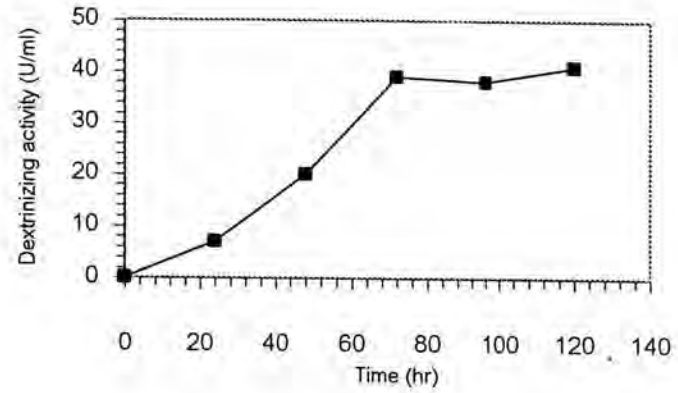
บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 ลักษณะการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11

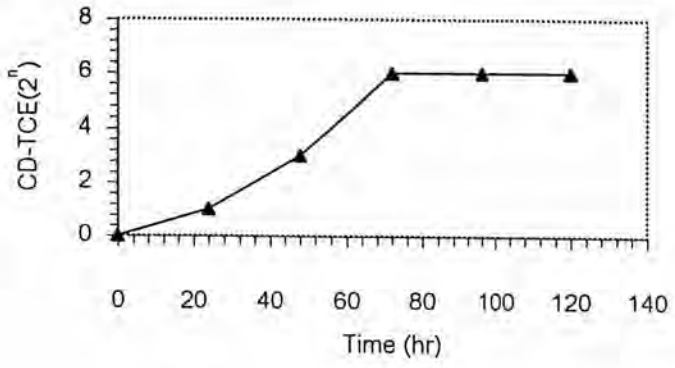
จากการทดลองชั่งน้ำหนักแห้งของ *Bacillus sp.* A11 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Horikoshi ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการวัดทั้งวิธี Dextrinizing Assay และวิธี CD-TCE Assay พบว่าแอคติวิตี CGTase และการเจริญของเชื้อมีค่าสูงสุดในช่วงเดียวกัน และไม่ลดลงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 - 120 ชั่วโมง (รูปที่ 8) แสดงว่า แบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณและช่วงเวลาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงใช้ *Bacillus sp.* A11 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ CGTase

3.2 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นปฐมภูมิกับขั้นทุติยภูมิ

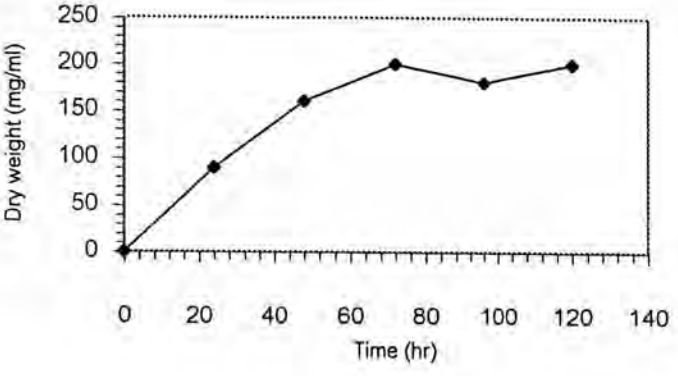
การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายด้วยวิธีปฐมภูมิและวิธีทุติยภูมิจำเป็นต้องใช้วิธีที่เหมาะสม การทดลองนี้ได้เลี้ยงเชื้อที่ฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและเชื้อที่ทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG บนอาหารแข็ง Horikoshi ด้วยเทคนิค point inoculation บ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Clear zone) คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำสายพันธุ์ใหม่นั้นมาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยวัดแอคติวิตี CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing Assay และวิธี CD-TCE assay เพื่อเป็นการทดสอบว่าวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ทั้งสองขั้นตอนให้ผลสอดคล้องกัน จึงหาความสัมพันธ์โดยอ้างอิงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient,r) (ภาคผนวก) จากตารางที่ 3 และ 4 พบว่าเมื่อกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG ตามลำดับแล้วคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยสุ่มมาวิธีละ 50 โคโลนี นำมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ พบว่า ให้ค่า r = 0.80 และ 0.83 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่เชื่อถือได้ (รูปที่ 9 และ 10) มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน จึงใช้วิธีวัดค่า Clear zone มาคัดเลือกแบบปฐมภูมิ ส่วนวิธี Dextrinizing Assay และวิธี CD-TCE Assay นำมาใช้เป็นวิธีคัดเลือกแบบทุติยภูมิ



A



B



C

<u>รูปที่ 8</u> ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus sp* .A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi ที่อุณหภูมิ 37°ซ

A : Dextrinizing activity (U/ml)

B : CD-TCE (dilution)

C : dry weight (mg/ml)

1 17930132

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่า Clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Clear zone	Dextrinizing Activity (Unit/ml)
mutant - 1	3.83	20.7
mutant - 2	1.23	1.4
mutant - 3	5.41	35.6
mutant - 4	2.96	20.1
mutant - 5	3.78	15.1
mutant - 6	4.80	45.2
mutant - 7	5.75	38.2
mutant - 8	4.60	25.8
mutant - 9	4.80	20.5
mutant - 10	1.78	12.6
mutant - 11	5.75	35.2
mutant - 12	4.50	33.1
mutant - 13	4.80	46.0
mutant - 14	5.50	50.3
mutant - 15	4.80	37.0
mutant - 16	2.12	11.9
mutant - 17	5.75	45.3
mutant - 18	3.02	21.8
mutant - 19	5.50	41.2
mutant - 20	3.56	28.2
mutant - 21	1.43	7.7
mutant - 22	5.00	39.6
mutant - 23	2.78	23.5
mutant - 24	3.12	25.2
mutant - 25	1.32	10.9

ตารางที่ 3 (ต่อ) เปรียบเทียบค่า Clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

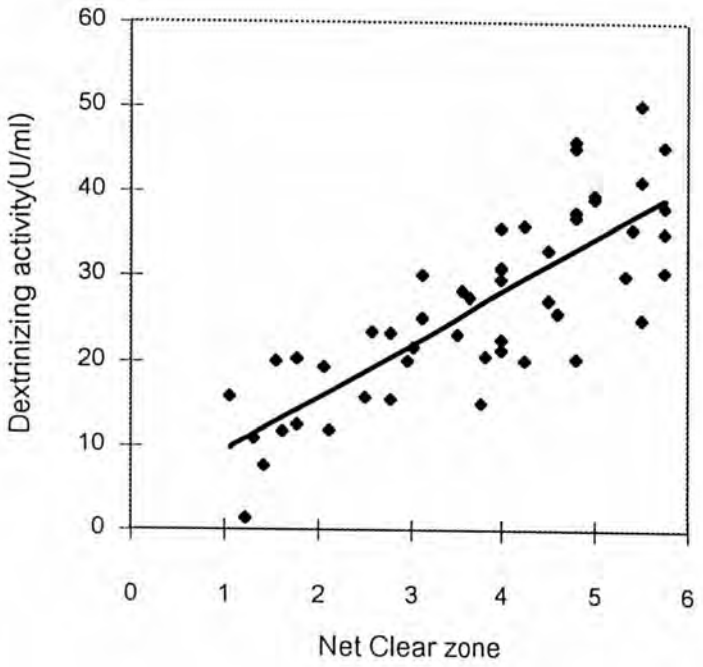
Strain	Clear zone	Dextrinizing Activity (Unit/ml)
mutant - 26	4.00	21.4
mutant - 27	4.80	37.6
mutant - 28	3.50	23.3
mutant - 29	5.75	30.5
mutant - 30	3.65	27.5
mutant - 31	4.00	29.6
mutant - 32	4.00	30.9
mutant - 33	4.25	36.0
mutant - 34	4.00	31.0
mutant - 35	4.00	22.7
mutant - 36	4.00	35.7
mutant - 37	4.25	20.3
mutant - 38	4.50	27.2
mutant - 39	3.12	30.1
mutant - 40	1.63	11.7
mutant - 41	2.06	19.5
mutant - 42	5.33	30.1
mutant - 43	1.06	15.9
mutant - 44	2.58	23.6
mutant - 45	5.00	39.1
mutant - 46	2.50	15.8
mutant - 47	5.50	25.1
mutant - 48	1.56	20.1
mutant - 49	2.78	15.6
mutant - 50	1.78	20.4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า Clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG

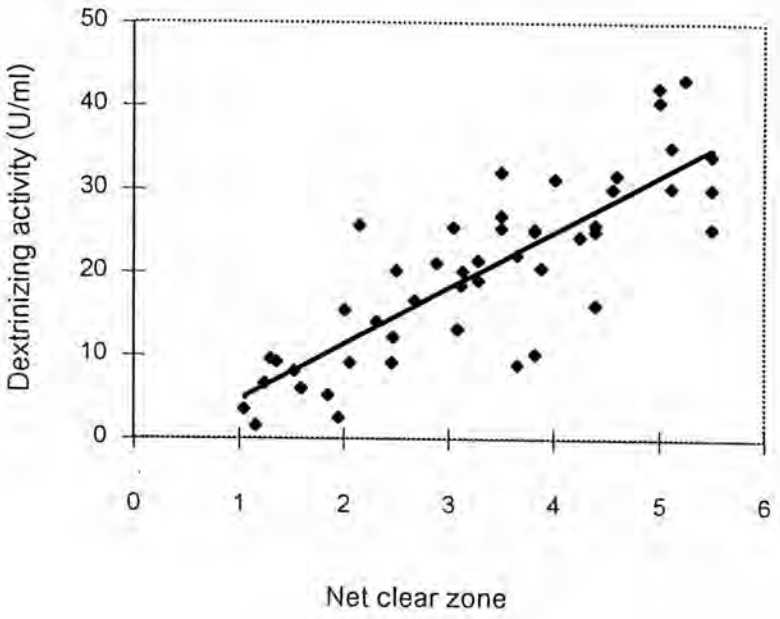
Strain	Clear zone	Dextrinizing Activity (Unit/ml)
mutant - 1	1.59	6.0
mutant - 2	4.60	31.8
mutant - 3	3.83	25.2
mutant - 4	3.83	10.3
mutant - 5	5.50	30.2
mutant - 6	4.40	25.1
mutant - 7	3.28	19.1
mutant - 8	1.36	9.2
mutant - 9	5.50	25.5
mutant - 10	2.15	25.7
mutant - 11	3.66	8.9
mutant - 12	1.30	9.6
mutant - 13	4.40	25.8
mutant - 14	5.50	34.2
mutant - 15	2.47	12.3
mutant - 16	3.89	20.6
mutant - 17	4.40	16.1
mutant - 18	2.89	21.2
mutant - 19	1.05	3.6
mutant - 20	5.50	30.2
mutant - 21	5.12	30.3
mutant - 22	1.85	5.2
mutant - 23	3.09	13.3
mutant - 24	3.83	25.1
mutant - 25	3.50	26.9

ตารางที่ 4 (ต่อ) เปรียบเทียบค่า Clear zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG

Strain	Clear zone	Dextrinizing Activity (Unit/ml)
mutant - 26	3.14	20.1
mutant - 27	1.52	8.1
mutant - 28	3.50	32.1
mutant - 29	3.28	21.5
mutant - 30	2.68	16.6
mutant - 31	3.50	25.4
mutant - 32	3.12	18.5
mutant - 33	1.95	2.6
mutant - 34	3.14	20.2
mutant - 35	2.06	9.2
mutant - 36	4.56	30.2
mutant - 37	2.01	15.5
mutant - 38	3.05	25.5
mutant - 39	3.66	22.1
mutant - 40	1.16	1.6
mutant - 41	5.12	35.2
mutant - 42	2.46	9.2
mutant - 43	4.25	24.4
mutant - 44	4.02	31.3
mutant - 45	1.25	6.6
mutant - 46	5.01	40.6
mutant - 47	2.32	14.1
mutant - 48	2.50	20.3
mutant - 49	5.00	42.3
mutant - 50	5.25	43.2



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง Clear Zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinzing Activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต



<u>รูปที่ 10</u> ความสัมพันธ์ระหว่าง Clear Zone จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิกับ Dextrinizing Activity ของ CGTase จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยสารเคมี NTG

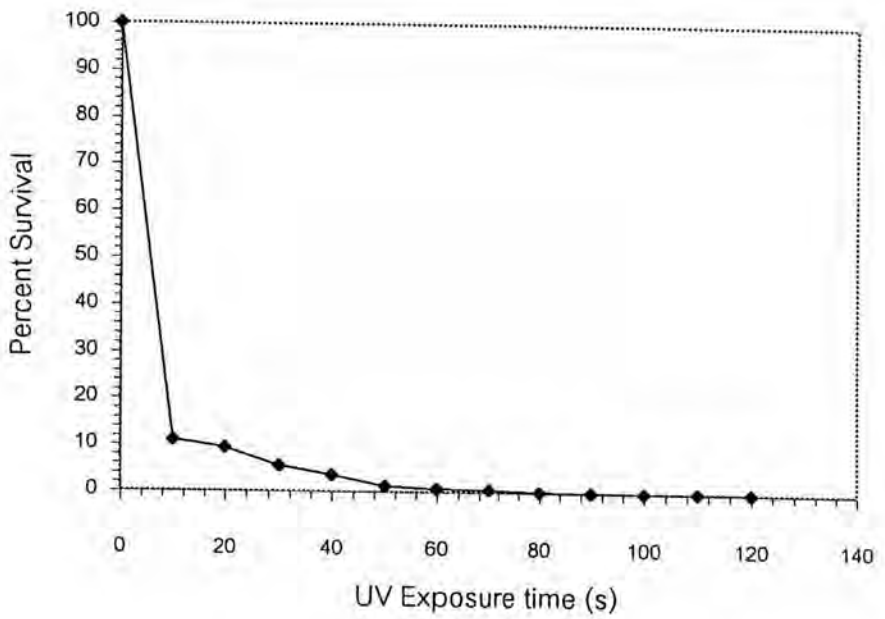
3.3 การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

3.3.1 การหาเวลาที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ก่อนที่จะทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตกับเซลล์ *Bacillus sp.* A11 เพื่อทำการกลายพันธุ์ต้องหาเวลาที่เหมาะสมในการทำการกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้นก่อน โดยพิจารณาการอยู่รอดของเซลล์ (Standard survival curve) และคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การอยู่รอดของสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ความเข้มแสง 15 วัตต์ กับสายพันธุ์ตั้งต้นที่อยู่ในรูปสารละลายแขวนลอย (cell suspension)ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่า OD_{420} เท่ากับ 0.7 โดยระยะห่างระหว่างเซลล์และหลอดอัลตราไวโอเลตประมาณ 20 เซนติเมตร แปรผันเวลาที่ฉายแสง 5-120 วินาทีแล้วนำไปเก็บในที่มืด 2 ชั่วโมง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่อยู่รอด เมื่อพิจารณาการอยู่รอดของเซลล์ จากรูปที่ 11 และตารางที่ 5 จะเห็นว่าในระยะเวลา 120 วินาที เซลล์ถูกทำลายหมด ส่วนที่เวลา 80 วินาที จะได้ 0.12 %survival และได้สายพันธุ์กลายที่มีค่า Clear zone สูงขึ้นมากที่สุด จึงใช้เวลาที่ 80 วินาทีในการทำการกลายพันธุ์

3.3.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มแอคติวิตีของ CGTase สูงขึ้นหลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำ ด้วยวิธีการคัดเลือกแบบปฐมภูมิ (ตารางที่ 5) จากการคัดเลือก 1,000 โคโลนีที่ได้จากการกลายพันธุ์ 80 วินาที ได้โคโลนี 150 โคโลนีที่มีค่า Clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (สายพันธุ์ตั้งต้นให้ค่า Clear zone เท่ากับ 3.83) จึงนำ 150 โคโลนีที่ได้มาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิด้วยวิธี Dextrinizing Assay และวิธี CD-TCE Assay พบว่าสายพันธุ์กลายให้แอคติวิตี CGTase ทั้งสูงขึ้นและลดลง จากตารางที่ 6 แสดงการนำสายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone สูงสุดมา 50 โคโลนี คัดเลือกขั้นทุติยภูมิ พบว่าได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีแอคติวิตีเอนไซม์ CGTase สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นสูงสุด 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ U-1, U-63 และ U-86 โดยเมื่อวัดแอคติวิตี CGTase ด้วยวิธี CD-TCE Assay พบว่าสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์มีแอคติวิตีเท่ากับ $1 : 2^6$ เท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น และเมื่อวัดแอคติวิตี CGTase สายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Dextrinizing Assay ได้ 72.5,70.4 และ 76.3 U/ml ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นมีแอคติวิตี 33.7 U/ml จึงคัดเลือกสายพันธุ์กลาย U-86 มาทำการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ต่อไป เนื่องจากเชื้อ



<u>รูปที่ 11</u> เปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์ *Bacillus sp* .A 11 หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 5 ผลการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์ *Bacillus sp.*A11 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

Time of exposure (s)	Percent Survival	Primary Screening	
		Number of colonies tested	Number of colonies with higher clear zone
0	100.0	100	0
10	11.0	100	0
20	9.40	100	0
30	5.50	100	0
40	3.60	100	1
50	1.20	100	1
60	0.70	100	7
70	0.55	100	12
80	0.12	100	21
90	0.06	50	1
100	0.02	50	0
110	0.01	50	0
120	0.00	50	0

ตารางที่ 6 ค่า Clear Zone และ CGTase แอคติวิตี ของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus* sp. A11 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear Zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
Bacillus sp. A11(control)	3.83	33.7	2^6
U-1	6.33	72.5	2^6
U-2	4.80	50.0	2^6
U-13	4.80	56.7	2^6
U-16	4.25	40.1	2^6
U-19	4.75	51.8	2^6
U-20	4.60	45.3	2^6
U-30	4.50	38.5	2^6
U-32	4.25	30.8	2^6
U-33	4.50	45.2	2^6
U-58	4.80	35.5	2^6
U-59	4.50	31.6	2^6
U-63	6.00	70.4	2^6
U-64	4.50	52.0	2^6
U-70	5.00	60.5	2^6
U-74	4.25	37.0	2^6
U-75	4.25	42.6	2^6
U-83	5.80	67.0	2^6
U-85	4.75	47.7	2^6
U-86	**4.25**	**76.3**	**2^6**
U-95	4.75	49.2	2^6
U-104	4.50	44.8	2^6
U-122	4.75	45.1	2^6

ตารางที่ 6 (ต่อ) ค่า Clear Zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear Zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE acticity (dilution limit)
U-162	4.80	39.6	2^6
U-165	4.75	47.0	2^6
U-167	4.00	20.6	2^6
U-169	4.75	45.3	2^6
U-179	4.75	34.7	2^6
U-180	4.50	33.0	2^6
U-183	5.00	44.7	2^6
U-287	4.75	47.0	2^6
U-290	5.00	50.0	2^6
U-292	5.00	51.0	2^6
U-293	4.25	34.3	2^6
U-297	4.50	70.4	2^6
U-302	4.00	17.2	2^6
U-303	4.00	18.0	2^6
U-305	4.00	60.6	2^6
U-339	5.33	61.3	2^6
U-441	5.50	65.0	2^6
U-444	5.00	49.8	2^6
U-445	5.33	68.2	2^6
U-550	5.66	66.5	2^6
U-551	5.33	66.1	2^6
U-552	4.00	18.5	2^6
U-554	4.25	30.0	2^6
U-658	5.00	55.0	2^6
U-699	5.33	68.0	2^6

ตารางที่ 6 (ต่อ) ค่า Clear Zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear Zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
U-705	4.00	21.0	2^6
U-806	4.00	17.0	2^6
U-814	5.00	69.0	2^6

U คือ สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์กลาย U-86 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้แอคติวิตีเอนไซม์ CGTase 76.3 U/ml ซึ่งเป็น 2.2 เท่าของสายพันธุ์ตั้งต้น

3.4 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

3.4.1 การหาความเข้มข้นของสาร NTG ที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus sp.* A11 ให้เกิดการกลายพันธุ์

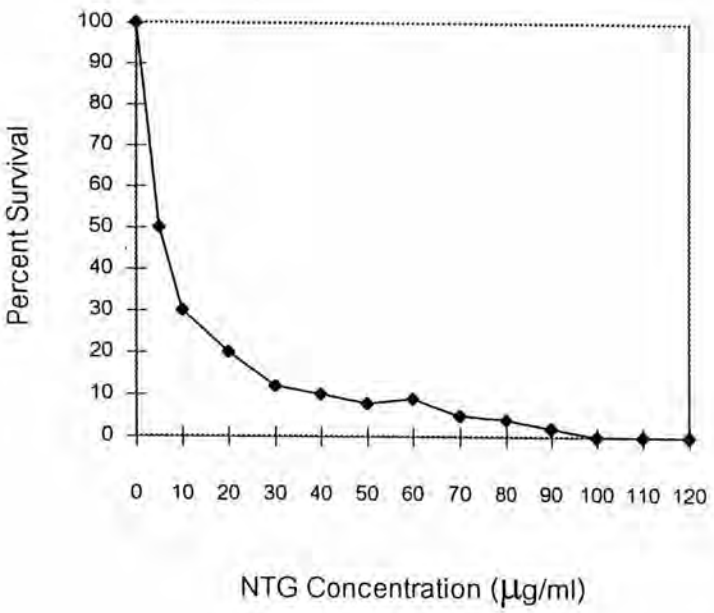
จากการทดลองหาความเข้มข้นของสารเคมี NTG ในการชักนำเชื้อ *Bacillus sp.* A11 ที่อยู่ในรูปสารละลายเซลล์แขวนลอยให้เกิดการกลายพันธุ์ ใช้ความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ OD_{420} เท่ากับ 0.7 แปรผันความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มกับสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนับจำนวนเซลล์ที่รอด คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังแสดงในตารางที่ 7 และ รูปที่ 12 เมื่อความเข้มข้น NTG เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 50% และเมื่อความเข้มข้น NTG 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์เหลือประมาณ 0.07% จึงนำเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาคัดเลือกต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้น NTG ที่ทำให้เซลล์ตาย 0-50% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำการกลายพันธุ์ (Mendell,1960 ; Calam,1970 ; Hopwood,1970)

