บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรชัน

1.1 สภาพทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์

ในการทำโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces* นั้น จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เส้นใยมากๆ ซึ่งสามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และเนื่องจาก *Streptomyces* เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศสูงมาก (highly aerobic) ดังนั้น ในระหว่างที่ทำการเลี้ยงเชื้อ จึงต้องมีการเขย่าและใส่ในภาชนะที่มีเนื้อที่ว่างพอที่การถ่ายเทอากาศจะเกิดขึ้นได้อย่างเต็มที่ นอกจากนั้นเส้นใยที่ใช้ยังต้องมีการกระจายตัวอย่างดี ไม่เกาะกันเป็นเม็ด(pellet) จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ6 โดยเลี้ยงเชื้อในภาชนะที่มีลักษณะต่างกัน คือ ขวดทรงกรวยธรรมดา ขวดทรงกรวยก้นบุบ และขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด (ภาคผนวกที่ 3) ผลดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า เมื่อเลี้ยงในขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด และในขวดทรงกรวยก้นบุบ เชื้อจะมีการเจริญดีกว่าเมื่อใช้ขวดทรงกรวยธรรมดา แต่เชื้อที่เลี้ยงในขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด จะให้เส้นใยที่มีลักษณะกระจายสม่ำเสมอมากกว่า โดยเฉพาะในเชื้อ *Streptomyces sp.42-9* ซึ่งมีแนวโน้มที่จะจับตัวเป็นเม็ดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEME ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้น ในการวิจัยขั้นต่อไปจะเลี้ยงเชื้อในขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวดเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์

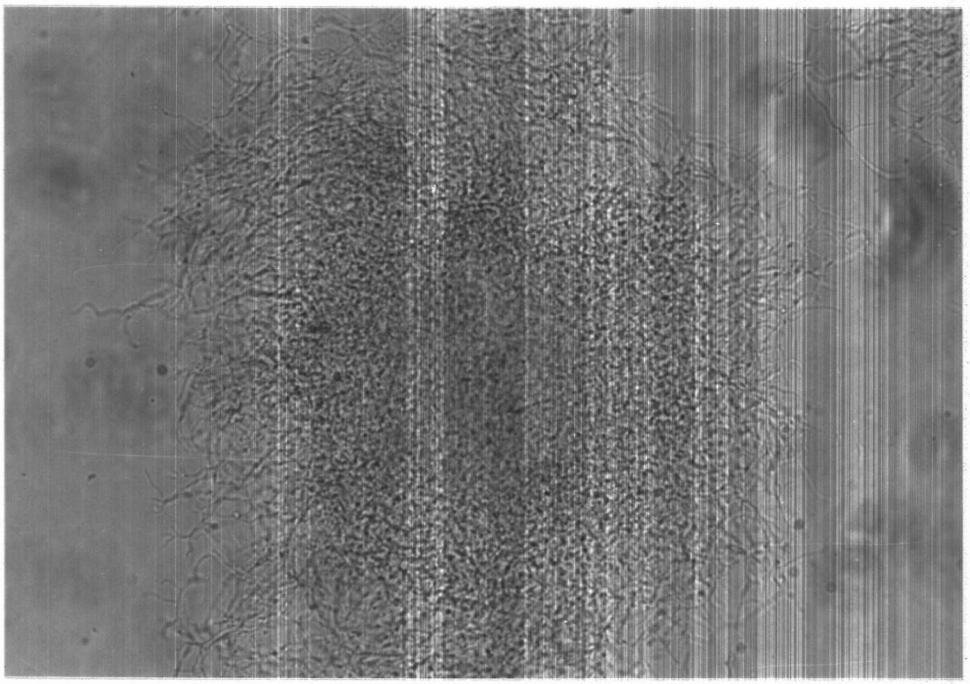
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Streptomyces sp. 19Ø-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* เมื่อเลี้ยงในภาชนะชนิดต่างๆ กัน

ชนิดของภาชนะ	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	สายพันธุ์ 190-1	สายพันธุ์ 42-9
ขวดทรงกรวยธรรมดา	0.92	0.91
ขวดทรงกรวยก้นบุบ	1.33	1.31
ขวดทรงกรวยธรรมดา ที่ใส่ขดลวด	1.35	1.28

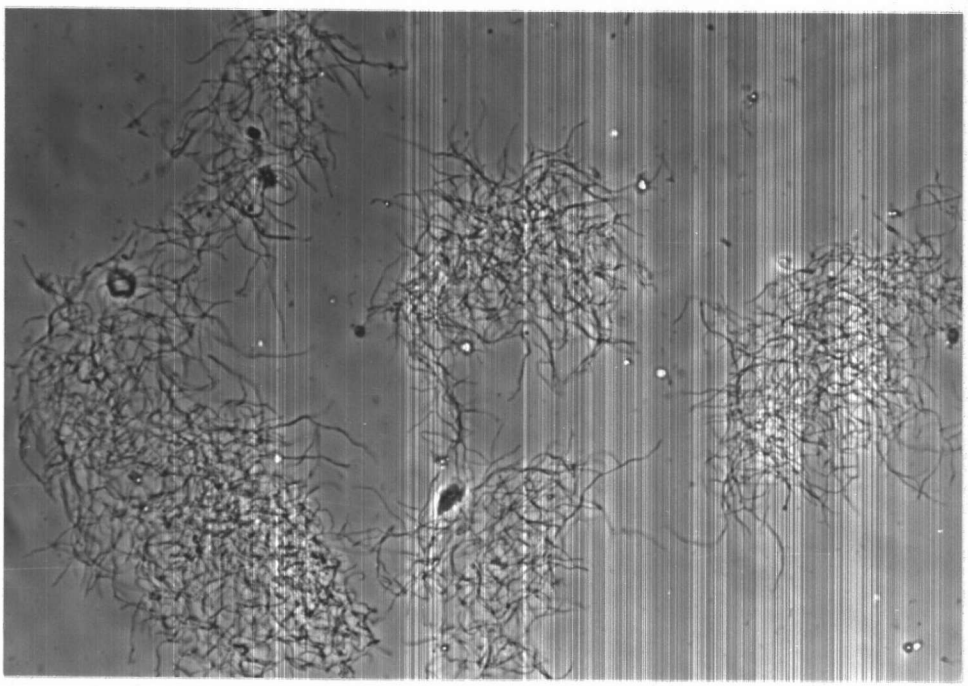
1.2 ผลของความเข้มข้นของไกลซีนต่อการเกิดโปรโตพลาสท์

เนื่องจากมีการศึกษาว่าไกลซีนมีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ของ*Streptomyces* โดย Sagara และคณะ (18)รายงานว่า การเติมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้ผนังเซลล์ของ *Streptomyces* ถูกย่อยด้วยไลโซไซม์ได้ง่ายขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการเกิดโปรโตพลาสท์ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของไกลซีนที่เหมาะสมที่ใช้ในเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของไกลซีนที่ทำให้ *Streptomyces sp.19Ø-1* และ *Streptomyces sp. 42-9*เกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีที่สุด โดยเลี้ยง *Streptomyces* ตามวิธีการในข้อ 6 บทที่ 2 แต่ผันแปรปริมาณของไกลซีนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ตามลำดับ พบว่า การเติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดโปรโตพลาสท์ และยังไม่มีผลต่อสัดส่วนของโคโลนีที่ไม่เกิดเป็นโปรโตพลาสท์(NON-PROTOPLAST UNIT)อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3 และ 4 นอกจากนี้ ไกลซีนยังมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ ทำให้ได้ปริมาณของเซลล์ที่จะใช้ทำโปรโตพลาสท์น้อยไปด้วย ดังนั้น ในการวิจัยขั้นต่อไปจะไม่เติมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะการกระจายของไมซีเลียมของ *Streptomyces sp.42-9* จากกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 40x2.5 เท่า เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างกัน คือ a)ขวดทรงกรวยธรรมดา *b)*ขวดทรงกรวยก้นบุบ c)ขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด

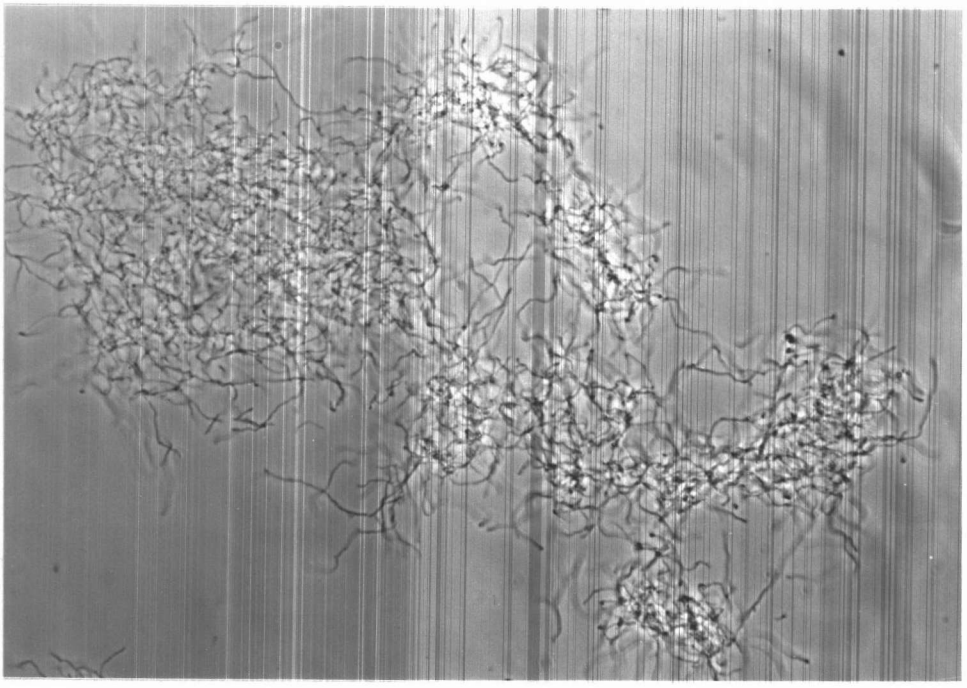


a)



b)

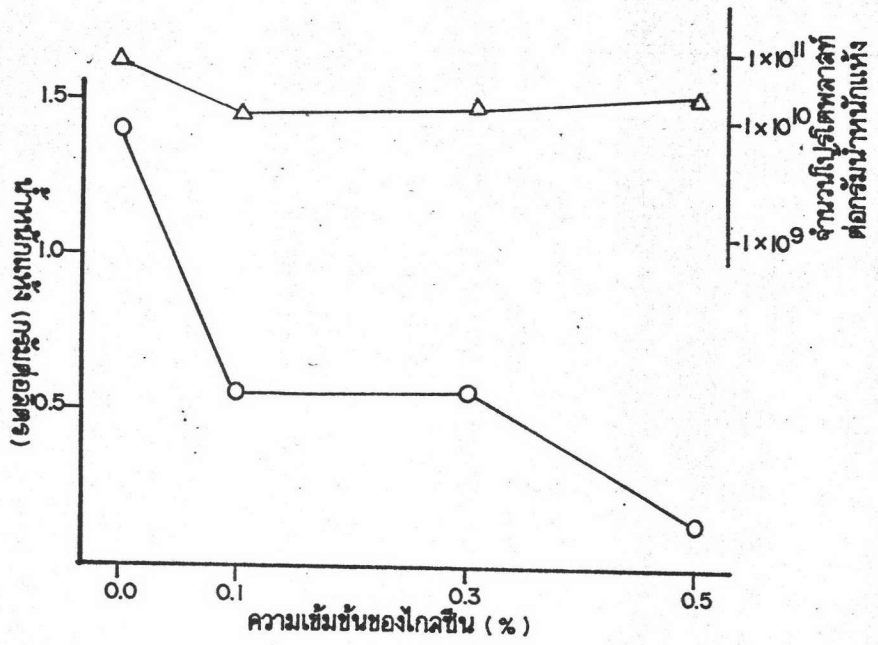
รูปที่ 1 แสดงลักษณะการกระจายของไมซีเลียมของ *Streptomyces sp.42-9* จากกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 40x2.5 เท่า เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างกัน คือ a)ขวดทรงกรวยธรรมดา b)ขวดทรงกรวยก้นบุบ c)ขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด (ต่อ)



c)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของไกลซีนต่อการเกิดโปรโตพลาสท์

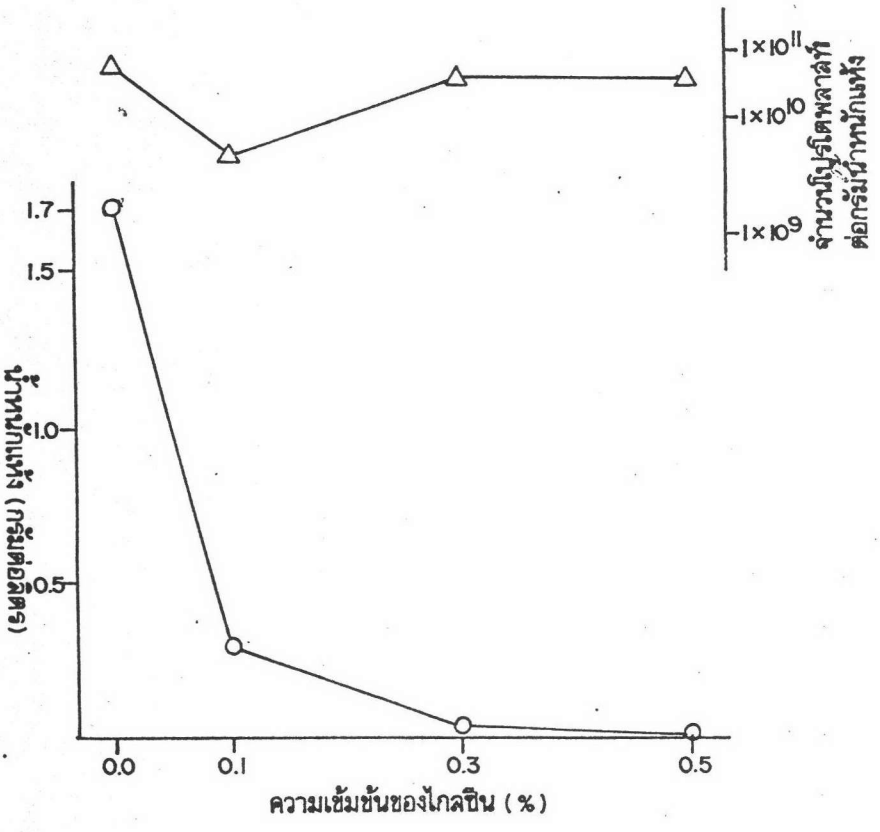
สายพันธุ์	ความเข้มข้นของไกลซีน (%น้ำหนักโดยปริมาตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	จำนวนโคโลนีที่ไม่เกิดโปรโตพลาสท์ (โคโลนีต่อมล.)
190-1	0.0	1.40	7.54×10^{10}	1.50×10^{4}
	0.1	0.53	1.66×10^{10}	1.70×10^{4}
	0.3	0.56	2.10×10^{10}	4.75×10^{4}
	0.5	0.13	2.85×10^{10}	3.00×10^{4}
42-9	0.0	1.70	7.15×10^{10}	1.45×10^{5}
	0.1	0.28	6.00×10^{9}	1.22×10^{5}
	0.3	0.03	5.20×10^{10}	6.50×10^{4}
	0.5	0.01	5.20×10^{10}	2.23×10^{4}



รูปที่ 2 แสดงผลของความเข้มข้นของไกลซีนต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ ใน *Streptomyces sp.190-1*

△——△ จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

○——○ น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 3 แสดงผลของความเข้มข้นของไกลซีนต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ ใน *Streptomyces sp.42-9*

△—△ จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

○—○ น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

1.3 ผลการทดสอบความทนต่อแรงดันออสโมติกของโปรโตพลาสท์

ในการรักษาสภาพของโปรโตพลาสท์นั้น ปกติต้องอยู่ในสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกภายนอกเท่ากับภายในเซลล์ (isotonic)และเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็น hypertonic โปรโตพลาสท์จะมีรูปร่างกลม ดังแสดงในรูปที่ 4 แต่ถ้าอยู่ในสภาพที่มีแรงดันออสโมติกไม่เหมาะสม จะทำให้โปรโตพลาสท์แตก และไม่สามารถกลับเป็นเซลล์สภาพปกติได้ อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสท์ของเชื้อแต่ละชนิด จะทนต่อแรงดันออสโมติกได้ไม่เท่ากัน โดยถ้า โปรโตพลาสท์นั้นทนต่อแรงดันออสโมติกได้สูง ก็จะสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีตัวรักษาแรงดันออสโมติกที่เหมาะสมอยู่ และอาจทำให้เข้าใจผิดว่าเป็นโคโลนีที่เจริญมาจากส่วนที่ไม่ใช่โปรโตพลาสท์ ทำให้การคำนวณค่าความถี่ในการรีเจนเนอเรทผิดไป จึงทดสอบความทนต่อแรงดันออสโมติกของโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 9.1 บทที่ 2 และนำมารีเจนเนอเรทตามวิธีการในข้อ 9.2 บทที่ 2 แต่ผันแปรสภาวะต่างๆ ดังนี้

