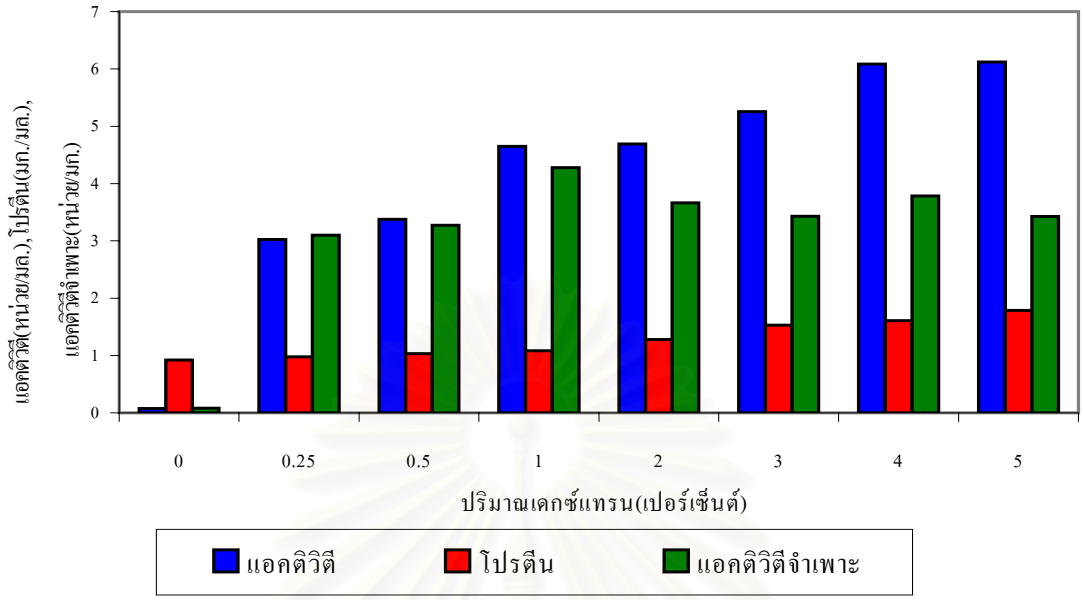
จากรูปที่ 31 พบว่าการเจริญของ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) สายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 นั้นแตกต่างกันน้อยมาก ส่วนการสร้างเดกซ์แทรนเนสจะเห็นว่าสายพันธุ์กลายมีการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมาก โดยในชั่วโมงที่ 36 สายพันธุ์กลายจะผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ 4.678 หน่วยต่อมล. และมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.096 หน่วยต่อมก. ส่วนสายพันธุ์ตั้งต้นให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีเท่ากับ 2.235 หน่วยต่อมล. และมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.064 หน่วยต่อมก. สายพันธุ์กลายมีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ในชั่วโมงที่ 36) คิดเป็นร้อยละ 109.31 และ 98.45 ตามลำดับ

7. ปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย ***Arthrobacter* sp. CUN26**

เมื่อทำการศึกษาปริมาณสารชักนำ (inducer) ได้แก่ เดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเป็น 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ได้ผลดังตารางที่ 27 และรูปที่ 32

ตารางที่ 27 การหาปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

เดกซ์แทรน (%)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)
0	0.075	0.923	0.081
0.25	3.025	0.976	3.099
0.5	3.379	1.032	3.274
1	**4.648**	**1.087**	**4.275**
2	4.692	1.280	3.666
3	5.254	1.531	3.431
4	6.085	1.608	3.784
5	6.122	1.787	3.426



รูปที่ 32 การแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

พบว่า ปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. CUN26 คือ 1 % โดยให้แอคติวิตีจำเพาะที่สูงสุดเท่ากับ 4.275 หน่วยต่อมก. ดังนั้นจึงใช้ปริมาณเดกซ์แทรน 1 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแทนเดกซ์แทรน 0.5 %

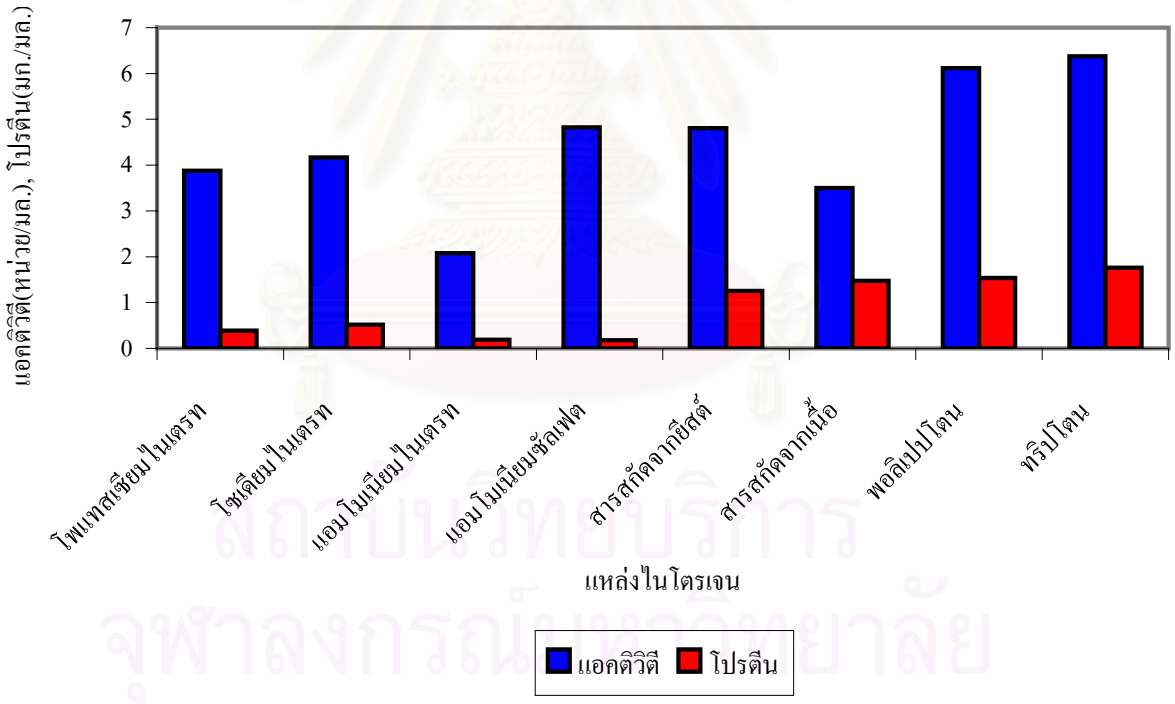
8. หาชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

8.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เมื่อทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนต่างๆที่ได้รับการปรับให้มีไนโตรเจนเท่ากับ 0.1089 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ได้ผลดังตารางที่ 28 และรูปที่ 33

ตารางที่ 28 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
โพแทสเซียมไนเตรท	3.875	0.387
โซเดียมไนเตรท	4.164	0.520
แอมโมเนียมไนเตรท	2.082	0.189
แอมโมเนียมซัลเฟต	**4.827**	**0.179**
สารสกัดจากยีสต์	4.809	1.256
สารสกัดจากเนื้อ	3.501	1.472
พอลิเปปโตน	6.116	1.540
ทริปโตน	**6.377**	**1.763**



รูปที่ 33 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ผลการทดลองพบว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 4.827 หน่วยต่อมล. และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือทริปโตน ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 6.377 หน่วยต่อมล. ดังนั้นจึงเลือกทริปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส

8.2 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

จากตารางที่ 28 และรูปที่ 33 จะเห็นว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสคือ แอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือทริปโตน ดังนั้นจึงทดลองนำ *Arthrobacter* sp. CUN26 มาเลี้ยงในอาหารที่มีการผสมระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต กับ ทริปโตน โดยนำมาหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสม ดังตารางที่ 5 (บทที่ 2) จากนั้นทำการวัดแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

พบว่าในการผสมแอมโมเนียมซัลเฟต และทริปโตนในอัตราส่วน 25 ต่อ 25 % นั้นจะให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.183 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในตารางที่ 29 ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (ตารางที่ 30 และรูปที่ 34) ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และ ทริปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส ที่อัตราส่วนร้อยละ 25 ต่อ 25 (%ของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อโดย 100 %ไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 1.0899 กรัมต่อลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

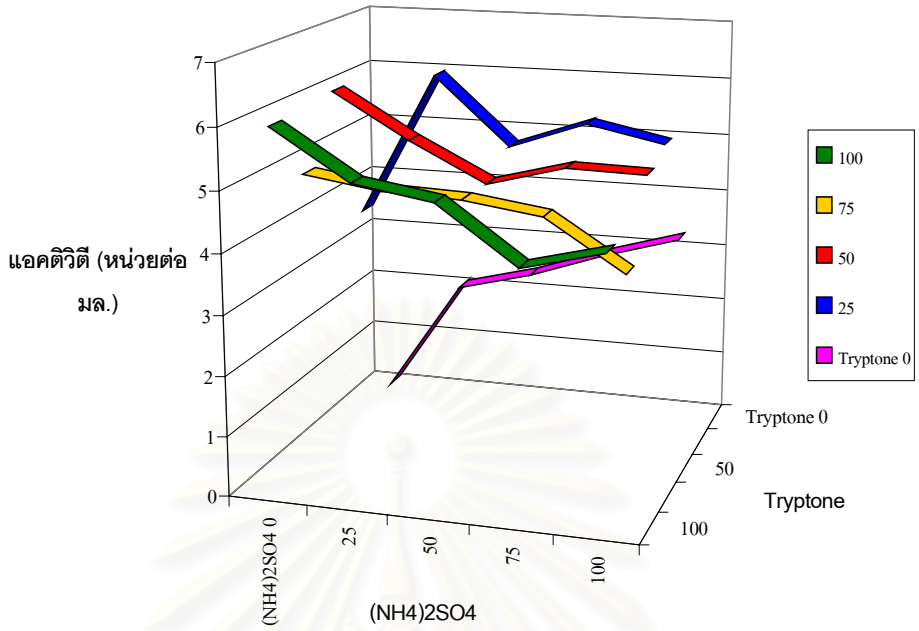
ตารางที่ 29 การศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

แอมโมเนียมซัลเฟต* (%) / ทริปโตน* (%)	0 (0 กรัมต่อลิตร)	25 (0.272 กรัมต่อลิตร)	50 (0.545 กรัมต่อลิตร)	75 (0.817 กรัมต่อลิตร)	100 (1.089 กรัมต่อลิตร)
100 (1.089 กรัมต่อลิตร)	Act. = 5.974	Act. = 5.165	Act. = 4.955	Act. = 4.033	Act. = 4.368
	Protein = 1.565	Protein = 1.432	Protein = 1.446	Protein = 1.453	Protein = 1.456
75 (0.817 กรัมต่อลิตร)	Act. = 4.940	Act. = 4.745	Act. = 4.697	Act. = 4.516	Act. = 3.692
	Protein = 1.043	Protein = 1.123	Protein = 1.096	Protein = 1.061	Protein = 1.157
50 (0.545 กรัมต่อลิตร)	Act. = 6.070	Act. = 5.313	Act. = 4.663	Act. = 5.015	Act. = 4.986
	Protein = 0.732	Protein = 0.827	Protein = 0.736	Protein = 0.731	Protein = 0.765
25 (0.272 กรัมต่อลิตร)	Act. = 3.716	***Act. = 6.183***	Act. = 5.027	Act. = 5.494	Act. = 5.222
	Protein = 0.376	Protein =0.376	Protein = 0.395	Protein = 0.387	Protein = 0.424
0 (0 กรัมต่อลิตร)	Act. = 0.110	Act. = 2.071	Act. = 2.413	Act. = 2.876	Act. = 3.265
	Protein = 0.128	Protein = 0.126	Protein = 0.122	Protein = 0.125	Protein = 0.128

*หมายเหตุ : %ของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย 100 %ไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 1.089 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 30 การผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก)

	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม/ CUN26	4.559	1.082
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม/ AG-2	2.392	1.122



รูปที่ 34 ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมล.) ของสายพันธุ์ CUN 26

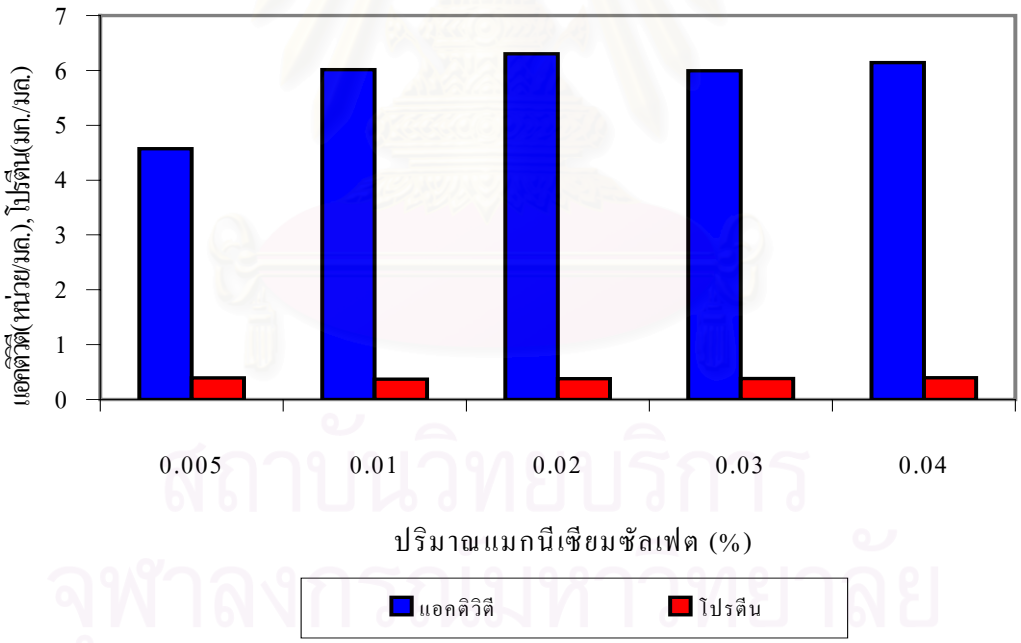
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 6 และ 7 เป็นสูตรเริ่มต้นแล้วแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต และวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ตารางที่ 31 หาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN26