3.4.2 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ทำการกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย U-86 ซ้ำ ด้วยสารเคมี NTG โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (OD_{420} เท่ากับ 0.7) บ่มกับสารละลาย NTG แปรผันความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 4.1 จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ โดยนำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์โดยสาร NTG มา 1,000 โคโลนี เลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi แล้ววัดค่า Clear zone ได้สายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone กว้างกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น U-86 ซึ่งเท่ากับ 4.25 มีทั้งหมด 89 สายพันธุ์ จึงนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ พบว่าสายพันธุ์กลายให้แอคติวิตี CGTase เพิ่มขึ้นและลดลง ดังตารางที่ 8 แสดงสายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone สูงสุด 56 สายพันธุ์ มี 3 สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีสูงสุดคือสายพันธุ์กลาย UN-590, สายพันธุ์กลาย UN-723 และสายพันธุ์กลาย UN-317 ให้ Dextrinizing activity 66.0, 66.4 และ 75.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและสายพันธุ์กลาย UN-317 ให้ค่าแอคติวิตี เท่ากับ 2^8 ซึ่งสูงสุดเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE Assay จึงนำสายพันธุ์กลาย UN-317 ไปทดลองกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตต่อไป

ตารางที่ 7 ผลการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์ *Bacillus sp.* A11 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

NTG concentration (μg/ml)	Percent Survival	Primary Screening	
		Number of colonies tested	Number of colonies with higher clear zone
0	100.0	100	0
5	50.0	100	1
10	30.0	100	3
20	20.0	100	7
30	12.0	100	11
40	10.0	100	20
50	7.8	100	33
60	9.0	100	50
70	5.0	100	15
80	4.0	100	7
90	2.0	100	2
100	0.07	100	1
110	0.02	100	0
120	0.01	100	0



รูปที่ 12 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลล์ *Bacillus sp.* A11 หลังจากถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ตารางที่ 8 ค่า Clear zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ U-86 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ U-86 ด้วยสารเคมี NTG

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD - TCE activity (dilution limit)
U-86(control)	4.25	58.0	2^6
UN-303	5.50	57.3	2^6
UN-305	5.50	54.8	2^7
UN-306	4.60	31.1	2^6
UN-310	5.75	61.0	2^7
UN-315	5.75	40.5	2^6
UN-317	4.60	75.9	2^8
UN-322	5.75	62.0	2^5
UN-327	5.75	65.7	2^6
UN-335	4.60	30.5	2^6
UN-359	4.60	26.6	2^6
UN-361	5.50	56.7	2^6
UN-380	4.60	28.0	2^6
UN-403	4.60	34.5	2^6
UN-411	5.50	56.0	2^6
UN-415	4.60	33.6	2^6
UN-418	5.50	57.2	2^7
UN-421	5.50	56.9	2^7
UN-430	4.60	26.7	2^5
UN-432	4.60	30.7	2^7
UN-435	5.50	57.9	2^7
UN-437	5.75	65.0	2^6
UN-438	5.25	49.4	2^6
UN-440	5.50	48.2	2^7

ตารางที่ 8 (ต่อ) ค่า Clear zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ U-86 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ U-86 ด้วยสาร NTG

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD - TCE activity (dilution limit)
UN-461	4.60	31.4	2^7
UN-465	4.60	28.0	2^6
UN-471	4.60	27.0	2^6
UN-477	4.60	29.9	2^6
UN-541	4.60	28.0	2^6
UN-546	5.75	68.0	2^5
UN-555	5.75	66.0	2^6
UN-562	5.50	59.6	2^7
UN-570	4.60	50.7	2^6
UN-574	5.50	66.4	2^7
UN-576	5.50	58.5	2^7
UN-586	5.50	60.0	2^6
UN-588	5.50	68.2	2^7
UN-590	5.50	66.0	2^7
UN-593	5.50	69.6	2^7
UN-693	5.50	68.0	2^7
UN-700	4.60	26.3	2^6
UN-717	5.50	58.2	2^7
UN-720	5.75	68.0	2^6
UN-723	5.50	56.4	2^7
UN-732	4.60	31.8	2^6
UN-735	5.50	58.4	2^7
UN-742	4.60	28.5	2^7
UN-752	4.60	27.0	2^6

ตารางที่ 8 (ต่อ) ค่า Clear zone และ CGTase แอคติวิตีของเชื้อสายพันธุ์ U-86 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ U-86 ด้วยสารเคมี NTG

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD - TCE activity (dilution limit)
UN-781	5.50	57.3	2^7
UN-782	4.60	26.6	2^6
UN-783	5.50	59.0	2^5
UN-790	5.50	58.0	2^6
UN-792	5.50	62.0	2^7
UN-794	4.60	27.0	2^5
UN-798	5.50	58.8	2^6
UN-821	4.60	25.0	2^6
UN-822	5.50	60.0	2^6

UN คือ สายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยครั้งแรกถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตแล้วนำมากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG

3.5 การกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย UN-317 ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

จากการนำสายพันธุ์กลาย UN-317 มาทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตพบว่า (ตารางที่ 9) ที่เวลา 60 วินาที ให้สายพันธุ์ใหม่ที่มีค่า Clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวนสูงสุด จึงใช้เวลาที่ 60 วินาที ทำการกลายพันธุ์ UN-317 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ UN-317 กับแสงอัลตราไวโอเลต จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่มีค่า Clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (UN-317)สูงสุด มา 52 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10) คัดเลือกขั้นทุติยภูมิด้วยวิธี Dextrinizing Assay และ CD-TCE Assay พบว่า เมื่อวัดด้วยวิธี Dextrinizing Assay สายพันธุ์ UNU-50 และสายพันธุ์ UNU-178 ให้แอคติวิตี Dextrinizing เท่ากับ 60.6 และ 62.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE Assay พบว่าสายพันธุ์ UNU-50 และ UNU-178 ให้ค่าแอคติวิตี เท่ากับ 2^7 และ 2^8 ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ UNU-178 ไปทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ต่อไป

3.6 การกลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลาย UNU-178 ซ้ำด้วยสารเคมี NTG

ทำการหาความเข้มข้นสาร NTG ที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์สายพันธุ์กลาย UNU-178 โดยแปรผันความเข้มข้นสาร NTG เป็น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น NTG 5-70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11) ให้สายพันธุ์กลายที่มีค่า Clear zoneสูงขึ้น เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

จากผลการทดลองตารางที่ 12 พบว่าสายพันธุ์กลาย UNUN-97, UNUN-125,UNUN-183 และ UNUN-192 ให้แอคติวิตี Dextrinizing เท่ากับ 89.2,80.8,75.8 และ 72.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE Assay พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ให้ค่าแอคติวิตี เท่ากับ 2^8 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน จึงทำการเก็บเชื้อสายพันธุ์กลายไว้ 4 สายพันธุ์ เพื่อทำการทดสอบความเสถียรของเชื้อสายพันธุ์กลายต่อไป

ตารางที่ 9 ผลการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสง UV ที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์สายพันธุ์กลาย UN-317 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

Time of exposure (s)	Percent Survival	Primary Screening	
		Number of colonies tested	Number of colonies with higher clear zone
0	100.0	100	0
10	10.1	100	0
20	3.78	100	0
30	1.25	100	1
40	0.81	100	5
50	0.38	100	10
60	0.14	100	18
70	0.06	100	1
80	0.0	10	0
90	0.0	10	0
100	0.0	10	0

ตารางที่ 10 ค่า Clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UN-317 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UN-317 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD - TCE activity (dilution limit)
UN-317(control)	4.60	43.2	2^7
UNU-14	5.00	44.3	2^7
UNU-20	5.75	48.0	2^7
UNU-21	5.00	45.0	2^5
UNU-25	5.75	54.8	2^7
UNU-26	5.75	56.5	2^6
UNU-33	4.75	43.0	2^7
UNU-34	5.75	54.5	2^7
UNU-50	5.75	60.6	2^7
UNU-51	5.75	54.0	2^6
UNU-105	5.00	52.5	2^7
UNU-119	5.00	44.5	2^7
UNU-122	5.75	54.6	2^7
UNU-128	5.75	54.1	2^7
UNU-136	5.75	50.0	2^7
UNU-137	5.75	52.1	2^7
UNU-146	4.75	44.8	2^7
UNU-148	4.75	43.9	2^7
UNU-149	5.75	48.0	2^6
UNU-156	5.00	41.7	2^7
UNU-163	6.00	56.4	2^6
UNU-178	**5.00**	**62.8**	$\mathbf{2^8}$
UNU-189	4.75	34.3	2^7
UNU-200	4.75	40.3	2^7
UNU-220	5.75	52.7	2^7

ตารางที่ 10 (ต่อ) ค่า Clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UN-317 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UN-317 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
UNU-221	5.00	42.0	2^7
UNU-299	4.75	37.8	2^7
UNU-302	4.75	45.4	2^7
UNU-312	4.75	38.3	2^7
UNU-319	5.75	58.3	2^7
UNU-333	5.75	56.8	2^7
UNU-339	4.75	32.7	2^7
UNU-406	5.00	45.6	2^7
UNU-414	5.75	56.0	2^6
UNU-422	5.00	39.5	2^7
UNU-430	4.75	30.3	2^7
UNU-455	5.75	53.6	2^7
UNU-509	5.75	51.7	2^7
UNU-518	4.75	46.6	2^7
UNU-520	4.75	41.7	2^7
UNU-552	4.75	45.4	2^7
UNU-571	4.75	50.0	2^7
UNU-612	4.75	42.2	2^7
UNU-641	5.75	56.6	2^7
UNU-651	4.75	40.6	2^7
UNU-660	5.00	42.0	2^7
UNU-663	5.00	40.8	2^6
UNU-670	5.75	54.3	2^7
UNU-700	4.75	40.0	2^6

ตารางที่ 10 (ต่อ) ค่า Clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UN-317 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UN-317 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
UNU-720	5.75	52.0	2^7
UNU-780	5.75	49.9	2^7

UNU คือ เชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 3 ครั้ง โดยแสงอัลตราไวโอเลต, สารเคมี NTG และ แสงอัลตราไวโอเลตซ้ำ ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ผลการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์สายพันธุ์กลาย UNU-178 และต่อ CGTase activity แสดงด้วยค่า clear zone ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

NTG concentration (μg/ml)	Percent Survival	Primary Screening	
		Number of colonies tested	Number of colonies with higher clear zone
0	100.0	100	0
5	30.0	100	1
10	21.0	100	3
20	10.0	100	8
30	9.0	100	11
40	7.0	100	20
50	1.0	100	14
60	0.8	100	4
70	0.2	100	1
80	0.07	100	0
90	0.01	100	0
100	0.0	0	0

ตารางที่ 12 ค่า Clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UNU-178 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UNU-178 ด้วยสารเคมี NTG

