# บทที่ 4
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

## การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต สารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

จากงานวิจัยของกลุ่มในภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ศึกษาการผลิต CGTase โดยสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 และเพิ่มประสิทธิภาพเพื่อให้การผลิตสูงขึ้นโดย อุไรวรรณ ( 2536 ) ซึ่งรายงานการปรับปรุงสภาวะการผลิตระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร สามารถผลิต CGTase ได้ Dextrinizing activity สูงสุด 136 U/ml และได้แอคติวิตี CD-TCE เท่ากับ $1:2^{10}$ dilution limit รวมถึงการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรม รายงานโดย สุรศักดิ์ (2536) ซึ่งทำการโคลน CGTase gene จาก *Bacillus sp.*A11 เข้าไปใน *Escherichia coli* ได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่สร้างขึ้นใหม่ชื่อว่า SV5 พบว่ามี Amylolytic activity เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วยวิธี CD-TCE assay พบว่าให้ตะกอน CD-TCE complex เท่ากับ $1:2^{1}$ dilution limit และได้ยืนยันผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเทคนิค HPLC แต่แอคติวิตีที่ทรานสฟอร์แมนท์ผลิตยังต่ำกว่าที่สายพันธุ์ตั้งต้นผลิตได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอีกวิธีหนึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิต CGTase คือวิธีการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG พร้อมทั้งศึกษาลักษณะสมบัติของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นิยมใช้เป็นวิธีแรกในการปรับปรุงสายพันธุ์ (strain development) หลังจากได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตตามต้องการแล้ว สามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ 2-3 ครั้ง โดยใช้สลับกับสารเคมีชักนำตัวอื่น ๆ เช่น NTG เป็นต้น(Calam,1970 : Sikyts,1983 ) โดยทั่วไปใช้หลอด mercury vapor มีอัตราการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 2537 $A^{\circ}$ (253.7 nm) การทดลองในงานวิจัยนี้ใช้หลอดแสงอัลตราไวโอเลตปล่อยความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร กำลังงาน 15 วัตต์

ความเข้มข้นของเซลล์ที่นำมากลายพันธุ์ที่เหมาะสมประมาณ $1x10^{7}$ - $1x10^{8}$ เซลล์ต่อมล. โดยต้องนับเซลล์ก่อนการฉายแสง UV วิธีที่ใช้ในการนับเซลล์มีหลายวิธี เช่นใช้ microscope counts, turbidity, colony - forming units และ electronic cell counts เป็นต้น (Suzuki และคณะ ,1989 ) งานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี colony forming unit โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์กระจายบนผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วเลี้ยงจนเจริญ นับเซลล์ที่เจริญได้ ซึ่งเมื่อหาความสัมพันธ์

ระหว่างความขุ่นของสารละลายเซลล์ ($A_{420}$) กับจำนวนโคโลนีเป็นเซลล์ต่อมล. ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาคผนวกที่ 5 โดยพบว่าจำนวนเซลล์ $6.7x10^7$ เซลล์ต่อมล. ให้ค่าความขุ่นของสารละลายประมาณ 0.7 หน่วย

การรักษาระยะห่างระหว่างแหล่งแสง UV กับเซลล์ควรมีระยะอย่างน้อย 20 ซม. ขึ้นไป (Fantini , 1975) เนื่องจากถ้าใกล้แหล่งแสงมาก ความร้อนจากแหล่งแสงจะมีส่วนทำให้เซลล์อ่อนแอ ทำให้เปอร์เซนต์รอดของเซลล์มีความผิดพลาดได้ ระหว่างการฉายแสง UV ต้องมีการกวนสารละลายเซลล์ โดยใช้ Magnetic stirrer หรือหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารละลายเซลล์ เพื่อให้แสง UV ส่องผ่านทั่วถึงทุกเซลล์ การควบคุมระยะเวลาการฉายแสง UV จะไม่ใช้วิธีปิด-เปิดไฟจากหลอดแสง UV แต่ใช้การปิด-เปิดจานใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารละลายเซลล์ ซึ่งแสง UV จะไม่สามารถทะลุผ่านฝาแก้วหรือพลาสติกในระยะเวลาสั้น ๆ ที่ทำการกลายพันธุ์ (Fantini, 1975 : Sikyts, 1983) การทดลองใช้ช่วงเวลาการฉายแสง 5-120 วินาที แล้วทำการกระจายเซลล์ที่ผ่านการฉายแสง UV บนอาหารแข็ง Horikoshi ที่อุณหภูมิ 37°ซ เก็บในที่มืดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปรากฏการณ์ photoreactivation ซึ่งถ้าให้เซลล์ที่กลายพันธุ์แล้วได้รับ visible light (แสงช่วงความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร ) เซลล์สามารถกลับมาเป็นสภาพปกติได้ (Marrell, 1975 : Boyd, 1988) ผลการทดลอง (ตารางที่ 5) ได้เปอร์เซนต์รอดของเซลล์อยู่ในช่วง 0-100 % ซึ่งเปอร์เซนต์รอดที่เชื่อว่าจะพบสายพันธุ์กลายได้มาก อยู่ในช่วงที่มีเปอร์เซนต์รอดระหว่าง 0.01-1.00% (Baltz, 1986 : Sikyts,1983 : Hopwood,1970) การทดลองพบว่าที่ระยะเวลาการฉายแสง 80 วินาที จะได้ 0.12 เปอร์เซนต์การอยู่รอดและได้จำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์สูงสุด (ตารางที่ 5 ) จึงใช้เวลานี้ทำการกลายพันธุ์ต่อไป