แมกนีเซียมซัลเฟต (%)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
0.005	4.570	0.394
0.01	6.014	0.370
0.02	6.303	0.378
0.03	5.995	0.382
0.04	6.141	0.398



รูปที่ 35 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26

เมื่อทำการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส พบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 0.02 % ซึ่งจะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด

เท่ากับ 6.303 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในตารางที่ 31 และรูปที่ 35 จึงเลือกใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.02 %ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตของสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

10. ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

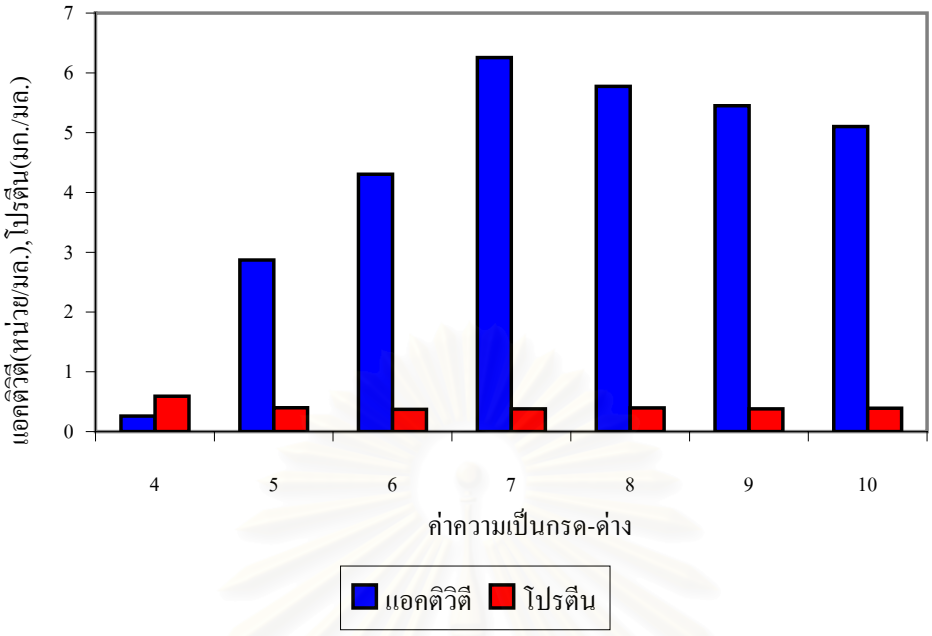
ทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 อันได้แก่ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

10.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0-10.0 หลังการเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนเนส เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ตารางที่ 32 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
4	0.260	0.592
5	2.870	0.400
6	4.304	0.373
7	**6.257**	**0.381**
8	5.773	0.397
9	5.450	0.381
10	5.102	0.392



รูปที่ 36 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลายกลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

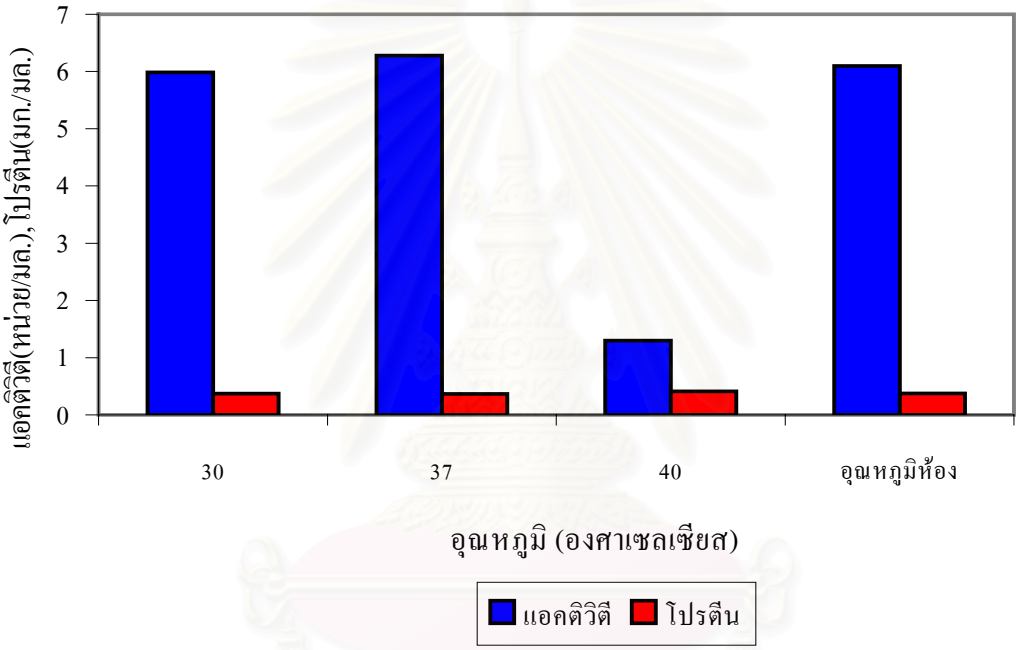
เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0-10.0 แล้วพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือ 7.0 โดยให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 6.257 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในตารางที่ 32 และรูปที่ 36 จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่ 7.0

10.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

แปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 30, 37, 40^{O}ซ และอุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ) หลังการเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 33 และรูปที่ 37

ตารางที่ 33 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

อุณหภูมิ (^{O}ซ)	แอคติวิตี(หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
30	5.985	0.372
37	**6.276**	**0.369**
40	1.301	0.411
อุณหภูมิห้อง (28-32)	6.096	0.376



รูปที่ 37 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

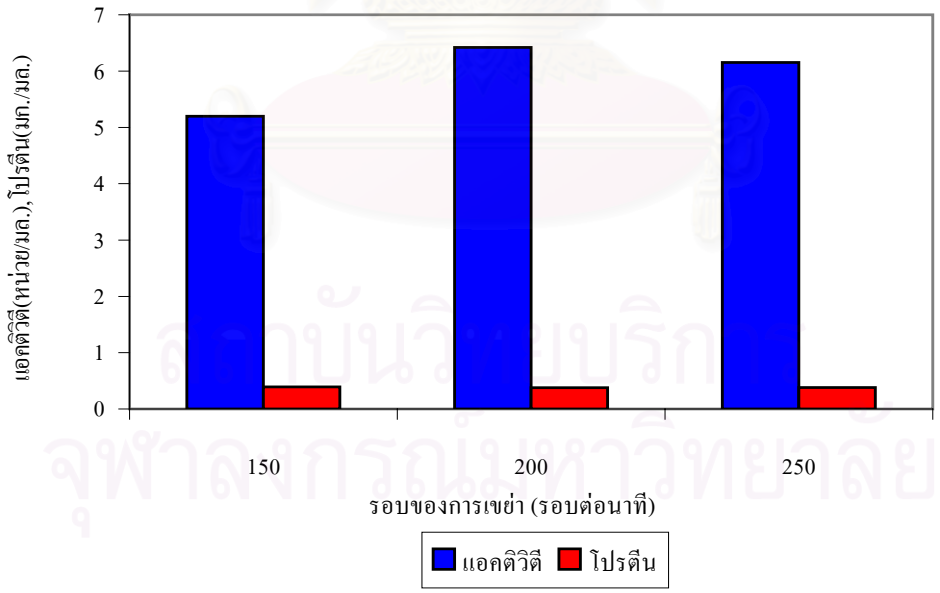
เมื่อทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เป็น 30,37,40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ) แล้วพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือ 37 ^{O}ซ โดยให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 6.276 หน่วยต่อมล. จึงเลือกใช้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่ 37 ^{O}ซ

10.3 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

โดยทำการแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าในการเลี้ยงเชื้อเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที หลังการเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรนเนส เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ได้ผลดังตารางที่ 34 และรูปที่ 38

ตารางที่ 34 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

รอบของการเขย่า (รอบต่อนาที)	แอคติวิตี(หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)
150	5.199	0.391
200	6.420	0.377
250	6.152	0.380



รูปที่ 38 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

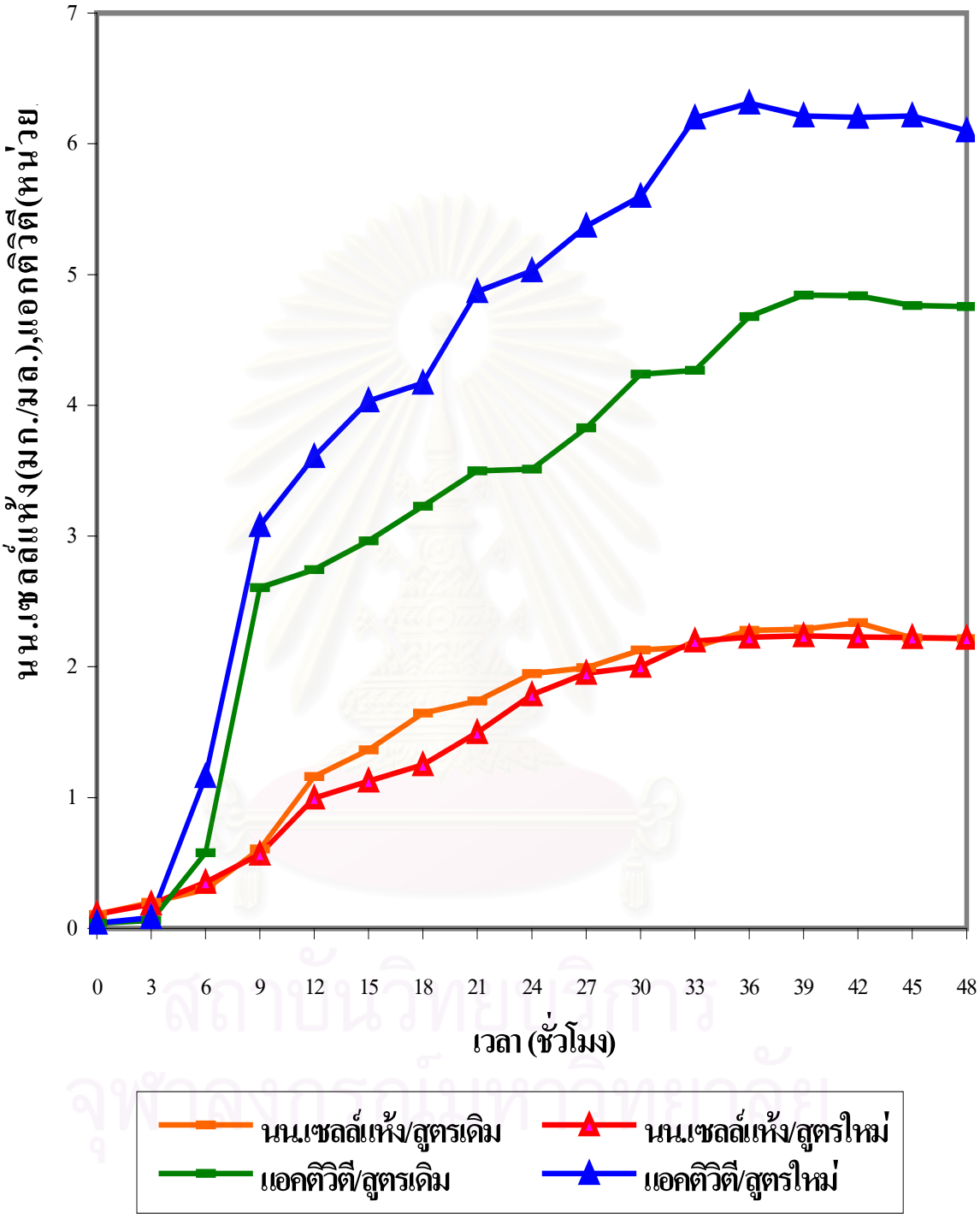
เมื่อแปรผันความเร็วรอบของการเขย่าในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่า ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Arthrobacter* sp. CUN26 คือ 200 รอบต่อนาที โดยให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 6.420 หน่วยต่อมล. ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ในการเลี้ยงสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

11. เปรียบเทียบสูตรอาหาร สภาวะเดิม กับ สูตรปรับปรุงและสภาวะใหม่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

นำสูตรอาหารและสภาวะที่ได้จากการปรับปรุงให้เหมาะกับการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 (ตารางที่ 30) มาทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและแอคติวิตี ได้ผลดังรูปที่ 39

ตารางที่ 35 เปรียบเทียบสูตรอาหารเดิม สภาวะเดิม กับสูตรปรับปรุงและสภาวะปรับปรุง ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

	สูตรเดิม/ สภาวะเดิม (กรัมต่อลิตร)	สูตรปรับปรุง/ สภาวะปรับปรุง (กรัมต่อลิตร)
K_2HPO_4	2	2
KH_2PO_4	1	1
NaCl	30	30
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	0.2
Polypeptone	10	-
Yeast extract	0.1	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	1.28
Tryptone	-	2.44
Dextran	5	10
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0	7.0
อุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ)	37^{O}ซ
รอบของการเขย่า	200 rpm	200 rpm



รูปที่ 39 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเลี้ยงสูตรเดิม สภาวะเดิม กับสูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง

พบว่า การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม สภาวะเดิม และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง ไม่แตกต่างกันเมื่อดูจากน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เชื้อผลิตได้นั้น จะเห็นว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง ที่เลี้ยงในสภาวะปรับปรุง จะมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม สภาวะเดิม โดยเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง เชื้อจะมีแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 6.31 หน่วยต่อมล. ซึ่งเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเดิม (Yamaguchi) สภาวะเดิม ในชั่วโมงที่ 36 นั้น พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงที่เลี้ยงในสภาวะปรับปรุงจะมีค่ามีแอคติวิตีสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม สภาวะเดิม คิดเป็นร้อยละ 34.88 (1.3 เท่า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

