TH1000010

# การปรับปรุงการผลิตวิตามินบีหกโดยการฉายรังสีแกมมา ในเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน

# Improvement of Vitamin B-6 Production by Gamma Radiation in Bacterial Isolates from Soil Sample

ยานี ตรองพาณิชย์[1] ชิดชนก อนุตระกูลชัย[1] และ ณัฐธยาน์ เปียแดง[2]
Yanee Trongpanich[1], Chitchanok Anutrakunchai[1] and Nattayana Piadang[2]

## บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 ซึ่งคัดแยกจากดิน สามารถผลิตวิตามินบีหกในรูปของ pyridoxamine เป็นหลักในปริมาณ 0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูงกว่า 40°C การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวิตามินบีหกของเชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 ให้สามารถผลิตวิตามินบีหกในอุณหภูมิที่สูงขึ้นโดยการใช้รังสีแกมมา เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรม ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณความเข้มรังสีในระดับ 0.8 – 1 kGy พบเชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50°C จำนวน 677 isolates เมื่อตรวจวัดการผลิตวิตามินบีหกต่อปริมาณโปรตีน พบ 4 isolates ที่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้ปริมาณสูง ได้แก่ 08-361 10-3 10-94 และ 10-98 จากการศึกษาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหก พบเชื้อกลายพันธุ์ 08-361 มีปริมาณการผลิตวิตามินบีหกสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ แต่มีปริมาณการผลิตลดลงเมื่อเทียบกับการคัดเลือกในครั้งแรก รูปของวิตามินบีหกที่เชื้อพันธุ์กลายทั้ง 4 isolates ผลิตขึ้นไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ปกติ การศึกษาในอนาคต จะเป็นการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการคงตัวของสายพันธุ์

**คำสำคัญ:** วิตามินบีหก แบคทีเรีย การกลายพันธุ์ รังสีแกมมา

## Abstract

A vitamin B-6 producing bacterium, *Rhizobium* sp. 6.1C1 was isolated from soil and produced vitamin B-6 (mainly pyridoxamine) 0.27 mg per liter. *Rhizobium* sp. 6.1C1 is mesophile bacterium which was not able to grow at over 40°C. The objective of this study was to improve vitamin B-6 production in high temperature by gamma radiation. The result showed that 677 mutant isolates which were obtained from irradiation dose 0.8 and 1 kGy, were able to grow at 50°C. Only 4 isolates (08-361, 10-3, 10-94 and 10-98) showed high amount of vitamin B-6 per mg protein. From the results of optimum temperature and initial pH of medium showed that isolate 08-361 showed higher amount of vitamin B-6 than wild type. However, this value of vitamin B-6 from this mutant was lower than that when screening. Forms of produced vitamin B-6 from mutant were identified by HPLC. The result showed produced vitamin B-6 were PM and PMP, similar with wild type. Effect of gamma radiation on stability of mutant is further study.

**Keywords:** vitamin B-6, bacteria, mutation, gamma radiation

[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2] สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ จตุจักร กรุงเทพ 10900

## คำนำ

วิตามินบีหกเป็นวิตามินที่ละลายน้ำ สามารถทนความร้อนในสภาวะที่เป็นกรดแต่ไม่ทนต่อแสง ซึ่งร่างกายคนและสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ ประกอบด้วย 6 รูป ได้แก่ Pyridoxine (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamine (PM) และอีก 3 รูปที่รวมอยู่กับฟอสเฟตในรูปของฟอสเฟตเอสเทอร์ ได้แก่ Pyridoxine 5'-phosphate (PNP), Pyridoxal 5'-phosphate (PLP), Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP) ทำหน้าที่เป็นโคเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ทั้งยังมีความสำคัญในเมตาบอลิซึมของเม็ดเลือดแดง รวมถึงการทำงานในระบบประสาทด้วย (Leklem, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าวิตามินบีหกสามารถช่วยลดภาวะเครียด(McCarty, 2000) และมีผลต่อการเสริมสร้างผิวพรรณให้แข็งแรง (Coburn *et al.,* 2003) รวมถึงสามารถจับกับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้หยุดการทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเรื้อรังเช่น เบาหวาน โรคที่เกี่ยวข้องกับการทำลายระบบประสาท (neurodegenerative diseases) หรือภาวะชราตามปกติ (normal physiological aging) (Kang *et al.*, 2005)