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD - TCE activity (dilution limit)
UNU-178(control)	4.75	58.6	2^7
UNUN-47	5.00	42.1	2^7
UNUN-84	6.00	60.5	2^8
UNUN-97	**6.00**	**89.2**	**2^8**
UNUN-99	5.00	43.7	2^7
UNUN-100	4.75	39.8	2^7
UNUN-125	**6.00**	**80.8**	**2^8**
UNUN-126	5.00	44.0	2^7
UNUN-127	4.75	43.2	2^7
UNUN-183	**6.25**	**75.8**	**2^8**
UNUN-187	5.00	46.8	2^7
UNUN-188	5.00	41.1	2^7
UNUN-189	5.00	46.8	2^7
UNUN-190	4.75	43.9	2^7
UNUN-191	6.25	50.6	2^7
UNUN-192	**6.25**	**72.3**	**2^8**
UNUN-196	5.00	49.4	2^7
UNUN-287	6.25	64.9	2^8
UNUN-291	6.25	54.7	2^7
UNUN-292	6.00	54.4	2^7
UNUN-294	5.00	43.1	2^7
UNUN-321	6.00	61.2	2^7
UNUN-323	5.00	43.3	2^7
UNUN-333	6.00	54.2	2^7
UNUN-335	5.00	44.0	2^7

ตารางที่ 12 (ต่อ) ค่า Clear zone และแอคติวิตี CGTase ของเชื้อสายพันธุ์ UNU-178 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ UNU-178 ด้วยสารเคมี NTG

Strain	Primary screening	Secondary screening	
	Clear zone	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
UNUN-463	5.25	48.0	2^7
UNUN-502	4.75	38.5	2^7
UNUN-503	5.00	44.0	2^7
UNUN-505	5.00	42.0	2^7

UNUN คือ เชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 4 ครั้งโดย แสงอัลตราไวโอเลต , สารเคมี NTG , แสงอัลตราไวโอเลตซ้ำ และสารเคมี NTG ซ้ำ ตามลำดับ

3.7 เปรียบเทียบการเจริญและแอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น

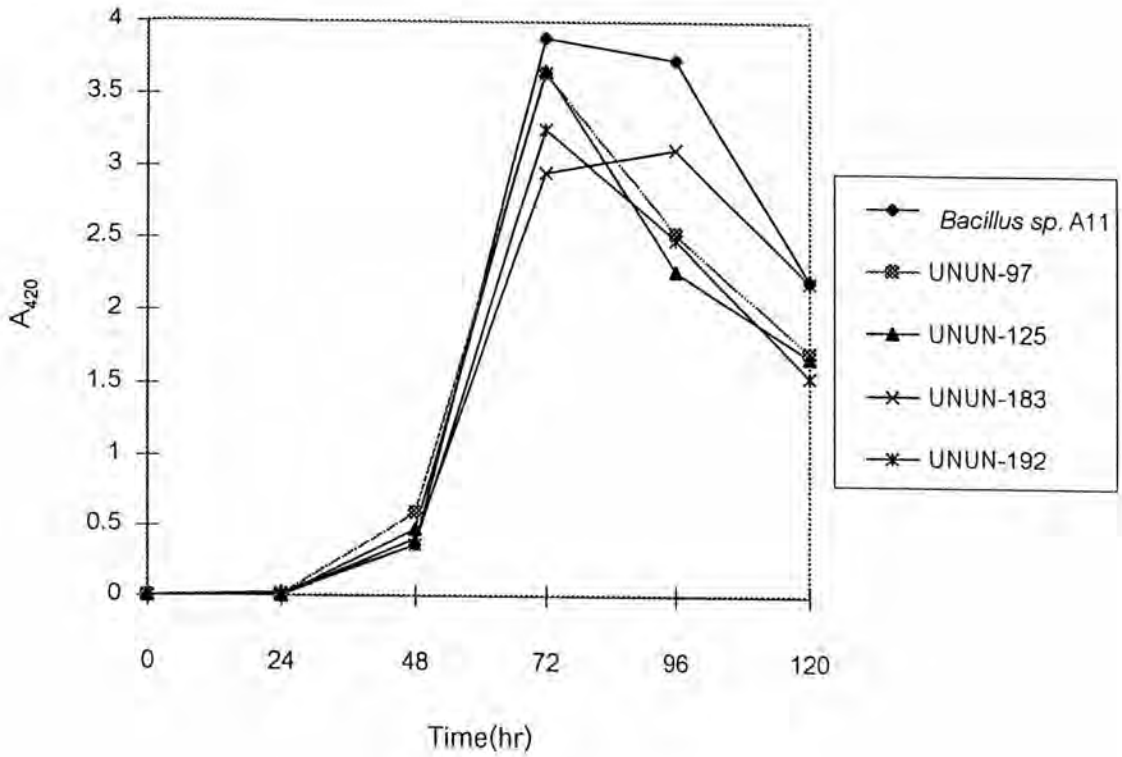
3.7.1 เปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์กลาย

เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้น (*Bacillus sp.* A11) และเชื้อสายพันธุ์กลาย UNUN-97 , UNUN-125, UNUN-183 และ UNUN-192 ในอาหารเหลว Medium I 25 มิลลิลิตร จากนั้น Transfer เชื้อโดยใช้ 1% inoculum ไปเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi 250 มิลลิลิตร ที่มีแป้งข้าวเจ้า 1% ที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็วรอบ 250 rpm พบว่า lag phase ทั้ง 5 สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เซลล์ต้องใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงในการปรับสภาวะ หลังจากนั้นในระหว่างชั่วโมงที่ 24-48 เซลล์สามารถเจริญได้โดย UNUN-97 เจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์อื่น ช่วง log phase ของทุกสายพันธุ์อยู่ในช่วงเวลา 48-72 ชั่วโมง และ ทั้ง 5 สายพันธุ์เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (Stationary phase) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และ UNUN-183 ยังคงรักษาระดับการเจริญคงที่จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 จึงลดการเจริญลง ในขณะที่สายพันธุ์กลายอีก 3 สายพันธุ์เมื่อเจริญสูงสุดที่ชั่วโมง 72 จะลดอัตราการเจริญลง (รูปที่ 13)

3.7.2 ศึกษาการผลิต CGTase ของเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ได้เปรียบเทียบการผลิต CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้น กับสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ UNUN-97 , UNUN-125 ,UNUN-183 และ UNUN-192 หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 13) พบว่า UNUN-97 มีแอคติวิตี CGTase เมื่อวัดด้วย Dextrinizing activity สูงสุด คือ 89.2 U/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.2 เท่า ขณะที่เมื่อวัด CD-TCE activity สายพันธุ์กลายทั้ง 4 มีแอคติวิตีเท่ากับ 2^8 เท่ากัน ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2^2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีรวม และค่า Specific activity ของสายพันธุ์ตั้งต้น กับ UNUN -97 (ตารางที่ 14) พบว่า สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีแอคติวิตีรวมสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 3.8 เท่า และมี specific activity สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 4.6 เท่า

เก็บสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกไว้ 4 สายพันธุ์ คือ UNUN-97, UNUN-125, UNUN-183 UNUN-192 และสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ ที่เวลาต่างๆนำมาถ่ายเชื้อลงบนอาหารเหลว Medium I แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Horikoshi เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาหาแอคติวิตีของ CGTase (ตารางที่ 15,16 และรูปที่ 14) พบว่าเมื่อเก็บเชื้อไว้เป็นเวลา 60 วัน เปอร์เซนต์ของ Dextrinizing activity ที่ลดลงของสายพันธุ์ตั้งต้นเท่ากับ 36.4 % ส่วนสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ลดลง 6.8% , UNUN-125 ลดลง



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้กับสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp* . A11 ที่อุณหภูมิ 37°ซ

ตารางที่ 13 แอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	Dextrinizing activity (Unit/ml)	CD-TCE activity (dilution limit)
Bacillus sp. A11	41.3	2^6
UNUN-97	89.2	2^8
UNUN-125	80.8	2^8
UNUN-183	75.8	2^8
UNUN-192	72.3	2^8

ตารางที่ 14 สารละลายเอนไซม์ (Crude CGTase) ที่ได้จากการเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้นและเชื้อสายพันธุ์กลาย UNUN-97

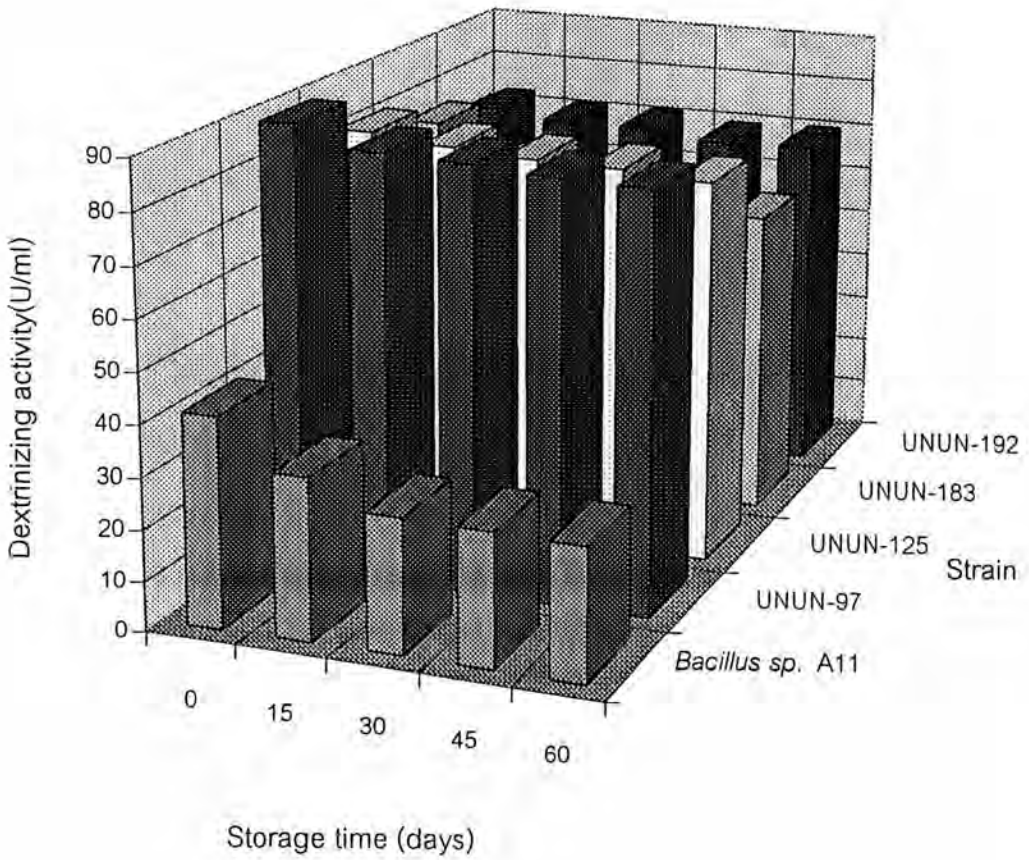
Strain	Volume(ml)	Dextrinizing activity (total Units)	Total protein (mg)	Specific activity(Unit/mg)	CD-TCE (dilution limit)
Bacillus sp. A11	2,000	35,880	860	42	$1:2^5$
UNUN-97	2,000	134,680	700	192	$1:2^8$

ตารางที่ 15 แอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ ที่เวลาต่างกัน