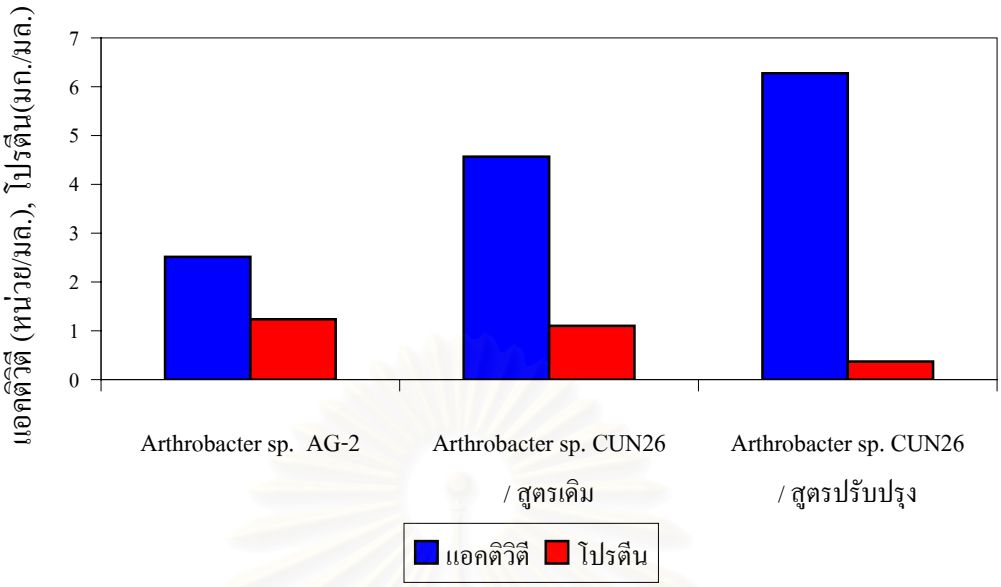
12. เปรียบเทียบแอคติวิตี และโปรตีน ระหว่าง *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น, *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง

ทำการเลี้ยง *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ สูตรปรับปรุงตามภาวะจากข้อ 11 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอคติวิตี และโปรตีน ดังแสดงผลในตารางที่ 36, รูปที่ 40

ตารางที่ 36 เปรียบเทียบแอคติวิตี และโปรตีน ระหว่าง *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น, *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง

	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	โปรตีน (มก./มล.)	ร้อยละการเพิ่มแอคติวิตี (หน่วย/มล.)
Arthrobacter sp. AG-2	2.514	1.237	-
Arthrobacter sp. CUN26 / สูตรเดิม	4.568	1.102	81.70 (1.82เท่า)
Arthrobacter sp. CUN26 / สูตรปรับปรุง	6.276	0.369	149.64 (2.50เท่า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 40 เปรียบเทียบแอคติวิตี และโปรตีน ระหว่าง *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น, *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง

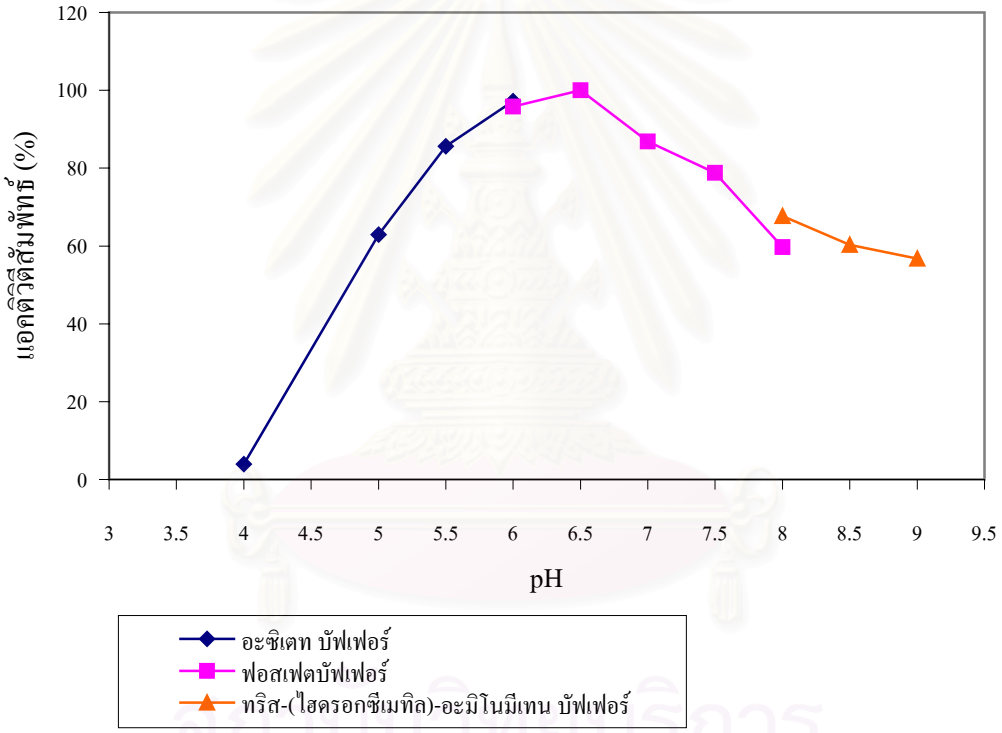
พบว่าสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น คิดเป็น 81.70% เมื่อทำการปรับปรุงอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสแล้ว จะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 มีแอคติวิตีสูงกว่า *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น คิดเป็น 149.64 % หรือ 2.5 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. สมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN26

13.1 ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

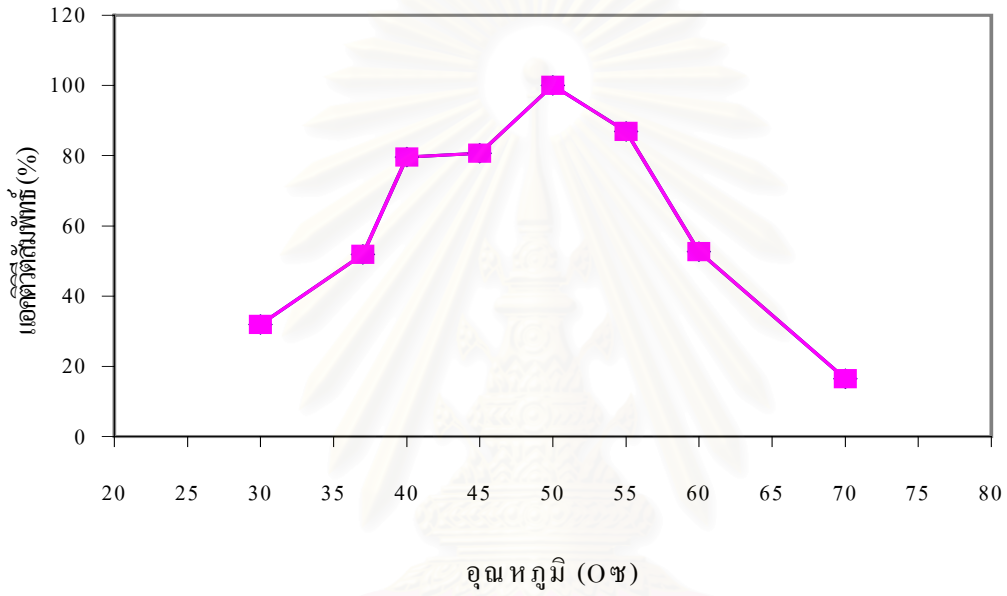
เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในบัฟเฟอร์ที่มีการแปรผันความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 4.0-9.0 ภายใต้สภาวะมาตรฐาน แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 นี้เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 41



รูปที่ 41 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

13.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 ที่มีการบ่มปฏิกิริยาต่างๆอันได้แก่ 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70^{O}ซ พบว่าอุณหภูมิ 50^{O}ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 42

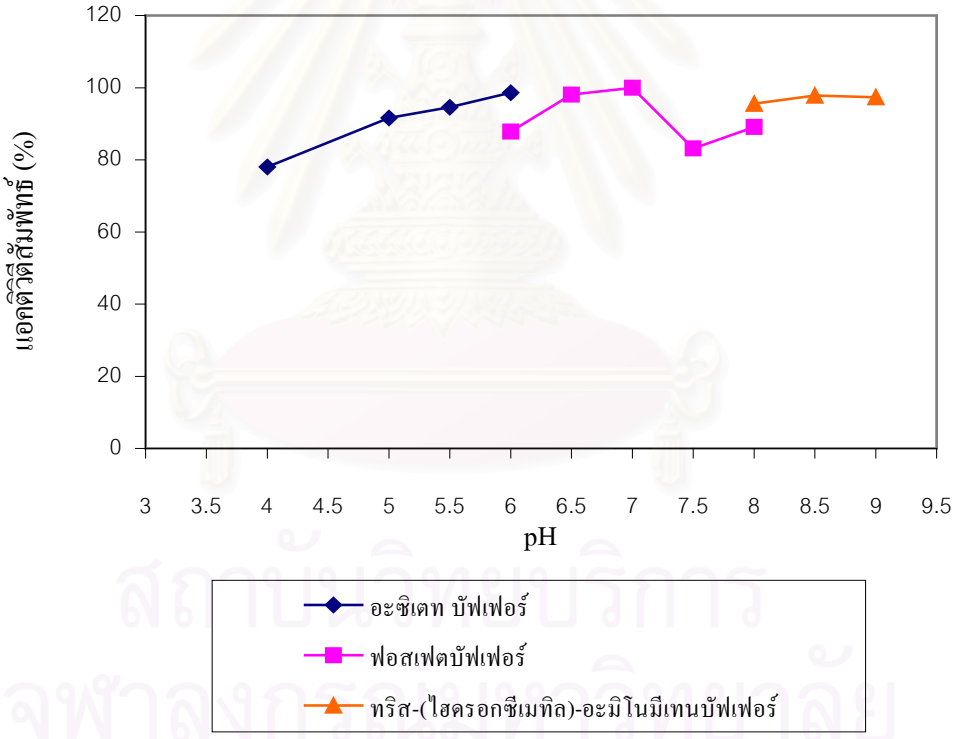


รูปที่ 42 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 30-70 ^{O}ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรด-ด่าง

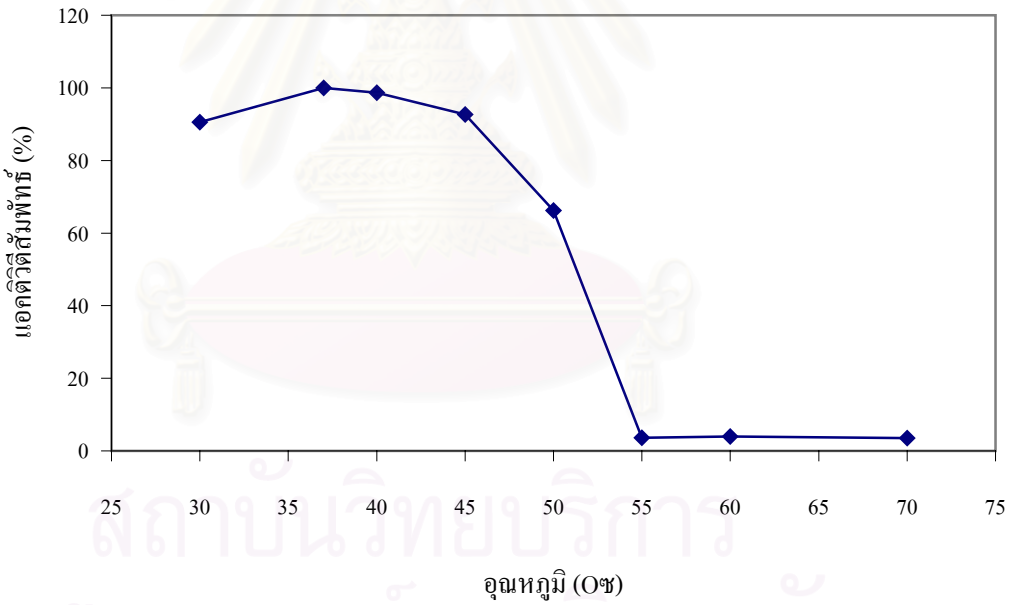
นำเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ต่างๆ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อที่ 11.3 ที่มีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.0-9.0 มาบ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายใต้สภาวะมาตรฐาน จากการตรวจสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN26 มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงกว้าง คือ 5.0-9.0 เป็นช่วงที่มีแอคติวิตีประมาณ 90-100 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของบัฟเฟอร์ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 43



รูปที่ 43 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

13.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

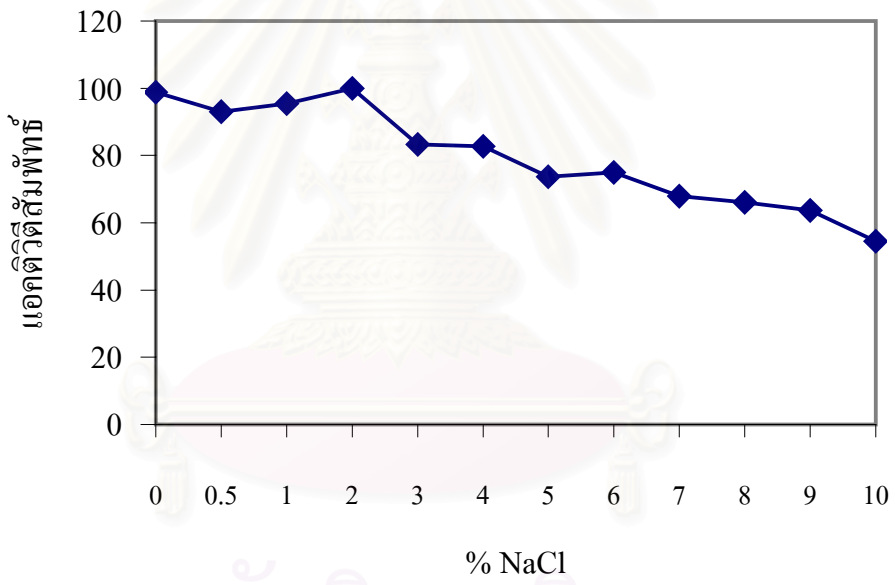
นำเอนไซม์ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นที่พอเหมาะ มาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายใต้สภาวะมาตรฐาน เมื่อตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิพบว่า เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN26 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 30-45 ^{O}ซ และมีแอคติวิตีลดลงเหลือประมาณ 70 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50^{O}ซ และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 55^{O}ซ ดังแสดงในรูปที่ 44