ในปัจจุบันวิตามินบีหกได้รับความนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารเสริมและเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารเครื่องสำอาง เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้า ทั้งยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตอีกด้วย เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ สำหรับประเทศไทยนั้นจากสถิติการนำเข้าที่ผ่านมาในช่วงปี 2544-2547 มีการนำเข้าวิตามินบีหกเฉลี่ยถึง 9-10 ล้านบาทต่อเดือน (กรมศุลกากร, 2548)

ปัจจุบันการผลิตวิตามินบีหกทางอุตสาหกรรม ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) (Lin, 2003) การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตวิตามินบีหก จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตวิตามินบีหกได้ (Mittenhuber, 2001) จากงานวิจัยที่ได้ทำก่อนหน้านี้ พบเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 ซึ่งคัดแยกจากดิน สามารถผลิตวิตามินบีหกในรูปของ pyridoxamine เป็นหลัก (Phimwapi *et al.*, 2005) ซึ่งผลิตได้ในปริมาณ 0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 เป็น mesophile ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 25-40°C

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 ในการผลิตวิตามินบีหก เพื่อให้ทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรม

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 ที่ผ่านการฉายรังสี

#### 1.1 การฉายรังสีเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์

แบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 สายพันธุ์ดั้งเดิม ถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร SM เพื่อวัดปริมาณเซลล์ (Colonies Forming Unit (CFU)/ml) เทียบกับค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 600 nm เพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการฉายรังสี จากนั้นปริมาณเชื้อที่เหมาะสม จะถูกนำไปฉายรังสี ที่ความเข้ม 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 kGy ตามลำดับ อัตราการฉายรังสี (dose rate) เท่ากับ 10.588 kGy/ชั่วโมง โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ปรมาณูวิจัย (TRR-1/M1) โดยมี $^{60}$Co เป็นแหล่งพลังงาน ที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ เชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 ที่ถูกฉายแสง จะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง SM ที่อุณหภูมิ 50°C เพื่อคัดแยกเชื้อที่ทนต่ออุณหภูมิสูงและผลิตวิตามินบีหก

#### 1.2 การวัดปริมาณวิตามินบีหกโดย agar diffusion assay (Phimwapi *et al.*, 2005)

เชื้อยีสต์ *S. carlsbergensis* ATCC 9080 ถูกเลี้ยงในอาหารแข็ง YM ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ย้ายเซลล์

ยีสต์ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มล. และวัดความขุ่นที่ OD 600 nm ให้เท่ากับ 1 เติมเซลล์ยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 ลงในอาหารแข็ง PAM ปริมาตร 20 มล. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. ตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณวิตามินบีหก (30 µl) จะถูกหยอดลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด

ปริมาณวิตามินบีหกจะถูกวัดโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของปริมาณวิตามินบีหกมาตรฐาน (0.25 – 2 ng) เนื่องจากวิธีนี้สามารถวัดปริมาณวิตามินบีหกได้เฉพาะรูปอิสระที่ไม่ได้รวมอยู่กับฟอสเฟต ดังนั้น จึงต้องมีการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากวิตามินบีหก โดย hydrolysis ด้วย 0.055 N HCl และนำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 5 M NaOH ก่อนนำไปหยอดหลุม

**1.3 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธี Dye-binding Method (Bradford, 1976)**

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร SM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อปริมาตร 500µl จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 50µl เติม 10N NaOH 20µl และน้ำกลั่น 30µl นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางในอัตราส่วน 1:10 แล้วเติม CBBG-250 1ml ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 5-10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง 595 nm นำผลที่ได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน BSA (mg/ml) โดยใช้ SM เป็น Blank

**2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. 6.1C1**

**2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. 6.1C1**

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาและสายพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหารเหลว SM ที่อุณหภูมิ 37 45 50 55 และ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ไปตรวจวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี agar diffusion assay และส่วนเซลล์แบคทีเรีย นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Dye-binding Method