หลังจากทำการกลายพันธุ์แบคทีเรียแล้ว จะนำเซลล์ที่รอดชีวิตมาทดสอบหาสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ เทคนิคการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสำคัญอย่างยิ่ง จะต้องเป็นวิธีที่เฉพาะต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และสามารถหาสารที่ต้องการจะคัดเลือกจากจุลินทรีย์ได้ วิธีที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลายมีหลายวิธี เช่น การคัดเลือกแบบสุ่ม (random screening) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโคโลนี ( colony morphology ) การเปลี่ยนแปลงสีโคโลนี ( changes in pigment/ colony color) เป็นต้น งานวิจัยนี้เริ่มการคัดเลือกแบบสุ่ม ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและนักวิจัยส่วนมากใช้ทดสอบหาจำนวนโคโลนีที่ ได้จากการกลายพันธ์ (Fantini, 1975) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านสารก่อการกลายพันธุ์บนอาหารแข็ง Horikoshi ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิต CGTase ( Horikoshi ,1971) ผลการทดลองพบว่าในจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีโคโลนีขนาดใหญ่บ้างเล็กบ้างปะปนกัน ทำ

การสุ่มคัดเลือก สายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญได้ดี มีโคโลนีขนาดใหญ่ จากนั้นคัดเลือกด้วยวิธีที่เฉพาะขึ้นโดยใช้เทคนิค point inoculation ตรวจสอบหาสายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น การคัดเลือกขั้นต่อไปทำโดยการนำไปเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ตรวจสอบสารที่ต้องการ คือ CGTase ด้วยวิธี CD-TCE Assay และวิธี Dextrinizing activity Assay ( Nakamura และ Horikoshi , 1975 ) ซึ่งวิธี Dextrinizing activity assay เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะต่อ CGTase เนื่องจากเอนไซม์หลายชนิด เช่น amylase และ amylolytic enzyme อื่นสามารถไฮโดรไลซ์พันธะ $\alpha$-1,4-glycosidic เช่นเดียวกัน จึงต้องวัดโดยวิธี CD-TCE Assay ซึ่งเป็นวิธีที่จำเพาะขึ้นเนื่องจากเป็นการตรวจวัดไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นโดยตรง แต่ต้องใช้เวลานานประมาณ 48 ชั่วโมง และตะกอนที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากสารอื่นที่ไม่ใช่ไซโคลเดกซ์ทรินก็ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบตะกอนที่เกิดขึ้นด้วย อาจใช้วิธี TLC หรือ HPLC จากการทดลอง ใช้วิธี HPLC ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและจากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

จากการใช้ Clear zone ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิและตรวจหา CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing activity และวิธี CD-TCE assay ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นทุติยภูมิ พบว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาสายพันธุ์กลายที่ผลิต CGTase ได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นตามต้องการ และเมื่อหาความสัมพันธ์ของวิธีการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ โดยอ้างอิงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r ) พบว่าจากตารางที่ 3 และ 4 เมื่อกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG แล้วคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายโดยสุ่มมาวิธีละ 50 โคโลนี นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ พบว่า ให้ค่า r = 0.80 และ 0.83 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าวิธีการทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กันและเป็นความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน (Kleinbaum และ Kupper,1978) ดังนั้นวิธีการคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิจึงเป็นวิธีที่เหมาะสม Dhwale (1982) ได้รายงานว่าขนาดของ starch clearing zone เมื่อเจริญ *S. alluvius* บนอาหารแข็ง และแอคติวิตี amylolytic เมื่อเจริญเชื้อในอาหารเหลว มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ไปในทางเดียวกันเมื่อ plot กราฟระหว่างค่า clear zone และ แอคติวิตี amylolytic และในปี ค.ศ. 1990 Horn และคณะ เพาะเลี้ยง *Schwaniomyces occidentalis* เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ได้ทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง starch clearing zone และแอคติวิตี amylolytic โดย plot กราฟระหว่างค่าทั้งสอง พบว่ามีความสัมพันธ์ถึง 98% correlation นอกจากนี้ยังรายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า clear zone และแอคติวิตี amylolytic นี้มีข้อจำกัด คือสามารถใช้กับ species เดียวกันเท่านั้น