Storage time (day)	Dextrinizing activity (Unit/ml)					CD-TCE activity (dilution limit)				
	Bacillus sp. A11	UNUN-97	UNUN-125	UNUN-183	UNUN-192	*Bacillus sp.* A11	UNUN-97	UNUN-125	UNUN-183	UNUN-192
0	41.3	89.2	80.8	75.8	72.3	2^6	2^8	2^8	2^8	2^8
15	32.0	85.2	79.2	68.1	70.8	2^6	2^8	2^8	2^8	2^8
30	26.8	84.6	78.2	64.4	70.7	2^6	2^8	2^8	2^8	2^8
45	26.55	83.5	77.9	62.7	69.1	2^5	2^8	2^7	2^7	2^7
60	26.3	83.1	76.9	61.8	69.7	2^5	2^7	2^7	2^7	2^7

ตารางที่ 16 เปอร์เซนต์การลดลงของแอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลายเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่ -20 °ซ ที่เวลาต่างกัน

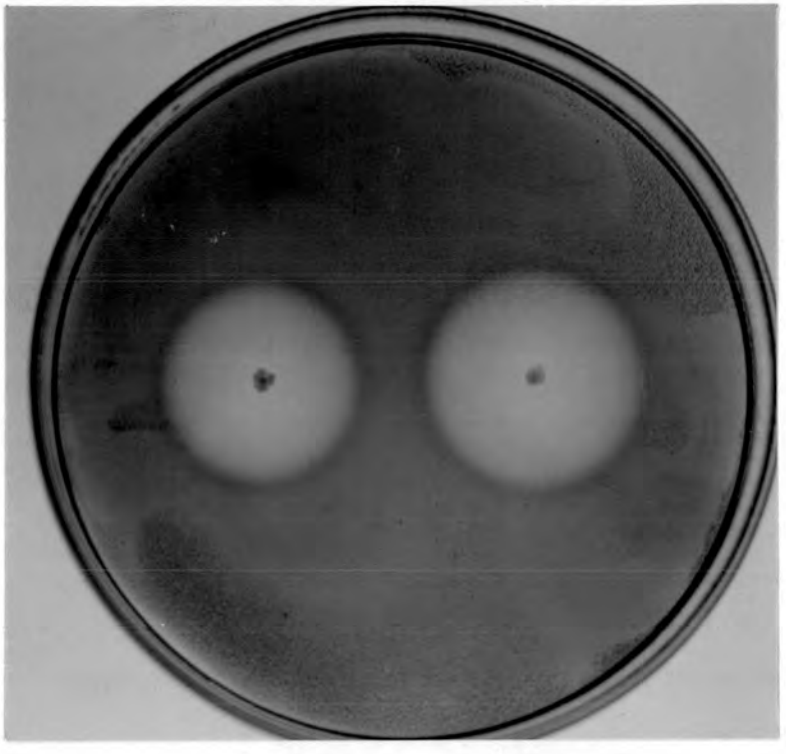
Storage time(day)	Loss of dextrinizing activity (%)				
	Bacillus sp. A11	UNUN-97	UNUN-125	UNUN-183	UNUN-192
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	22.5	4.4	1.9	10.2	2.0
30	35.2	5.1	3.2	15.0	2.2
45	35.9	6.3	3.6	17.3	4.3
60	36.4	6.8	4.9	18.4	3.6



รูปที่ 14 แอคติวิตี CGTase ของ *Bacillus sp* . A11 และสายพันธุ์กลาย เมื่อเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ - 20°ซ

4.9%,UNUN-183 ลดลง 18.4% และสายพันธุ์กลาย UNUN-192 ลดลง 3.6% ในขณะที่การลดลงของ CD-TCE ของสายพันธุ์ตั้งต้นในช่วงการเก็บ 30 วันแรกแอคติวิตีไม่ลดลงแต่เมื่อเก็บไว้ 45 วันแอคติวิตีของสายพันธุ์กลาย UNUN-125,UNUN-183 และ UNUN-192 ลดลง จาก 2^8 เป็น 2^7 ในขณะที่สายพันธุ์กลาย UNUN-97 เมื่อเก็บไว้ 60 วัน แอคติวิตีจึงจะลดลงด้วยสัดส่วนที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีความคงทนในการรักษาประสิทธิภาพการผลิต CGTase ที่แน่นอน ในปริมาณสูง และสม่ำเสมอ มากที่สุด งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ทำการทดลองต่อไป (รูปที่ 15 แสดงการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ที่คัดเลือกได้)

A



B

<u>รูปที่ 15</u> การคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิโดยการวัดความกว้างวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37° ซ แล้วราดทับด้วยไอโอดีนรีเอเจนต์

A : สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

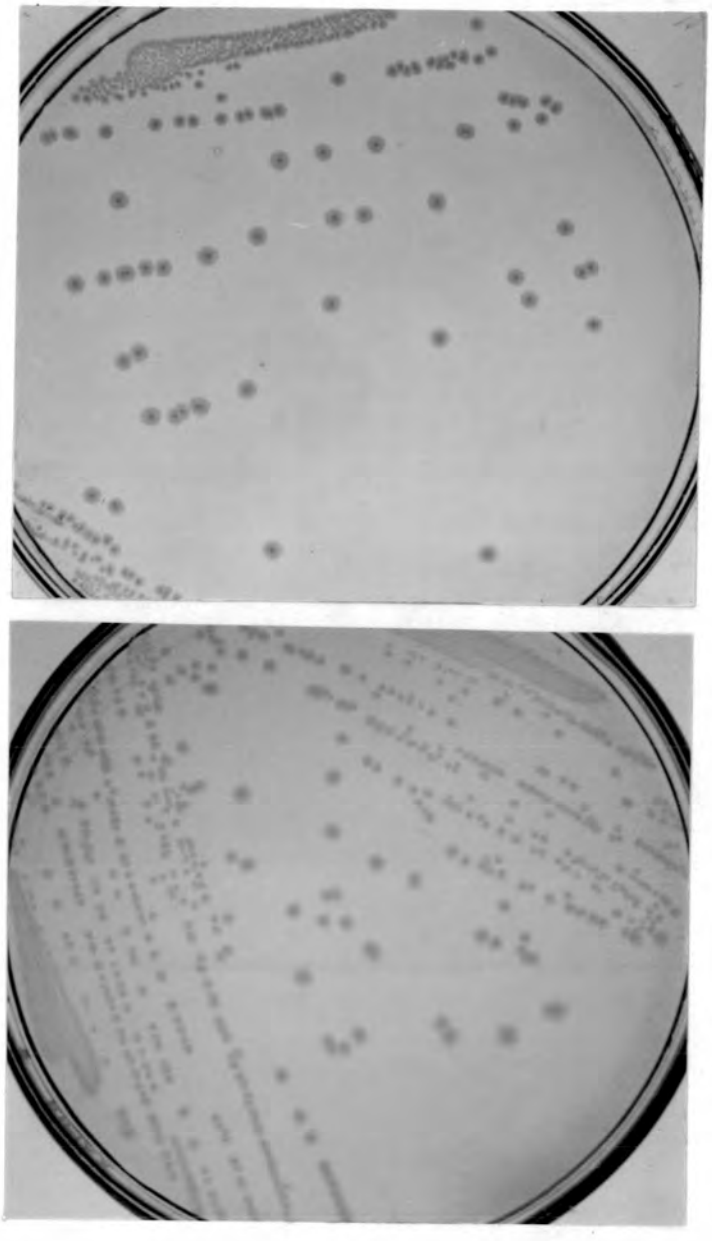
B : สายพันธุ์กลาย UNUN-97

3.8 ลักษณะรูปร่างโคโลนีของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

เมื่อนำสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ทั้ง 2 (จากรูปที่ 16) ไม่มีความแตกต่างกัน โคโลนีของทั้ง 2 สายพันธุ์มีสีเหลืองอ่อน ขุ่น ทึบแสง มีผิวมัน การเจริญกระจายเป็นจุดๆ มีขอบเรียบ เป็นเมือก (slime) ขนาดไม่แตกต่างกัน

3.9 ลักษณะเซลล์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายUNUN-97จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (SEM)

จากการนำสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายUNUN-97เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope โดย fix เซลล์ด้วย OsO_4 แล้วฉาบด้วยทอง (Ion Sputter) จากรูปที่ 17 พบว่าทั้งสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 เป็นแบคทีเรียลักษณะรูปเป็นท่อน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของแบคทีเรียในจีนัส bacilli มีการจัดเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาวโดยเฉพาะสายพันธุ์ตั้งต้นจะสังเกตุเห็นได้ชัด เมื่อหาค่าเฉลี่ยความกว้าง x ยาว จากสายพันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง ของทั้ง 2 สายพันธุ์จะได้ 0.33 x 1.74 และ 0.51 x 2.10 ไมโครเมตร สำหรับสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายตามลำดับ และจากการกลายพันธุ์พบว่าเซลล์สายพันธุ์กลายต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นคือมีเซลล์ขนาดแตกต่างกันปะปน บางเซลล์มีขนาดกว้างกว่าเดิมจนเห็นได้ชัด (ค่า SD ของความกว้าง x ยาว = 0.14 x 0.63 ไมโครเมตร) ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก (ค่า SD ของความกว้าง x ยาว = 0.05 x 0.39 ไมโครเมตร)



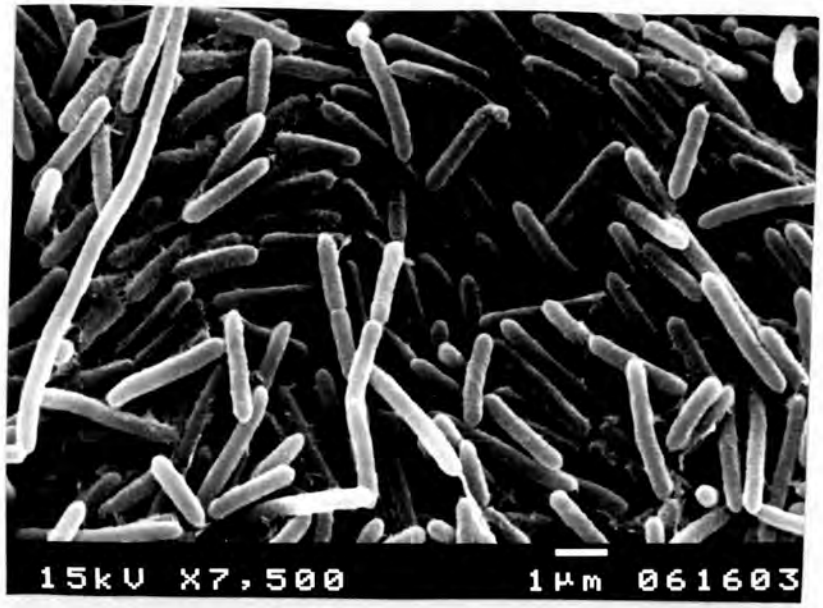
A

B

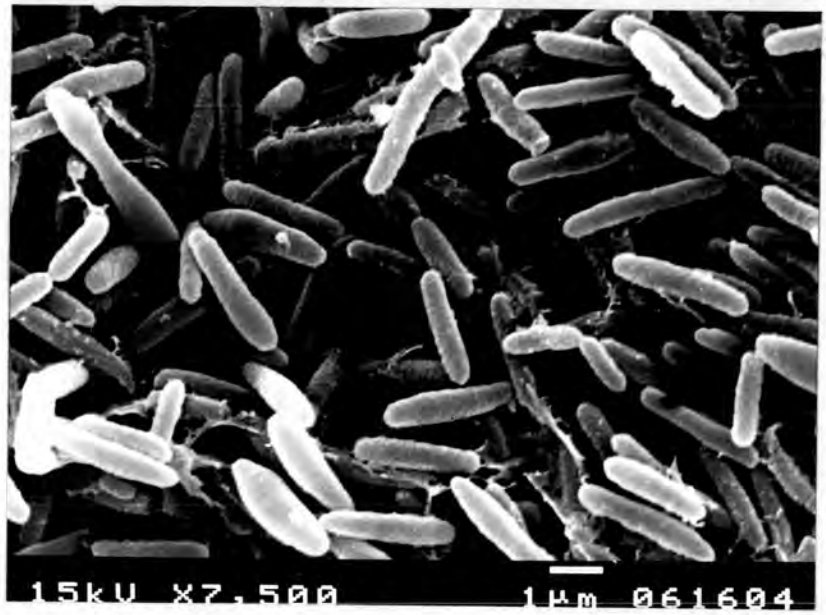
<u>รูปที่ 16</u> ลักษณะเซลล์ที่เจริญบนอาหารแข็ง Horikoshi เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ

A : สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

B : สายพันธุ์กลาย UNUN-97



A



B

<u>รูปที่ 17</u> ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope(SEM) กำลังขยาย 7,500 เท่า

A : สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

B : สายพันธุ์กลาย UNUN-97

3.10 ลักษณะเซลล์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (TEM)

นำสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน Transmission Electron Microscope โดย fix เซลล์ด้วย OsO_4 และย้อมเซลล์ด้วย Lead Citrate พบว่า (รูปที่ 18 - 19) เซลล์สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีการสร้างสปอร์ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นไม่มี และทั้ง 2 สายพันธุ์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์มีการสร้างผนังกั้นในระหว่างการแบ่งเซลล์ มีผนังเซลล์ (cell wall) ห่อหุ้มเซลล์ สายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งรียาวในขณะที่สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีอัตราส่วนของความยาว : ความกว้างของแท่งเซลล์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

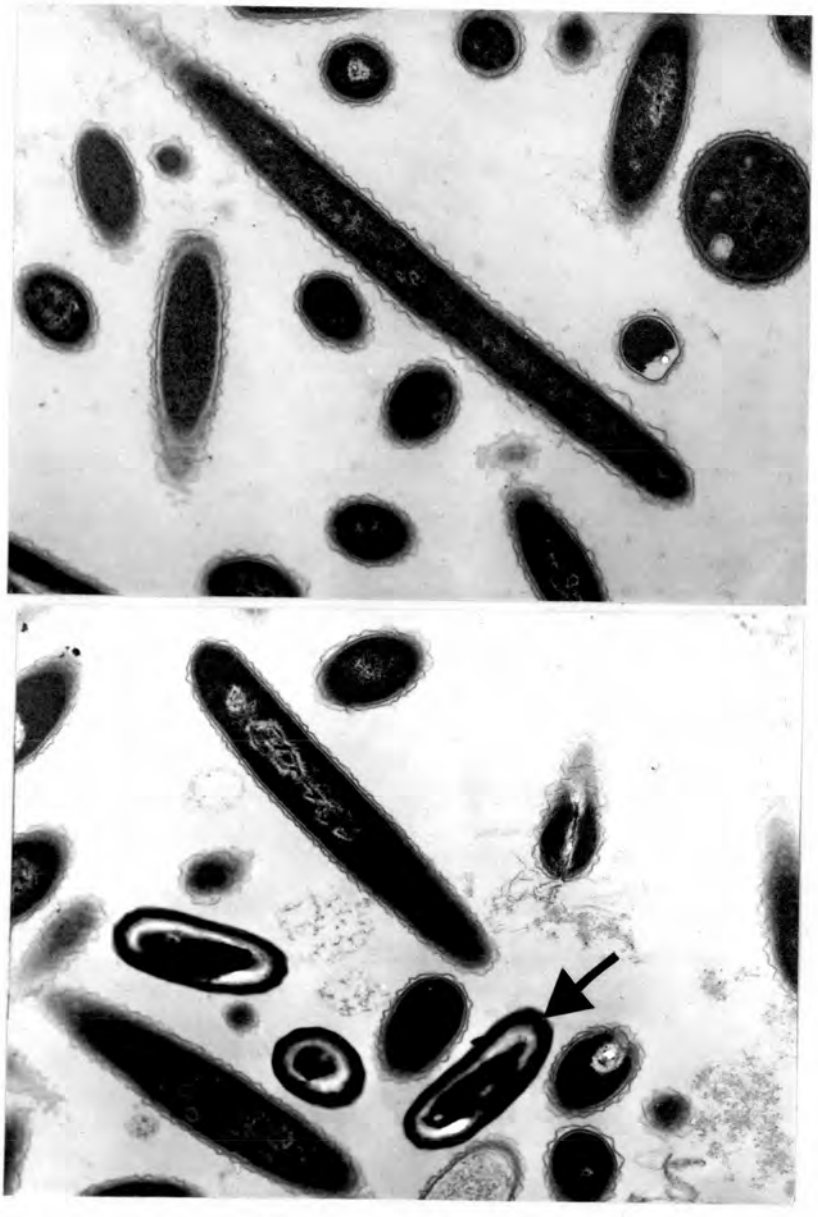
3.11 สภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาโดย CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย UNUN-97

3.11.1 ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase

นำสารละลายเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ที่เตรียมได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ไปวัดแอคติวิตีของ CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing Assay โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลองจาก pH 6 เป็น pH 3-10 (รูปที่ 20A,20B) พบว่า CGTase ที่เตรียมจากสายพันธุ์ตั้งต้นมีช่วงการทำงานกว้างระหว่าง pH 4-10 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 ส่วน Crude CGTase ที่เตรียมจากสายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีช่วงการทำงานระหว่าง pH 4.5-10 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 เช่นเดียวกับสายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนCD-forming activity (รูปที่ 20C) พบว่า Crude CGTase ที่เตรียมจากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายมีช่วงการทำงานกว้างระหว่าง pH 4.5-10 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6-7 และ pH 6-8 ตามลำดับ

3.11.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase

นำสารละลายเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ที่เตรียมได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ไปวัดแอคติวิตีเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing Assay โดยเปลี่ยนสภาวะการทดลองจากอุณหภูมิ 40°ซ เป็นอุณหภูมิ 25-75 °ซ (รูปที่ 21A,21B) พบว่า Crude CGTase ที่เตรียมจากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายมีช่วงการทำงานกว้าง คือ ระหว่าง 40-70 °ซ และทำงานได้ดีที่สุดที่ 60-65°ซ และ 65°ซ ตามลำดับ ในกรณี CD-forming activity (รูปที่ 21C) พบว่า Crude CGTase ที่เตรียมจากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย มีช่วงการทำงานกว้าง ระหว่าง 30-60°ซ และทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30-60°ซ เช่นเดียวกัน

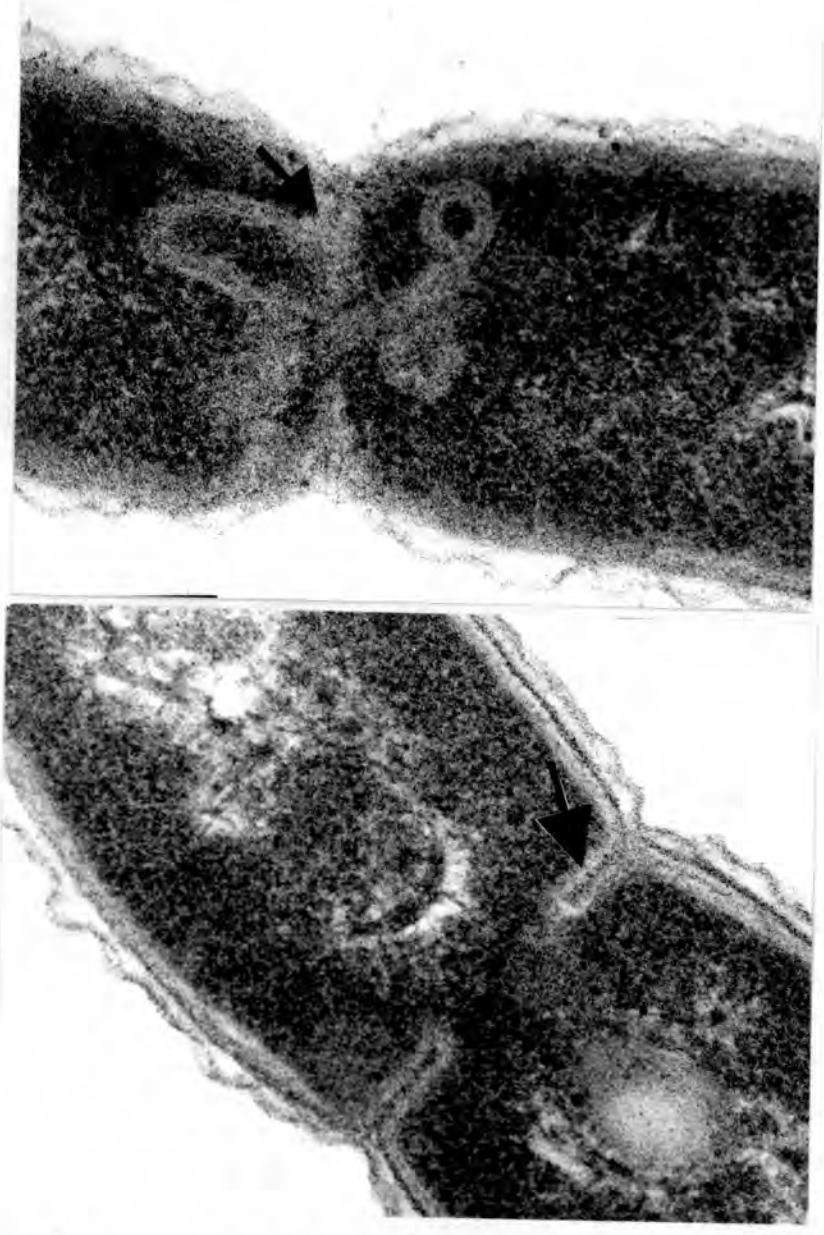


<u>รูปที่ 18</u> ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน Transmission Electron Microscope (TEM) กำลังขยาย 15,000 เท่า

A : สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

B : สายพันธุ์กลาย UNUN-97

ลูกศรชี้ แสดงสปอร์ของเซลล์สายพันธุ์กลาย UNUN-97



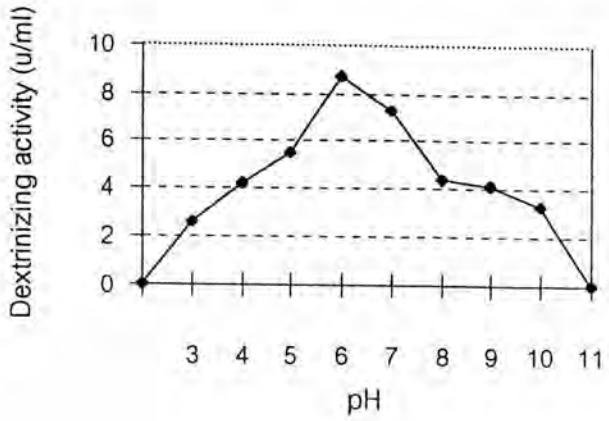
<u>รูปที่ 19</u> ลักษณะเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (TEM) กำลังขยาย 109,500 เท่า

A : สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

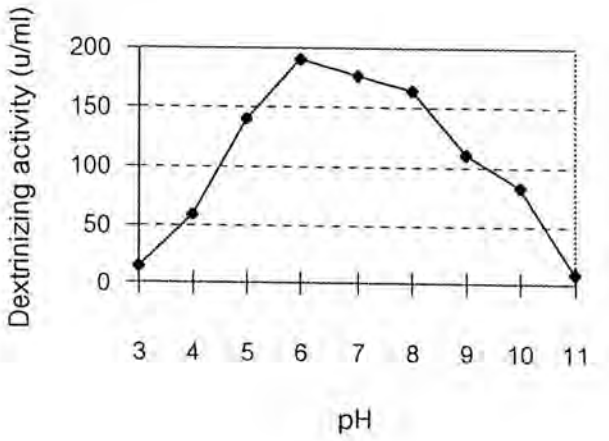
B : สายพันธุ์กลาย UNUN-97

ลูกศร A แสดงการแบ่งเซลล์ของสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11

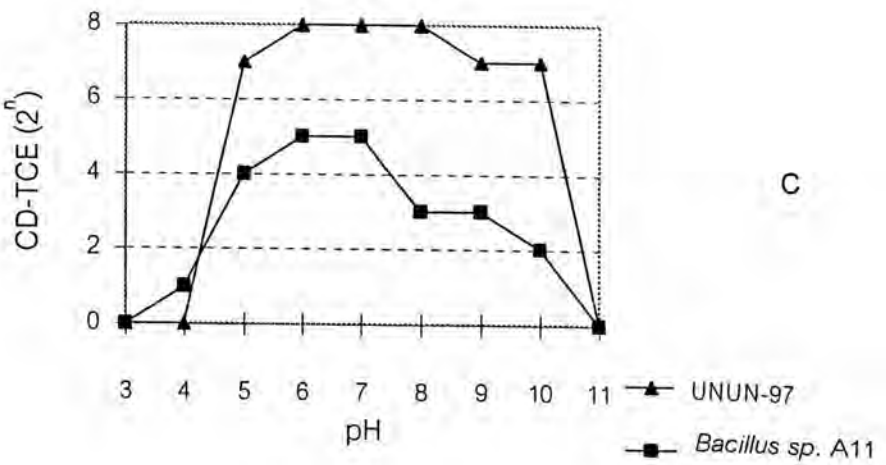
ลูกศร B แสดงการแบ่งเซลล์ของสายพันธุ์กลาย UNUN-97



A



B



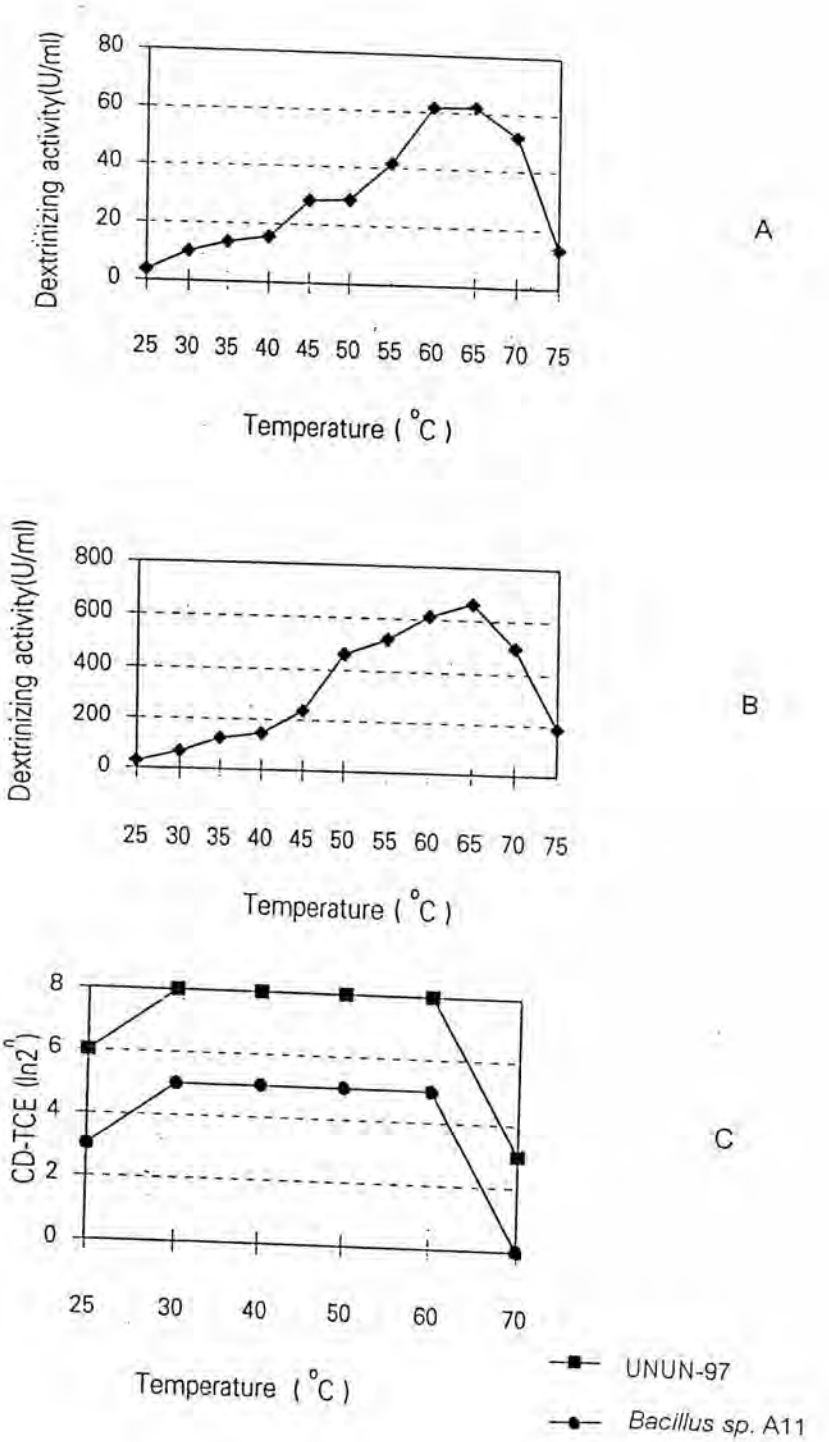
C

<u>รูปที่ 20</u> ภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase

A : Dextrinizing activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11

B : Dextrinizing activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97

C : CD-TCE activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97



รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Crude CGTase

A : Dextrinizing activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11

B : Dextrinizing activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97

C : CD-TCE activity ของ Crude CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97

3.12 การทำสารละลาย CGTase ที่แยกได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำสารละลายเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยนำไปผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4°ซ (รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 2.12) ขั้นตอนสำคัญ คือ การดูดซับด้วยแป้ง การล้างตะกอนด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5 การชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยบัฟเฟอร์เดิมซึ่งมี 0.2 M มอลโตส และการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration พบว่า มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 เท่ากับ 6,466 และ 19,213 Unit / mg protein ตามลำดับ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าเอนไซม์ตั้งต้น 153 เท่าและ 100 เท่า ตามลำดับ

3.13 การเปรียบเทียบ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในด้านความจำเพาะต่อแอนติบอดี

จากการทำอิมมูโนดิฟฟิวชันเพื่อหาความจำเพาะของสารละลายเอนไซม์ ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude enzyme) และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ต่อ anti-CGTase แอนติบอดี พบว่า CGTase จากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีพอเหมาะได้ เส้นตะกอน (precipitin line) ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $1 : 2^5$ เท่ากัน (รูปที่ 22 และ 23)

A

B

<u>รูปที่ 22</u> การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase
โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

A หลุมกลาง C_1 : Crude CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11
(4.3 μg protein)

หลุม 1-6 : anti serum เจือจาง 2^1 - 2^6

B หลุมกลาง C_2 : Crude CGTase ที่แยกได้จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97
(3.5 μg protein)

หลุม 1-6 : anti serum เจือจาง 2^1 - 2^6

<u>รูปที่ 23</u> การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี อิมมูโนดิฟฟิวชัน

A หลุมกลาง C_1 : Partial Purified CGTase ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* A11 (0.1 μg protein)

หลุม 1-6 : anti serum เจือจาง 2^1-2^6

B หลุมกลาง C_2 : Partial Purified CGTase ที่แยกได้จาก UNUN-97 (0.08 μg protein)

หลุม 1-6 : anti serum เจือจาง 2^1-2^6

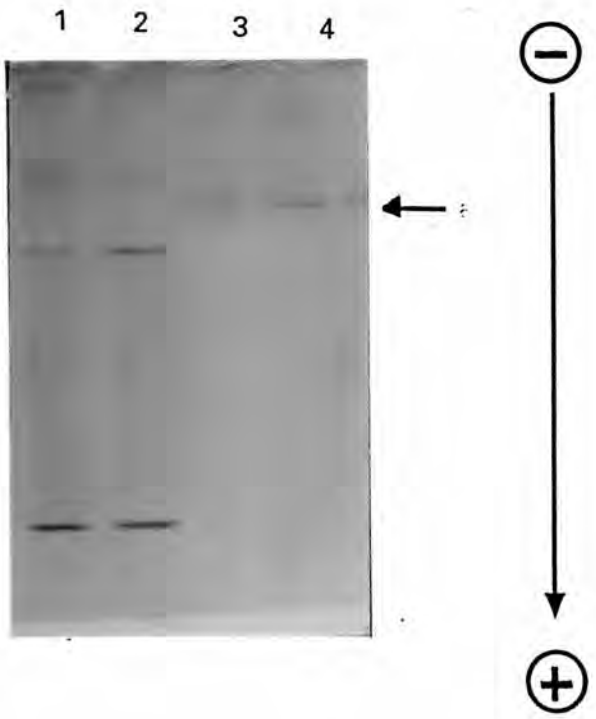
3.14 การเปรียบเทียบเอนไซม์ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

3.14.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ

นำสารละลาย Crude CGTase และสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ติดตามแถบโปรตีนในแผ่นเจล โดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 24 จะเห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 ละสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จะปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ (lane 1 และ lane 2) ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (lane 3 และ lane 4) เหลือโปรตีน 1 แถบ (แถบ CGTase) จากรูปแบบโปรตีน CGTase ของ 2 สายพันธุ์ที่ได้ พบว่าน่าจะไม่มีความแตกต่างกันในด้านประจุสุทธิและขนาดโมเลกุล