**2.2 การศึกษาค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. 6.1C1**

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาและสายพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหารเหลว SM ที่มีค่า pH ของอาหารเริ่มต้น เท่ากับ 5 6 7 8 และ 9 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ไปตรวจวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี agar diffusion assay และส่วนเซลล์แบคทีเรีย นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Dye-binding Method

**3. การศึกษารูปของวิตามินบีหกที่ผลิตได้ในเชื้อ isolate ที่กลายพันธุ์ โดย วิธี reverse phase isocratic HPLC**

นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ ของเชื้อสายพันธุ์กลายและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม นำไปวิเคราะห์รูปของวิตามินบีหกที่เชื้อผลิตได้ ด้วยวิธี reverse phase isocratic HPLC (Trongpanich *et al.*, 2005)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 ที่ผ่านการฉายรังสี**

**1.1 การฉายรังสีเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์**

จำนวนเชื้อที่เหมาะสมต่อการฉายรังสีของแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 อยู่ในช่วง $0.42 \times 10^8$ - $0.657 \times 10^8$ CFU/ml จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในแต่ละความเข้มรังสี แสดงให้ดูดังตารางที่ 1 ซึ่งเมื่อนำเชื้อที่รอดชีวิตภายหลังการฉายรังสี ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง SM และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C พบว่ามีเพียงเชื้อที่ถูกฉายรังสีในระดับ 0.8 – 1 kGy เท่านั้น ที่

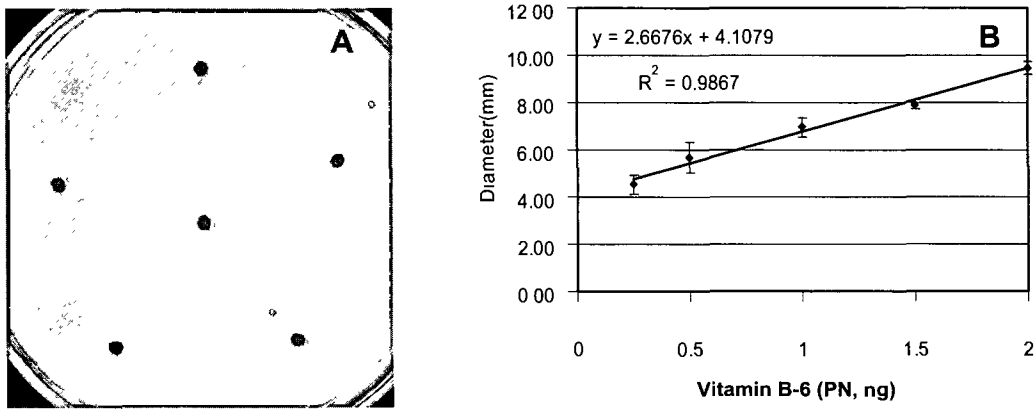
สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50°C โดย แยกเชื้อกลายพันธุ์จากการฉายรังสีที่ 0.8 kGy ได้จำนวน 570 isolates และที่ 1kGy มีจำนวน 107 isolates รวม 677 isolates จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ปริมาณความเข้มของรังสี ในระดับ 0.8 – 1 kGy เท่านั้นที่สามารถทำให้แบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนปริมาณความเข้มของรังสีที่ 2-4 kGy ไม่ปรากฏการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย

**ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในแต่ละปริมาณรังสี**

| ความเข้มของรังสี (kGy) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml) | อัตราการรอดตาย (%) |
|---|---|---|
| 0 | $5.8 \times 10^8$ | 0.0000000 |
| 0.2 | $4.1 \times 10^6$ | 0.7068965 |
| 0.4 | $3.6 \times 10^4$ | 0.0062068 |
| 0.6 | $7.7 \times 10^2$ | 0.0001327 |
| 0.8 | 100 | 0.0000172 |
| 1.0 | 80 | 0.0000137 |