รูปที่ 44 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

13.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

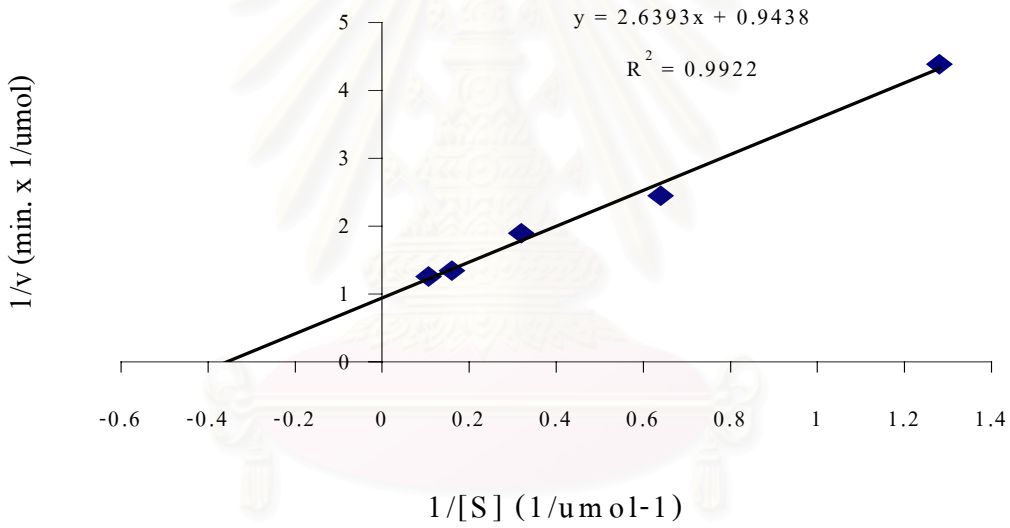
เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ตั้งแต่ 0-10 %ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 แล้วบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายใต้สภาวะมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-4 % และเมื่อมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นมากกว่า 4 % แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงตามคามเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 45



รูปที่ 45 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

13.6 การหาค่า *Km* ของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN26

นำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆกัน แปรผันความ เข้มข้นของเดกซ์แทรนที-2000 เป็น 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 1.875 % แล้วตรวจสอบ แอคติวิตีของเอนไซม์ นำมาคำนวณเพื่อเขียนกราฟแบบ ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) จะได้กราฟดังรูปที่ 46 ซึ่งได้ค่า *Km* ของเดกซ์แทรนเนสต่อเดกซ์แทรนที-2000 เป็น 2.796 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 46 กราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp CUN26 สายพันธุ์กลาย

14. สมบัติของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 และจากสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2

ตารางที่ 37 สมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่ได้จากการกลายพันธุ์

สมบัติของเอนไซม์	เดกซ์แทรนเนส	
	Arthrobacter sp. AG-2	*Arthrobacter* sp. CUN26
- อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	55 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส
- ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์,pH = 7.0	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์,pH = 6.5
- ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	สูงถึง 40 องศาเซลเซียส	สูงถึง 45 องศาเซลเซียส
- ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง	5.5-7.0	5.0-9.0
- ค่า *Km* ต่อเดกซ์แทรนที-2000 (μM)	3.22	2.796

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 เทียบกับสายพันธุ์กลาย CUN26 พบว่าเอนไซม์จากสายพันธุ์ CUN26 มีลักษณะที่ต่างไปจาก AG-2 ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยมีการเปลี่ยนจาก 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็น 50 องศาเซลเซียส และ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ในขณะที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้น และสายพันธุ์กลาย CUN26 มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนที-2000 มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่คัดแยกได้จากดิน จ.นนทบุรี โดย ณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ จากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 มาทำการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 จัดอยู่ในสกุล *Arthrobacter* sp. เชื้อสกุลนี้ได้เคยมีรายงานของ Sawai และคณะ ในปี 1976 อันได้แก่ *Arthrobacter globiformis* T6 ที่แยกได้จากดิน ว่ามีความสามารถในการสร้างไอโซมอลโต-เดกซ์แทรนเนส (isomalto-dextranase) ซึ่งสามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนให้เป็นไอโซมอลโตส และในขณะเดียวกันไอโซมอลโตสที่ได้นี้จะมีผลยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรน ทำให้ลดการเกิดฟันผุลงได้ และ จากงานวิจัยของ Kubo และคณะ ในปี 1993 ได้ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิดที่มีเดกซ์แทรนเนสยีน จาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 เข้าไปใน *Streptococcus gordonii* ทำให้ยับยังการสร้างเดกซ์แทรนของ *Streptococcus gordonii* ได้ ทำให้การเกาะติดของเชื้อและอัตราการเกิดฟันผุลดลง

เนื่องจากสภาวะในช่องปากนั้นมีการแปรเปลี่ยนได้อย่างกว้างขวาง โดยขึ้นกับสิ่งที่บริโภคเข้าไป ดังนั้นเดกซ์แทรนเนสที่จะนำไปใช้ในช่องปากนั้นควรมีความสามารถในการทนสภาวะต่างๆในช่องปากได้ ซึ่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นสารหนึ่งที่มีการบริโภคอย่างต่อเนื่องจากอาหารที่บริโภค เอนไซม์ที่เหมาะสมจึงควรสามารถทนต่อความเค็มอย่างน้อยในระดับที่มนุษย์บริโภคเข้าไป จากผลการทดลองที่ 2 จะเห็นว่า เชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ โดยจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 % ดังนั้นในขั้นตอนต่อๆไปในการกลายพันธุ์ AG-2 ให้สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีสูงจะเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 %เสมอ ทั้งนี้เนื่องจากว่าอาหารที่รับประทานเข้าไป มักมีระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 3 %

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยใช้สูตรอาหาร Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 % และใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อของ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ) ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 10 % ตามรายงานของ ณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) เป็นภาวะมาตรฐานเริ่มต้นในการทดลองนี้

จากการที่ความไวรับ (sensitivity) ของจุลินทรีย์ต่อสารก่อการกลายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันที่อายุเชื้อต่างๆ ในทางปฏิบัติควรเลือกเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) เนื่องจากเชื้อในช่วงนี้มีอัตราการเจริญเป็นไปอย่างเต็มที่และคงที่ และเป็นระยะที่เซลล์แข็งแรงและมีกิจกรรมของเซลล์ที่ดี (Caldwell, 1995) มีรายงานของ Adelberg และคณะในปี 1965 ศึกษาช่วงอายุของ *E. coli* K12 ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ โดยแปรระยะการเจริญในช่วง ทวีคูณ (logarithmic), เริ่มต้นคงที่ (early stationary) และหลังจากคงที่ (late stationary) พบว่า เมื่อกลายพันธุ์ *E. coli* K12 ด้วย NTG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมล. ในการเจริญช่วง logarithmic จะให้อัตราการกลายพันธุ์ 1.2×10^{-3} ต่อเชื้อที่รอด ซึ่งมากกว่าช่วงการเจริญ early และ late stationary ที่ให้อัตราการกลายพันธุ์เพียง 0.27×10^{-3} และ 0.12×10^{-3} ต่อเชื้อที่รอด ตามลำดับ

ดังนั้นการทดลองในขั้นแรกจึงศึกษาถึงรูปแบบการเจริญของ *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ พบว่าการเจริญในอาหารเหลว Yamaguchi ชั่วโมงที่ 12-15 เชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) จึงใช้เชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 ในช่วงอายุ 15 ชั่วโมงในการกลายพันธุ์

เมื่อศึกษาถึงการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Arthrobacter* sp. AG-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yamaguchi เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ในขั้นทุติยภูมิ พบว่าปริมาณแอคติวิตีจำเพาะค่อยๆเพิ่มปริมาณมากขึ้น จนสูงสุดในชั่วโมงที่ 39 ของการเลี้ยงเชื้อคือ 2.136 หน่วยต่อมก. และเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 36 พบว่าปริมาณแอคติวิตีจำเพาะที่ได้เท่ากับ 2.069 หน่วยต่อมก. ซึ่งไม่แตกต่างจากปริมาณแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 39 มากนัก ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพื่อการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในขั้นทุติยภูมิคือ 36-48 ชั่วโมง

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมินั้นอาศัยการสังเกตความกว้างของบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yamaguchi ที่เททับด้วยเอธานอล เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง ในการคัดเลือกดังกล่าวการดูลักษณะโคโลนีภายนอกนั้นจะไม่สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในเชิงปริมาณได้ ดังนั้นในการคัดเลือกโคโลนีที่จะมาทดสอบในขั้นปฐมภูมินั้นจึงเป็นการคัดเลือกแบบสุ่มโดยอาศัยอัตราร้อยละการรอดที่เหมาะสมในการที่จะเกิดเชื้อสายพันธุ์กลาย เช่นในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ร้อยละการรอดที่ 0.1-5.0 จะเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์เหมาะสม (Fantini, 1975) ส่วนการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG นั้นได้มีรายงานของ Miller ในปี 1972 รายงานไว้ว่า ภาวะการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ที่ร้อยละการรอดอยู่ในช่วง 0-50 นั้นเป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นช่วงร้อยละการรอดที่กว้างมากสำหรับการ

คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เป็นการคัดเลือกแบบสุ่มและไม่สามารถดูความแตกต่างของเชื้อด้วยลักษณะภายนอกได้ ทำให้การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายมีความยุ่งยาก จำนวนเชื้อที่จะนำมาใช้คัดเลือกมีปริมาณมากทำให้การทำงานเป็นไปได้ช้าและลำบาก ดังนั้นผู้ทดลองจึงได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG ที่มีร้อยละการรอดอยู่ในช่วง 0-30 เป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด สำหรับการคัดเลือกเชื้อในขั้นปฐมภูมิโดยอาศัยการสังเกตความกว้างของบริเวณใสนั้น ไม่สามารถบอกค่าที่แน่นอนของการสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ว่าการสร้างนั้นมีมากน้อยเพียงใด เพียงแต่เป็นการสังเกตผลคร่าวๆว่ามีเชื้อใดที่สามารถให้บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีการเดกซ์แทรนลงไปแล้วให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จึงน่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นได้ แต่ไม่สามารถบอกค่าที่แน่นอนได้เนื่องจาก ในการสังเกตความกว้างของบริเวณใสบนจานเลี้ยงเชื้อนั้นต้องควบคุมปัจจัยหลายอย่างเพื่อเปรียบเทียบปริมาณที่แน่นอน เช่น ขนาดของจานเลี้ยงเชื้อ, ปริมาณอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ และขนาดของเชื้อที่จุดลงไป เป็นต้น ซึ่งเป็นการควบคุมที่ทำได้ลำบาก ดังนั้นการบอกความสามารถของเชื้อสายพันธุ์กลายในการสร้างเดกซ์แทรนเนส จึงต้องทำการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสับสเตรท (เดกซ์แทรนที-2000) ด้วยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถหาแอคติวิตีของเอนไซม์ในเชิงปริมาณได้ จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเพื่อนำมาคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณแอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย เพื่อเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

การปรับปรุงสายพันธุ์ในงานวิจัยครั้งนี้ ใช้สิ่งชักนำที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ แสงอัลตราไวโอเลต และสาร NTG เพราะการใช้สารชักนำการกลายพันธุ์หลายๆชนิดร่วมกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้หลายรูปแบบ ได้สายพันธุ์กลายที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นมากขึ้น ทำให้โอกาสการกลายพันธุ์กลับ (reverse mutaion) ไปมีสารพันธุกรรมเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้นน้อยลง (Fantini, 1975)

จากการทำการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 3 รอบ และ NTG 4 รอบ ทำให้ได้สายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp CUN4-10 มีแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส เท่ากับ 4.155 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp AG-2 ซึ่งมีแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 2.132 หน่วยต่อมก. โดยมีลำดับการกลายพันธุ์ดังรูปที่ 47

Arthrobacter sp. AG-2

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 2.299 หน่วยต่อมก.)