จากผลการทดลองด้วยการฉายแสง UV เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยวิธีปฐมภูมิและวิธีทุติยภูมิ ได้สายพันธุ์กลาย U-86 ให้ Dextrinizing activity 76.4 Unit/ml ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นมีแอคติวิตี 33.7 Unit/ml และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE Assay พบว่า สายพันธุ์กลาย U-86 มีแอคติวิตีเท่ากับ $1:2^6$ เท่ากับแอคติวิตีสายพันธุ์ตั้งต้น

โดยทั่วไปการปรับปรุงสายพันธุ์ จะไม่ใช้สารก่อการกลายพันธุ์หรือ ใช้วิธีทางกายภาพหรือเคมีเพียงอย่างเดียว เนื่องจากประสิทธิภาพของสารก่อการกลายพันธุ์แต่ละชนิดมีน้อย ทำปฏิกิริยาแบบสุ่ม และการปรับปรุงสายพันธุ์จะประสบความสำเร็จมากกว่า หากใช้สารก่อกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่งชนิด (Fantini, 1975) งานวิจัยนี้จึงทำการกลายพันธุ์ต่อไปด้วยการใช้สารเคมี NTG

ปัจจัยแรกที่ควรคำนึงถึงในการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยสารเคมี NTG คือ ระยะและสภาพการเจริญของเซลล์ที่นำมาใช้ในการกลายพันธ์ (Fantini, 1975) พบว่า เมื่อ NTG เข้าจับกับเซลล์ NTG จะให้หมู่อัลคิล ($CH_3$) 1 หมู่แก่เบสเพียวรีนที่บริเวณ replication fork ของดีเอนเอที่กำลังจำลองตัวทันที ดังนั้นในการชักนำเซลล์ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำเซลล์ที่นำมาใช้ควรอยู่ในช่วง log phase (Fantini, 1975) จากการทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว Horikoshi เป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัวเต็มที่ ในช่วง log phase ของการเจริญนำมาทำการกลายพันธุ์ โดยนำเซลล์มาละลายใน 0.85% NaCl เพื่อให้เซลล์ยังคงสภาพ ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมล. สำหรับการเตรียม stock สารละลาย NTG สำหรับนำมาเติมในสารละลายเซลล์ควรเตรียมใหม่ๆ ก่อนใช้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนเวลาอันสมควร เนื่องจาก NTG มีความสามารถละลายได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และมีการแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น diazomethane ($CH_2N_2$) ซึ่งเป็น strong methylating agent แล้วเข้าจับกับเซลล์อย่างรวดเร็ว (Calam, 1970 : Hopwood, 1970 : Fantini, 1975) การทดลองจึงใช้ NTG ละลายในทรีส-กรดมาลิอิกบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ในการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG พบว่าโดยทั่วไปเวลาที่ NTG สามารถเข้าจับกับเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ใช้เวลาประมาณ 15 นาที ( Hopwood, 1970 : Adelberg, 1965) หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ NTG โดยการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับรายงานของ Hopwood (1970) และ Fantini (1975) นำสารละลายเซลล์มาเจือจางให้พอเหมาะ กระจายลงบนอาหารแข็ง Horikoshi บ่มที่ 37°ซ นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต คำนวณเปอร์เซนต์รอดชีวิต ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซนต์รอดเป็นไปตามสัดส่วนกับความเข้มข้น NTG ที่ใช้ คือ ความเข้มข้นมาก เปอร์เซนต์รอดยิ่งต่ำลง โดยการหาความเข้มข้น NTG ที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์มีความจำเพาะแต่ละสายพันธุ์ ควรทำการทดลองหาก่อนทำการกลายพันธุ์ (Fantini, 1975) เช่น