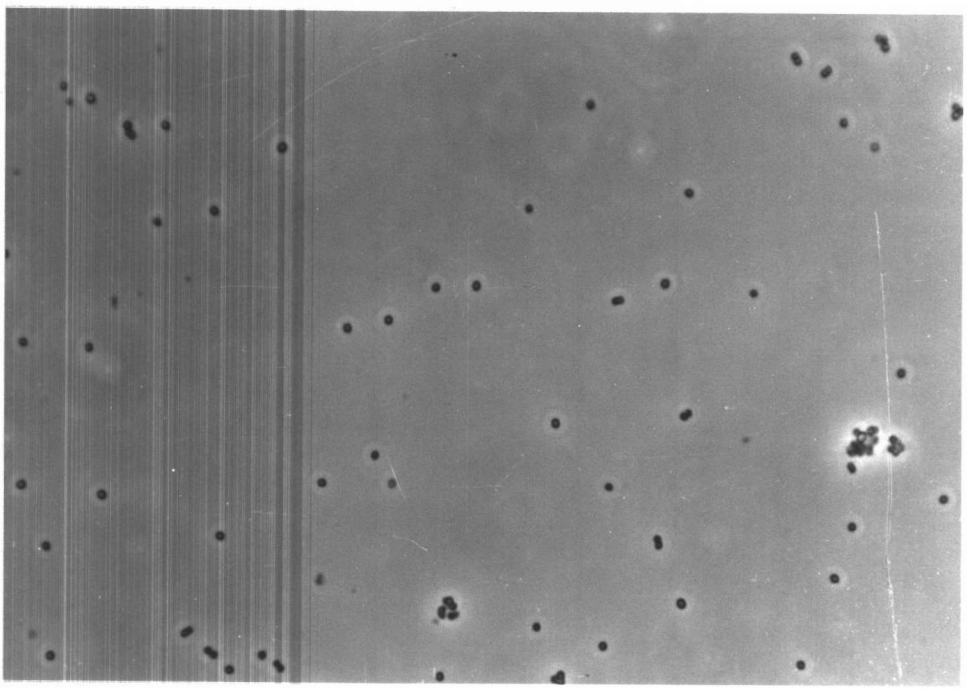
1. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีซูโครสเป็นสารช่วยรักษาแรงดันออสโมติก และเพาะบนอาหารวุ้น R_2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมในการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์
2. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยสารละลาย 0.01% SDS และเพาะบนอาหารวุ้น R_2
3. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และเพาะบนอาหารวุ้น L ซึ่งปราศจากสารรักษาแรงดันออสโมติก (ภาคผนวกที่ 1.4)

จากตารางที่ 3 และ รูปที่ 5 พบว่าเมื่อเจือจางโปรโตพลาสท์ด้วยบัฟเฟอร์ P และกระจายโปรโตพลาสท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 จะมีจำนวนโคโลนีที่ขึ้นได้บนอาหารชนิดนี้ถึง 1.40×10^7 และ 1.00×10^7 ใน *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* ตามลำดับ เมื่อกระจายโปรโตพลาสท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ L จำนวนโคโลนีต่อมล. ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีค่าลดลงประมาณ 100 เท่า และเมื่อเจือจางโปรโตพลาสท์ด้วย 0.01% SDS พบว่า โคโลนีที่เจริญได้ ลดลงไปอีก 100 เท่า ของที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L แสดงว่า การเก็บรักษาโปรโตพลาสท์ในบัฟเฟอร์ P และเลี้ยงโปรโตพลาสท์ในอาหารวุ้น R_2 จะช่วยรักษาสภาพโปรโตพลาสท์ไว้ได้ดีที่สุด จึงสามารถรีเจนเนอเรทเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ปกติได้มากที่สุด ส่วนการเลี้ยงในอาหารวุ้น L นั้น แม้จะทำการรักษาสภาพของ

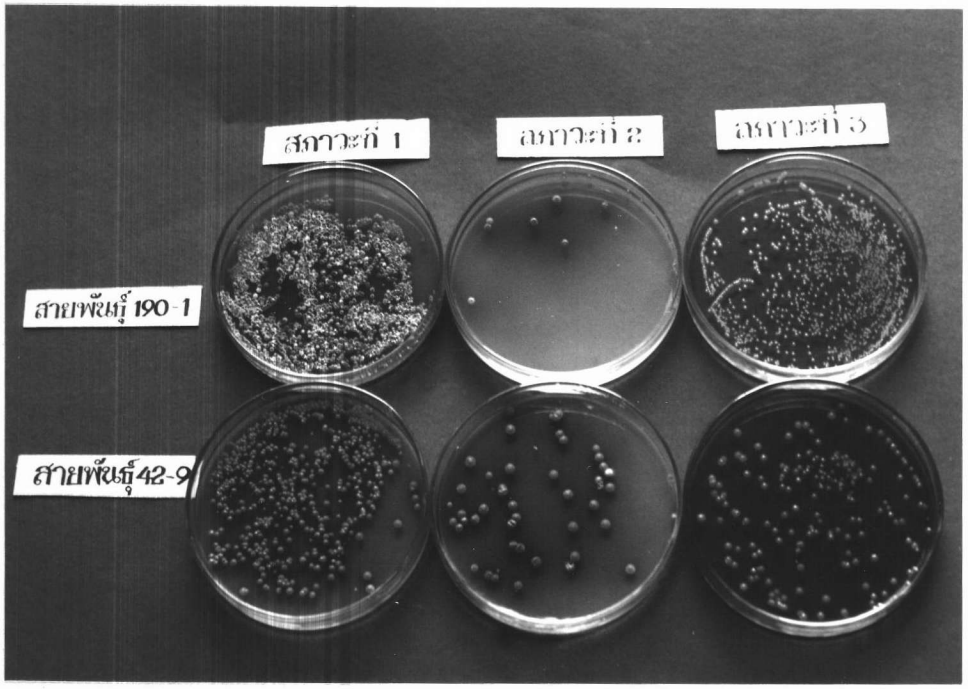
โปรโตพลาสท์โดยการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P ก็ตาม แต่ก็มีการรีเจนเนอเรทได้น้อย แสดงว่าองค์ประกอบของอาหารวุ้น L มีแรงดันออสโมติกที่ไม่เหมาะสมต่อโปรโตพลาสท์ แต่ก็ยังมีโปรโตพลาสท์บางส่วน ที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกที่ไม่เหมาะสม ของอาหารวุ้น L และมีการรีเจนเนอเรทได้มากกว่าโปรโตพลาสท์ ที่เจือจางด้วย 0.01 % SDS และเลี้ยงโปรโตพลาสท์ในอาหารวุ้น R_2 ส่วนการเจือจางโปรโตพลาสท์ด้วย 0.01 % SDS จะทำให้โปรโตพลาสท์แตกมากที่สุดทั้งนี้เพราะ SDS เป็นแอนอิออนิกดีเทอร์เจนท์ที่มีสมบัติทำลายผนังเมมเบรนอย่างรุนแรง แต่ก็ยังมีโคโลนีเจริญได้บนอาหารวุ้น R_2 คาดว่าโคโลนีที่ยังสามารถเจริญได้นั้น น่าจะมาจากส่วนของเส้นใยที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยไลโซไซม์ และสามารถลอดผ่านการกรองมาได้ ในขั้นตอนเตรียมโปรโตพลาสท์ ดังนั้นในการหาค่ารีเจนเนอเรทต่อมล. ในการทดลองต่อไปจะหาจากค่าของ จำนวนโคโลนีต่อมล.ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และกระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 หักออกด้วยจำนวนโคโลนีต่อมล. ที่เจือจางด้วย 0.01%SDS กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์ที่แรงดันออสโมติกต่างกัน