↓ 1^{st} UV

สายพันธุ์ AU3

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 2.502 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.088 เท่า)

↓ 2^{nd} UV

สายพันธุ์ BU5

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 2.305 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.769 เท่า)

↓ 3^{rd} UV

สายพันธุ์ CU15

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 3.111 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.438 เท่า)

↓ 1^{st} NTG

สายพันธุ์ CUN26

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 4.120 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.459 เท่า)

↓ 2^{nd} NTG

สายพันธุ์ CUN2-5

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 4.063 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.789 เท่า)

↓ 3^{rd} NTG

สายพันธุ์ CUN3-1

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 4.330 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 2.041 เท่า)

↓ 4^{th} NTG

สายพันธุ์ CUN4-10

(แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส 4.155 หน่วยต่อมก. มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 1.930 เท่า)

รูปที่ 47 ลำดับขั้นตอนการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสาร NTG ได้สายพันธุ์กลาย CUN4-10

จากรูปที่ 46 จะเห็นว่าค่าที่เพิ่มขึ้นของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์แต่ละครั้ง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นนั้นมีค่าที่ไม่แน่นอน เช่น สายพันธุ์ BU5 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ AG-2 1.769 เท่า เมื่อนำสายพันธุ์ BU5 ไปกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะได้เชื้อสายพันธุ์ CU15 ซึ่งสายพันธุ์ CU15 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ AG-2 1.438 เท่าซึ่งมีค่าลดลงจากตอนที่ทำการกลายพันธุ์สายพันธุ์ AU3 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้วได้เชื้อสายพันธุ์กลาย BU5 ทั้งนี้เนื่องมาจากในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น แต่ละครั้งจะได้แอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 ไม่คงที่ แต่ไม่แตกต่างกันในแต่ละครั้งที่เลี้ยงมากนัก ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, อากาศ และอาหาร เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำการเปรียบเทียบแอตติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 ทุกครั้งในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย ทั้งขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ในแต่ละครั้งนั้น มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก AG-2 เป็นค่าที่ไม่แน่นอนดังรูปที่ 46 นั้น เช่น สายพันธุ์ BU5 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ AG-2 1.769 เท่า แต่เมื่อนำสายพันธุ์ BU5 ไปกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะได้เชื้อสายพันธุ์ CU15 ซึ่งสายพันธุ์ CU15 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ AG-2 1.438 เท่า ทั้งนี้เนื่องมาจากในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้มีความไม่เสถียร แอคติวิตีจำเพาะจะลดลงเมื่อนำมาทำการกลายพันธุ์ต่อ จึงมีโอกาสได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีแอคติวิตีจำเพาะที่ต่ำลงแต่ยังคงมีค่าที่สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 ดังนั้นในการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์แต่ละครั้งนั้น จะต้องมีการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 และสายพันธุ์กลายที่เป็นเชื้อตั้งต้นในการทำการกลายพันธุ์ในครั้งนั้น กับเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งนั้นด้วย

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมักนิยมใช้ในการกลายพันธุ์ครั้งแรกของจุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุดในการกลายพันธุ์เชื้อเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีสมบัติแตกต่างกัน มีรายงานถึงอัตราร้อยละการรอดที่จะให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ดี คือช่วง 0.1-1.0 % (Miller, 1972; Carton and Brown, 1981) และ 0-5 % (Fantini, 1975) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่อัตราร้อยละการรอด 0-5 % เพื่อให้มีโอกาสได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ดี

ในปี ค.ศ. 1968 Clowes และ Hays ได้รายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมีหลายปัจจัยด้วยกัน ดังตัวอย่างเช่น ความหนาแน่นของเชื้อในการกลายพันธุ์ เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตผ่านทะลุเนื้อเยื่อต่างๆได้ไม่ดี ดังนั้นหากมีความหนาแน่นของเซลล์แขวนลอยมาก ก็จะทำให้โอกาสที่แสงอัลตราไวโอเลตจะสัมผัสกับเซลล์ได้น้อยลง ในทางปฏิบัติปริมาณเซลล์แขวนลอยที่เหมาะสมคือ น้อยกว่า 10^8 เซลล์ต่อมล. อาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนสำคัญในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้นถ้าเซลล์แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้

ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์นั้นลดลง เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตได้มากกว่าจึงทำให้ปริมาณที่แสงอัลตราไวโอเลตผ่านไปสู่เชื้อแขวนลอยลดลงด้วย อีกทั้งยังอาจทำให้เกิดการสร้างสารพิษหรือสารอินทรีย์ เปอร์ออกไซด์ ที่จะรบกวนทำให้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตยาวออกไป ในทางปฏิบัติควรใช้เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในบัฟเฟอร์หรือน้ำเกลือ (NaCl 0.85%) เพราะมีการดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตที่ต่ำ ส่วนในลักษณะทางกายภาพของเชื้อนั้น ในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ดีเอ็นเอของแบคทีเรียในนิวเคลียสนั้นมักจะน้อยกว่าในเซลล์ที่มีขนาดเล็ก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์มวลต่อปริมาตรเซลล์ ทั้งนี้การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตยังขึ้นกับ ความเข้มของแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ในการกลายพันธุ์ และระยะห่างของแสงอัลตราไวโอเลตกับเซลล์แขวนลอยด้วย

ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการใช้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์สูงสุด จึงควรหาภาวะที่เหมาะสมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยข้างต้น เพื่อเพิ่มโอกาสการได้เชื้อสายพันธุ์กลายเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 คือการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 80-120 วินาที ได้ช่วงร้อยละการรอด 3.19-0.06

เมื่อพิจารณาเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสมในแต่ละครั้งของการทดลองพบว่าเวลาที่ใช้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของจุลชีพด้วย โดยจากการทดลองนี้ หลังจากการกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 และได้สายพันธุ์กลาย AU3 และ BU5 ตามลำดับ นำมาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตพบว่าสายพันธุ์กลาย AU3 และ BU5 ใช้เวลา 60-120 วินาที และ 80-140 วินาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาหลายครั้งนั้นจะมีอัตราการรอดที่สูงขึ้น เนื่องจากเชื้ออาจมีความต้านทานต่อแสงอัลตราไวโอเลตเพิ่มขึ้น

ในการทดลองพบว่าในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งนั้น กราฟร้อยละการรอดที่ได้จะมีความแตกต่างกันไป (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก ค) ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อที่นำมาเป็นเชื้อในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งนั้นจะมีลักษณะทางสรีระวิทยาแตกต่างกัน ปริมาณเซลล์เริ่มต้นไม่เท่ากัน ระยะเวลาในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์จึงแตกต่างกัน และจะเห็นว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์มาแล้วหลายครั้งนั้นจะเกิดการต้านทานต่อสิ่งกลายพันธุ์มากขึ้น ดังเช่น ในการกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26 พบว่าเชื้อจะให้อัตราการรอดอยู่ในขอบเขตที่ต้องการนั้นต้องใช้เวลานานกว่าเดิม คือ 0-80 นาที ดังนั้นจึงต้องทำการแปรผันความเข้มข้นของ NTG อีกครั้งเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26

การที่สายพันธุ์กลาย CUN4-10 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพิ่มมากขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากแสงอัลตราไวโอเลตและสาร NTG ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสารพันธุกรรมหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์เดกซ์แทรนเนส จึงมีส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์เดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์ เมื่อทำการกลายพันธุ์ต่อไปอีกหลายๆรอบ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์เดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้นตามลำดับในการสายพันธุ์กลายรุ่นต่อๆมา

จากงานวิจัยนี้หลังจากทำการ กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสาร NTG แล้ว สามารถเลือกเชื้อที่มีความสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ดีและมีความเสถียรที่ดี 2 ชนิดคือ CUN26 และ CUN4-10 หลังจากทำการตรวจสอบความเสถียรอีกครั้งโดยการทำการถ่ายเชื้อทั้งหมด 30 ครั้ง แล้วทำการตรวจสอบแอคติวิตีจำเพาะ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26 มีความเสถียรที่ดี มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ค่อนข้างคงที่ ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN4-10 นั้นมีความไม่เสถียรจะเห็นได้จากร้อยละการลดลงของแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 27.32 ดังนั้นจึงเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26 เป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการ กลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. AG-2 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสที่ดีที่สุด

การเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธ์กลาย CUN26 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 ในระดับขวดเขย่า และวิเคราะห์ปริมาณแอคติวิตี จากผลที่ได้สายพันธุ์กลาย CUN26 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 คิดเป็นร้อยละ 98.45

การศึกษาปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26 พบว่าเดกซ์แทรนที่มีความเหมาะสมในการชักนำเพื่อการสร้างเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลายจะมีค่าเท่ากับ 1 % ซึ่งแตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นที่ต้องการเพียง 0.5 % (ณฐินี, 2540) ทั้งนี้เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยต้องการการชักนำ (Inducible enzyme) โดยสารที่ใช้ชักนำคือเดกซ์แทรน ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะแปรผันตามปริมาณของสารที่ชักนำ โดยสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 ต้องการปริมาณของสารชักนำคือ 0.5 % เมื่อเพิ่มปริมาณสารชักนำมากขึ้นปริมาณเอนไซม์ที่ได้จะมีปริมาณเท่าเดิม ในขณะที่สายพันธุ์กลาย CUN26 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจึงต้องการปริมาณของสารชักนำมากกว่าเดิม คือ 1 % เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 4.827 หน่วยต่อมล. ทั้งนี้เนื่องจากว่าแอมโมเนีย (NH_3) สามารถถูกนำไปใช้ได้ง่ายในเซลล์ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเมตาบอลิสมที่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้พลังงานมากนัก ในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไนเตรทจะถูกนำไปใช้ได้ยากกว่าเพราะการนำไปใช้จะต้องผ่านการรีดิวซ์ให้เป็น

แอมโมเนียก่อน ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ได้ทำการศึกษานั้นพบว่าทริปโตนเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือจะให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 6.377 หน่วยต่อมล. โดยปกติแล้วเชื้อจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน และในกระบวนการผลิตสารบางชนิด เช่น กรดอะมิโน เอนไซม์ จะจุลินทรีย์จะเจริญและผลิตสารนั้นได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนอยู่ด้วย ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสนี้จะใช้แหล่งไนโตรเจนจาก 2 แหล่งคือ อนินทรีย์ไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟต และอินทรีย์ไนโตรเจนคือ ทริปโตน แล้วทำการหาปริมาณสัดส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เท่ากับร้อยละ 25 ต่อ 25 จากนั้นศึกษาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม พบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 % จะทำให้การผลิตเดกซ์แทรนเนสของ CUN26 มีค่าแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 6.303 หน่วยต่อมล. ทั้งนี้แมกนีเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญโดยมีผลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์แบคทีเรีย

ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่ทำการศึกษาได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ และความเร็วรอบของการเขย่าในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญที่จะเป็นข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาระดับขยายส่วนต่อไป

ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของสายพันธุ์กลาย CUN26 คือ 7.0 ซึ่งในสูตรอาหารจะมีสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ ฟอสเฟต โดยจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ให้อยู่ในช่วง 7.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น พบว่าที่ 37 ^{O}ซ ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 6.276 หน่วยต่อมล. ในขณะที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ และอุณหภูมิห้อง (28-32^{O}ซ) ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า 37^{O}ซ ไม่มากนัก ส่วนที่อุณหภูมิ 40^{O}ซ นั้นมีค่าแอคติวิตีต่ำมากคือ 1.301 หน่วยต่อมล. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการผลิตเดกซ์แทรนเนสจะขึ้นกับการเจริญของเซลล์ (Growth associate) ดังนั้นที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการสูญเสีย (leakage) ขององค์ประกอบของเซลล์ เช่นกรดนิวคลีอิก, กรดอะมิโน และโปรตีน เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้เซลล์ตายได้ เมื่อศึกษาปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมโดยการหารอบของการเขย่า พบว่าที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 6.420 หน่วยต่อมล. ส่วนรอบของการเขย่าที่ 150 และ 250 รอบต่อนาทีนั้นจะให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 5.199 และ 6.152 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ เนื่องจากการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีมีผลทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารน้อย ทำให้เชื้อเจริญและสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ไม่ดีจึงมีแอคติวิตีจำเพาะไม่สูงนัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรเดิม สภาวะเดิม กับ สูตรปรับปรุง สภาวะปรับปรุง จะเป็นดังตารางที่ 35 และเมื่อศึกษารูปแบบการเจริญ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย CUN26 เพื่อให้ได้การผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุด พบว่าในชั่วโมงที่ 36-48 เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลือกเก็บเชื้อ ซึ่งถ้าเลยระยะเวลานี้ไปแล้วอาจทำให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสลดลง เนื่องจากการที่เซลล์ตายและสลายตัวปลดปล่อยโปรตีเอสซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ จึงทำให้สูญเสียเดกซ์แทรนเนสไป และเมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26 ที่ทำการปรับปรุงสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมแล้วพบว่า สายพันธุ์กลาย CUN26 จะมีแอคติวิตีที่สูงกว่า AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น คิดเป็น 149.64% หรือ 2.5 เท่า ทั้งนี้ความแตกต่างที่พบอาจเนื่องจากเชื้อสายพันธุ์กลายมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมไปซึ่งส่งผลให้ลักษณะพันธุกรรมที่เปลี่ยนนั้นมีผลต่อความเหมาะสมของสูตรอาหารและสภาวะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันออกไป

จากการศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลาย พบว่า เอนไซม์นี้มีค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 ที่อุณหภูมิ 50^{O}ซ เมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สร้างโดย *Arthrobacter* sp. AG-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น (ตารางที่ 37) พบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์นี้มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง คือระหว่าง 5.0-9.0 ซึ่งเมื่อเทียบกับความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์กลาย CUN26 จะมีความเสถียรในช่วงของความเป็นกรด-ด่างที่กว้างกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น AG-2 (ตารางที่ 37) จากการที่เดกซ์แทรนเนสสายพันธุ์กลาย CUN26 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง และสามารถทำงานได้ดีเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึง 4% นั้น ทำให้เป็นผลดีต่อการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมในอนาคต โดยเฉพาะเมื่อนำเอนไซม์ไปใช้ในทางทันตกรรมเนื่องจากในช่องปากนั้นมีการแปรปรวนของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่องปากและค่าความเป็นกรด-ด่างสูงมาก สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสนั้น พบว่า เอนไซม์นี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง โดยมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 45^{O}ซ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50^{O}ซ เอนไซม์ (โปรตีน) จะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 55 ^{O}ซ จะทำให้เอนไซม์นี้เสียสภาพโดยสมบูรณ์ ซึ่งมีผลให้ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการนำไปใช้ในช่องปาก จะพบว่าอุณหภูมิในช่องปากนั้นจะอยู่ในช่วง 30-40^{O}ซ ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสยังคงมีความ

เสถียรอยู่ ดังนั้นเอนไซม์นี้น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรมได้ต่อไป เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลาย พบว่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (Vmax) เท่ากับ 1.060 ไมโครโมลของเดกซ์แทรน (ที-2000) ต่อนาที และมีค่าคงที่ Michaelis (*Km*) เท่ากับ 2.796 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50^{O}ซ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิรพันธ์ พันธ์วุฒิกร. 2542. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล ใน จิรพันธ์ พันธ์วุฒิกร (บรรณาธิการ), การวินิจฉัยและการบำบัดการติดเชื้อสาเหตุจากฟัน หน้า 49-80. กรุงเทพมหานคร:บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด.