Sanchez และ Olmedo (1975) พบว่าสำหรับ *E.Coli* ความเข้มข้น NTG 0.1 μg/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทำการกลายพันธุ์ และ Zimmerman และคณะ (1965) กลายพันธุ์เชื้อ *Haemophilus influenzae* ใช้ความเข้มข้น NTG 30 μg/ml ในการกลายพันธุ์ และ Delic และคณะ (1970) ทำการกลายพันธุ์ *Streptomyces coelicolor* โดยใช้ความเข้มข้น NTG สุดท้ายเป็น 1.0 mg/ml และ จันทิมา ( 2539 ) ใช้ความเข้มข้น NTG 5-100 μg/ml กลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25

เปอร์เซนต์รอดที่ได้จากการกลายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารเคมี NTG ซึ่งทำให้มีโอกาสพบสายพันธุ์กลายได้มากอยู่ในช่วง 0-50 เปอร์เซนต์ (Mendell, 1960 : Calam, 1970 : Hopwood, 1970) การทดลองนี้จึงได้นำเซลล์ที่มีเปอร์เซนต์รอดในช่วง 0-50 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ถูกเติมสาร NTG ความเข้มข้น 5-100 μg/ml (ตารางที่ 7) มาคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายด้วยวิธีปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

จากการทดลองเมื่อชักนำให้เซลล์ *Bacillus sp.* A11 กลายพันธุ์ด้วยแสง UV สลับกับการใช้สารเคมี NTG แล้วพบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิต CGTase สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นได้ โดยพบว่า *Bacillus sp.* A11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นมีประสิทธิภาพในการผลิต CGTase เมื่อวัดด้วยวิธี Dextrinizing activity เท่ากับ 33.7 U/ml และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE assay มีแอคติวิตี 1:$2^6$ dilution limit เชื้อสายพันธุ์กลาย U-86 ซึ่งคัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้นด้วยแสง UV เป็นเวลา 80 วินาที มีประสิทธิภาพในการผลิต CGTase เมื่อวัดด้วยวิธี Dextrinizing activity เท่ากับ 76.3 U/ml มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.2 เท่า และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE assay มีแอคติวิตีเท่ากับ 1: $2^6$ dilution limit เมื่อเก็บสายพันธุ์กลาย U-86 ไว้ในอาหารแข็ง Medium I ในหลอด ที่ 4 °ซ 15 วัน พบว่า Dextrinizing activity ลดลงเหลือ 58.0 U/ml ในขณะที่ CD-TCE activity ไม่ลดลง จากนั้นนำสายพันธุ์ U-86 ไปทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ที่มีความเข้มข้นในช่วง 5-100 μg/ml ได้สายพันธุ์กลาย UN-317 เมื่อวัด Dextrinizing activity เท่ากับ 75.9 U/ml (มากกว่าสายพันธุ์กลาย U-86 30.9 เปอร์เซนต์) และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE assay มีแอคติวิตีเท่ากับ 1:$2^8$ dilution limit (มากกว่า U-86 เป็น $2^2$ เท่า) เมื่อเก็บสายพันธุ์กลาย UN-317 ไว้ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 วัน พบว่า Dextrinizing activity ของสายพันธุ์กลาย UN-317 ลดลงเหลือ 43.2 U/ml และ CD-TCE activity ก็ลดลงเหลือ 1:$2^7$ dilution limit ด้วย จากนั้นชักนำสายพันธุ์ UN-317 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสง UV อีกครั้งเป็นเวลา 60 วินาที ได้สายพันธุ์กลาย UNU-178 ที่มี

ประสิทธิภาพในการผลิต CGTase เมื่อวัดด้วยวิธี Dextrinizing activity เท่ากับ 62.8 U/ml (มากกว่าสายพันธุ์ UN-317 45.4 เปอร์เซนต์) และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE assay มีแอคติวิตีเท่ากับ $1:2^8$ dilution limit (มากกว่า UN-317 เป็น $2^1$ เท่า) จากนั้นเก็บสายพันธุ์กลาย UNU-178 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 วัน พบว่า Dextrinizing activity ลดลงเหลือ 58.6 U/ml และ CD-TCE activity ลดลงเหลือ $1:2^7$ dilution limit จากนั้นชักนำสายพันธุ์ UNU-178 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG อีกครั้ง ที่ความเข้มข้นในช่วง 5-70 μg/ml ได้สายพันธุ์กลาย UNUN-97 ประสิทธิภาพในการผลิต CGTase สูงสุดเมื่อวัดด้วยวิธี Dextrinizing activity เท่ากับ 89.2 U/ml (สูงกว่าสายพันธุ์กลาย UNU-178 52.2 เปอร์เซนต์) และ เมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE assay มีแอคติวิตีเท่ากับ $1:2^8$ dilution limit (สูงกว่า UNU-178 เท่ากับ $2^1$ เท่า) สายพันธุ์กลาย UNUN-97 ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ 4 ครั้ง โดยใช้แสง UV สลับกับสารเคมี NTG นี้มี Dextrinizing activity มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 เท่ากับ 164.7 เปอร์เซนต์ และ CD-TCE activity มากกว่า $2^2$ เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลายมีความเสถียรน้อย สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้โดยระบบการซ่อมแซมของเซลล์ จึงต้องทำการกลายพันธุ์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสหลายจุด การจำลองแบบ DNA สายใหม่ (daughter strand DNA) ไม่สามารถจดจำสาย DNA แบบเดิมได้ การซ่อมแซมเบสผิดไปจากเดิม เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้เชื้อมีความเสถียรมากขึ้น

จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( r ) ระหว่างการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิของการกลายพันธุ์ทุกครั้ง ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 6,8,10 และ 12 พบว่าได้ค่า r เท่ากับ 0.75, 0.80, 0.77 และ 0.75 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ทุกครั้งที่ทำการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลาย เมื่อวัด Clear zone แล้ว ก่อนคัดเลือกขั้นทุติยภูมิได้ทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว Horikoshi แล้วเก็บเกี่ยวสารละลายเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยเปรียบเทียบ Dextrinizing activity เป็น U / ml ถึงแม้ไม่ได้แสดงการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เป็น U / mg protein แต่ได้มีการควบคุมปริมาณเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงให้เท่ากันทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายโดยวัดความขุ่นของเซลล์ในอาหาร Medium I ให้มีค่า $A_{420}$ ประมาณ 0.3-0.4 แล้วจึงนำสารละลายเซลล์ไปถ่ายลงในอาหารเหลว Horikoshi โดยทำ 1% transfer ทั้งนี้หากเซลล์เจริญในอาหารเหลว Horikoshi ได้ดีไม่เท่ากัน การเปรียบเทียบเอนไซม์แอคติวิตีโดยใช้ค่า U / ml อาจทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาด อย่างไรก็ดี สำหรับสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุด คือ UNUN-97 สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 13) และ จากตารางที่ 6,8,10 และ 12 พบว่าค่า CD-TCE activity ที่วัดได้จากสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้ง

ต้นไม่มีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการวัด CD-TCE activity รวมทั้ง Dextrinizing activity คือที่ pH 6 และ อุณหภูมิ 40 °ซ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้น หากทำการวัดที่สภาวะเหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์กลายซึ่งอาจต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น คงจะได้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกันมากกว่านี้

ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายทุกขั้นตอนในการทดลองนี้ คัดเลือกสายพันธุ์กลาย ที่มีทั้ง Clear zone , Dextrinizing activity และ CD-TCE activity สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากการศึกษาของ Kimura และคณะ (1989) พบว่าส่วนปลาย N - terminal ของเอนไซม์ CGTase จะทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ α-amylase ขณะที่ส่วนควบคุมการเกิดวงแหวนไซโคลเดกซ์ทรินอยู่บริเวณส่วน C-terminal ของเอนไซม์ แสดงว่า สายพันธุ์กลายที่มีทั้ง Dextrinizing activity และ CD-TCE activity สูงกว่าสายพันธุ์เดิมนั้น มีการเปลี่ยนลำดับเบสในทั้ง 2 บริเวณที่ควบคุมแอคติวิตีดังกล่าว ของเอนไซม์ CGTase อย่างไรก็ดี จากผลที่ได้พบว่า มีบางสายพันธุ์ที่มี Dextrinizing activity ต่ำกว่า แต่ CD-TCE activity เท่ากับสายพันธุ์เดิมด้วย (เช่น สายพันธุ์ UNU-319 ในตารางที่ 10 และ สายพันธุ์ UNUN-100 และสายพันธุ์ UNUN-502 ในตารางที่ 11) ซึ่งสายพันธุ์กลายเหล่านี้ อาจมีการกลายพันธุ์ในเฉพาะส่วน N - terminal และมี บางสายพันธุ์มี Dextrinizing activity สูง แต่ CD-TCE ต่ำ เช่นสายพันธุ์ UN-546 (ตารางที่ 8) เป็นต้น