วิธีการ	จำนวนโคโลนีต่อมล.	
	Streptomyces sp. 190-1	*Streptomyces sp.42-9*
1. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และเพาะบนอาหารวุ้น R_2	1.40×10^7	1.33×10^7
2. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยสารละลาย 0.01% SDS และเพาะบนอาหารวุ้น R_2	1.00×10^2	5.00×10^3
3. โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และเพาะบนอาหารวุ้น L	2.70×10^4	1.55×10^5



รูปที่ 4 แสดงลักษณะโปรโตพลาสท์ ของ *Streptomyces sp.190-1* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 5 แสดงความสามารถในการรีเจนเนอเรทของเชื้อ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 10^{-3} และผันแปรสภาวะต่างๆ ดังนี้

สภาวะที่ 1 โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และเพาะบนอาหารวุ้น R_2

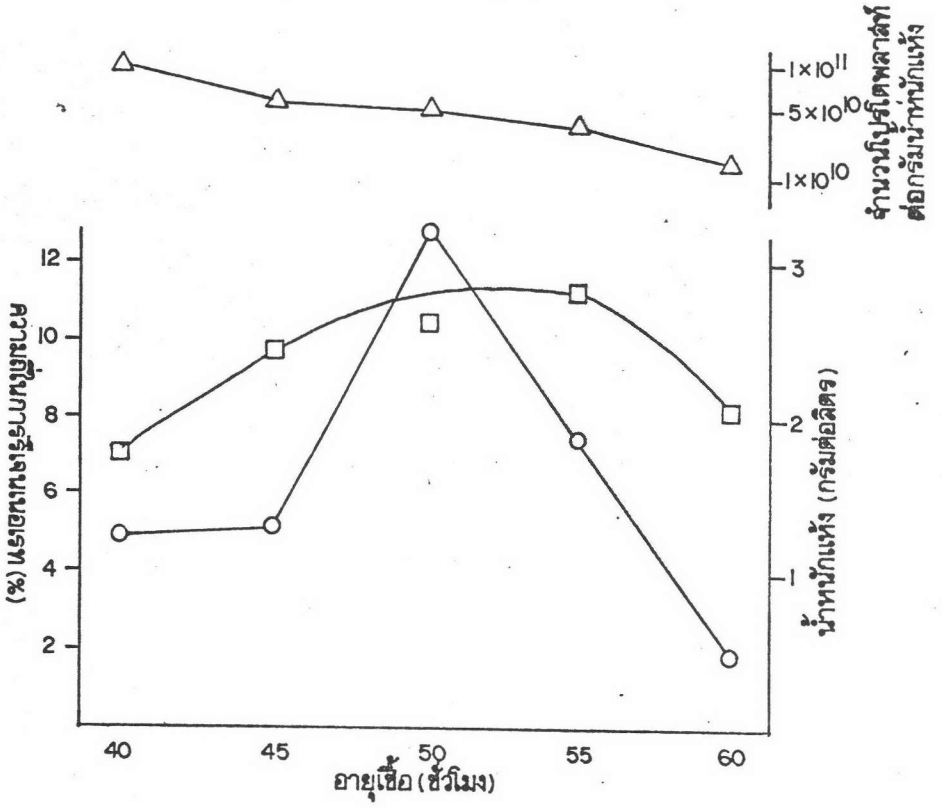
สภาวะที่ 2 โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยสารละลาย 0.01% SDS และเพาะบนอาหารวุ้น R_2

สภาวะที่ 3 โปรโตพลาสท์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ P และเพาะบนอาหารวุ้น L

1031327

1.4 ผลของอายุเชื้อต่อการเกิดโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรชัน

เนื่องจากสภาพทางกายภาพของเส้นใยที่ใช้ มีผลต่อคุณสมบัติของโปรโตพลาสท์ โดย Baltz.(4) รายงานว่าการใช้เส้นใยที่มีอายุอยู่ในช่วงระหว่าง exponential phase และ stationary phase จะทำให้เชื้อ *S.fradiae* และ *S. griseofuscus* มีการรีเจนเนอเรทได้ดี และใช้ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ได้ดี ส่วนโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากเส้นใยที่มีอายุมากจะรีเจนเนอเรทได้น้อยลง งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษา ถึงความสัมพันธ์ระหว่างอายุเชื้อ การเกิดโปรโตพลาสท์ และการรีเจนเนอเรท โดยทำการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 6 บทที่ 2 แต่ผันแปรระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเป็น 40, 45, 50, 55 และ 60 ชม. ตามลำดับ นำเชื้อที่ได้ไปเตรียมโปรโตพลาสท์และรีเจนเนอเรทตามวิธีการในข้อ 9.1 และ 9.2 ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 *Streptomyces sp. 190-1* จะมีการรีเจนเนอเรทได้ดีที่อายุของเชื้อประมาณ 50 ชม.ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง exponential phase และ stationary phase มีค่าความถี่ในการรีเจนเนอเรท 12.83% ส่วน *Streptomyces sp. 42-9* รีเจนเนอเรทได้ดีในช่วง exponential phase ที่อายุของเชื้อ 50-55 ชม. มีค่าความถี่ในการรีเจนเนอเรทในช่วง 1.49 - 1.67 % แต่อายุของเชื้อไม่มีผลต่อการเกิดเป็น โปรโตพลาสท์ ซึ่งจะเห็นได้จากค่าของจำนวนโปรโตพลาสท์ต่อน้ำหนักแห้ง ที่เวลาต่างๆ จะมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจะใช้เชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomycessp. 42-9* ที่มีอายุประมาณ 50 ชม. เพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์ที่จะใช้สำหรับเชื่อมโปรโตพลาสท์

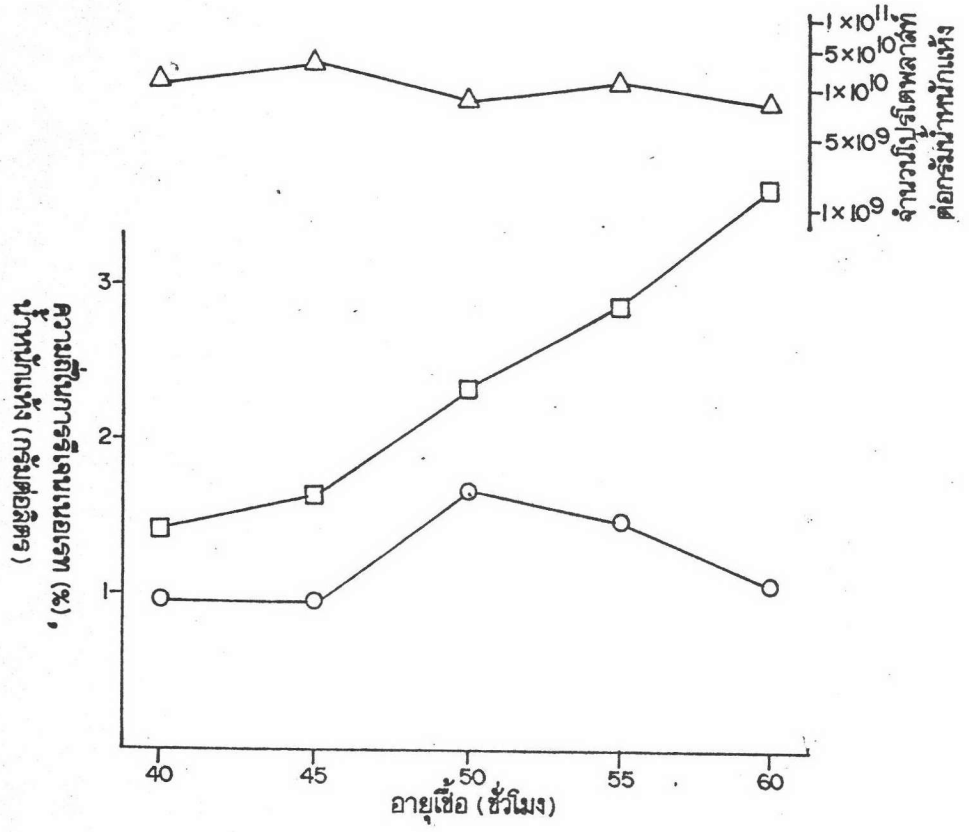


รูปที่ 6 แสดงผลของอายุเชื้อของ *Streptomyces sp.190-1* ต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ และการรีเจนเนอเรชัน

○—○ ความถี่ในการรีเจนเนอเรท (%)

△—△ จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

□—□ น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 7 แสดงผลของอายุเชื้อของ *Streptomyces sp.42-9* ต่อการเกิดโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรชัน

○—○ ความถี่ในการรีเจนเนอเรท (%)