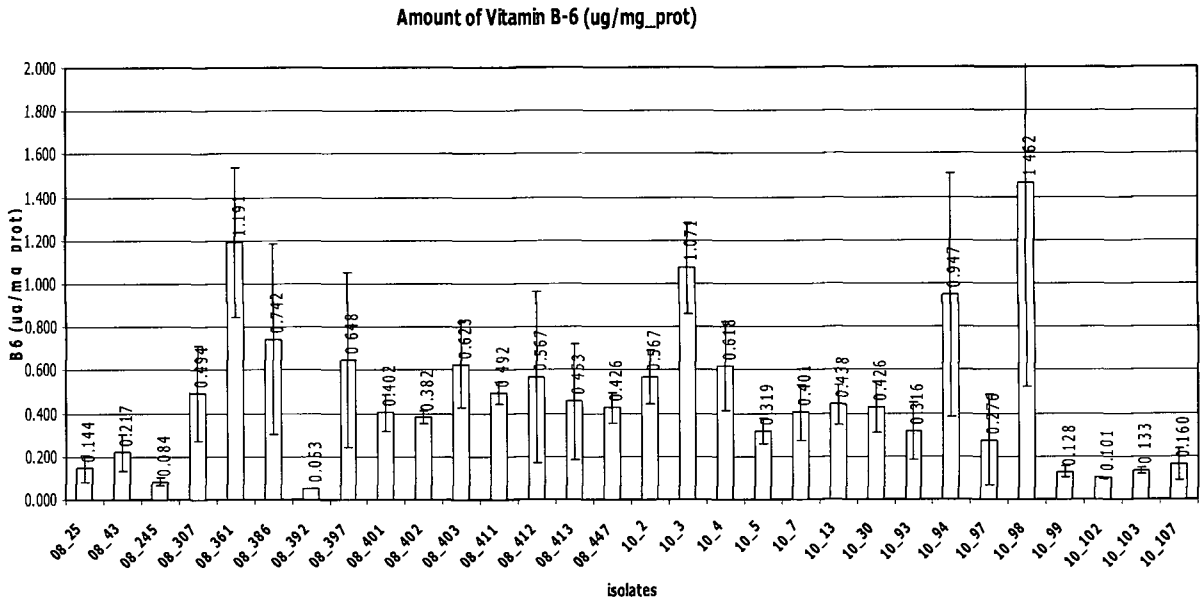
**1.2 การวัดปริมาณวิตามินบีหกโดย agar diffusion assay**

นำเชื้อพันธุ์กลายทั้งหมด (677 isolates) ที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีที่ 0.8 และ 1 kGy มาเลี้ยงในอาหารเหลว SM ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเฉพาะส่วนอาหารที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย มาตรวจหาปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี agar diffusion assay แสดงดังรูปที่ 1 เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด คัดเลือกเชื้อพันธุ์กลายที่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้สูงกว่า 0.8 μg/mg protein ซึ่งมีจำนวน 30 isolates นำเชื้อทั้ง 30 isolates มาเลี้ยงและทำการคัดเลือกอีกครั้ง พบว่าเชื้อพันธุ์กลายส่วนใหญ่ มีการผลิตวิตามินบีหกลดลง ดังรูปที่ 2 คัดเลือกเชื้อพันธุ์กลายที่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้สูงกว่า 0.8 μg/mg protein ซึ่งได้จำนวน 4 isolates ได้แก่ 08-361 10-3 10-94 และ 10-98 เพื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบีหกและรูปของวิตามินบีหกที่ผลิตขึ้นต่อไป




**รูปที่ 1 agar diffusion assay และกราฟมาตรฐานวิตามินบีหก ในรูป pyridoxine โดย A; แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงการเจริญยีสต์ ในวิตามินบีหกปริมาณ 0.25 – 2 ng ตามเข็มนาฬิกา หลุมกลางเป็นอาหาร SM ที่ไม่มีวิตามินบีหกเป็นส่วนประกอบ B; กราฟมาตรฐานวิตามินบีหก**

**1.3 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye-binding Method ปรากฏผลดังรูปที่ 2**




**รูปที่ 2 ปริมาณวิตามินบีหกต่อโปรตีนของเชื้อกลายพันธุ์ 30 isolates เชื้อถูกเลี้ยงในอาหารเหลว SM ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง**