นอกจากนี้จากการทดลอง พบว่าสายพันธุ์กลาย UNUN- 97,UNUN-125, UNUN-183 และ UNUN-192 ให้ Dextrinizing activity เท่ากับ 89.2,80.8,75.9 และ 72.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อวัดด้วยวิธี CD-TCE Assay พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ $2^6$ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน จึงทำการเก็บเชื้อสายพันธุ์กลายไว้ 4 สายพันธุ์เพื่อทำการทดสอบความเสถียรของเชื้อสายพันธุ์กลายต่อไป

## การเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ การเจริญและความเสถียรของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น

เมื่อศึกษารูปแบบการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97, UNUN-125, UNUN-183 และ UNUN-192 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มี lag phase อยู่ในช่วง 0-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเริ่มมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงไป 72 ชั่วโมง ในอาหารเหลว Horikoshi สำหรับ *Bacillus sp.* A11 และสาย

พันธุ์กลาย UNUN-183 จะคงที่ต่อไปถึงชั่วโมงที่ 96 การเจริญก็จะลดลง ส่วนสายพันธุ์กลายอีก 3 สายพันธุ์การเจริญจะลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 72

รูปแบบการเจริญของ *Bacillus sp.* A11 วัลยา (2534) ได้รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus sp.* A11 ในอาหารเหลว Medium I ในขวดเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ สามารถเจริญเข้าสู่ระยะสูงสุด (Stationary phase)เมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในปี 2536 อุไรวรรณ ได้ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Bacillus sp.*A11 ในอาหารเหลว Horikoshi ในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเข้าสู่ระยะสูงสุดเมื่อเวลา 54 ชั่วโมงและ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการที่สายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 ในการทดลองมีการเจริญเข้าสู่ระยะสูงสุด ช้ากว่าที่ อุไรวรรณ (2536) เพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า 18 ชั่วโมง ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากปริมาตรที่เลี้ยงต่างกัน โดยอุไรวรรณเลี้ยง 40 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในขณะที่การทดลองเลี้ยง 200 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงต่อขนาดของขวดชมพู่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยอากาศที่เชื้อได้รับจากการเลี้ยงของอุไรวรรณมีปริมาณมากกว่า เชื้อเจริญเร็วกว่า หรืออาจเป็นไปได้ที่ *Bacillus sp.* A11 มีการ subculture หลาย ๆ ครั้ง ทำให้ประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์ช้าลง

เมื่อทดสอบคุณสมบัติคงทนของสายพันธุ์กลาย พบว่า เมื่อเก็บเชื้อไว้ที่ -20 °ซ เป็นเวลา 60 วัน (ตารางที่ 16) เปอร์เซนต์ของ Dextrinizing activity ที่ลดลงของสายพันธุ์ตั้งต้นเท่ากับ 3.4% ส่วนสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ลดลง 6.8% และสายพันธุ์กลาย UNUN-192 ลดลง 3.6% ซึ่งลดลงน้อยที่สุด และการลดลงของ CD-TCE ของสายพันธุ์กลาย UNUN-192 ลดลงเมื่อเก็บเชื้อไว้ 45 วันในขณะที่สายพันธุ์กลาย UNUN-97 เมื่อเก็บเชื้อไว้ 60 วัน CD-TCE จึงลดลงในสัดส่วนเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีความคงทนมากที่สุด ในการรักษาประสิทธิภาพการผลิต CGTase ที่แน่นอน ในปริมาณสูงและสม่ำเสมอ ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม เป็นระยะเวลา 60 วัน และจากการที่แอคติวิตี CGTase ของสายพันธุ์ตั้งต้นลดลงมาก ถึงแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงในสภาะที่เหมาะสมกับการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้น อาจเนื่องจากสายพันธุ์ตั้งต้นถูกนำมาใช้ศึกษาการผลิต CGTase เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน ประมาณ 10 ปี มีการ subculture หลาย ๆ ครั้ง ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเพื่อให้เซลล์มีสมบัติคงที่ ควรมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่เหมาะสม เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากเชื้อขึ้นอยู่กับคุณสมบัติด้านพันธุกรรมของเซลล์โดยตรง การควบคุมสิ่งแวดล้อมในการผลิตเพียงแต่ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตสารได้มากที่สุดเท่าที่พันธุกรรมของเซลล์สามารถอำนวยให้ได้ ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อให้มีคุณสมบัติคงที่จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จากผลการทดลอง เมื่อสังเกตด้วยสายตาเปล่า พบว่าลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ทั้ง 2 ไม่มีความแตกต่างกันโดยโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ขุ่น ทึบแสง มีผิวมัน การเจริญกระจายเป็นจุด ๆ มีขอบเรียบเป็นเมือก ขนาดไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 16) แต่เมื่อส่องดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (รูปที่ 17) พบว่าเซลล์สายพันธุ์กลายต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้น คือมีเซลล์ขนาดแตกต่างกันปะปน บางเซลล์มีขนาดกว้างกว่าเดิมจนเห็นได้ชัด ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งขนาดไม่แตกต่างกัน และเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (รูปที่ 18-19) พบว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งรียาว ในขณะที่สายพันธุ์กลาย UNUN-97 อัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของแท่งเซลล์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่ง Rapers และ Holt (1984) รายงานว่า การกลายพันธุ์เป็นการชักนำให้พันธุกรรมหรือดีเอนเอเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม ดีเอนเอส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอาจมีหรือไม่มีผลต่อการผลิตสารที่ต้องการ แต่การที่ลักษณะภายนอกของเซลล์มีความแตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น เป็นหลักฐานหนึ่งที่แสดงให้ทราบว่าพันธุกรรมบางส่วนของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อการเจริญเป็นรูปร่างของเซลล์ และจากการสังเกตุลักษณะเซลล์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 (รูปที่ 18) และผลการเจริญของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธ์กลาย (รูปที่ 13) วิเคราะห์ได้ว่าสายพันธุ์กลาย UNUN-97 น่าจะสร้างสปอร์ได้เร็วกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น คือเริ่มสร้างหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร Horikoshi เป็นเวลา 3 วัน