△—△ จำนวนโปรโตพลาสท์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

□—□ น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

2. ผลการหาความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของ *Streptomyces*

2.1 ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะตามธรรมชาติของ *Streptomyces*

จากการทดสอบความสามารถต้านยาปฏิชีวนะตามธรรมชาติของ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* เพื่อใช้เป็นตัวติดตามลักษณะของลูกผสมที่ต้องการ (marker) ตามวิธีการในข้อ 8 บทที่ 2 ผลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า *Streptomyces sp.190-1* สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินได้ดี ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล.โดยยังมีการเจริญตามปกติ และทนต่อยาปฏิชีวนะสเตรพโตมัยซินได้เล็กน้อย แต่มีการเจริญน้อยมาก ในขณะที่ *Streptomyces sp.42-9* ไม่สามารถเจริญได้เลย บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยเตตราซัยคลิน และ สเตรพโตมัยซิน ส่น *Streptomyces sp. 42-9* สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล.ขณะที่ *Streptomyces sp.190-1* ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ ส่วนในยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้แก่ อีริโทรมัยซิน กานามัยซินนั้นเชื้อทั้ง2สายพันธุ์ไม่สามารถต้านยาได้เลย ดังนั้นในการคอนจูเกชันและการเชื่อมโปรโตพลาสท์จะคัดเลือกลูกผสม โดยการใช้ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล. และ แอมพิซิลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล. เป็น marker

2.2 ความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของ *Streptomyces* ที่ได้จากการสร้างขึ้น

เนื่องจาก *Streptomyces sp. 42-9* มีการเจริญช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแอมพิซิลิน และจำนวนโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ คือ เมื่อเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำลง เชื้อจะไม่มีการเจริญเลย ซึ่งเป็นปัญหาต่อการนับจำนวนโคโลนีเพื่อใช้คำนวณหาความถี่ในการรีคอมบิเนชัน จึงได้สร้าง marker ใหม่สำหรับเชื้อ*Streptomyces sp. 42-9* โดยการทรานสฟอร์มพลาสมิดที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เข้าไป (ภาคผนวกที่ 6) จากการทดสอบ ความสามารถในการต้านยาอีริโทรมัยซินของ*Streptomyces sp.42-9*ที่ได้รับการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ 4027 ซึ่งมียีนต้านยาอีริโทรมัยซินเข้าไป (*Streptomyces sp. 42-9/pIJ4027*) ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า *Streptomyces sp. 42-9* จะมีความสามารถในการต้านยาอีริโทรมัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล. เพิ่มขึ้น ส่วน*Streptomyces sp.190-1* ไม่สามารถต้านยาอีริโทรมัยซินได้เลย ดังนั้นใน

การทดลองต่อไปจึงใช้ *Streptomyces sp.42-9* ที่ได้รับการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ 4027 เข้าไปในการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ *Streptomyces sp. 190-1* โดย marker ที่ใช้ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้ คือ ลูกผสมนั้นจะต้องมีความสามารถในการต้านยาทั้งเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัมต่อมล.และอีริโทรมัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมล.

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9*

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น	การเจริญของเชื้อ	
	(ug/ml)	*Streptomyces sp.190-1*	*Streptomyces sp.42-9*
อีริโทรมัยซิน	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
คลอแรมเฟนิคอล	10	+1	+1
	20	-	-
	30	-	-
กานามัยซิน	5	-	-
	10	-	-
	20	-	-
สเตรพโตมัยซิน	5	+1	-
	10	-	-
	20	-	-
เตตราซัยคลิน	10	+4	+3
	20	+4	+1
	30	+3	-
แอมพิซิลิน	10	+1	+4
	20	-	+3
	30	-	+3

ตารางที่ 5 แสดงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะอีริโทรมัยซินของ *Streptomyces sp. 42-9* ที่ได้ทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ 4027 เข้าไป

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (ug/ml)	การเจริญของเชื้อ *Streptomyces190-1*	การเจริญของเชื้อ *Streptomyces 42-9/pIJ4027*
อีริโทรมัยซิน	10	-	+4
	20	-	+3
	30	-	+3

หมายเหตุ +1...+4 แสดงลำดับการเจริญของเชื้อ จากน้อยไปมาก ตามลำดับ โดย +4 มีค่าเทียบเท่ากับการเจริญของเชื้อเมื่อไม่มียาปฏิชีวนะ

\- หมายถึงไม่มีการเจริญของเชื้อ

3. ผลการคอนจูเกชันและการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces*

3.1 การวิเคราะห์ลูกผสมสายพันธุ์มาตรฐาน

เนื่องจาก *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทย เป็นเชื้อใหม่ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยเฉพาะในแง่ของการเชื่อมโปรโตพลาสท์ การนำเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้แล้ว มาศึกษาการเชื่อมโปรโตพลาสท์ในห้องปฏิบัติการ ก่อนที่จะทำการศึกษากับเชื้อใหม่ จะช่วยให้ทราบได้ว่าสภาวะแวดล้อมและปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้น มีความเป็นไปได้ที่จะทำให้ผลการทดลองกับเชื้อใหม่สำเร็จมากน้อยเพียงใด โดยการเปรียบเทียบผลกับที่มีผู้รายงานไว้

Hopwood (49,50) รายงานว่า ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *S. coelicolor M124* และ *S.coelicolor M130* จะให้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันเป็น 8.4×10^{-2} ดังได้นำมาแสดงไว้ในตารางที่ 6 ผู้วิจัยได้นำเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 2เชื้อ

นี้ ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ศาสตราจารย์ David A.Hopwood แห่งสถาบัน John Innes, Norwich สหราชอาณาจักร มาศึกษารีคอมบิเนชัน โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์ และการทำคอนจูเกชัน โดยใช้ความสามารถในการต้านยาสเตรพโตมัยซิน ของ *Streptomyces coelicolor M130* และลักษณะพิเศษ จาก *Streptomyces coelicolor M 124* ซึ่งต้องการอิสติดีนจากภายนอกเพื่อใช้ในการเจริญ เป็นตัวคัดเลือกลูกผสม พบว่าความถี่ในการรีคอมบิเนชันของการคอนจูเกชันเป็น 9.60×10^{-6} และความถี่ในการรีคอมบิเนชัน ของการเชื่อมโปรโตพลาสท์เป็น 6.73×10^{-4} โดยการเชื่อมโปรโตพลาสท์ จะให้ค่าความถี่ในการรีคอมบิเนชัน สูงกว่าการคอนจูเกชันประมาณ 100 เท่า แต่ต่ำกว่าที่ Hopwood รายงานไว้ประมาณ 100 เท่า (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนี้ สามารถทำให้เกิดรีคอมบิเนชันของ *Streptomyces* ได้ จึงเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้กับการรีคอมบิเนชัน ระหว่าง *Streptomyces sp. 190-1* และ *Sreptomyces sp.42-9*

ตารางที่ 6 แสดงผลการรีคอมบิเนชันของ *Streptomyces* สายพันธุ์มาตรฐาน

เชื้อ	ชนิดของอาหารที่ใช้คัดเลือก	คอนจูเกชัน		เชื่อมโปรโตพลาสท์	
		จำนวนโคโลนีต่อมล.	ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน	จำนวนโคโลนีต่อมล.	ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน
Streptomyces coelicolor sp. M124 x M130	MM+arg+pro+cys+ura+str	1.00×10^{8}		3.24×10^{8}	
	MM+his+ura+str	4.20×10^{6}	9.60×10^{-6}	1.99×10^{8}	6.73×10^{-4}
	MM+arg+pro+cys +ura+str	1.00×10^{3}		2.82×10^{5}	
Streptomyces coelicolor sp. M124 x M130	-	-	-	-	8.4×10^{-2} **

หมายเหตุ ** เป็นค่าการรีคอมบิเนชัน ที่ Hopwood (50) รายงานไว้

: MM หมายถึง minimal media

: arg, pro, cys, his, ura หมายถึง กรดอมิโน อาร์จินีน โพรลีน ซิสเตอีน ฮิสติดีน และ ยูราซิล ตามลำดับ

3.2 การวิเคราะห์ลูกผสมของ *Streptomyces* ที่ทำการศึกษา

3.2.1 การวิเคราะห์ลูกผสมของ *Streptomyces* ที่ทำการศึกษา

จากการทำคอนจูเกชันและเชื่อมโปรโตพลาสท์ตามวิธีการข้อ 9.3 และข้อ 10 แล้วนำไปวิเคราะห์หาลูกผสมตามวิธีการข้อ 11 ในบทที่ 2 ผลดังแสดงในตารางที่ 7