**2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. 6.1C1**

**2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. 6.1C1**

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกของเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 สายพันธุ์ปกติและเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 4 isolates ได้แก่ 08-361, 10-3, 10-94 และ 10-98 แสดงดังตารางที่ 2 เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 4 isolates สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ตั้งแต่ที่ 37 - 50°C โดย อุณหภูมิ 37°C เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อกลายพันธุ์ 08-361, 10-3 และ 10-94 ในขณะที่ เชื้อกลายพันธุ์ 10-98 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกที่ 45°C โดยพบว่า ปริมาณวิตามินบีหกที่ได้จากเชื้อพันธุ์กลาย 08-361 และ 10-98 มีปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนั้น พบว่า เชื้อพันธุ์กลายทุกตัวไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ มากกว่า 50°C ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ขณะคัดเลือกเชื้อกำหนดอุณหภูมิให้เชื้อเจริญอยู่ที่ 50°C ถ้ากำหนดอุณหภูมิในขณะที่คัดเลือกเชื้อให้สูงกว่านี้ อาจทำให้ได้เชื้อที่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูงขึ้นได้

**2.2 การศึกษาค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อพันธุ์กลาย**

ค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกของเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. 6.1C1 สายพันธุ์ปกติและเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 4 isolates ได้แก่ 08-361, 10-3, 10-94 และ 10-98 แสดงดังตารางที่ 3 เชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 4 isolates สามารถเจริญได้ในค่า pH ที่กว้างตั้งแต่ที่ 5- 9 โดย ค่า pH ที่ 7 เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อกลายพันธุ์ 08-361 และ สายพันธุ์ปกติ ในขณะที่เชื้อกลายพันธุ์ 10-3 และ 10-98 มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกที่ 9.0 และเชื้อกลายพันธุ์ 10-94 มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกที่ 8.0 ปริมาณปริมาณวิตามินบีหกที่ได้จากเชื้อพันธุ์กลาย 08-361 มีปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ ณ ค่า pH ที่เหมาะสม ในการทดลองนี้ ไม่มีการกำหนดค่า pH อยู่ในช่วงกรด ทั้งนี้เนื่องจาก เชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 สายพันธุ์ปกติ ไม่สามารถเจริญได้ในค่า pH 3 และ 4

เชื้อสายพันธุ์กลาย มีความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ เมื่อเทียบในการทดลองเดียวกัน แต่เมื่อเทียบกับปริมาณการผลิตวิตามินบีหกของเชื้อสายพันธุ์กลาย จากการคัดเลือกในครั้งแรก พบว่าความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกลดลง ทั้งนี้ อาจเกิดจากการซ่อมแซมตัวเองของแบคทีเรีย (Lim, 1998) ซึ่งคาดว่าการฉายรังสีซ้ำหรือการปรับปรุงพันธุ์ด้วย mutagents อาจทำให้การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น สามารถคงอยู่อย่างถาวรได้

**ตารางที่ 2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย**

| สายพันธุ์ | ปริมาณวิตามินบีหก (μg/mg protein) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 37°C | 45°C | 50°C | 55°C | 60°C |
| Wild Type 6.1C1 | 0.152 | - | - | - | - |
| Mutant 08-361 | 0.168 | 0.160 | 0.075 | - | - |
| Mutant 10-3 | 0.033 | 0.033 | 0.021 | - | - |
| Mutant 10-94 | 0.064 | 0.056 | 0.052 | - | - |
| Mutant 10-98 | 0.127 | 0.173 | 0.032 | - | - |

ตัวเลขที่ปรากฏ เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

**ตารางที่ 3 ค่า pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย**

| สายพันธุ์ | ปริมาณวิตามินบีหก (μg/mg protein) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | pH 5.0 | pH 6.0 | pH 7.0 | pH 8.0 | pH 9.0 |
| Wild Type 6.1C1 | 0.061 | 0.110 | 0.123 | 0.119 | 0.091 |
| Mutant 08-361 | 0.053 | 0.078 | 0.152 | 0.106 | 0.102 |
| Mutant 10-3 | 0.057 | 0.084 | 0.091 | 0.078 | 0.091 |
| Mutant 10-94 | 0.015 | 0.033 | 0.062 | 0.112 | 0.064 |
| Mutant 10-98 | - | 0.019 | 0.026 | 0.018 | 0.061 |