**การวิเคราะห์เปรียบเทียบ CGTase และผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน**

จากการเปรียบเทียบภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 (รูปที่ 20) พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในช่วง pH 6-7 เหมือนกัน และที่ pH 8 เอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์กลายมีความเสถียรกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น จากรายงานของอุไรวรรณ (2536) พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 มีความเสถียรดีที่ pH 7-9

จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Horikoshi พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นมี Dextrinizing activity สูงสุดที่ 60 °ซ (รูปที่ 21) และเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์กลาย UNUN-97 มี Dextrinizing activity สูงสุดที่ 65 °ซ ในขณะที่ CD-forming activity

ของเอนไซม์ทั้งสอง ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-60 °ซ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 จะลดลงอย่างรวดเร็ว จากรายงานของวัลยา (2534) พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Medium II มี Dextrinizing activity สูงสุดที่ 60 °ซ แต่แอคติวิตีของ CD-forming activity ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40-50 °ซ ความแตกต่างที่ได้จากผลการทดลอง น่าจะเนื่องมาจากความแตกต่างของส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เนื่องจากเป็นสูตรอาหารต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้น และจากรูปที่ 20 และรูปที่ 21 วิเคราะห์ได้ว่า ถ้าต้องการให้สายพันธุ์กลาย UNUN-97 ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินให้สูงขึ้น ควรให้เอนไซม์ CGTase เร่งปฏิกิริยาที่ pH 9 และอุณหภูมิ 30 °ซ ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์ CGTase มีความสามารถในการเกิด cyclization (CD - forming activity) สูง และเกิด dextrinizing activity ไม่มากนัก

จากการเปรียบเทียบ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย ในด้านความจำเพาะต่อแอนติบอดี พบว่า สารละลายในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีพอเหมาะ ได้เส้นตะกอน (precipitin line) ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1 : $2^5$ เท่ากัน แสดงว่า ปริมาณของ CGTase จากทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ผลิตได้น่าจะไม่มีความแตกต่างกัน และรูปแบบของ CGTase จากทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันด้วย สามารถจับกับแอนติบอดีได้อย่างจำเพาะ

จากผลการทดลองได้สายพันธุ์กลาย UNUN-97 ที่มี Dextrinizing activity และ CD-TCE activity สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 2.2 เท่าและ $2^2$ เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณและรูปแบบของ CGTase จากทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของยีนสายพันธุ์ตั้งต้น ได้สายพันธุ์กลายที่มีการสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป โดยเอนไซม์ที่สายพันธุ์กลายสร้างขึ้นอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ active site ทั้งด้าน N-terminal และ C-terminal ทำให้สามารถจับกับสับเสตรทได้ดีขึ้น และเกิดปฏิกิริยา cyclization ได้เร็วขึ้น จึงมีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

จากการเปรียบเทียบเอนไซม์ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ พบว่า สารละลายในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ที่ได้จากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย จะปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ(รูปที่ 24) ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เหลือโปรตีน 1 แถบ จาก