การศึกษาการทำคอนจูเกชันและการเชื่อมโปรโตพลาสท์ในเชื้อ *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* โดยใช้ความสามารถในการต้านยาแอมพิซิลิน และเตตราซัยคลินเป็นตัวคัดเลือกลูกผสมนั้น พบว่า การเชื่อมโปรโตพลาสท์จะให้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงกว่าการคอนจูเกชัน 3125เท่า คือ มีค่าความถี่ในการรีคอมบิเนชัน ของการคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์เป็น 4.54×10^{-7}และ 1.46×10^{-3} ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเจริญ ของเชื้อ*Streptomyces sp.42-9* บน minimal media ที่เสริมด้วยแอมพิซิลิน นั้นจะเจริญได้ช้ามากและเมื่อกระจายสปอร์แขวนลอยบน minimal media โดยเจือจาง ให้มีความเข้มข้นต่ำลงจะไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารชนิดนี้เลย ทำให้มีปัญหาในการนับจำนวนโคโลนี และการหาค่าความถี่ในการรีคอมบิเนชัน จึงหลีกเลี่ยงปัญหานี้โดยการทรานสฟอร์ม พลาสมิด pIJ 4027 ซึ่งมียีนต้านยาอีริโทรมัยซิน เข้าไปใน *Streptomyces sp. 42-9* ทำให้เชื้อนี้มีคุณสมบัติใหม่เพิ่มขึ้นคือ จะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมอีริโทรมัยซินลงไปซึ่งจากเดิมที่ไม่สามารถเจริญได้เลยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้และเมื่อทำการคอนจูเกชัน และเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่างเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* กับ *Streptomyces sp.42-9* ที่ทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ4027เข้าไป โดยคาดว่า ลูกผสมจะต้องเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เสริมด้วยเตตราซัยคลิน เข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล. และอีริโทรมัยซินเข้มข้น 10ไมโครกรัมต่อมล. ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces sp.190-1* หรือ *Streptomyces sp. 42-9/pIJ4027* จะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ พบว่า ความถี่ในการรีคอมบิเนชันของการ เชื่อมโปรโตพลาสท์ มีค่าสูงกว่าการ คอนจูเกชัน 497 เท่า คือ มีค่าความถี่ในการ รีคอมบิเนชันของการคอนจูเกชันและการเชื่อมโปรโตพลาสท์เป็น 8.41×10^{-5} และ 4.15×10^{-2} ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งโดยการสุ่มมา 48 โคโลนี พบว่า ทั้งหมด 100% สามารถเจริญ

ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยเตตราซัยคลินและอีริโทรมัยซิน นอกจากนั้น ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการเชื่อมตัวเองของโปรโตพลาสท์ (self fusion) โดยนำโปรโตพลาสท์ของตัวมันเอง มาเชื่อมกันภายใต้สภาวะที่ใช้เชื่อมโปรโตพลาสท์ เพื่อเป็นตัวควบคุม ผลดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า ไม่มีเชื้อใดที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ใช้คัดเลือกเฉพาะลูกผสม ดังนั้นจึงเป็นที่แน่ชัดว่า ลูกผสมที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือก เป็นรีคอมบิแนนท์จริง จึงนำลูกผสมเหล่านั้นมาตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลนเนสต่อไป

3.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา(morphology)ของลูกผสมที่ได้

เชื้อลูกผสมที่ได้จากการคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS จะสร้างสปอร์สีเทา สีของอาหารเลี้ยงเชื้อใต้โคโลนีเป็นสีเทาออกดำ ซึ่งเป็นลักษณะของ *Streptomyces sp. 190-1*ที่สามารถสร้างสี(pigment) ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบางเชื้อมีสีของอาหารเลี้ยงเชื้อใต้โคโลนีเป็นสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งเป็นลักษณะของ *Streptomyces sp.42-9* แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า มีบางโคโลนีที่ได้จากการคอนจูเกชัน และ การเชื่อมโปรโตพลาสท์ ให้ลักษณะที่ต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างสิ้นเชิง โดยโคโลนีจะมีสีเหลืองเข้ม ไม่สร้างสปอร์ และลักษณะผิวของโคโลนีจะไม่เรียบเป็นรอยหยัก มีความเสถียร โดยเมื่อถ่ายเชื้อไปเรื่อยๆเป็นจำนวน 5 ครั้ง เชื้อที่ได้ ก็ยังมีสีเหลืองเข้มเหมือนเดิม ในขณะที่บางเชื้อซึ่งไม่เสถียร เมื่อทำการถ่ายเชื้อไปเพียงครั้งเดียว เชื้อก็จะเปลี่ยนลักษณะจากโคโลนีสีเหลืองเข้ม ไปเป็นเชื้อที่สร้างสปอร์สีเทาเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่เช่นเดิม ลักษณะของลูกผสมที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 8 และ9

ตารางที่ 7 แสดงผลการรีคอมบิเนชันของ *Streptomyces* ที่ทำการศึกษา

เชื้อ	ชนิดของอาหารที่ใช้คัดเลือก	คอนจูเกชัน		เชื่อมโปรโตพลาสท์	
		จำนวนโคโลนีต่อมล.	ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน	จำนวนโคโลนีต่อมล.	ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน
Streptomyces	$MM+A_{30}$	1.00×10^{4}		1.10×10^{2}	
sp. 190-1	$MM+T_{30}$	2.20×10^{8}	4.54×10^{-7}	6.701×10^{3}	1.46×10^{-3}
x *42-9*	$MM+A_{30}+T_{30}$	1.00×10^{2}		1.00×10^{1}	
Streptomyces	$MM+E_{10}$	3.30×10^{7}		8.20×10^{5}	
sp. 190-1	$MM+T_{30}$	1.10×10^{7}	8.41×10^{-5}	3.15×10^{5}	4.15×10^{-2}
x *42-9/pIJ4027*	$MM+E_{10}+T_{30}$	3.70×10^{3}		4.73×10^{4}	
Streptomyces	$MM+A_{30}$	-		-	
sp. 190-1	$MM+T_{30}$	6.50×10^{8}	-	1.40×10^{8}	-
x *190-1*	$MM+A_{30}+T_{30}$	-		-	
Streptomyces	$MM+A_{30}$	5.50×10^{6}		8.00×10^{3}	
sp. 42-9	$MM+T_{30}$	-	-	-	-
x *42-9*	$MM+A_{30}+T_{30}$	-		-	
Streptomyces	$MM+E_{10}$	9.94×10^{8}	-	4.80×10^{5}	-
sp. 42-9/pIJ4027	$MM+T_{30}$	-		-	
x *42-9/pIJ4027*	$MM+E_{10}+T_{30}$	-		-	

หมายเหตุ : MM หมายถึง minimal media

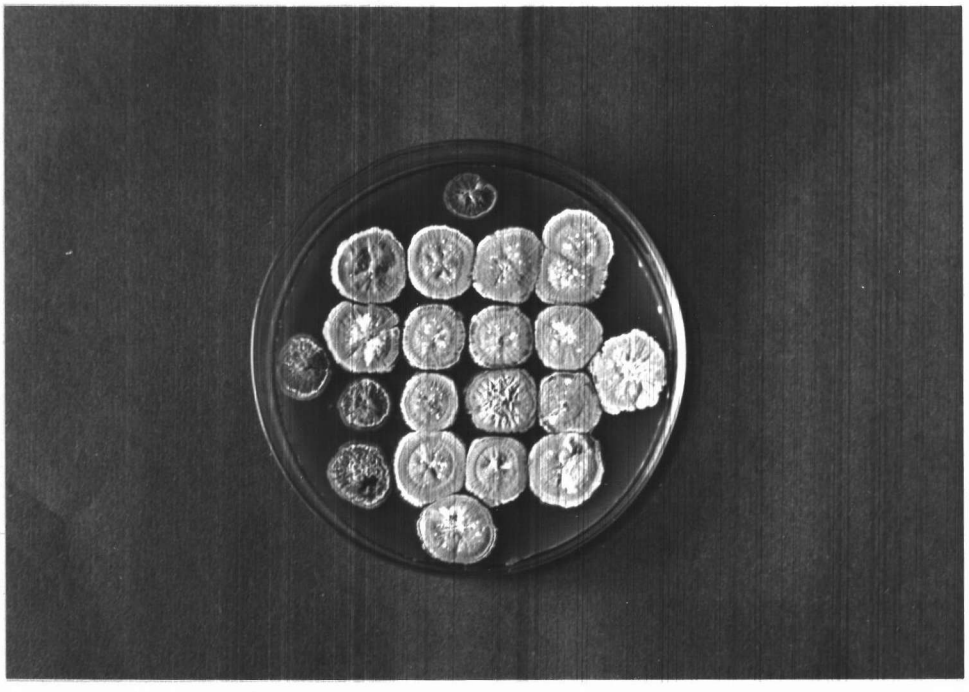
: A_{30}, T_{30}, E_{10} คือ ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน เข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล.