โชตนา ประมวลวัลลิกุล 2534. การกลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลินจี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลันธรรมศาสตร์.

นาถชวา ชวานนท์. 2543. การขยายยีน 16 S rRNA จากแบคทีเรียที่สร้างเดกซ์แทรนเนสโดยวิธี PCR เพื่อการแสดงเอกลักษณ์. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเพิ่มประสบการณ์ ภาควุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิภาพร ศิริเพ็ญ. 2542. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 เพื่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิค. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. การกลายพันธุ์., พันธุศาสตร์, หน้า 237-260. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงเพ็ชร เดชะประทุมวัน. 2536. คราบจุลินทรีย์กับโรคเหงือกและฟัน., สารต้านฟันผุและสารลดคราบจุลินทรีย์, หน้า 9-21. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิศิษฐพร เผื่อนพิภพ. 2529. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อใช้ในการทำปุ๋ยหมักจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โศภนา อิงควิวัฒน์. 2528. การเปรียบเทียบปริมาณ Loery Protein และ Kjeldahl Protein ของ *Candida utilis* Y46 ที่เลี้ยงในน้ำมะพร้าวและน้ำสับปะรด. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเพิ่มประสบการณ์ ภาควุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akasaka, H., Komasaki, H., and Arai, T. 1989. Fermantation method for producing hyaluronic acid. United States Patent: 4,801,539.

Alan, G.A., Jack, R.G., and John, F.M. 1999. Gene mutation and repair. In B.B. Edith (ed.) The Science of Genetic, pp. 508-535. FortWorth: Saunders College Pulishing.

Annous, B.A., and Blaschek, H.P. 1991. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutyricum* mutants with enhanced amylolytic activity. Appl. Environ. Microbiol. 57 (9): 2544-2548.

Baltz, R.H. 1986. Strain improvement. In A.L. Demain; and N.A. Solomon (eds.), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, pp. 154-169. Washington, D.C.:American Society for Microbiology.

Barrett, J.F., Barrett. T.A., and Curtiss, R. 1986. In Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., and McGhee, J. R. (eds.), Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*., pp. 205-215. Natherland: Elsevier Science Publishers.

Block, P.L., Dooney, C.L., and Howe, E.E. 1969. The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodont. 40:105-110.

Bowen, W.H. 1978. Role of carbohydrate in dental caries. In J.H. Shaw; and G.G. Roussos (eds.), Proceeding Sweetener and Dental Caries, sp. supp. Feeding, Weight and Obesity Abstracts, 147–155.

Burnette, G.W., and Scherp, K.W. 1962. Oral Microbiology and Infectious Disease, pp. 386–401. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.

Burnette, G.W., and Schuster, G.S. 1978. In Student (ed.), Oral Microbiology and Infectious Disease, pp. 204–209. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.

Caldwell, D.R. 1995. Microbial Physiology and Metabolism. USA.:Wm.C.Brown Communications.

Carton, B.C., and Brown, B.J. 1981. Gene mutation. In E.W. Nester (ed.), Manual of Methods for General Bacteriology, pp. 221-227. Washington, D.C.:American Society for Microbiology.

Chaiet, L., Kempf, A.J., Harman, R., Kaczka, E., Weston, R., Nolstadt, K., and Wolf, F.J. 1970. Isolation of dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Microbiol. 20:421-426.

Charles, A.F., and Farrell, L.N. 1957. Preparation and use of enzymatic material from *Penicillium lilacinum* to yield clinical dextran. Can. J. Microbiol. 3:239-247.

Clowes, R.C., and Hayes, W. 1968. Mutation, Experiments in microbial genetics, pp. 13-21. Oxford and Edinburgh:Blackwell Scientific.

Cole, J.A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochemical Society Transaction. 5(4): 1232-1239.

Costa, D.T., Bier, L.C., and Gaida, F. 1974. Dextran hydrolysis by a *Fusobacterium* strain isolated from human dental plaque. Archs. Oral. Biol. 19:341-342.

Fantini, A.A. 1975. Strain development. In H.H. John (ed.), Method in Enzymology, 43 vols. pp. 24-41. New York:Academic Press.

Fitzgerald, R.J., Keyes, P.H., Stoudt, T.H., and Spinell, D.M. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. JADA. 76:301-304.

Forgarty, W.M., and Kelly, C.J. 1984. In Wiseman, A. (ed.), Topics in Enzyme and Fermentation Technology 3, pp. 67-69. New York: John Wileys and Sons.

Fugita, M., Sakai, S., Futai, M., and Amemura, A. 1990. Characterization of an isomerase-hyperproducing mutant of *Pseudomonas amyloderamosa.* Agric. Biol. Chem. 59(9): 2315-2321.

Fukumoto, J., Hiraoka, N., Hirose, T., and Tsuru, D. 1971. Studies 2 Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. Agric.Biol.Chem. 35(11):1727-1732.

Galvez-Mariscal, A., and Lopes-Munguia, A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paccilomyces lilacinus* strain. Applied. Microbiol. Biotechnol. 36: 327-331.

Gardner, E.J., simmons, M.J., and Snustard, D.P. 1981. Chemical induced mutation. In Principles of Genetics 8 th ed., pp. 298-303. NewYork: Wiley and Sons

Gibbons, R.J., and Van Houte, J. 1980. Receptors and recognition, Series B, vol.6. In E.H. Beachey (ed.), Bacterial Adherence, pp. 66–103. London : Chapman and Hall.

Glazer, A.N., and Nikaido, H. 1995. Microbial Bictechnology: Fundamentals of Appied Microbiology, pp. 270. USA.: W.H. Freeman and Company.

Goodenough, U. 1978. SOS repair. In G. Kendall; S. Jean (eds), Genetics, pp. 193-194. NewYork Holt, Rinehart and Winston.

Guggenheim, B. 1970. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int.Dent.J. 20(4): 657-678.

Hamada, S., and Slade, H.D. 1980. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44: 371-444.

Hattori, A., and Ishibashi, K. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45(10):2347-2349.

Holbrook, W.P., and Mcmillan, C. 1977. The hydrolysis of dextran by gram-negative non-sporing anaerobic bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 43: 369-374.

Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1992. Characterization of the dextranase purified from *Streptococcus mutants* ingbritt. Microbiol. Immunol. 36(9): 969-976.

Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1998. Detection of dextranase producing gram-negative oral bacteria. Caries Research. 13: 382-386.

Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Nonma, M., Okada, G. and Chiba, S. 1994. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranse gene from Arthrobacter globiformis T6. Journal of Bacteriology. 176(24): 7730-7734.

Jan, F., and Anna, G. 1997. Screening and mutagenesis of molds for improvement of simultaneous production catalase and glucose oxidase. Enzyme and Microbial Technology. 20: 344-347.

Jolly, S.C., and Prakash, C. 1987. Removal of dextran from sugar cane juice. Int. Sugar. I. 89:184-186.

Kalra, M.S., Kuila, R.K., and Ranganathan, B. 1973. Activation of nisin production by UV-irradiation in a nisin-producing strain of *Streptococcus lactis*. Experientia. 29(5):624-625.

Kaster, A.G., and Brown, L.R. 1983. Extracellular dextranase activity produced by human oral strain of the genus *Bifidobacterium* sp. Agric. Biol. Chem. 37:2527-2533.

Kim, D., and Day, D.E. 1995. Isolation of a dextranase constitutive mutant *of Lipomyces starkeyi* and its for production of clinical size dextran. Letters in Applied Microbiology. 20: 268-270.

Kim, J.H., Yoo, S.J., Oh, D.K., Kweon, Y.G., Park, D.W., Lee, C.H., and Gil, G.H. 1996. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture condition for the production of high molecular weight hyaluronic acid. Enz. Microbio. Tech. 19:440-445.

Kobayashi, M., Takagi, S., Shiota, M., Mitsushi, Y., and Matsuda, K. 1983. An isomaltatriose-producing dextranase from *Flavobacterium* sp. M-73: Purification and properties. Agric. Biol. Chem. 47:2585-2593.

Koenig, D.W., and Day, D.F. 1989. Introduction of *Lipomyces starkeyii*. Appl. Env. Microbiol. 55(8): 2079-2081.

Kosaric, N., Yu, K., and Zajic, J.E. 1973. Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. Biotech. And Bioeng. 15:729-741.

Kubo, S., Kubota, H., Ohnishi, Y., Morita, T., Matsuya, T. and Matsushiro, A. 1993. Expression and secretion of an Arthrobacter dextranase in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. Infect. Immun. 61(10): 4375-4381.

Leach, S.A.1969. Dextranase and dental caries. British.Dental.J.: 325-330.

Lee, S.H., and Rho, Y.T. 1999. Improvement of tylosin dermentation by mutation and medium optimization. Letter in Applied Microbiology. 28: 142-144.

Loesche, W.T. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev. 50 (4):353–380.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurrement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Madhu, and Prabhu, K.A. 1985. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. Enz. Microb. Technol. 7:573-577.

McGhee, J.R., and Michalek, S.M. 1981. Immunology of dental caries: Microbial aspects and local immunity. Ann. Rev. Microbiol. 35:595–638.

Melville, T.H., and Rusell, C. 1981. Microbiology for Dental Students. 3rd ed., pp. 323-338, London: William Medical Book Ltd.

Mendell, J.D., and Greenberg, J. 1960. A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3(6): 575-577.

Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics, pp. 113-143. USA.:Cold Spring Habour Lab.

Mizuno, t., Mori, H., Ito, H., Matsui, H. Kimura, A., and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacteria fuscum* var. dextranlyticum strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(9): 1582-1588.

Montville, T.L., Cooney, C.L., and Sinskey, A.J. 1978. *Streptococcus mutans* dextransucrase: A Review. Adv. in Appl. Microbiol. 24: 55-84.

Noltel, W.A. 1973. Oral Microbiology, pp. 251–270. Saint Louis: The C.V. Mosby Company.

Okami, Y., Kurasawa, S., and Hirose, Y. 1980. A new glucanase produced by a marine *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 44(5):1191–1192.

Okami, Y. 1986. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. Microb. Ecol. 12: 65-78.

Park, M.G., Jang, J.D., and Kang, W.K. 1996. *Streptococcus zooepidemicus* medium and process for preparation hyaluronic acid. United States Patent: 5,496,726.

Peter, J. R. 1999. DNA mutation and repair. In M. erin; C. Lynn; d. Evelyn (eds), Fundamentals of Genetics, pp. 407-423. San Francisco: Benjamin Cummings, an imprint of addison Wesley Longman.

Rasoull, I., and Kulkarni, P.R. 1994. Enhancement of β-galactosidase productivity of *Aspergillus niger* NCIM-616. Journal of Applied Bacteriology. 77: 359-361.

Ray, R.R., and Nanda, G. 1996. Isolation and application of hyper β-amylolytic mutant of *Bacillus megaterium*. Acta. Microbiol. Pol. 45(3-4):241-248.

Russel, P.J. 1996. Genetics. 4th ed. New York:Harper Collins College.

Sawai, T., Toriyama, K., and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. J.Biochem. 75:105–112.

Sawai, t., Ukigai, Y., and Nawa, A., 1976. Identification of an isomalto-dextranase producing bacterium, *Arthobacter globiformis*. Agric. Biol. Chem. 40: 1249-1250.

Schachtele, C.F. 1982. Postgraduate dental handbook series, vol.13. In F.J., Orland(ed.), Microbiology in Clinical Dentistry, pp. 153–168. Massachusetts: John Wright PSG Inc.

Schachtele, C.F., Staat, R.H., and Harlander, S.K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12(2):309-317.

Schuster, G.S. 1983. Oral Microbiology and Infectious Disease. 2nd ed., pp.164-206. USA: The Williams and Wilkins company.

Silverstone, L.M., Johnson, N.W., Mardie, J.M. and Williams, R.A.D. 1981. The Nature and problem of dental caries in man. In Dental Caries Aetiology, Pathology and Prevention, pp. 3-17. HongKong: The Macmillan Press Ltd.

Simonson, L.G., and Liberta, A.G. New source of fungal dextranase. Mycologia. 67:845-851.

Snustad, D.P., Simmonsons, M.J., and Jerkins, J.B. 1997. Principles of Genetics, pp. 311-348. New York:John Wiley & Sons.

Snustad, D.P., and Simmons, M.J. 2000. Mutation DNA repair and recombination. In H. David (ed.), Principles of Genetics, pp. 358-390. New York: John Wiley & Sons.

Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.

Staat, R.H., Gawronski, T.H., and Sahachtele, C.F. 1973. Detection and preliminary studies on dextranase producing microorganisms form human dental plaque. Infect Immun. 8 (6):1009–1016.

Staat, R.H., and Schachtele, C.F. 1976. Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of *Bacteriodes ochraceous*. J.Dent.Res. 55(6):1101-1110.

Stayermark, A.L. 1951. Microdetermination of nitrogen by the Kjeldahl method. In Quantitative Organic Microanalysis, pp. 134-153. NewYork: Blakiston.

Strickberger, M.W. 1985. Nature of the genetic code. In Genetic 3 rd ed., pp. 570-584. NewYork Macmillan Publishing Company.

Suchova, M., Demnerova, K., Bord, K., and Kralova, B. 1992. Production of L-α-glycerophosphate oxidase by lactic acid bacteria. Enzyme. Microbiol. Technol. 14: 917-922.

Sugiura, M., and Ito, A. 1975. Studies on dextranase VII. The kinetics parameter of *Brevibacterium fuscum* dextranase and molecular properties of the digestion products. Chem. Pharm. Bull. 23(7):1532-1536.

Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranase from *Bacteroides oralis* Ig42. Microbiol. Immunol. 26(5): 375-386.

