

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวน

ลิแวนเป็นพรุกแทนที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยการใช้น้ำตาลที่มีพรุกโทสหรือซูโครสเป็นองค์ประกอบ ลิแวนเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นยางเหนียว ละลายน้ำได้ดี ลิแวนมักพบได้ในขนมหวานประเภทที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนผสมหลัก เช่น ข้าวต้มมัด ข้าวเหนียวหน้าต่าง ๆ และบะจ่าง โดยจะสังเกตุได้ง่ายขึ้นเมื่อเก็บขนมดังกล่าวไว้จนเริ่มบูดเน่าจะพบยางเหนียวในขนม ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ข้าวต้มมัด บะจ่าง ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง ข้าวเหนียวหน้ากุ้ง และข้าวเหนียวหน้าสังขยา อย่างละ 5 ตัวอย่าง จากตลาดยิ่งเจริญ เขตสายไหม กรุงเทพมหานคร โดยเลือกซื้อตัวอย่างขนมจากผู้ขายที่ทำขนมชนิดนั้น ๆ ขึ้นเอง เพื่อเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พยายามคัดเลือก เก็บตัวอย่างในวันเสาร์ที่ 25 กุมภาพันธ์ 2549 เวลา 7.00 - 9.00 น. วางตัวอย่างขนมชนิดต่าง ๆ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างขนมชนิดละ 5 กรัมมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร คนจนเข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งให้ตะกอนนอนก้น แล้วนำส่วนใสด้านบนมาเจือจาง ดังแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ได้จากการเจือจางมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ตั้งทิ้งข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้องเลือก จุลินทรีย์ที่ปล่อยสารเมือกออกมานอกเซลล์ได้มาเลี้ยงซ้ำ จนได้จุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารเมือกตามชนิดของขนมไทย

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงรหัสชื่อแบคทีเรียที่เก็บมาคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวน

| ลำดับที่ | ชนิดอาหาร | รหัสชื่อ | ลักษณะของสารเมือก | | |
|----------|-------------------------|----------|-------------------|---------|-------------|
| | | | ความขุ่น | สี | ความเหนียว* |
| 1 | ข้าวต้มมัด 1 | ABK-1a | ใส | ไม่มีสี | +++ |
| | | ABK-1b | ใส | ไม่มีสี | + |
| 2 | ข้าวต้มมัด 2 | ABK-2a | ใส | ไม่มีสี | ++ |
| | | ABK-2b | ใส | ไม่มีสี | + |
| | | ABK-2c | ขุ่น | ไม่มีสี | + |
| 3 | ข้าวต้มมัด 3 | ABK-3a | ใส | เหลือง | +++ |
| 4 | ข้าวต้มมัด 4 | ND | - | - | - |
| 5 | ข้าวต้มมัด 5 | ABK-5a | ใส | เหลือง | +++ |
| 6 | บะจ่าง 1 | BBK-1a | ใส | ไม่มีสี | +++ |
| 7 | บะจ่าง 2 | BBK-2a | ใส | ไม่มีสี | +++ |
| | | BBK-2b | ใส | ไม่มีสี | +++ |
| | | BBK-3a | ใส | เหลือง | +++ |
| 8 | บะจ่าง 3 | BBK-3a | ใส | เหลือง | +++ |
| 9 | บะจ่าง 4 | BBK-4a | ใส | เหลือง | +++ |
| 10 | บะจ่าง 5 | BBK-5a | ใส | ไม่มีสี | +++ |
| | | BBK-5b | ใส | ไม่มีสี | ++ |
| 11 | ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง 1 | ND | - | - | - |
| 12 | ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง 2 | ND | - | - | - |
| 13 | ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง 3 | CBK-3a | ขุ่น | ไม่มีสี | + |
| 14 | ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง 4 | ND | - | - | - |
| 15 | ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง 5 | CBK-5a | ใส | ไม่มีสี | ++ |