เตตร้าซัยคลิน เข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมล.

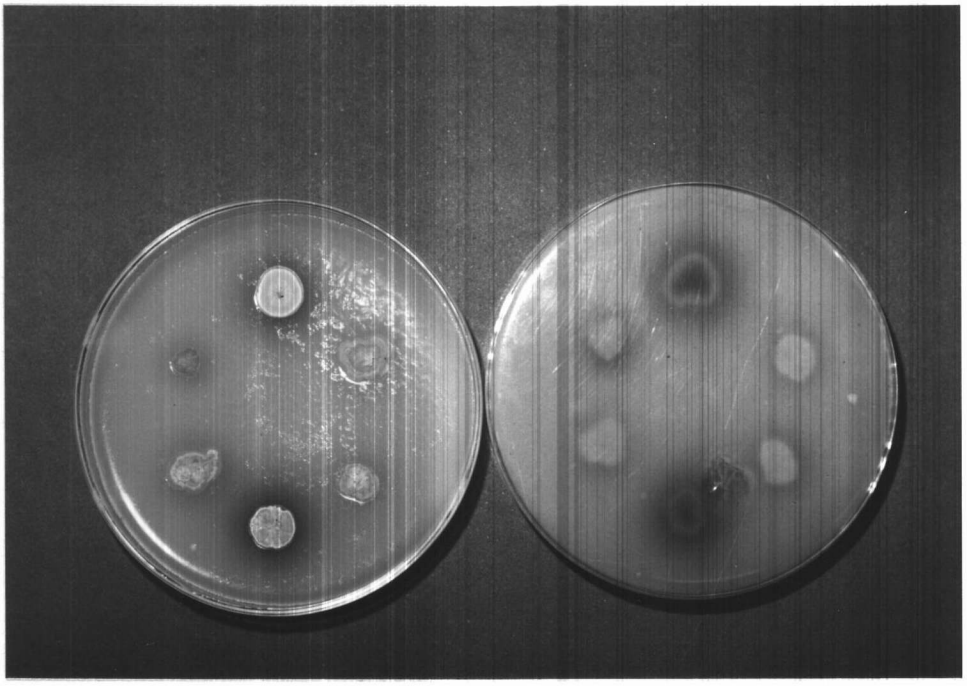
อิริโทรมัยซิน เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล.

: - หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ

: ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีของลูกผสม}}{\text{จำนวนโคโลนีของสายพันธุ์พ่อ+จำนวนโคโลนีของสายพันธุ์แม่}}$



รูปที่ 8 แสดง master plate ของลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9* บนอาหารวุ้น MS



(1) (2)

รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ด้านบน(1) และใต้โคโลนี(2) ของเชื้อ A(ซ้ายบน),P(ขวาบน),J(ซ้ายล่าง) และK(ขวาล่าง) ซึ่งได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ ระหว่าง *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* เปรียบเทียบกับ *Streptomyces sp.42-9*(บนสุด) และ *Streptomyces sp.190-1*(ล่างสุด)

4. ผลการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของลูกผสม (Recombinant) ที่ได้

นำลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสตามวิธีการในข้อ 12.1 และ 12.2 บทที่ 2 ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า เชื้อลูกผสมส่วนใหญ่มีแอคติวิตีต่ำกว่า *Streptomyces sp. 190-1* ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่คือมีแอคติวิตีต่ำกว่า 1279.31 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยลูกผสมที่มีลักษณะของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ใกล้เคียงกับ *Streptomyces sp.190-1* คือ มีลักษณะของเส้นใยเป็นปุย ละเอียด ไม่เกาะตัวเป็นเม็ด กระจายตัวในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาได้ดี จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ค่อนข้างสูง มีจำนวน 13 เชื้อ ได้แก่ เชื้อหมายเลข 3,4,6,8,9,10,11,17, 22,23,26,37,38 ให้แอคติวิตีอยู่ในช่วง 600.11-1001.08 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนเชื้อที่มีลักษณะเป็นเม็ด (pellet) และค่อนข้างตกตะกอนในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sp. 42-9* จะให้แอคติวิตีค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ตามมีบางเชื้อที่มีลักษณะคล้าย *Streptomyces sp.42-9* แต่สามารถให้แอคติวิตี ได้สูงกว่า 600 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ได้แก่ เชื้อหมายเลข 5,18,19,24,27,35,40 จึงคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อลูกผสมที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสสูงกว่า 600 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จำนวน 20 เชื้อ มาตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสต่อไป

ตารางที่ 8 แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของลูกผสม เปรียบเทียบกับ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9*

เชื้อ	แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	เชื้อ	แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
0	485.23	22*	899.60
1	392.81	23*	908.19
2	432.38	24*	719.12
3*	674.00	25	500.80
4*	842.51	26*	783.16
5*	798.33	27*	636.19
6*	693.22	29	522.45
7	586.92	30	584.57
8*	778.98	31	504.19
9*	1001.08	32	384.08
10*	739.01	33	548.76
11*	848.64	34	418.55
12	396.14	35*	685.60
13	331.38	36	460.18
14	564.97	37*	996.86
15	464.57	38*	939.08
16	397.13	39	418.98
17*	745.34	40*	747.64
18*	829.36	41	461.16
19*	646.29	42	568.72
20	437.69	44	500.11

ตารางที่ 8 แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสของลูกผสมเปรียบเทียบกับ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* (ต่อ)

เชื้อ	แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	เชื้อ	แอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
A	221.83	K	469.66
B	580.37	L	364.14
C	476.71	N	312.47
D	277.32	O	585.94
E	468.82	P	457.66
F	371.29	Q	332.43
G	356.99	R	332.25
H	328.79	S	244.12
I	371.28	42-9	282.16
J	375.53	190-1	1279.31

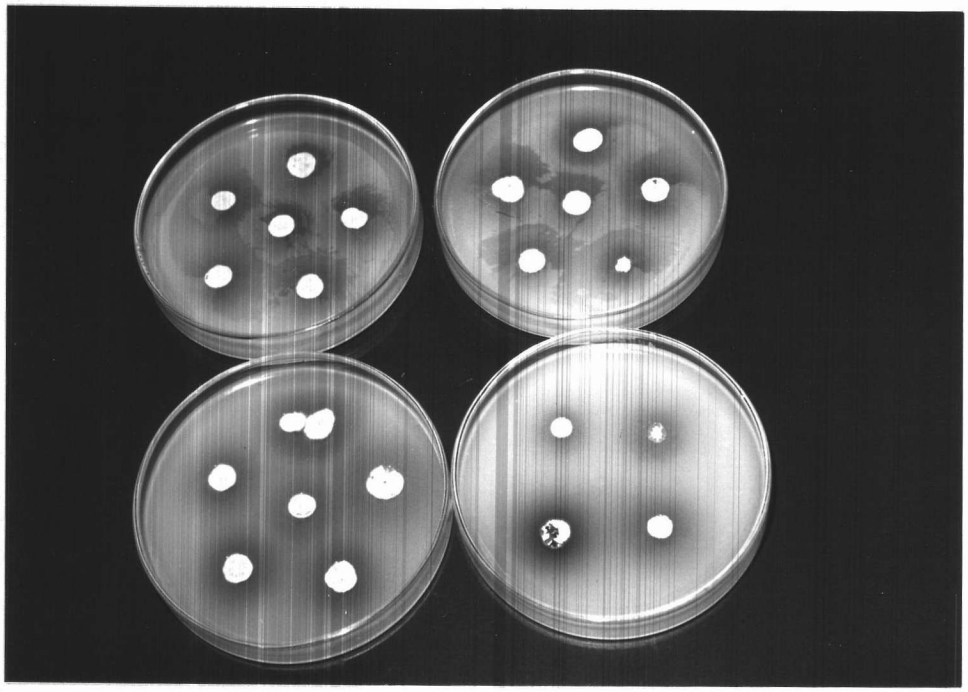
หมายเหตุ - เชื้อหมายเลข 0 ถึง 44 คือ ลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่างเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9/pIJ4027*
เชื้อหมายเลข A ถึง S คือ ลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่างเชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9*
- * คือ เชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า 600 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งและนำไปหาแอคติวิตีของไซแลนเนสต่อไป

5. ผลการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของลูกผสมที่ได้

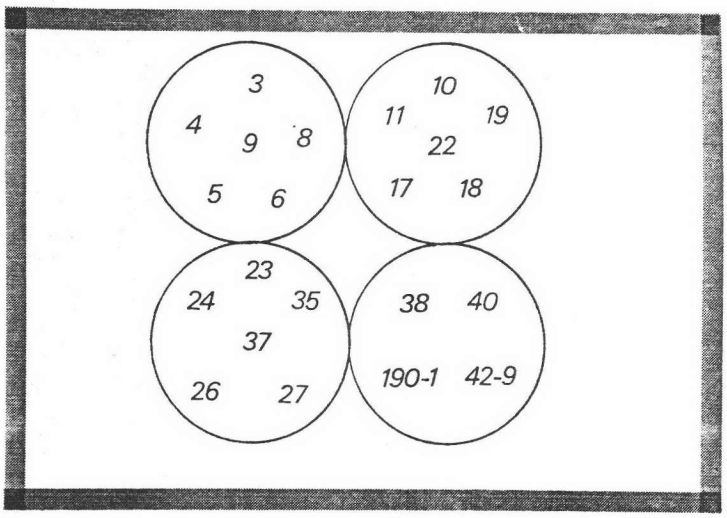
นำลูกผสมที่ได้คัดเลือกแล้วว่า มีแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูโคสไอโซเมอเรส ค่อนข้างสูง คือ สูงกว่า 600 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มาตรวจสอบหาค่าแอคติวิตี ของไซแลนเนสเบื้องต้น โดยดูจาก การให้บริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารวุ้นที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ตามวิธีการในข้อ 12.3 บทที่ 2 พบว่า เชื้อที่นำมาทดสอบทั้ง 20 สายพันธุ์ สามารถให้บริเวณใสรอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ได้ ดังแสดงในรูปที่ 10 จึงได้นำเชื้อทั้งหมด ไปตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารเหลวตามวิธีการในข้อ 12.4 บทที่ 2 โดยเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลว 2 ชนิด คือ อาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ และอาหารเหลวชนิด define medium ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่า

ในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบลูกผสมทั้ง 20 เชื้อ สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสออกมาย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลสได้ และมีแอคติวิตีของไซแลนเนสสูงกว่าที่เชื้อ *Streptomyces sp.190-1* สร้างขึ้น แต่ยังให้แอคติวิตีต่ำกว่า *Streptomyces sp. 42-9* ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ กลุ่มเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 0.82-1.04 หน่วยต่อ มล. มี 5 เชื้อ ได้แก่หมายเลข 3,11,18,22 และ 35 และเชื้อที่ให้แอคติวิตีปานกลาง อยู่ในช่วง 0.50-0.76 หน่วยต่อมล. มี 8 เชื้อ ได้แก่ เชื้อหมายเลข 6,8,17,19,23,24,27 และ 40 ส่วนเชื้อที่ให้แอคติวิตีค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 0.28-0.47 หน่วยต่อมล. มี 7 เชื้อ ได้แก่ 4,5,9,10,26,37 และ 38

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์ ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ โดยเชื้อ *Streptomyces sp. 42-9* ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ จะสร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้น 7.1 เท่า คือ สร้างเอนไซม์ได้สูงถึง 9.10 หน่วยต่อมล. ซึ่งจากเดิมสร้างเอนไซม์ได้ 1.28 หน่วยต่อมล.ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ กลุ่มเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารชนิดนี้มี 4 เชื้อ ได้แก่ เชื้อหมายเลข 11,18,22 และ 23 มีแอคติวิตีในช่วง 8.18-8.64 หน่วยต่อมล. ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ *Streptomyces sp.42-9* ส่วนเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้ปานกลาง ในช่วง 6.23-7.71หน่วยต่อมล. มี 8 เชื้อ ได้แก่เชื้อหมายเลข 3,5,8,9,17,26,35 และ 40 เชื้อ



รูปที่ 10 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) ของลูกผสมที่คัดเลือกได้ทั้ง 20 เชื้อ มีตำแหน่งของเชื้อหมายเลขต่างๆ ดังนี้



ที่ให้แอคติวิตีค่อนข้างต่ำมี 8 เชื้อ ได้แก่ เชื้อหมายเลข 4,6,10,19,24,27,37,38 ให้แอคติวิตีในช่วง 3.97-5.92 หน่วยต่อ มล. ผลดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสของลูกผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

เชื้อ	กากรำข้าว		ไซแลน	
	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)	วันที่ให้แอคติวิตีสูงสุด	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)	วันที่ให้แอคติวิตีสูงสุด
3	0.95	5	6.33	6
4	0.47	6	5.86	6
5	0.33	6	6.87	7
6	0.56	6	4.15	7
8	0.57	8	7.02	7
9	0.35	8	6.64	7
10	0.42	6	4.09	7
11	0.82	9	8.26	9
17	0.67	4	6.23	8
18	0.84	8	8.26	8
19	0.50	7	5.98	8
22	0.87	7	8.18	7
23	0.76	5	8.64	7
24	0.67	8	5.92	8
26	0.28	7	7.25	7
27	0.64	7	5.40	7

ตารางที่ 9 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสของลูกผสมเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (ต่อ)

เชื้อ	กากรำข้าว		ไซแลน	
	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)	วันที่ให้แอคติวิตีสูงสุด	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)	วันที่ให้แอคติวิตีสูงสุด
35	1.04	6	7.71	8
37	0.30	8	3.97	8
38	0.41	8	4.46	6
40	0.59	4	7.51	8
190-1	0.25	6	1.77	7
42-9	1.28	7	9.10	7

ตารางที่ 10 สรุปการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลนเนสของลูกผสมที่คัดเลือกได้

เชื้อหมายเลข	แอคติวิตี	
	กลูโคสไอโซเมอเรส (หน่วยต่อกรัม นน.แห้ง)	ไซแลนเนส(ไซแลน) (หน่วยต่อ มล.)
3	674.00	6.33
4	842.51	5.86
5	798.33	6.86
6	683.22	4.15
8	778.99	7.02
9	1001.08	6.64
10	739.01	4.09
11	848.64	8.26
17	746.34	6.23
18	828.36	8.26
19	646.28	5.98
22	899.60	8.18
23	908.16	8.64
24	719.12	5.92
26	783.16	7.25
27	636.19	5.40
35	685.60	7.71
37	896.86	8.97
38	939.08	4.46
40	747.64	7.51
190-1	1279.31	1.77
42-9	375.53	9.10

สรุปสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเกิดและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์

ภาชนะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ YEME ที่ไม่เติมไกลซีน

อายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการรีเจนเนอเรทของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 50-55 ชั่วโมง

สภาวะที่ใช้ในการรีเจนเนอเรท คือ เจือจางโปรโตพลาสท์ในบัฟเฟอร์ P หรือ 0.01 % SDS เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ขึ้นได้บนอาหาร R_2

ลักษณะพิเศษของเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกลูกผสม ได้แก่

ใน *Streptomyces sp.190-1* คือ ความสามารถในการต้านยาเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัมต่อ มล.

ใน *Streptomyces sp.42-9* คือ ความสามารถในการต้านยาแอมพิซิลิน 30 ไมโครกรัมต่อ มล.

ใน *Streptomyces sp.42-9/pIJ4027* คือ ความสามารถในการต้านยาอีริโทรมัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อ มล.

ลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์และให้ปริมาณของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ค่อนข้างสูง มีจำนวน 4 เชื้อ ได้แก่ เชื้อหมายเลข 11,18.22,23 โดยให้แอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสในช่วง 828.36-908.19 หน่วยต่อกรัม นน.แห้ง และสร้างไซแลนเนสในช่วง 8.18-8.64 หน่วยต่อ มล.

โดยสรุป งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ สามารถสร้างลูกผสมของ *Streptomyces* ที่สร้างได้ทั้งกลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลนเนส ด้วยวิธีการเชื่อม โปรโตพลาสท์