รูปแบบโปรตีน CGTase ของ 2 สายพันธุ์ที่ได้ น่าจะไม่มีความแตกต่างกันในด้านประจุสุทธิและขนาดโมเลกุล และเมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส พบว่า สารละลายในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Crude CGTase) ที่ได้จากทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปรากฏแถบโปรตีน ชัด 2 แถบ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนนี้ มีค่าประมาณ 70,000 ดาลตัน (แถบนี้คือ CGTase) และ 45,000 ดาลตัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของพรชัย (2539) พบว่า CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immunoaffinity มีโปรตีนแถบเดียว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน จากการทดลอง CGTase มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอจึงปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ผลที่ได้สรุปได้ว่า CGTase จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายไม่น่าจะต่างกันในด้านขนาดและรูปร่างโมเลกุล

Pongsawasdi และ Yagisawa (1987) ได้รายงานว่าเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus sp.* A11 จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD และได้ α-CD ในปริมาณน้อย หลังการตกตะกอนผลิตภัณฑ์ด้วย TCE ต่อมาอุไรวรรณ (2536) ได้ทำการวิเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย HPLC โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจาก reaction mixture ของ *Bacillus sp.* A11 หลังการบ่มแป้งกับสับสเตรทโดยไม่ใช้ TCE พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ α-, β- และ γ-CD ในอัตราส่วน 1:5.7:1.3 สำหรับผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินในงานวิจัยนี้ ได้ผลเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์ตั้งต้น *Bacillus sp.* A11 คือให้ β-CD เป็นพีคสำคัญ ไม่ว่าจะเตรียมผลิตภัณฑ์โดยใช้ TCE ตกตะกอนหรือไม่ใช้ และได้ทำการยืนยันโดยการเติม internal standard และเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เตรียมจากตะกอน CD-TCE complex และจาก reaction mixture ของสายพันธุ์กลาย UNUN-97 พบว่าให้ลักษณะโครมาโตแกรมเป็นพีค (peak) ของ β-CD เพียง peak เดียว แสดงว่าสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD เช่นกัน

## สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ใช้เวลาฉายแสง UV 80 วินาที และใช้ความเข้มข้น NTG 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ในการกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสง UV และสารเคมี NTG ค่า Correlation coefficient ของวิธีการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ โดยวิธีวัดค่า clear zone และการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยใช้วิธี Dextrinizing activity มีค่า 0.80 และ 0.83 ตามลำดับ
3. ในการทำกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสง UV สลับกับสารเคมี NTG จำนวน 4 ครั้ง เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีค่า Clear zone , Dextrinizing activity และ CD-TCE activity สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่าได้สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีแอคติวิตี Dextrinizing สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นประมาณ 2.2 เท่า และแอคติวิตี CD-TCE เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้น 4 เท่า
4. สายพันธุ์กลาย UNUN-97 มีการเจริญในอาหารเหลว Horikoshi ในช่วง 3 วันแรกไม่ต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้น
5. หลังการเก็บเชื้อไว้ที่ -20°ซ เป็นเวลา 60 วัน Dextrinizing activity ของสายพันธุ์ตั้งต้นลดลง 36.4% ส่วนสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ลดลง 6.8% ในขณะที่การลดลงของ CD-TCE ของสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อเก็บไว้ 45 วัน แอคติวิตีลดลงด้วยสัดส่วนเท่ากันกับสายพันธุ์กลาย UNUN-97 เมื่อเก็บไว้ 60 วัน
6. ลักษณะรูปร่างโคโลนีสายพันธุ์ทั้ง 2 เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าไม่มีความแตกต่างกัน คือ มีสีเหลือง ขุ่น ทึบแสง ผิวมัน แต่เมื่อส่องดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope พบว่าเซลล์สายพันธุ์กลายต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้น คือ เซลล์มีขนาดแตกต่างปะปนกัน ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งขนาดไม่แตกต่างกัน และเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope พบว่า สายพันธุ์ตั้งต้นมีลักษณะเป็นแท่งรียาวในขณะที่สายพันธุ์กลาย UNUN-97 อัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของแท่งเซลล์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น
7. ภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 คือที่ pH 6-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ที่อุณหภูมิ 60-65 °ซ
8. Crude และ Partially purified CGTase ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ CGTase ได้เส้นตะกอนซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1:2[5]

9. ในการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ของทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย UNUN-97 จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพและแบบ เอสดีเอส พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันด้านขนาด รูปร่างและประจุสุทธิ
10. ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการย่อยแป้งของ CGTase ของ *Bacillus sp.* A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ด้วย HPLC พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น $\beta$-CD