Tchuchiya, H.M., Jeanes, A., Briker, H.M., and Wilham, C.A. 1952. Dextran degrading enzyme from molds. J. Bacteriol. 52:513-519.

Thytrup, A., and Fejerkov, O. 1986. Textbook of Cariology. 1st ed., pp.117-123. Vojens: P.J.Schmidts Bogtrykker.

Tilbury, R.H. 1971. Dextrans and dextranase. Proc. 14th ISST.:1444-1458.

Van Houte, J., and Russo, J. 1986. In Hamada,s.,S.M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker and McGhee. J.R. (eds.), Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococus mutans*, pp. 157-167. Netherland: Elsevier Science Publishers.

Webb, E., and Spencer-Martin, I. 1983. Extracellular endodextranase from the yeast *Lipomyces starkeyi*. Can. J. Microbiol. 29:1092-1095.

Weaver, R.F., and Hedrick, P.W.1997. Gene Mutation. In S. Elizabeth (ed.), Genetics 3 rd edition, pp. 295-315. USA: Wm.C. Brown Pulishers.

Wheatley, M.A., and Moo-Yong, M. 1977. Degrading of Polysaccharides by endo- and exoenzymes. Dextran- Dextranase model system. Biotech and Bioeng. 19:219-233.

Wolinsky, L.E. 1988. Caries and Cariology. In M.G. Newman and R. Nisingarrd (eds.), Oral Microbiology and Immunology, pp.389-409. Jonanovich: W.B. Saunder Company

Wu, D.H., Wen, C.Y., Chu, W.G., Lin, L.L., and Hsu, W.H. 1993. Selection of antibiotic-resistant mutants with enhanced isoamylase activity in *Pseudomonas amyloderamosa*. Biotechnology Letters. 15(9): 883-888.

Wynter, C.V.A., Galea, C.F., Cox, L.M., Dawsen, M.W., Patel, B.K., Hamilton, S, De Jersay, J and Inkerman, P.A. 1995: Thermostable dextranase: screening, detection and preliminary characterization. Journal of Applied Bacteriology. 79: 203-212.

Yamaguchi, T., and Gocho, S. 1983. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated Brevibacterium sp. Agric.Biol.Chem. 37: 2527-2533.

Zerenhuizen, L.P.T.M. 1968. Cell-bound exodextranase of *Bacillus* sp. Carbohys. Res. 6:310–318

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหารของ Yamaguchi

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$)	0.1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121^{O}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: สูตรอาหารของ Yamaguchi ในข้อนี้นั้นมีความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเท่ากับ 3 % ดังนั้นถ้าต้องการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ NaCl ให้เปลี่ยนปริมาณของ NaCl ที่ใช้

1.2 สูตรอาหารดัดแปลงของ Okami (BHI)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion from	200.0	กรัม
Beef Heart, Infusion from	250.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน (Bacto Proteose Peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Bacto Dextrose)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Brain heart Infusion กรัมละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร ถ้าต้องการให้มีความเข้มข้นของเกลือ 3 %ให้เติม NaCl 30 กรัมลงไปด้วย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121^{O}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกเชื้อ Yamaguchi agar

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$)	0.1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121^{O}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: สูตรอาหารของ Yamaguchi ในข้อนี้นั้นมีความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเท่ากับ 3 % ดังนั้นถ้าต้องการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ NaCl ให้เปลี่ยนปริมาณของ NaCl ที่ใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมีโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)	12.1	กรัม
กรดมาลิอิก	11.6	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.7	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.25	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์เดกซ์แทรนเนสโดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.1 สารละลายเดกซ์แทรน ที 2000 ความเข้มข้น 0.625%

ละลายเดกซ์แทรน ที 2000 จำนวน 0.625 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

3.2 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (Alkaline Copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71 กรัม และโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มล. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ลงไป 100 มล. และเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 10 % ลงไป 80 มล. ผสมให้เข้ากันและทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มล.ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

3.3 สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 21 มล.ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาซิเนตที่มีความเข้มข้น 12 % ลงไป 50 มล. และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

4. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry's method)

4.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	300	มล.

4.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CUSO_4$)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

4.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

4.4 สารละลาย Lowry D (Phenol reagent) ประกอบด้วย

สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

5. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

5.1 สารเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วยส่วนผสมของ

โพแทสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (K_2SO_4)	100	ส่วน
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรท ($CuSO_4 \bullet 5H_2O$)	10	ส่วน
ผงซีลีเนียม (Selenium powder)	1	ส่วน

5.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 %

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 4 %

กรดบอริก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

5.4 สารละลายอินดิเคเตอร์ ประกอบด้วย

Methyl red 0.2 % ในเอธานอล 95 % 2 ส่วน

Methylene blue 0.2% ในเอธานอล 95 % 1 ส่วน

5.5 กรดกำมะถันเข้มข้น (Sulphuric acid)

5.6 Methy orange indicator solution ความเข้มข้น 0.1 %

Methyl orange 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

5.7 สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 นอร์มัล

โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส (น้ำหนักโมเลกุล 105.99) นำมาอบที่อุณหภูมิ 100^{O}ซ ประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน Desiccator และนำมา 5.2990 กรัม ทำให้เป็นสารละลายโดยเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

5.8 สารละลายมาตรฐานของกรดกำมะถัน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

กรดกำมะถัน 28 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล. แล้วหาความเข้มข้นของกรดกำมะถัน 0.1 นอร์มัล โดยใช้สารละลาย 0.1 นอร์มัลโซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 25 มล. และสารละลาย Methyl orange เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติจะเปลี่ยนสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจากสีเหลืองเป็นสีชมพู

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดกำมะถันโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = นอร์มัลของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เท่ากับ 0.1 นอร์มัล

N_2 = นอร์มัลของสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต เท่ากับ 25 มล.

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถันที่ใช้ในการไตเตรท (มล.)

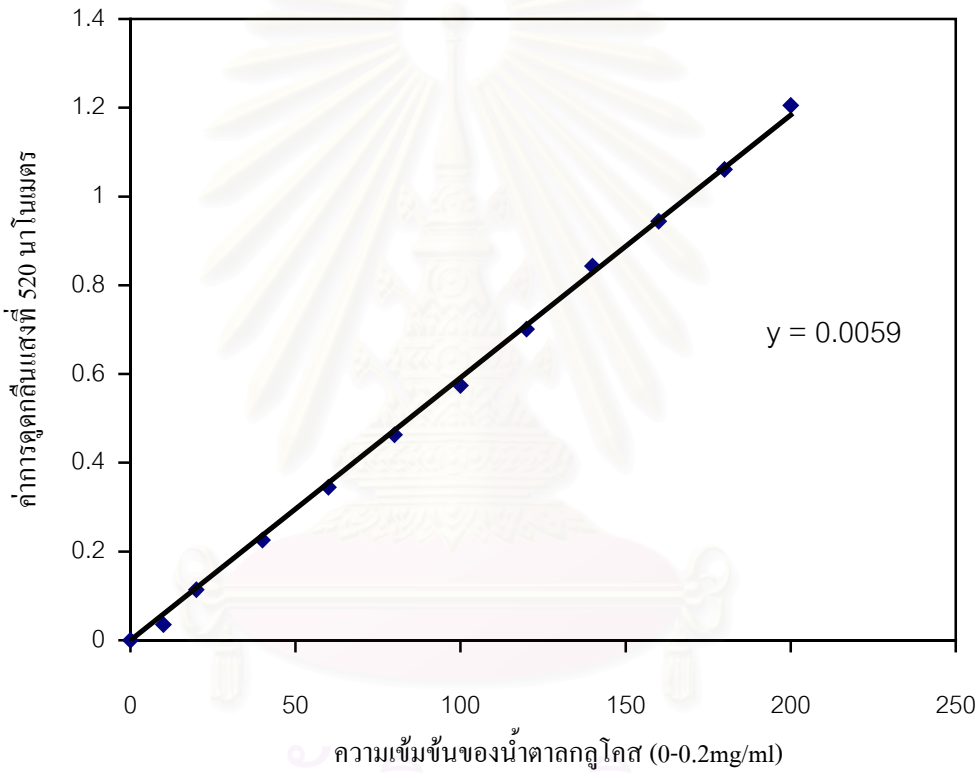
5.9 สารละลายกรดกำมะถัน 0.01 นอร์มัล

ใช้กรดกำมะถัน 0.1 นอร์มัลจำนวน 100 มล. และเติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล.

ภาคผนวก ค

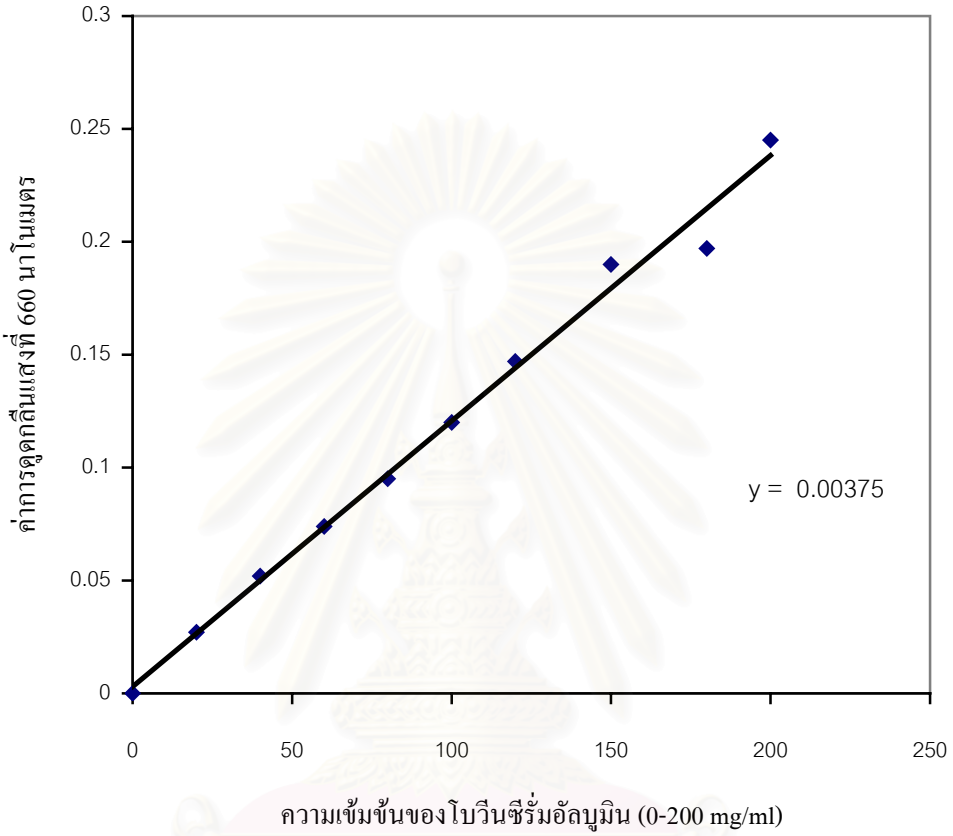
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์



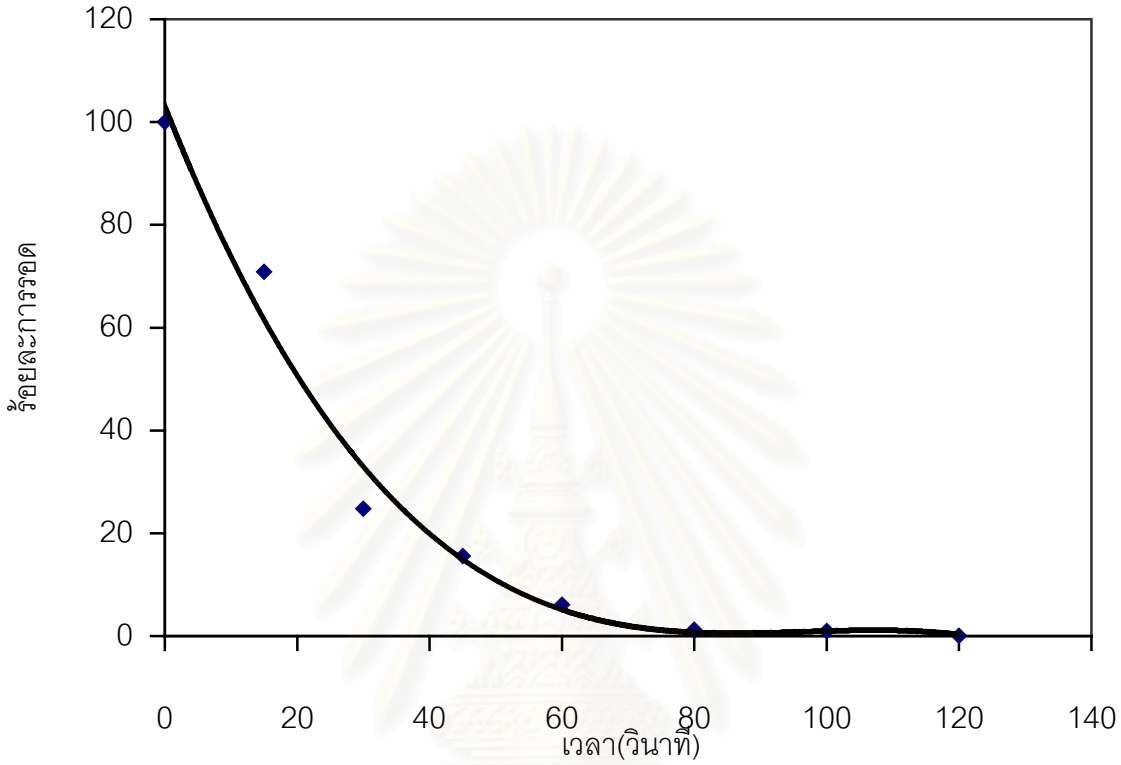
รูปที่ 48 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