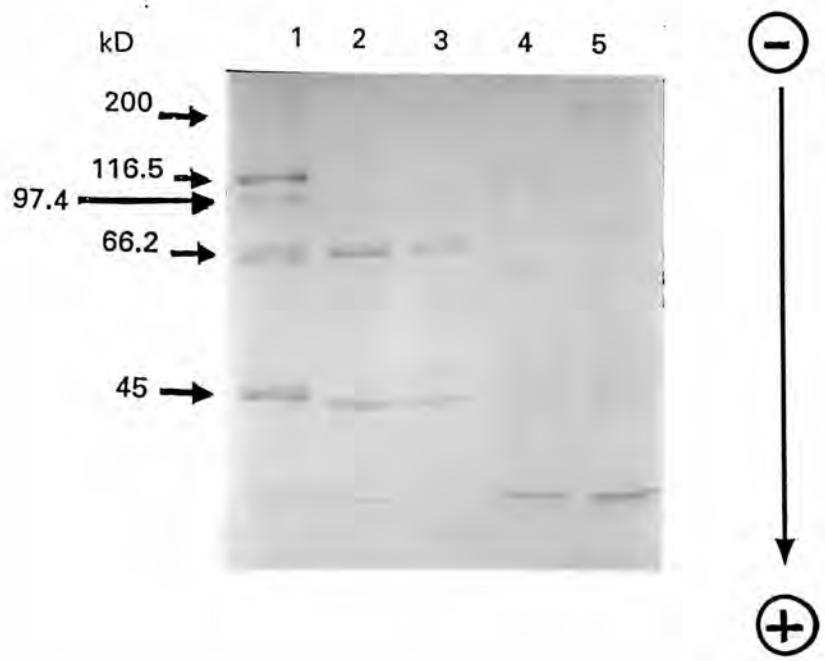
3.14.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

นำสารละลายในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) และสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 และเชื้อสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส ติดตามแถบโปรตีนในแผ่นเจล โดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25 จะเห็นว่าสารละลายส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ (lane 4 และ lane 5) ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปรากฏแถบโปรตีนชัด 2 แถบ (lane 2 และ lane 3) จากการเปรียบเทียบแถบโปรตีนใน lane 2 และ lane 3 กับโปรตีนมาตรฐาน (lane 1) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนนี้ มีค่าประมาณ 70,000 ดาลตัน (แถบนี้คือ CGTase) และ 45,000 ดาลตัน ตามลำดับ ผลที่ได้สรุปได้ว่า CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายไมน่าจะต่างกันในด้านขนาดและรูปร่างโมเลกุล



<u>รูปที่ 24</u> รูปแบบของโปรตีน แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ

1. Crude CGTase ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11	15 ไมโครกรัมโปรตีน
2. Crude CGTase ที่ได้จาก UNUN-97	15 ไมโครกรัมโปรตีน
3. Partially purified CGTase ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11	20 ไมโครกรัมโปรตีน
4. Partially purified CGTase ที่ได้จาก UNUN-97	20 ไมโครกรัมโปรตีน



<u>รูปที่ 25</u> รูปแบบของโปรตีน แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

1. Standard molecular weight protein : myosin(200 kD), β-galactosidase (116.5 kD) , Phosphorylase b (97.4 kD), BSA (66.2 kD) และ Ovalbumin (45 kD) 2 ไมโครกรัมโปรตีน
2. Partially purified CGTase ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 15 ไมโครกรัมโปรตีน
3. Partially purified CGTase ที่ได้จาก UNUN-97 7.5 ไมโครกรัมโปรตีน
4. Crude CGTase ที่ได้จาก *Bacillus sp.* A11 20 ไมโครกรัมโปรตีน
5. Crude CGTase ที่ได้จาก UNUN-97 20 ไมโครกรัมโปรตีน

3.15 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการย่อยแป้งของ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ด้วย HPLC

ในการเปรียบเทียบ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลายในด้านผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ทั้งสอง พบว่าเมื่อนำตะกอนขาวที่ได้จากการทำ CD-TCE Assay มาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าตะกอนขาวที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude enzyme) ของ *Bacillus sp.* A11 และ UNUN-97 ให้ลักษณะของโครมาโตแกรมเป็นพีค (peak) เดียวและมี retention time เท่ากับ 6.28 และ 5.96 นาทีตามลำดับ (รูปที่ 26) ซึ่งมีเวลาใกล้เคียงมากกับ retention time ของ peak ของ standard β-CD ที่มีค่าเท่ากับ 6.08 จากนั้นจึงนำเอาสารละลายตัวอย่างในแต่ละตัวอย่างผสมกับสารละลายมาตรฐาน β-CD ในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) เป็น internal standard พบว่าได้ peak เดียวเหมือนเดิมทั้งคู่ โดยมีพื้นที่ใต้ peak เพิ่มขึ้น และมี retention time เท่ากับ 6.22 และ 5.82 นาที ตามลำดับ แสดงว่าตะกอนขาวที่นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC คือ β-CD และเมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจาก reaction mixture (วิธีทำ ข้อ 2.11.2.2) วิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC พบว่า สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการทำงานของ Crude CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ให้ลักษณะโครมาโตแกรมเป็น 2 peak (รูปที่ 27) โดย peak แรกมี retention time เท่ากับ 5.13 และ 5.05 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีเวลาใกล้เคียงกับ retention time ของ peak ของ Phosphate buffer pH 6.0 ส่วน peak ที่ 2 มี retention time เท่ากับ 6.53 และ 6.61 นาที ตามลำดับ มีเวลาใกล้เคียงกับ retention time ของ peak ของ standard β-CD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.85 นาที มาก ดังนั้น ผลที่ได้ แสดงว่า เอนไซม์ CGTase จากทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกันในด้านการเร่งปฏิกิริยาให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

รูปที่ 26 HPLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน (คอลัมน์ Supelco-NH_2 ตัวชะคือ ตัวทำละลายผสม Acetonitrile:water เท่ากับ75:25 (v/v) อัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที retention time มีหน่วยเป็นนาที)

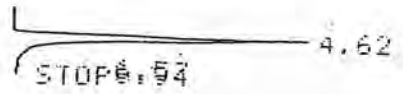
A-C คือ สารละลายมาตรฐาน α- , β- และ γ- CD ตามลำดับ (ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; ฉีด 10 ไมโครลิตร)

D คือ สารละลายของตะกอน CD-TCE ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) จาก *Bacillus sp.* A11 (ฉีด 10 ไมโครลิตร)

E คือ สารละลายของตะกอน CD-TCE ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) จาก *Bacillus sp.* A11 ผสมกับสารละลายมาตรฐาน β-CD ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (ฉีด 20 ไมโครลิตร)

F คือ สารละลายของตะกอน CD-TCE ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97 (ฉีด 10 ไมโครลิตร)

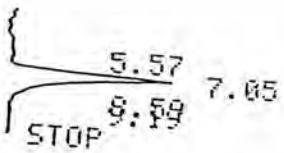
G คือ สารละลายของตะกอน CD-TCE ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ผสมกับสารละลายมาตรฐาน β-CD ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (ฉีด 20 ไมโครลิตร)

A 

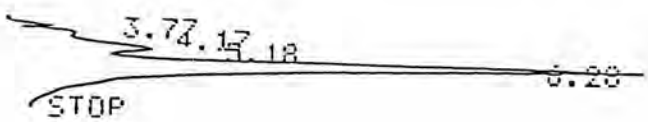
α-CD

B

β-CD

C 

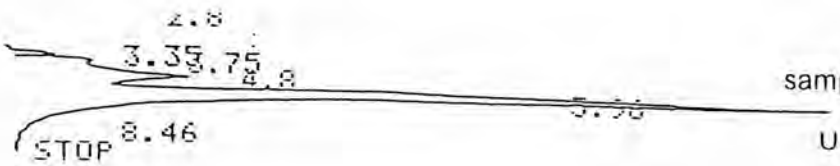
γ-CD

D 

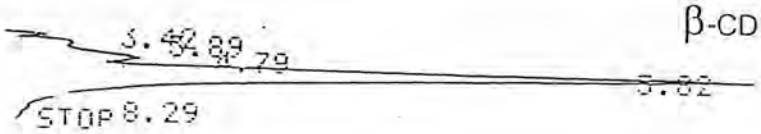
sample from *Bacillus sp.*A11

E

β-CD + sample from *Bacillus sp.*A11

F 

sample from UNUN-97

G 

β-CD + sample from UNUN-97

รูปที่ 27 HPLC โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน (คอลัมน์ Supelco-NH2 ตัวชะคือ ตัวทำละลายผสม Acetonitrile : Water เท่ากับ 75: 25 (v/v) อัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที retention time มีหน่วยเป็นนาที)

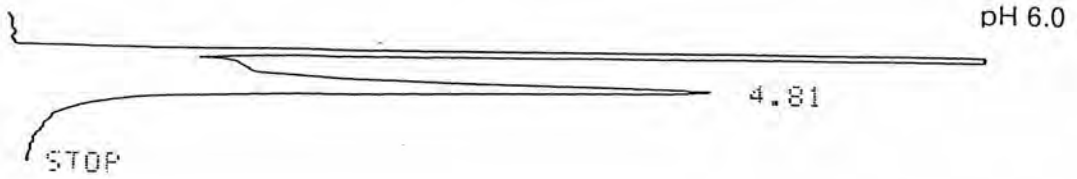
A คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0
(ฉีด 20 ไมโครลิตร)

B คือ สารละลายมาตรฐาน β-CD (ละลายในน้ำกลั่น)
(ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ; ฉีด 10 ไมโครลิตร)

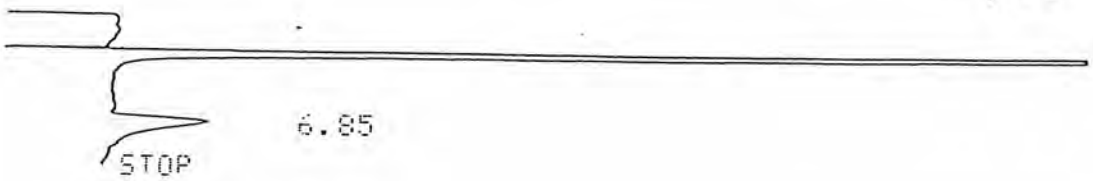
C คือ ผลิตภัณฑ์จาก reaction mixture ที่เร่งปฏิกิริยาโดย Crude CGTase จากสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 (ฉีด 5 ไมโครลิตร)

D คือ ผลิตภัณฑ์จาก reaction mixture ที่เร่งปฏิกิริยาโดย Crude CGTase จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97 (ฉีด 5 ไมโครลิตร)

A

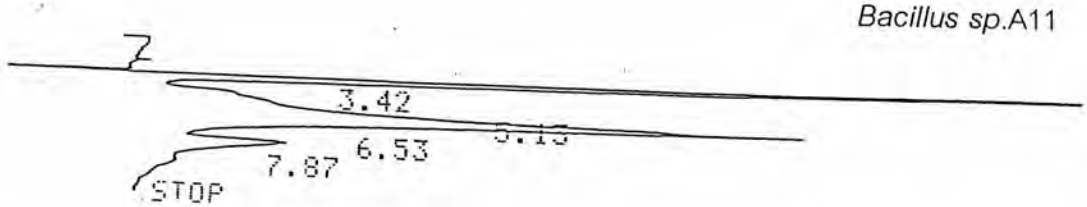


B



C

reaction mixture from *Bacillus sp.*A11



D

reaction mixture from UNUN-97