ตัวเลขที่ปรากฏ เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

**3. การศึกษารูปของวิตามินบีหกที่ผลิตได้ในเชื้อ isolate ที่กลายพันธุ์ โดยวิธี reverse phase isocratic HPLC**

เมื่อนำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ ของเชื้อสายพันธุ์กลายและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม นำไปวิเคราะห์รูปของวิตามินบีหกที่เชื้อผลิตได้ ด้วยวิธี reverse phase isocratic HPLC พบว่า ไม่มีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ปกติ ซึ่งผลิตวิตามินบีหกในรูป Pyridoxamine (PM) และ Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP)

## สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตวิตามินบีหกในเชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 เพื่อให้ทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็นประโยชน์ต่อการผลิตในอุตสาหกรรม ในการศึกษานี้ ได้ทำการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตวิตามินบีหก โดยการใช้รังสีแกมมา ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 เกิดการกลายพันธุ์ คือ 0.8-1 kGay ผลการกลายพันธุ์ พบเชื้อ *Rhizobium* sp. 6.1C1 กลายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตวิตามินบีหกได้สูงที่อุณหภูมิ 50°C จำนวน 4 isolates ได้แก่ 08-361, 10-3, 10-94 และ 10-98 โดยพบว่า เชื้อพันธุ์กลาย 08-361 มีปริมาณ

การผลิตวิตามินบีหกสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสมและค่า pH ที่เหมาะสม ซึ่งรูปของวิตามินบีหกที่ผลิตได้ อยู่ในรูปเดียวกับสายพันธุ์ปกติ ได้แก่ PM และ PMP การศึกษาในอนาคต จะเป็นการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการคงตัวของสายพันธุ์

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติขอขอบคุณ รศ.ดร.เสาวนิตย์ ทองพิมพ์ สำหรับคำแนะนำการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการฉายรังสี

## เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร. (2548) **สถิติการนำเข้า-ส่งออก.** ค้นข้อมูลวันที่ 14 ตุลาคม 2548 จาก http://www.customs.go.th

Bradford MM (1976) **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254

Coburn SP, Slominski A, Mahuren JD, Wortsman J, Hessle L, and Millan JL. (2003) **Cutaneous metabolism of vitamin B-6.** *J. Invest. Dermatol.* 120, 292-300.

Kang Z, Li H, Li G, and Yin D (2005) **Reaction of pyridoxamine with malondialdehyde: mechanism of inhibition of formation of advanced lipoxidation end-products.** *Amino Acids.* Jul 5 [Epub ahead of print]

Leklem JE (1999) **Vitamin B-6.** In shils, M. *et al.* Eds. Nutrition in Health and Disease, 9th Edition. Baltimore: Willims & Wilin., 413-422

Lim Daniel (1998) Microbial genetics. In Microbiology, 2nd Edition. McGraw Hill Co., 246-251.

Lin H (2003) **Continuing a successful partnership.** Retrieved March 28, 2005 from www.sea.siemens.com/chemphar/case/cbchina.htm

McCarty MF (2000) **High-dose pyridoxine as an 'anti-stress' strategy.** *Med. Hypothesis.* 54, 803-807.

Mittenhuber G (2001) **Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways.** *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 1-20.

Phimwapi S, Trongpanich Y and Niamsanit S (2005) **Isolation and characterization of vitamin $B_6$ biosynthesis *Rhizobium* sp. from Thailand.** The 10th Biological Sciences Graduate Congress. 30 November-2 December 2005, Department of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore. Abstract. P41.

Trongpanich Y, Niamsanit S, and Siri S (2005) Vitamin B-6 degradation by pyridoxamine-pyruvate transaminase and pyridoxine4-oxidase from *Ochrobactrum anthropi* and *Enterobacter clocae*-like bacteria. **ScienceAsia** 31 : 307-311.