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงรหัสชื่อแบคทีเรียที่เก็บมาคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวน (ต่อ)

| ลำดับที่ | ชนิดอาหาร | รหัสชื่อ | ลักษณะของสารเมือก | | |
|----------|------------------------|----------|-------------------|---------|-----------|
| | | | ความขุ่น | สี | ความหนืด* |
| 16 | ข้าวเหนียวหน้ากึ่ง 1 | ND | - | - | - |
| 17 | ข้าวเหนียวหน้ากึ่ง 2 | DBK-2a | ขุ่น | ไม่มีสี | ++ |
| 18 | ข้าวเหนียวหน้ากึ่ง 3 | DBK-3a | ขุ่น | ไม่มีสี | + |
| | | DBK-3b | ใส | ไม่มีสี | + |
| 19 | ข้าวเหนียวหน้ากึ่ง 4 | ND | - | - | - |
| 20 | ข้าวเหนียวหน้ากึ่ง 5 | DBK-5a | ใส | ไม่มีสี | ++ |
| 21 | ข้าวเหนียวหน้าสังขยา 1 | EBK-1a | ขุ่น | ไม่มีสี | + |
| 22 | ข้าวเหนียวหน้าสังขยา 2 | ND | - | - | - |
| 23 | ข้าวเหนียวหน้าสังขยา 3 | EBK-3a | ขุ่น | ไม่มีสี | + |
| | | EBK-3b | ใส | ไม่มีสี | + |
| 24 | ข้าวเหนียวหน้าสังขยา 4 | EBK-4a | ใส | ไม่มีสี | + |
| 25 | ข้าวเหนียวหน้าสังขยา 5 | EBK-5a | ใส | ไม่มีสี | ++ |

* เมื่อสังเกตความหนืดของสารเมือกก่อนและหลังหมวนงานเลี้ยงเชื้อไปมาด้วยตาเปล่าทำให้สามารถแบ่งจุลินทรีย์ได้ 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่รูปร่างของสารเมือกรอบโคโลนีมีคงรูปร่างเดิมได้ แทนความหนืดด้วย +++

กลุ่มที่รูปร่างของสารเมือกรอบโคโลนีมีคงรูปร่างเดิมได้ แทนความหนืดด้วย +++

กลุ่มที่รูปร่างของสารเมือกรอบโคโลนีเปลี่ยนแปลง แต่ยังคงรูปอยู่ได้ แทนความหนืดด้วย ++

กลุ่มที่รูปร่างของสารเมือกรอบโคโลนีไม่สามารถคงรูปร่างเดิมได้ แทนความหนืดด้วย +

ND; non-detected ไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมือก

จากการทดลองพบว่าข้าวต้มมัดเป็นตัวอย่างขนมที่เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารเมือกที่ดีกว่าตัวอย่างขนมชนิดอื่น โดยสารเมือกที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในขนมนี้มีลักษณะที่มองด้วยตาเปล่าที่แตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 4.1 ทำให้สามารถแบ่งจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมือกออกเป็น 3 กลุ่มตามความหนืดของสารเมือก คือ จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมือกที่มีความหนืดสูง ได้แก่ ABK-1a ABK-3a ABK-5a BBK-1a BBK-2a BBK-2b BBK-3a BBK-4a และ BBK-5a จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมือกที่มีความหนืดปานกลาง ได้แก่ ABK-2a BBK-5b CBK-5a DBK-2a DBK-5a และ EBK-5a จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมือกที่มีความหนืดต่ำ ได้แก่ ABK-1b ABK-2b ABK-2c CBK-3a DBK-3a DBK-3b EBK-1a EBK-3a EBK-3b และ EBK-4a

ความหนืดของสารเมือกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะเป็นปัจจัยกำหนดมวลโมเลกุลของสารเมือก โดยสารเมือกที่มีความหนืดสูงมักจะเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ส่วนพอลิเมอร์ที่มีความหนืดต่ำนั้นมักจะมีมวลโมเลกุลต่ำ มวลโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิแวนจะเป็นตัวกำหนดประโยชน์ใช้สอยของพอลิเมอร์กล่าวคือ พอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงนิยมใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหาร เช่น ไอศกรีมเพื่อสุขภาพ เนื่องจากลิแวนเป็นสารที่ให้พลังงานน้อยและยังเป็นสารพรีไบโอติกอีกด้วย (Cumming และคณะ, 2001) ส่วนพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำนั้นมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการขยายขนาดของเซลล์เนื้องอกได้ (Yoo และคณะ, 2004)

จุลินทรีย์สามารถผลิตสารเมือกได้หลายชนิด สารเมือกที่สร้างขึ้นนี้โดยมากเป็นสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ จึงเรียกรวมกันว่า แอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) หรือพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งมีหลายประเภท เช่น แดรกซ์แทน (dextran) และฟรุคแทน (fructan) โดยฟรุคแทนนั้นมีน้ำตาลฟรุคโทสเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะอาศัยสมบัติดังกล่าวตรวจสอบพอลิ

แซคคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์เบื้องต้น โดยทำปฏิกิริยาซาลิวานอฟฟ์ (Saliwanoff's reaction) เพื่อทดสอบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อน้ำตาลคีโทส (ketose) ทำให้สามารถแยกพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลคีโทสเป็นองค์ประกอบออกจากน้ำตาลชนิดอื่นได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิเมอร์จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 25 ชนิด ด้วยปฏิกิริยาซาลิวานอฟฟ์

| รหัสชื่อ | ผลจากปฏิกิริยาซาลิวานอฟฟ์* | น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ | รหัสชื่อ | ผลจากปฏิกิริยาซาลิวานอฟฟ์* | น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ |
|----------|----------------------------|-------------------------|----------|----------------------------|-------------------------|
| ABK-1a | + | คีโทส | BBK-5b | - | อัลโดส |
| ABK-1b | - | อัลโดส | CBK-3a | - | อัลโดส |
| ABK-2a | - | อัลโดส | CBK-5a | - | อัลโดส |
| ABK-2b | - | อัลโดส | DBK-2a | + | คีโทส |
| ABK-2c | - | อัลโดส | DBK-3a | - | อัลโดส |
| ABK-3a | - | อัลโดส | DBK-3b | - | อัลโดส |
| ABK-5a | - | อัลโดส | DBK-5a | - | อัลโดส |
| BBK-1a | - | อัลโดส | EBK-1a | - | อัลโดส |
| BBK-2a | - | อัลโดส | EBK-3a | - | อัลโดส |
| BBK-2b | + | คีโทส | EBK-3b | - | อัลโดส |
| BBK-3a | - | อัลโดส | EBK-4a | - | อัลโดส |
| BBK-4a | - | อัลโดส | EBK-5a | - | อัลโดส |
| BBK-5a | - | อัลโดส | | | |

ผลจากปฏิกิริยาซาลิวานอฟฟ์ (+) สารละลายสีแดงเล็กน้อย (-) สารละลายสีเหลือง-เขียว

จากตารางที่ 4.2 เมื่อนำพอลิแซคคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ที่ผ่านไฮโดรไลซิสด้วยกรดจากแบคทีเรียทั้ง 25 ชนิด มาทำปฏิกิริยาซาลิวานอฟซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อน้ำตาลคีโทส พบว่าพอลิเมอร์ที่เกิดผลบวก คือเปลี่ยนสีของสารละลายซาลิวานอฟที่เป็นสีแดงเลือดนกได้นั้นมี 3 ชนิดคือพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย ABK-1a BBK-2b และ DBK-2a

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์สร้างพอลิแซคคาไรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ในกลุ่มของแตรกซ์แตนซึ่งมีน้ำตาลอัลโดสเป็นองค์ประกอบมากกว่าพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลคีโทสเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากในธรรมชาติจุลินทรีย์สร้างแอกโซพอลิแซคคาไรด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดึงอาหารเข้าสู่เซลล์ โดยมักจะพบแอกโซพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้อยู่รอบๆ เซลล์ ในรูปที่พร้อมจะดึงเข้าเซลล์ได้ทันที เมื่อจุลินทรีย์ต้องการอาหารก็จะดึงเอาแตรกซ์แตนซึ่งมีกลูโคสเป็นหน่วยย่อยเข้าสู่เซลล์ ซึ่งกลูโคสที่ได้จากแตรกซ์แตนนี้เป็นน้ำตาลในรูปที่ส่งเข้าวัฏจักรไกลโคลิซิสใช้สร้างพลังงานให้แก่เซลล์ได้ทันที ในขณะที่น้ำตาลคีโทสซึ่งเป็นส่วนประกอบในฟรุกแทนนั้นต้องถูกเปลี่ยนเป็นฟรุกโทส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) ก่อนจึงจะส่งเข้าวัฏจักรไกลโคลิซิสได้ ทำให้จุลินทรีย์มักจะสร้างแตรกซ์แตนมากกว่าพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลคีโทสเป็นองค์ประกอบ

แต่อย่างไรก็ตามพอลิคีโทสที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนั้นอาจจะไม่ใช่ฟรุกแทน โดยอาจเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลคีโทสชนิดอื่น เช่น ทากาโทส (tagatose) ซอร์โบส (sorbose) และไซลูโลส (xylulose) ดังนั้นจึงต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ในการทดลองขั้นต่อไป

การผลิตพอลิแซ็กการไรรด์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์

ในการผลิตพอลิเมอร์จากแบคทีเรียทั้งสามชนิดนั้นทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LPM ปริมาตร 100 mL โดยในอาหารดังกล่าวมีซูโครส (กลูโคสและฟรุกโทสอย่างละ 1 mole) เป็นส่วนผสมอยู่ 10 กรัม ดังนั้นสามารถอนุมานได้ว่าในอาหาร LPM มีฟรุกโทสอยู่ 5 กรัม จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียทั้งสามชนิดผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

| รหัสชื่อ | ลักษณะพอลิเมอร์ | ความหนืด* | น้ำหนักแห้ง (g) | การเปลี่ยนฟรุกโทสเป็นพอลิเมอร์ (%) |
|----------|-----------------|-----------|--------------------|---------------------------------------|
| ABK-1a | เส้นใยสีขาว | +++ | 0.75 | 30 |
| BBK-2b | เส้นใยสีขาว | +++ | 1.4 | 56 |
| DBK-2a | เส้นใยสีขาว | + | 0.35 | 14 |

* ความหนืดเมื่อละลายพอลิเมอร์ 0.1 กรัม ในน้ำ 1 mL

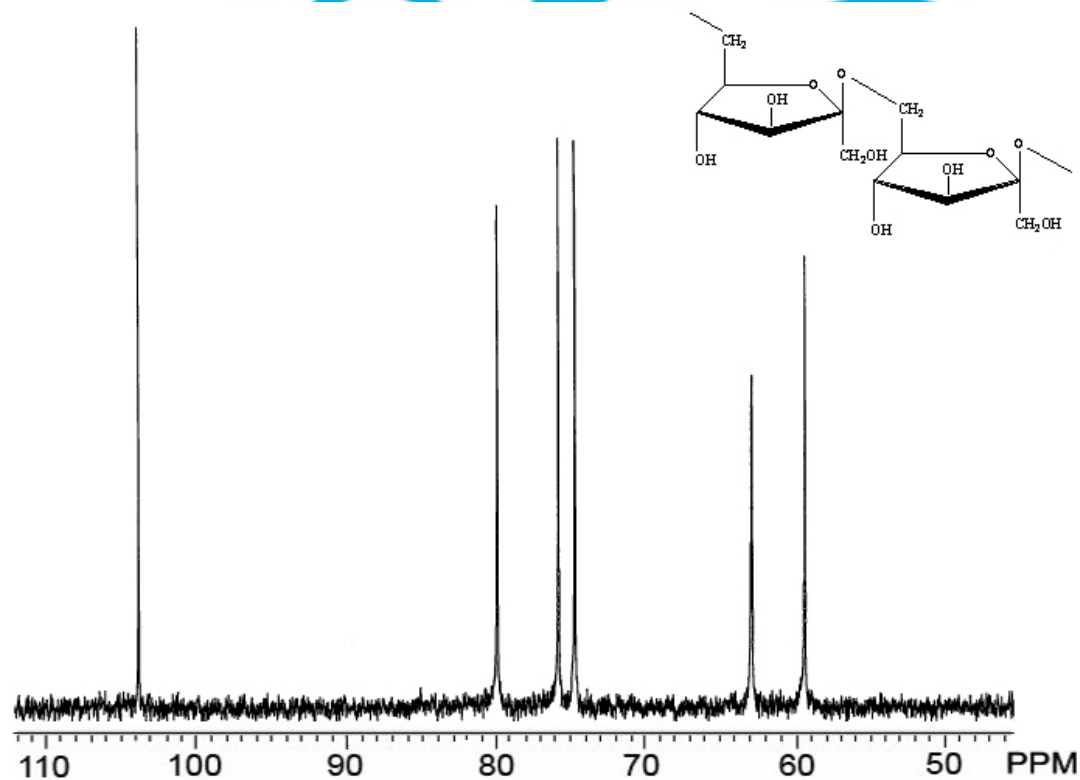
จากตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรีย BBK-2b ผลิตพอลิเมอร์ได้มากกว่าแบคทีเรีย ABK-1a และ DBK-2a ประมาณ 2 และ 4 เท่าตามลำดับ โดยแบคทีเรีย BBK-2b สามารถเปลี่ยนฟรุกโทสเป็นพอลิเมอร์ได้มากกว่า 50 %

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดกับแอกโซพอลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตลิแวนเพื่อการค้าในปัจจุบัน เช่น ลิแวนจาก *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi และ *Rahnella aquatilis* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนฟรุกโทสเป็นพอลิเมอร์ 98% และ 54% (Shin และคณะ, 2005 และ Kim และคณะ, 1998) จึงให้เห็นว่าแบคทีเรีย BBK-2b เป็นตัวเลือกที่ดีในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณมากเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย BBK-2b ด้วย ^{13}C -NMR

เมื่อนำพอลิเมอร์จาก BBK-2b ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^{13}C -NMR พบสัญญาณของธาตุคาร์บอน (carbon signal) จำนวน 6 สัญญาณ ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองที่ C-2 resonance ($\delta = 104$) ซึ่งให้ว่าพอลิเมอร์มีน้ำตาลในรูปปีต้า-ฟรุกโทฟูแรนโนส (β -fructofuranose) เป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบ chemical shift ของพอลิเมอร์จาก BBK-2b กับฟรุกแทนจาก *Lactobacillus reuteri* 121 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แล้ว พบว่าพอลิเมอร์จาก BBK-2b มี chemical shift คล้ายกับลิแวนจาก *Lactobacillus reuteri* 121 ซึ่งมีโครงสร้างแบบ $[\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D}\text{-fructofuranose (2}\rightarrow)]_n$ (Van Hijum และคณะ, 2001)



แผนภาพที่ 4.1 ^{13}C -NMR ของลิแวนที่ผลิตโดย BBK-2b

ตารางที่ 4.4 ตารางเปรียบเทียบ chemical shift ที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ ระหว่างลิแกนด์จาก BBK-2b และ *Lactobacillus reuteri* 121

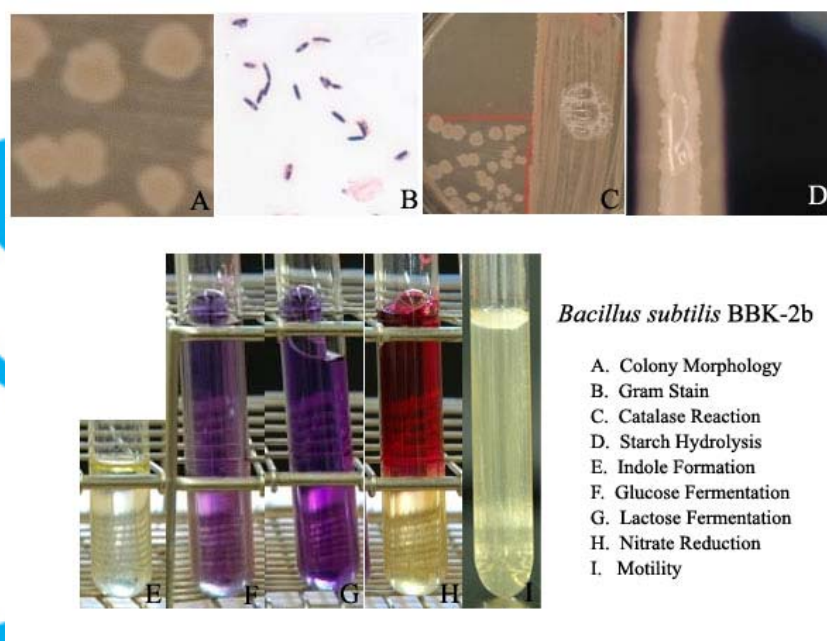
| $^{13}\text{C-NMR}$ | ลิแกนด์จาก BBK-2b | ลิแกนด์จาก <i>Lactobacillus reuteri</i> 121 |
|---------------------|-------------------|---|
| C-1 | 59.5 | 59.6 |
| C-2 | 103.8 | 104.0 |
| C-3 | 75.8 | 76.0 |
| C-4 | 74.8 | 74.9 |
| C-5 | 79.8 | 80.0 |
| C-6 | 62.9 | 63.2 |

การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างลิแกนด์โดยการเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมี

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-2b มาศึกษาพื้นฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-2b ที่เจริญบนอาหาร LB มีโคโลนีสีขาว เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร โคโลนีแบน ขอบไม่เรียบ (undulate) บางโคโลนีมีขอบคล้ายหนามและหาง (spiking and tailing) ขึ้นออกตามรอยเข็ม ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.2 BBK-2b เป็นแบคทีเรียที่ย้อมแกรมติดสีน้ำเงิน หรือมีแกรมบวก (gram positive) สร้างสปอร์เป็นรูปไข่ (oval) อยู่ด้านปลายของเซลล์ เมื่อนำ BBK-2b มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ catalase ได้ ไม่สามารถสร้าง Idole ได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถเกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส และแลคโทสได้ BBK-2b สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ แบคทีเรียนี้สามารถย่อยแป้งบนอาหารแข็งที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ (starch agar) BBK-2b ใช้ออกซิเจนในการเจริญดูจะเห็นได้จากการทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งแข็ง (motility test on semi-solid medium) ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.3 เมื่ออาศัยลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรีย BBK-2b คือ *Bacillus subtilis*



แผนภาพที่ 4.2 สัณฐานวิทยาของ *Bacillus subtilis* BBK-2b บนอาหารแข็ง



แผนภาพที่ 4.3 สัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus subtilis* BBK-2b

การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างลิแวนโดยการเปรียบเทียบ 16S rRNA

จากการศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีแล้วพบว่าแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในจีนัสและสปีชีส์ใด แล้วนั้นทางคณะผู้วิจัยต้องการยืนยันผลอีกครั้ง โดยเลือกใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ซึ่งทำการทดลองโดย Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มชิ้นยีน 16S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ pA ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดง 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ pH' ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดง 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' และใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

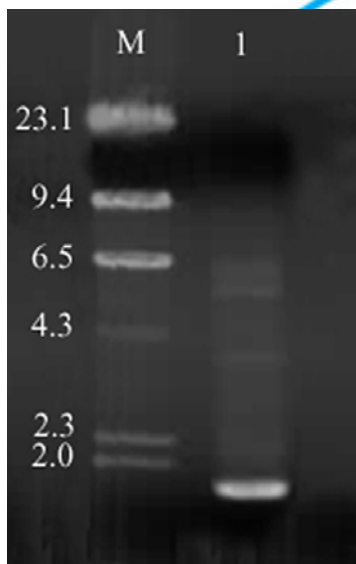
| | ปริมาณที่ใช้ | ปริมาตรที่ใช้ |
|---------------------------------|--------------|---------------|
| 2U/ μ L Vent DNA polymerase | 1 U | 0.5 μ L |
| 10 X Buffer | 1X | 5 μ L |
| 100 mM MgSO ₄ | 2 mM | 1 μ L |
| 10 pmole/ μ L pA และ pH' | 0.4 μ M | 2 μ L |
| 10 mM dNTP | 0.4 μ M | 1 μ L |
| Genomic DNA template | 200 ng | 0.4 μ L |
| Ultrapure water | | 0.28 |
| | ปริมาตรรวม | 50 μ L |

แล้วตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | | | | | |
|----|--------------|-------------|-------|----------|------|------|
| 1. | pre-denature | ที่อุณหภูมิ | 94 °C | เป็นเวลา | 4.00 | นาที |
| 2. | denature | ที่อุณหภูมิ | 94 °C | เป็นเวลา | 1.00 | นาที |
| 3. | annealing | ที่อุณหภูมิ | 60 °C | เป็นเวลา | 1.00 | นาที |
| 4. | extension | ที่อุณหภูมิ | 72 °C | เป็นเวลา | 2.00 | นาที |

ทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานในขั้นตอน 2 - 4 จำนวน 25 รอบ และในรอบสุดท้ายตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานที่ 72 ° C ต่อไปอีก 2 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบขนาดโดยการทำ agarose gel electrophoresis ซึ่งได้ผลดังแผนภาพที่ 4.4 จากการทดลองพบว่า PCR product ที่ได้ นั้น มีดีเอ็นเอ 16S rRNA ซึ่งมีขนาด 1.6 kb เป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากนั้นนำ PCR product ไปเติมเบสอะดีนีน โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของ Taq DNA Polymerase แต่อย่างไรก็ตามในปฏิกิริยายังมีดีเอ็นเออื่น ๆ ปนมาด้วย จึงต้องนำ PCR product ดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการตัดดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.6 kb ออกจาก agarose gel แล้วนำไปผ่าน Qiaquick Gel Extraction Kit เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ขึ้น

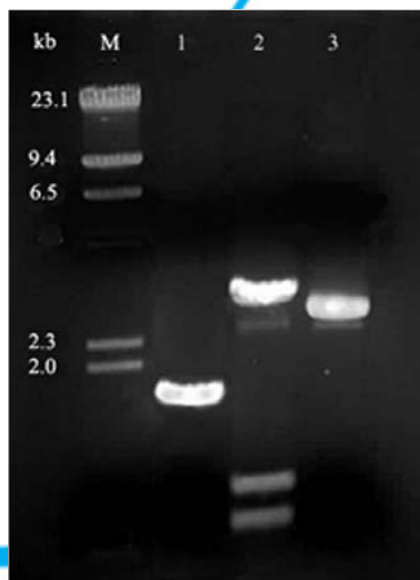
นำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-Easy แล้วส่งเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top-10 แล้วคัดเลือก *E. coli* ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอพาหะที่มีชิ้น 16S rRNA แทรกอยู่โดยวิธี blue-white screening สกัดดีเอ็นเอพาหะออกจากเซลล์ *E. coli* แล้วนำไปตัดที่ตำแหน่งจำเพาะด้วย *EcoRI* จากนั้นนำ ดีเอ็นเอพาหะที่ได้ มาตรวจสอบขนาดโดยการทำ agarose gel electrophoresis ซึ่งได้ผลดังแผนภาพที่ 4.5 จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนชิ้น 16s rRNA โดยเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะได้จริง ดังจะเห็นได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 900 base pair หลุดออกมาจากดีเอ็นเอพาหะขนาด 3.3 kb โดยเรียกดีเอ็นเอพาหะที่มีชิ้น 16S rRNA แทรกอยู่นี้ว่า p16s



แผนภาพที่ 4.4 แสดงยีน 16S rRNA จาก BBK-2b ที่เพิ่มจำนวนโดยการทำให้ PCR โดยใช้ Primer pA และ pH⁺ ได้ ยีนยีนขนาดประมาณ 1600 bp

โดยกำหนดให้ lane M เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda/HinDIII$

lane 1 เป็น PCR product ขนาด 1.6 kb



แผนภาพที่ 4.5 แสดงยีน 16S rRNA ที่ถูกตัดออกจากดีเอ็นเอพหุ โดยการตัดที่บริเวณจำเพาะด้วย *EcoRI*

โดยกำหนดให้ lane M ดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda/HindIII$

lane 1 PCR product ขนาด 1.6 kb ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

lane 2 p16s/*EcoRI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 0.9 และ 0.7 bp

lane 3 p16s ที่ยังไม่ผ่านการตัดด้วย *EcoRI*

จากนั้นนำ p16S มหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.6 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่สามารถหาลำดับเบสได้ 1496 เมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่พบว่ายีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย BKK-2b เหมือนกับ 16S rRNA ยีนของ *Bacillus subtilis* strain KD-1 99% ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.7 จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-2b คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งสอดคล้องกับผลการระบุชนิดโดยสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี

TCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCAATCCACTAGTGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAC
 GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
 ACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
 CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
 TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA
 GGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
 GGCGAARGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
 GACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCG
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGG
 GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
 TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
 CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
 CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG
 TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

แผนภาพที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนจากเชื้อเอ็นเอของแบคทีเรีย BKK-2b

ด้วยไพเมอร์ pA และ pH⁺ โดยยีน 16S rRNA นี้มีขนาด 1496 bp

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Sequence 1: BKK-2b 1496 bp

Sequence 2: *B.subtilis* 1360 bp

Sequences (1:2) Aligned. Score: 99

```

BKK-2b          TCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATCCACTAGTGATTAGAGTTTGATCCT 60
B.subtilis    -----

BKK-2b          GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAG 120
B.subtilis    -----GAGCGGACAGATGGGAG 17
                *****

BKK-2b          CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA 180
B.subtilis    CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA 77
                *****

BKK-2b          CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCA 240
B.subtilis    CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCA 137
                *****

BKK-2b          GACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG 300
B.subtilis    AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG 197
                *****

BKK-2b          GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC 360
B.subtilis    GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC 257
                *****

BKK-2b          ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA 420
B.subtilis    ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA 317
                *****

BKK-2b          TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGC 480
B.subtilis    TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGC 377
                *****

BKK-2b          TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCCGTTCAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAAC 540
B.subtilis    TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC 437
                *****

BKK-2b          CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG 600
B.subtilis    CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG 497
                *****

BKK-2b          TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC 660
B.subtilis    TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC 557
                *****

BKK-2b          CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG 720
B.subtilis    CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG 617
                *****

```

```

BKK-2b      GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCG 780
B.subtilis GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCG 677
*****

BKK-2b      ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT 840
B.subtilis ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT 737
*****

BKK-2b      ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA 900
B.subtilis ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA 797
*****

BKK-2b      GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC 960
B.subtilis GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC 857
*****

BKK-2b      AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC 1020
B.subtilis AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC 917
*****

BKK-2b      GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG 1080
B.subtilis GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG 977
*****

BKK-2b      GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA 1140
B.subtilis GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA 1037
*****

BKK-2b      AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTAAG 1200
B.subtilis AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTAAG 1097
*****

BKK-2b      GTGACTGCCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA 1260
B.subtilis GTGACTGCCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA 1157
*****

BKK-2b      TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT 1320
B.subtilis TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT 1217
*****

BKK-2b      AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA 1380
B.subtilis AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA 1277
*****

BKK-2b      GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT 1440
B.subtilis GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT 1337
*****

BKK-2b      ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC 1496
B.subtilis ACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC 1360
*****

```

แผนภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน 16S rRNA ของ *Bacillus subtilis* BKK-2b

กับ *Bacillus subtilis* KD-1 โดยการทำให้ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม

CLUSTAL W (1.83) โดยตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์ต่างกัน ลำดับเบสแทนด้วยสีแดง