2. กราฟมาตรฐานของโปรตีน



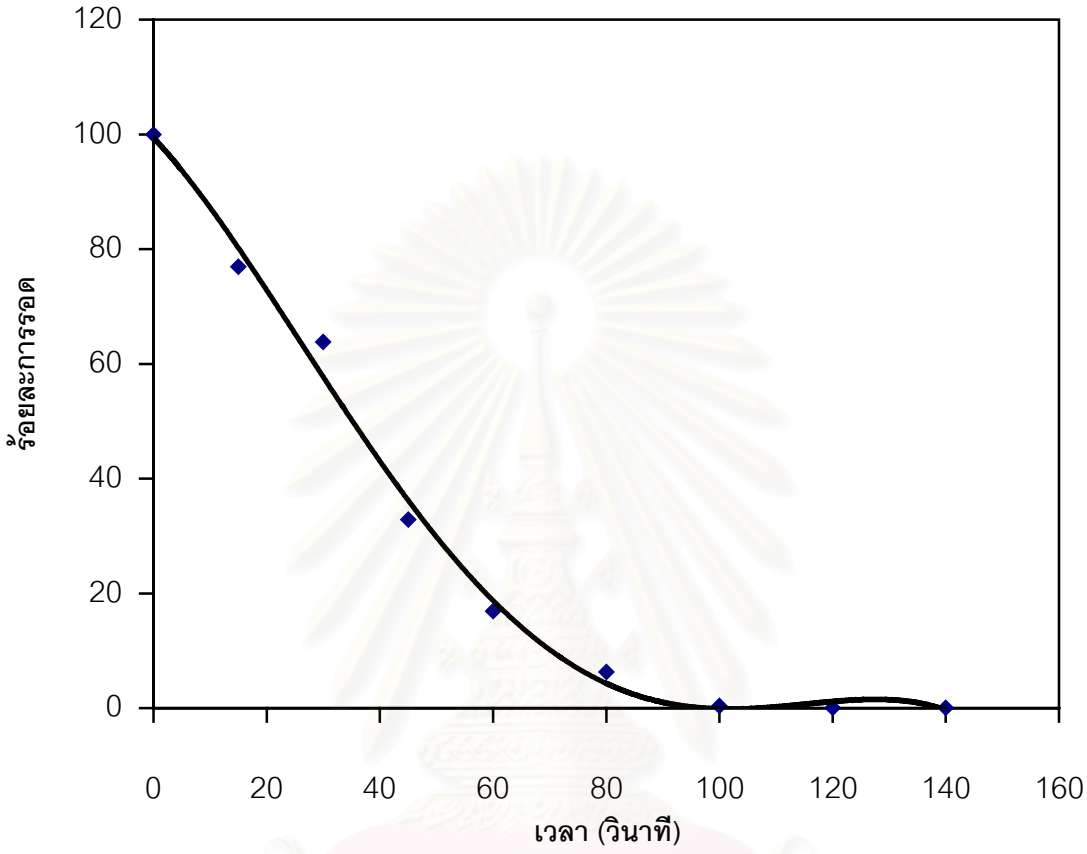
รูปที่ 49 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



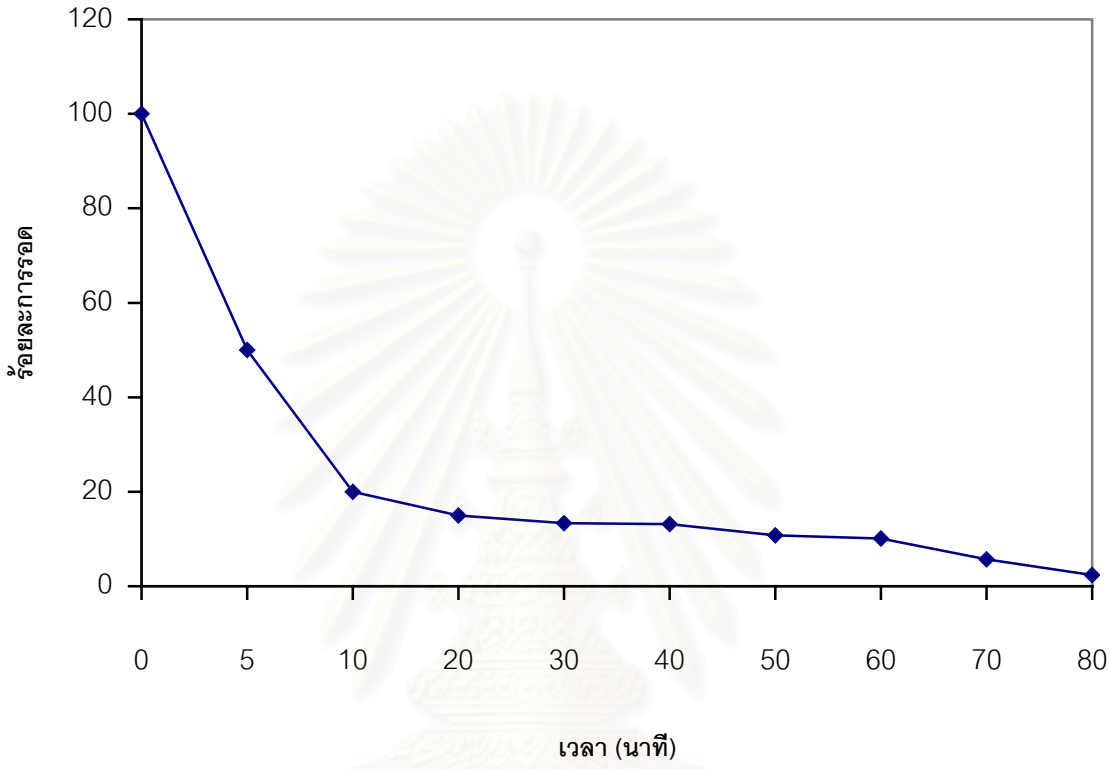
รูปที่ 50 ร้อยละการรอดของ AU3 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



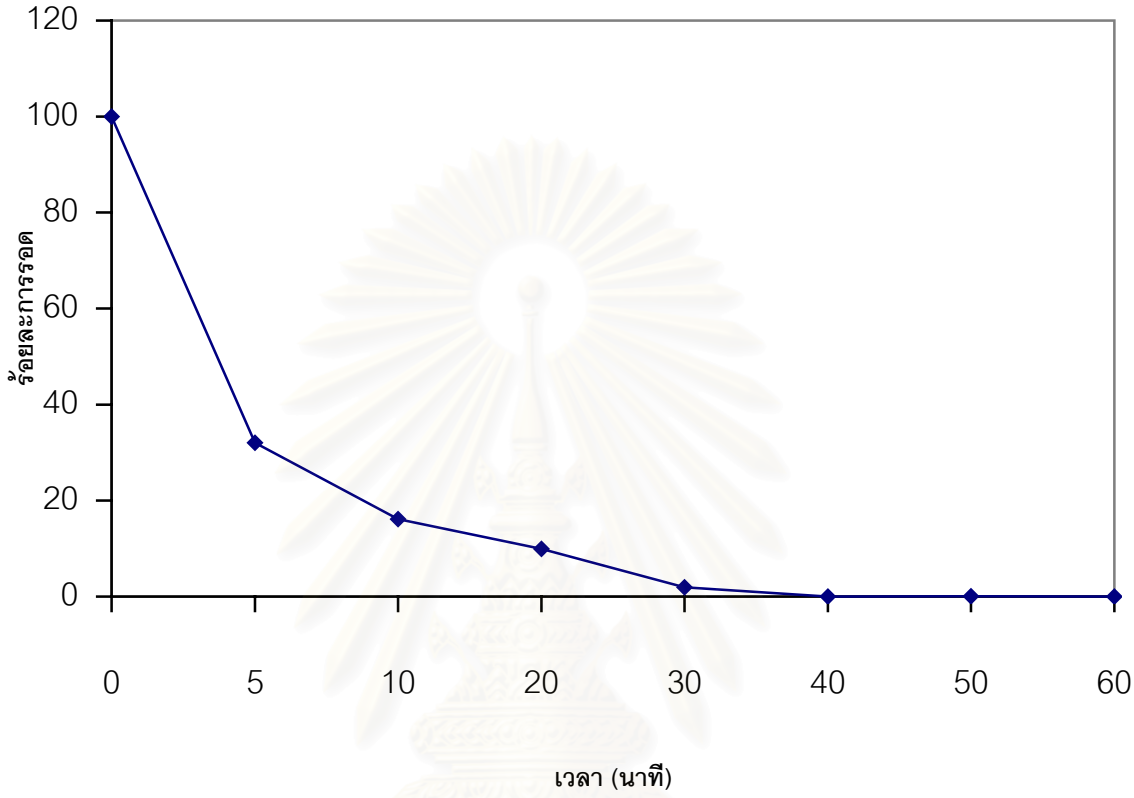
รูปที่ 51 ร้อยละการรอดของ BU5 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 52 ร้อยละการรอดของ CUN26 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53 ร้อยละการรอดของ CUN3-1 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมล. ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

รูปแสดงการสร้างเดกซ์แทรนเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

1. การตรวจสอบการสร้างเดกซ์แทรนเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยการเททับเอธานอล 95 % บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยดูการให้ความกว้างของบริเวณใส

รูป 54 รูปแสดงการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยการดูความสามารถในการให้บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi ที่มีการเททับด้วยเอธานอล

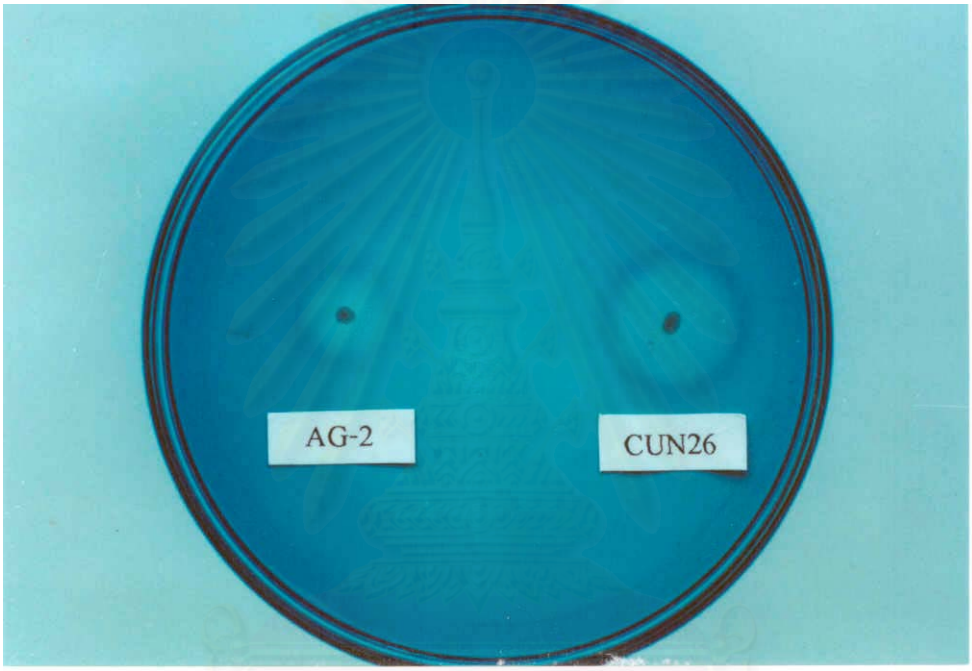
หมายเหตุ : AG-2 คือ เชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 สายพันธุ์ตั้งต้น

AU3 คือ เชื้อ *Arthrobacter* sp. AU3 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบที่ 1

ส่วนเชื้ออื่นที่ไม่ได้บอกชนิดไว้เป็นเชื้อ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์กลายอื่นๆ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตรอบที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เปรียบเทียบการสร้างเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *Arthrobacter* sp. CUN26 สายพันธุ์กลาย (ที่คัดเลือกได้จากเชื้อสายพันธุ์กลายทั้งหมดที่ทำการกลายพันธุ์) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมบลูเดกซ์แทรน แทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นสับสเตรทที่มีอินดิเคเตอร์ในการบอกความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดยดูการให้ความกว้างของบริเวณใส



รูปที่ 55 รูปความกว้างของบริเวณใสบนอาหารที่มีบลูเดกซ์แทรน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Arthrobacter* sp. AG-2 และสายพันธุ์กลาย *Arthrobacter* sp. CUN26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การเตรียมการและการป้องกันอันตรายจากการกลายพันธุ์

<u>แสงอัลตราไวโอเลต</u>

เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอัลตราไวโอเลตควรมีการสวมแว่นป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรง เพราะเป็นแสงที่เป็นอันตรายต่อตา ควรมีการสวมแว่นป้องกันหรือใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีกระจกกั้น ควรสวมถุงมือเมื่อต้องทำงานภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตนี้ผ่านกระจกได้ไม่ดี เชื้อที่ต้องการฉายแสงเพื่อกลายพันธุ์จึงต้องเปิดฝาจานเพราะเลี้ยงเชื้อไว้

<u>สารเคมี NTG (N-methy1-N' – nitro –N – nitrosoguanidine)</u>

สาร NTG เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้วย ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง สาร NTG เป็นสารที่อันตรายต่อการสัมผัส การสูดดมการทดลองเกี่ยวกับสาร NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็ง หรือสารละลาย ควรสวมถุงมือยางตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหย ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารชนิดนี้เด็ดขาด การชั่งสาร NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษชั่งสารเพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทำการทดลองและผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง อย่าเปิดขวดที่ใส่สาร NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อที่แห้งสนิทและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสาร NTG เติมลงในหลอด ปิดฝาแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของสารและนำไปเตรียมเป็น stock ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1 N NaOH ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออก ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง และควรสวมถุงมือยางในการล้างด้วย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว สุหัทยา จิระนันทิพร เกิดวันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และเข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 ที่อยู่ปัจจุบัน 50/725 ซอยสุขุมวิท 105 ถนนสุขุมวิท เขตบางนา กรุงเทพฯ 10260

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย