งานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

# การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์

ปี 2539

# กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2538 ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณ จันทิมา จิรนุชนาฏ นิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดเก็บ เรียบเรียงข้อมูล และพิมพ์รายงานนี้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 19 | ผลผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์..... | 53 |
| 20 | เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์..... | 53 |
| 21 | เปรียบเทียบแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีก่อนและหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น70เปอร์เซนต์ระหว่าง *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์)..... | 64 |
| 22 | ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์..... | 65 |

# ตารางรูป


| รูปที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 1 | แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต..... | 24 |
| 2 | แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG..... | 27 |
| 3 | ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับระยะเวลาฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์..... | 30 |
| 4 | ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับความเข้มข้นสารเคมี NTG เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์..... | 36 |
| 5 | ผลผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยง 5 ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 และหาเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ | 52-1 |
| 6 | ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) โดยดูจากกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป (กำลังขยาย 7,500 เท่า) หลังการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง..... | 54-1 |
| 7 | ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ดั้งต้น) โดยดูจากกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป (กำลังขยาย 7,500 เท่า) หลังการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง..... | 54-2 |
| 8 | อัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน..... | 56 |

# ตารางรูป


| รูปที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 9 | อัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน | 57 |
| 10 | แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน | 58 |
| 11 | แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน | 60 |
| 12 | แสดงอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน อัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง | 61-1 |
| 13 | แสดงอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus subtilis* UUNN-1 เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน อัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง | 61-2 |

# บทที่ 1
# บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีนโดยจะไฮโดรไลส์สับสเตรทที่เป็นโพลีเปปไทด์โมเลกุลสายยาวให้เป็นโมเลกุลสายสั้นลงรวมทั้งช่วยไฮโดรไลส์เอนไซม์อื่นที่สังเคราะห์ขึ้นอยู่ในรูปที่ยังทำงานไม่ได้ (inactive precursor form) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงานได้ (active form) (1) เอนไซม์โปรตีเอสผลิตได้จากพืช สัตว์และจุลชีพในระยะแรกๆ นั้นมักเตรียมโปรตีเอสได้จากพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืช เช่น โบรมีเลนจากสับปะรด ปาเปนจากยางมะละกอ โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น ทริปซินจากตับอ่อน เรนนินจากกระเพาะลูกวัวโปรตีเอสที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมมากที่สุดคือโปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพ ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถผลิตโปรตีเอสได้มีทั้งเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย (2) *Bacillus spp.*เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงการค้าที่สำคัญซึ่งพบว่า Bacillus ที่สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส และ นิวทรัลเมธาโลโปรตีเอส ได้แก่ *B. amyloliquefaciens, B.subtilis* และ *B.cereus* Bacillus ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้แก่ *B.licheniformis* และ *B.pumilus* ส่วน Bacillus ที่ผลิตนิวทรัลเมธาโลโปรตีเอสได้แก่ *B.thermoproteolyticus, B. stearcthermophilus* และ *B.megaterium*(3)โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมสารซักฟอก ฟอกหนัง อาหาร เครื่องดื่ม ขนมปัง เนยแข็ง ยา เส้นใยทอผ้า กระดาษ และการผลิตน้ำยางที่มีคุณภาพดี โดยเฉพาะอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก ซึ่งมีปริมาณการใช้เอนไซม์โปรตีเอส คิดเป็นมูลค่าสูงที่สุดถึง 89% เมื่อเทียบกับอุตสาหกรรมอื่น (4) เอนไซม์โปรตีเอสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ใน อุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มีลักษณะการใช้งานและแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ต่างๆกันมากมาย ในปีคศ.1905 Rohm ได้นำโปรตีเอสจากตับอ่อนผสมกับโซเดียมคาร์บอเนตมาใช้ในการฟอกหนัง และกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนัง ซึ่งต่อมาในปีคศ. 1913 ได้มีการนำเอนไซม์โปรตีเอสมาใช้เป็นสารซักฟอกเป็นครั้งแรก แต่มีปัญหาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ และความคงทนในสภาวะเป็นด่างที่ไม่ดี การใช้เอนไซม์จึงไม่เป็นที่แพร่หลายนักในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 Jaag นักธุรกิจในประเทศสวิทซ์เซอร์แลนด์ ได้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากตับอ่อน ใช้ชื่อทางการค้าว่า Bio-38 และได้ทดสอบคุณภาพในปี คศ. 1945 แต่คุณสมบัติและประสิทธิภาพยังต่ำอยู่จนกระทั่งในปี คศ.1959 จึงได้มีการพัฒนาคุณภาพและผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Bio-40 ซึ่งมีคุณสมบัติดีกว่าเอนไซม์จากตับอ่อน ปี คศ. 1960 บริษัท NOVO ประเทศเดนมาร์กได้ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งเรียกกันทั่วไปว่าSubtilisin carlberg ใช้ชื่อทางการค้าขณะนั้นว่า Biotex และได้เริ่มเข้าสู่ตลาดในยุโรปและสหรัฐอเมริกา โดยมีส่วนแบ่งการตลาดประมาณ 45 - 50%

ในปี คศ.1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้ให้คำรับรองเอนไซม์นี้สามารถใช้ร่วมกับการซักล้างได้โดยไม่มีอันตราย (5) โปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพบางชนิดเป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ จึงง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง (6) จากการนำโปรตีเอส ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย จึงได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการใช้เอนไซม์และเพื่อลดต้นทุนในการผลิต จึงได้มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และทำให้เหมาะสมกับสภาพการใช้งานในอุตสาหกรรมบางประเภท ซึ่งอาจอาศัยเทคนิค การดัดต่อยีน (genetic engineering) หรือเทคนิคการกลายพันธุ์ (mutation technique) (7) ซึ่งเทคนิคการกลายพันธุ์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมและประสบความสำเร็จกับจุลชีพหลายชนิด โดยสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น ใช้แสงอุลตราไวโอเลตหรือสารเคมีบางชนิด

การใช้แสงอุลตราไวโอเลต ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เพราะง่ายและสะดวก ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ 254 nm.เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ DNA สามารถดูดกลืนแสงเข้าไปในเบสของกรดนิวคลีอิกได้สูงสุด ปัจจัยในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ได้แก่ ความยาวคลื่นของแสงอุลตร้าไวโอเลต ระยะเวลาระยะห่างจากแหล่งแสง และความเข้มของแสง (8, 9)

NTG (N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine) เป็น alkylating agent ชนิดหนึ่งทำหน้าที่ใส่หมู่ Alkyl ให้กับ nucleotide ที่ตำแหน่งต่างๆ เช่น ตำแหน่ง Oxygen ที่ 6 ของ Guanine ทำให้เกิดการจับคู่ของเบสผิดพลาด เช่น G จับกับ T เป็นต้น ดังนั้นเมื่อใช้เป็น Chemical mutagen จะเปลี่ยนแปลง GC เป็น AT แบบ Transition วิธีนี้เป็นการกลายพันธุ์โดยตรง นอกจากนี้อาจทำให้เกิด Depurination ของ nucleotide ที่ได้รับหมู่ Alkyl ด้วยการสูญเสีย Purine ที่ได้รับหมู่ Alkyl นั้นและเกิดช่องว่างขึ้น สุดท้าย Replication ก็จะหยุด และเกิดการซ่อมแซม DNA แบบ SOS repair ซึ่งจะทำให้เกิด Replication ผ่านช่องว่างนั้น โดยการใส่ nucleotide ที่ผิดพลาดเข้าไปในDNA สายใหม่เป็นการเปลี่ยน GCเป็นTA แบบTransversion NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์หลายจุดในบริเวณที่เกิด Replication (8, 10)

จากงานวิจัยปรับปรุงสายพันธุ์ Bacillus ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้มากมายหลายชนิดและยังมีคุณสมบัติในการหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ได้จึงมีประโยชน์และสะดวกในการสกัดเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ หรือการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อนั้น เช่น ในปี คศ.1986D.N.Shah และคณะได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *B. licheniformis* โดยใช้ UV light ซึ่งพบว่ามี mutant หนึ่งสายพันธุ์ คือ VS-1 สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้มากกว่า สายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 100-110% (11) นอกจากนี้ปี คศ.

1985 Fumiko Morohoshi และ Nobuo Munakata ได้ศึกษาถึงผลของ alkylating agents ในการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* พบว่ามี mutant 3 สายพันธุ์ ที่ไวต่อ NTG (12,13)

เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอสจึงได้มีผู้ทำการศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อนี้โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *B. licheniformis* ATTC 21415 พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้ไม่แตกต่างกันนัก และเมื่อศึกษาสมบัติใน ด้านกายภาพ เคมี จลนศาสตร์ ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปบไทด์ของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน คือ Subtilisin carlberg และ Subtilisin BPN พบว่าความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปบไทด์เหมือนกับเอนไซม์ทั้งสองชนิด (14) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยจึงเลือกใช้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในการทดลองทำการกลายพันธุ์ด้วย กระบวนการทาง Physical Mutation และ Chemical Mutation เพื่อเป็นการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น

<u>วัตถุประสงค์ของงานวิจัย</u>

ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในปริมาณสูง ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้ คือ ได้เชื้อที่กลายพันธุ์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ต่อไป

# บทที่2
# ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

## 2.1 ครุภัณฑ์

| ครุภัณฑ์ | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| 1. เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotrometer) | Shimazu , Japan |
| 2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) Spectronic 2000 | Baush & Lomb , U.S.A. |
| 3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer) Spectronic 20 D | Baush & Lomb , U.S.A. |
| 4. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigirated Microcentrifuge) Sigma 2 MK | Sigma Laboratory , Werntern Germany |
| 5. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) Model HA-30 | Hirayama Manufacturing Coperation, Japan |
| 6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Model Heraeus Type B 5050 E | Heraeus , Germany |
| 7. เครื่องเหวี่ยงดกตะกอน (Centrifuge) Kokusan Model H-103N Series | Kokusan , Japan |
| 8. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary Water Bath Shaker) | New Brunswick Scientific Co.,Inc.,U.S.A. |
| 9. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled Environment Incubator Shaker) Psycrotherm Model G760 | New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.Y., U.S.A. |
| 10.เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) Model PHM 83 Autocal | Radiometer, Copenhagen, Denmark |
| 11.ตู้ "ISSCO" Laminar Flow Model BVT-124 | International Scientific supply, Co.,Ltd., U.S.A. |
| 12.หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TUV 15W/G15T8 | Philips, Holland |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| ครุภัณฑ์ | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| 13.เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) MS-90 No. 341659 | Farga Instrument Ltd., Taiwan |
| 14.เครื่องเขย่า (Vortex )Model K550-GE | Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y.11716, U.S.A. |
| 15.เครื่องชั่งสาร Mettler AE-200 S | Mettler Instrument AG., Switzerland |
| 16.เครื่องชั่งสาร Sartorius | Scientific Promotion Co., Ltd. |
| 17.เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน Kjeldatherm | Gerhardt, Germany |
| 18.กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนไมโครสโคป (Scanning Electron Microscope) | U.S.A. |

2.2 เคมีภัณฑ์

| สารเคมี | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| Casein hammarsten | BDH Laboratory Chemical Division, |
| L-Tyrosine | England |
| Ammonium sulfate | Fluka AG. Buch, Switzerland |
| Glucose | |
| Imidazole | |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane | |
| Trichloroacetic acid | |
| Calcium chloride | E. Merck AG. darmstadt, Germany. |
| Di-potassium hydrogenphosphate | |
| Potassium dihydrogenphosphate | |
| Magnesium sulfate | |
| Maleic acid | |
| Sodium carbonate | |
| Sodium bicarbonate | |

| สารเคมี | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| Skim milk | Mission Health Food Co., LTD., Thailand |
| N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ( NTG ) | Sigma Chemical Co., LTD., U.S.A. |
| Bovine serum albumin ( BSA, A grade ) | |

## 2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด บางนา-ตราด กม. 21 บางพลี สมุทรปราการ

## 2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

*Bacillus subtilis* TISTR 25 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (**T**hailand **I**nstitude of **S**cientific and **T**echnological **R**esearch) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

# บทที่ 3
# วิธีการทดลอง

## 1. การเตรียมสารละลาย

### 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

**Nutrient agar slant**

| | |
|---|---|
| Beef extract | 3 กรัม |
| Peptone | 5 กรัม |
| Bacto agar | 15 กรัม |
| NaCl | 5 กรัม |

ละลายสารในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองและนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดมา วางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อยังไม่นำมาใช้

### 1.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

**อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium)**

**สูตรที่ 1 ( MG Halpern, 1981)**

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 1 กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.50 กรัม |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) | 20 กรัม |
| กลูโคส | 5 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตรนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**สูตรที่ 2 (Sadanobu และ คณะ ,1975)**

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.5 กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 กรัม |

| | | |
|---|---|---|
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $MnSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตรนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Luria Broth**

| | | |
|---|---|---|
| Yeast extract | 10 | กรัม |
| Bacto peptone | 5 | กรัม |
| Bacto agar | 15 | กรัม |
| NaCl | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ละลายส่วนผสมของอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบขั้นปฐมภูมิ

**Skim milk stock solution**

ชั่งนมผงขาดมันเนย (skim milk) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**Skim milk agar plate**

ชั่ง Bacto agar 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม skim milk stock solution 5 มิลลิลิตร และเติมยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนนำไปเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.4 <u>การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากถั่วเหลือง และ กากเมล็ดทานตะวัน โดยเตรียมวัตถุดิบดังนี้

การย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรด โดยชั่งวัตถุดิบ 12 กรัม ใส่ในภาชนะที่ทนกรด เติมกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จำนวน 40 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส นำไปปรับ pHให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มอลตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอนำมาใช้

1.5 <u>สารละลายสำหรับหาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี</u>

<u>สารละลายบัฟเฟอร์ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 ,8.5 และ 9.0</u>

ละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris (hydroxy-methyl)-aminomethane) 12.12 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.6 , 8.5 และ 9.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 และ 8.0</u>

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 53.65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และ โซเดียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 27.8 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็น stock solution ผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

| pH | $NaH_2PO_4$ (ml) | $Na_2HPO_4$ (ml) |
|---|---|---|
| 7.5 | 80 | 420 |
| 8.0 | 26.5 | 473.5 |

เติมน้ำกลั่นลงในบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร

<u>สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5,10.0 และ10.5</u>

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น stock solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไบคาร์บอเนต ตามอัตราส่วนต่อไปนี้

| pH | $Na_2CO_3$ (ml) | $NaHCO_3$ (ml) |
|---|---|---|
| 9.5 | 65.0 | 185.0 |
| 10.0 | 137.0 | 112.5 |
| 10.5 | 202.5 | 47.5 |

เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร นำไปวัด pH

สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 11.0

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ 0.1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

สารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6

ชั่งอิมมิดาโซล 6.808 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และ ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.6

สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ pH 10.5

ชั่งเคซีนฮาร์มมาสเดน 0.5 กรัม ละลายใน สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 คนจนเคซีนละลายหมด นำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 10.5 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้เย็น

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจน กรดไตรคลอโรอะซีติก ละลายหมด บรรจุในขวดสีชา เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำมาใช้

1.6 สารละลายสำหรับทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์

ชั่งสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คน จนสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ละลายหมด บรรจุในขวด

สารละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล)-อะมิโนมีเธน-มาเลตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.0

ชั่งทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล)-อะมิโนมีเธน 12.1 กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 11.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น นำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอลเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บบรรจุใส่ขวด

การเตรียม Stock solution ของ NTG

โดยการชั่งสาร NTG 0.001 กรัม ละลายในสารละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทริล)-อะมิโนมีเธน-มาเลต บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร

1.7 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl (Leonard , 1987)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรโดยให้ความร้อนช่วยในการละลาย

สารละลายอินดิเคเตอร์

ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และเมธิลลีนบลู 0.1กรัม นำไปละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.1 การเก็บรักษาเชื้อระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก stock ลงบน Nutrient agar (NA) Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ประมาณ 12-16 ชั่วโมงปิดจุกพันด้วยพาราฟิลม์เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

2.2 การเก็บรักษาเชื้อระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient Broth ประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว ผสมกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ เทปิดทับผิวหน้า 1-2 เซนติเมตร ปิดจุกพันด้วยพาราฟิลม์ เก็บไว้ที่-20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

3. การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจาก NA-slant 1-2 loop ลงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

3.2 การเลี้ยงและการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อโดยการใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดูดน้ำเลี้ยงจากข้อ 3.1 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ เท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นผสมสารละลายแขวนลอยให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ค่าที่วัดได้ไม่ควรเกิน 0.5 เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

4. การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1 การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet Light)

4.1.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1 และ 3.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ Log phase ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.1.2 ปิเปตเซลล์แขวนลอย 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี Magnetic stirrer กวนตลอดเวลา

4.1.3 นำเซลล์แขวนลอยไปฉายด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 15 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนตลอดเวลาที่ระยะเวลาในการฉายแสงต่างๆกัน

4.1.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตร ของเซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตร้าไวโอเลตลงบนอาหารวุ้นแข็ง LB ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

4.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์การรอด

4.1.6 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะ รูปร่าง ขนาด และ สี ของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

4.1.7 นำโคโลนีที่เจริญนำไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีในข้อ 5

## 4.2 การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยสารเคมี NTG ( N-methyl-N′-nitro-N -nitrosoguanidine )

4.2.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1 และ 3.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ Log phase เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำการกระจายอีกครั้งด้วย ทรีส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.2.2 นำสารละลาย NTG ในทรีส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 เติมลงใน 1 มิลลิลิตรของสารละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4.2.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอยที่ได้ลงบนอาหารวุ้นแข็ง LB ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง

4.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (โคโลนีที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์การรอด

4.2.6 ตรวจหาโคโลนีที่เกิดการกลายพันธุ์เบื้องต้น โดยดูลักษณะ รูปร่าง ขนาด และ สี ของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม

4.2.7 นำโคโลนีที่เจริญ นำไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีในข้อ 5

5. การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่กลายพันธุ์

5.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ **(Primary Screening)**

5.1.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นชนิดแข็ง (agar)ที่มีนมผงขาดมันเนย (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ผสมกับยาปฏิชีวนะเดตร้าไซคลินความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถาดกระจกขนาด 17.5x45x0.5 เซนติเมตร

5.1.2 เขี่ยโคโลนีเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่กลายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 4 ด้วยไม้จิ้มฟันลงบนอาหารในข้อ 5.1.1.บรรจุลงในกล่องแสตนเลสที่มีฝาปิดขนาด 20x20x50 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งอบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้

5.1.3 คัดเลือกเชื้อ *Bacillus subtilis*ที่กลายพันธุ์ และให้ค่าอัตราส่วนของความกว้างบริเวณใสรอบๆโคโลนีต่อความกว้างโคโลนีของเชื้อ หรือ เรียกว่า Potency Index* (ภาคผนวก ) มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น นำมาคัดเลือกต่อตามวิธีในข้อ 5.2

5.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ **(Secondary screening)**

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส (ดัดแปลงจากวิธีของ Richardson และ Tewhaiti,1978)

เก็บตัวอย่างมาเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาหาแอคติวิตี โดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่น และ นำไปแช่ลงในอ่างน้ำเย็นหยุดปฏิกิริยาทันที โดยเติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก )

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่สภาวะของการวัดแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่าง จะต้องทำหลอดควบคุมด้วยสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงโดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีก่อน และหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก จากนั้นจึงค่อยเติมตัวอย่างลงไป นำไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใส นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดควบคุม แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

6. <u>การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส</u>

pH ที่ใช้ในการทดลองคือ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5,10.0,10.5 และ 11.0 โดยเตรียมบัฟเฟอร์ดังนี้

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 8.0 , ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.5 และ 9.0 , คาร์บอเนด-ไบคาร์บอเนต pH 9.5,10.0,10.5 และ 11.0

การหา pH ที่เหมาะสม ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสทั้งหมด ทำการบ่มตัวอย่างกับเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโร-อะซิติก 2 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

7. <u>การหา อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส</u>

อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองคือ 25, 37, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสทั้งหมด ทำการบ่มตัวอย่างกับเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10 เปอร์เซนต์ ของกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

**8. <u>การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยง</u>**

ถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้นที่เตรียมตามข้อ 3.1 ลงในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 , สูตรที่ 2 ที่มีส่วนประกอบดังในข้อ 1.2 และอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบ ดังมีส่วนประกอบตามข้อ 1.3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาวัดการเจริญที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีข้อ 5.2 เปรียบเทียบและคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

**9. <u>การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl</u> (Leonard , 1987)**

นำตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 1-2 มิลลิลิตร เติมคะตาลิส 7 กรัม (โพตัสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น Buchi โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร นำเอาขวดที่บรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยดมารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 200มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง แล้วจึงนำไปไตเตรท กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไตเตรทจนสีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเขียวใส คำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A= ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B= ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C= ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V= ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

1.4= มวลโมเลกุลของไนโตรเจนทำให้มีหน่วยเป็นกรัมเปอร์เซนต์

**10. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry , 1959)**

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**11. การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM)**

ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาด้วย SEM จะต้องอยู่ในสภาพที่ปราศจากน้ำหรือความชื้นใดๆ และมีสภาพผิวที่นำไฟฟ้า ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง มีดังนี้

1. แช่ตัวอย่าง (pre-fix) ใน 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชม. หรือข้ามคืนในตู้เย็น
2. ล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที
3. แช่ตัวอย่าง (post-fix) ใน 1 % $OsO_4$ ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 หรือในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชม.
4. ล้างด้วย phosphate buffer หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที
5. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydrate) ด้วย ethanol หรือ acetone ที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% และ100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10-15 นาที
6. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง (critical point dryer)
7. ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง (stub) ด้วยเทป 2 หน้า หรือกาว
8. นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (ion sputter)
9. นำไปส่องดูด้วย SEM

**12. การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงและทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ผงโดยเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ**

**12.1 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผง**

ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้วแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 70 เปอร์เซนต์ ( 472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) โดยค่อยๆเติมทีละน้อย คนเบาๆตลอดเวลาจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลาย

หมดแล้วจึงนำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมากรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 42 และล้างตะกอนด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้ง จากนั้นนำเอนไซม์ที่อบแห้งแล้ว นำมาบดให้เป็นผง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ผงที่ได้

12.2 <u>การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ</u>

เตรียมเอนไซม์ผงซึ่งได้จากการทดลองในข้อที่ 8.1 แบ่งเอนไซม์ผงที่ได้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20, 4, 25, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาแอคติวิตีเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีผงที่เตรียมได้ ก่อนที่จะนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ หาค่าแอคติวิตีที่เหลือเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซนต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

# บทที่ 4
## ผลการทดลอง

**1. <u>การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25</u>**

ในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งในปี พ.ศ. 2535 เกษม พงษ์มณี ได้ทำการทดลอง พบว่า เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 และบนอาหารวุ้น Skim milk (นมผงขาดมันเนย) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 นี้ มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารวุ้น และ อาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

**1.1 <u>การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารวุ้น</u>**

เพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ลงบนอาหารวุ้นที่มี 5% Skim milk ผสมอยู่ตามวิธีการข้อ 1.3โดยการใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อลงบนอาหารวุ้น เป็นจุดๆ เว้นระยะห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความกว้างของบริเวณใสและความกว้างของโคโลนี พบว่า ในจำนวน 100 ซ้ำ มีอยู่ 56 ซ้ำ ที่ให้ค่า Potency Index* (ภาคผนวก ) เท่ากับ 6.67 ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนค่าเฉลี่ยของ Potency Index* เท่ากับ 6.6344 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ภาคผนวก) เป็น 0.1851

**ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จำนวน 100 ซ้ำ ที่ให้ความกว้างบริเวณใสและความกว้างโคโลนีขนาดต่าง ๆกัน**

| ความกว้างบริเวณใส (มม.) | ความกว้างโคโลนี (มม.) | <u>ความกว้างบริเวณใส</u> ความกว้างโคโลนี | ความถี่ | เปอร์เซนต์ |
|---|---|---|---|---|
| 9.0 | 1.5 | 6.00 | 3 | 3 |
| 9.5 | 1.5 | 6.33 | 4 | 4 |
| 10.5 | 1.6 | 6.56 | 7 | 7 |
| 11.0 | 1.7 | 6.47 | 16 | 16 |
| 12.0 | 1.8 | 6.60 | 56 | 56 |
| 12.5 | 1.8 | 6.94 | 14 | 14 |

1.2 ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับขวดเขย่า

นำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร สำหรับผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูตรอาหาร Basal medium สูตร 1 ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 วิเคราะห์ปริมาณแอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2

จากตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 70.269 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.1516

2. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ

หลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตและ สารเคมี NTG จะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น โดยทำการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นปฐมภูมิ และ ทุติยภูมิ ซึ่งในการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิ จะใช้วิธีการตรวจหาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบน Skim milk plate อย่างคร่าวๆ สามารถทำได้คราวละมากๆ สะดวก และรวดเร็ว ส่วนการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium สูตร1 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ด้วยวิธีที่ให้ผลถูกต้องแน่นอนอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นในการเลือกสายพันธุ์ใหม่ วิธีที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ วิธีที่ใช้ตรวจสอบในขั้นปฐมภูมิ จะต้องให้ผลที่มีสัมพันธ์กับผลที่ได้จากขั้นทุติยภูมิ จึงต้องทำการทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ของวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งสองขั้นตอน

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เป็นการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สามารถทำได้โดยเพาะเชื้อลงบนอาหารวุ้นที่มีอินดิเคเตอร์อยู่ ในการทดลองนี้ อินดิเคเตอร์ที่ใช้คือ นมผงขาดมันเนย (Skim milk) ซึ่งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากเป็นสารที่หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ให้บริเวณใสที่ชัดเจน และสามารถเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสกว้างได้สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาไม่นาน รวมทั้งตรวจสอบได้คราวละมากๆ จึงเป็นการประหยัดเวลาและแรงงาน ในการตรวจสอบหาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ดังนั้นในการเปรียบเทียบจะใช้ค่าอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี หรือเรียกว่า Potency Index* (ภาคผนวก) ในการคัดเลือกจะคัดเลือกเชื้อที่ให้ค่า Potency Index* ที่สูงกว่าค่า Potency Index* ของเชื้อดั้งเดิม จากนั้นจึงนำสายพันธุ์ใหม่นั้นมาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 ซึ่งจะให้ผลถูกต้องมากขึ้น เพื่อเป็นการทดสอบว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ทั้งสองขั้นตอนให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงทำการหาความสัมพันธ์ของ

หอสมุดกลาง อุตสาหกรรม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้ กับอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี Potency Index*

**2.1 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตในขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ**

ทำการสุ่มตัวอย่างที่ผ่านการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต 50 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 และ 5.2 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ค่า Potency Index* อยู่ในช่วง 6.0-14.0 ส่วนปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ที่ได้จะแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 38.05 ถึง 139.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index กับปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ดังรูปที่ 1

**ตารางที่ 2 ค่า Potency Index* จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบ กับปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตโดยนำมาทำการทดสอบจำนวน50 สายพันธุ์**

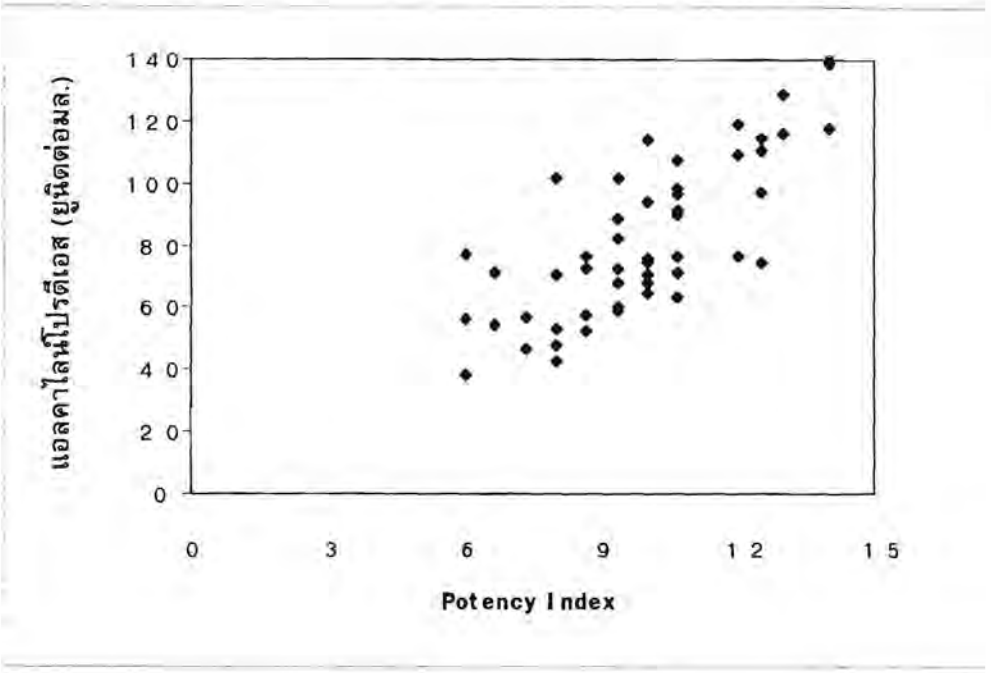
| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index * | แอลคาไลน์โปรตีเอส (ยูนิต/มล.) |
|---|---|---|
| Mutant - 1 | 14.00 | 138.44 |
| Mutant - 2 | 14.00 | 139.71 |
| Mutant - 3 | 14.00 | 117.96 |
| Mutant - 4 | 13.00 | 129.01 |
| Mutant - 5 | 13.00 | 116.33 |
| Mutant - 6 | 12.50 | 74.65 |
| Mutant - 7 | 12.50 | 114.52 |
| Mutant - 8 | 12.50 | 97.49 |
| Mutant - 9 | 12.50 | 110.89 |
| Mutant - 10 | 12.00 | 109.26 |

| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index * | แอลคาไลน์โปรตีเอส* (ยูนิต/มล.) |
|---|---|---|
| Mutant - 11 | 12.00 | 76.65 |
| Mutant - 12 | 12.00 | 119.23 |
| Mutant - 13 | 10.67 | 98.39 |
| Mutant - 14 | 10.67 | 63.42 |
| Mutant - 15 | 10.67 | 91.33 |
| Mutant - 16 | 10.67 | 71.39 |
| Mutant - 17 | 10.67 | 90.24 |
| Mutant - 18 | 10.67 | 107.45 |
| Mutant - 19 | 10.67 | 76.65 |
| Mutant -20 | 10.67 | 96.58 |
| Mutant - 21 | 10.00 | 76.10 |
| Mutant - 22 | 10.00 | 64.51 |
| Mutant - 23 | 10.00 | 114.34 |
| Mutant - 24 | 10.00 | 70.49 |
| Mutant - 25 | 10.00 | 74.84 |
| Mutant - 26 | 10.00 | 67.77 |
| Mutant - 27 | 10.00 | 94.22 |
| Mutant - 28 | 9.33 | 67.77 |
| Mutant - 29 | 9.33 | 59.07 |
| Mutant - 30 | 9.33 | 88.79 |
| Mutant - 31 | 9.33 | 82.08 |
| Mutant - 32 | 9.33 | 60.16 |
| Mutant - 33 | 9.33 | 72.48 |
| Mutant - 34 | 9.33 | 101.47 |
| Mutant - 35 | 8.67 | 72.66 |
| Mutant -36 | 8.67 | 76.29 |
| Mutant - 37 | 8.67 | 57.98 |

| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index * | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิต/มล.) |
|---|---|---|
| Mutant - 38 | 8.67 | 52.55 |
| Mutant - 39 | 8.00 | 101.47 |
| Mutant - 40 | 8.00 | 52.91 |
| Mutant - 41 | 8.00 | 48.20 |
| Mutant - 42 | 8.00 | 42.76 |
| Mutant - 43 | 8.00 | 70.85 |
| Mutant - 44 | 7.33 | 56.90 |
| Mutant - 45 | 7.33 | 46.93 |
| Mutant - 46 | 6.67 | 54.54 |
| Mutant - 47 | 6.67 | 71.39 |
| Mutant - 48 | 6.00 | 56.53 |
| Mutant - 49 | 6.00 | 38.05 |
| Mutant -50 | 6.00 | 77.19 |

* ความกว้างบริเวณใส / ความกว้างโคโลนี

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ




**รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับ ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต**

จากกราฟจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) (ภาคผนวก) เท่ากับ 0.7747 ซึ่งเป็นค่าที่พอยอมรับได้ ในการใช้ค่า Potency Index* สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และ ใช้การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2 สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

## 2.2 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์จากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ

ทำการสุ่มตัวอย่างที่ผ่านการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG จำนวน 50 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 และ 5.2 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ค่า Potency Index* อยู่ในช่วง 6.0-14.0 ส่วนปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ที่ได้จะแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 40.23 ถึง 129.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index กับ ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ดังรูปที่ 2

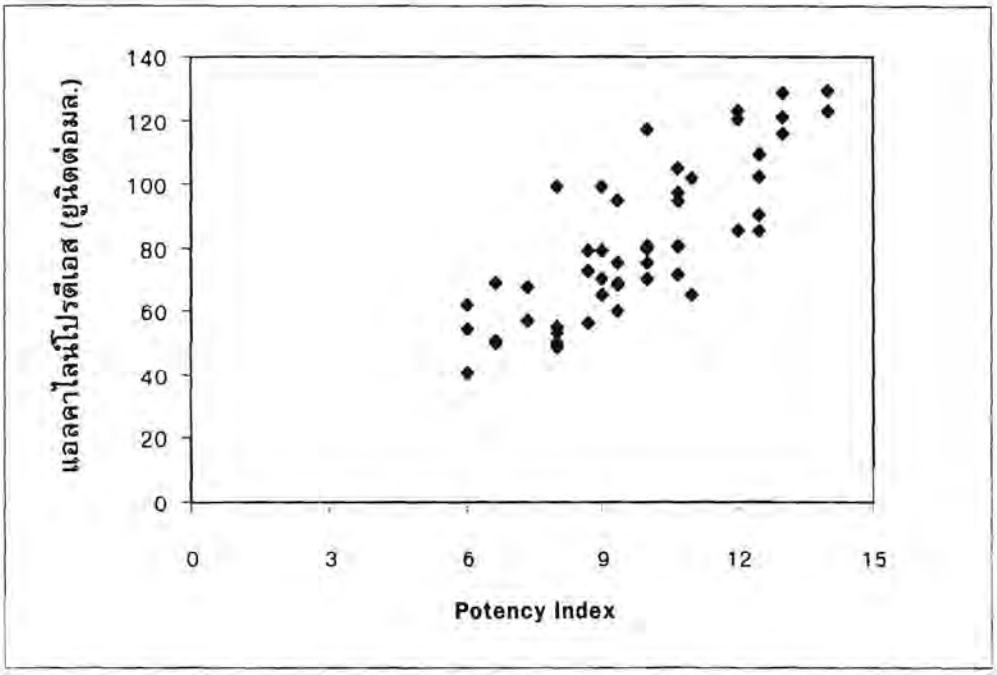
ตารางที่ 3 ค่า **Potency Index*** จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบ กับปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี **NTG** โดยนำมาทดสอบ **50** สายพันธุ์

| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index * | โปรตีเอสแอคติวิตี้ (ยูนิต/มล.) |
|---|---|---|
| Mutant - 1 | 14.00 | 129.13 |
| Mutant - 2 | 14.00 | 123.20 |
| Mutant - 3 | 13.00 | 121.16 |
| Mutant - 4 | 13.00 | 128.57 |
| Mutant - 5 | 13.00 | 115.91 |
| Mutant - 6 | 12.50 | 85.78 |
| Mutant - 7 | 12.50 | 102.71 |
| Mutant - 8 | 12.50 | 90.45 |
| Mutant - 9 | 12.50 | 109.58 |
| Mutant - 10 | 12.00 | 120.65 |
| Mutant - 11 | 12.00 | 85.75 |
| Mutant - 12 | 12.00 | 123.15 |
| Mutant - 13 | 11.00 | 101.90 |
| Mutant - 14 | 11.00 | 65.15 |
| Mutant - 15 | 11.00 | 101.77 |
| Mutant - 16 | 10.67 | 80.31 |
| Mutant - 17 | 10.67 | 95.15 |
| Mutant - 18 | 10.67 | 105.25 |
| Mutant - 19 | 10.67 | 71.66 |
| Mutant - 20 | 10.67 | 97.00 |
| Mutant - 21 | 10.00 | 80.10 |
| Mutant - 22 | 10.00 | 70.20 |
| Mutant - 23 | 10.00 | 117.38 |
| Mutant - 24 | 10.00 | 80.48 |
| Mutant - 25 | 10.00 | 75.15 |

| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index * | โปรตีเอสแอคติวิตี้♣ (ยูนิต/มล.) |
|---|---|---|
| Mutant - 26 | 9.33 | 68.91 |
| Mutant - 28 | 9.33 | 68.59 |
| Mutant - 29 | 9.33 | 60.15 |
| Mutant - 30 | 9.33 | 75.19 |
| Mutant - 31 | 9.00 | 78.96 |
| Mutant - 32 | 9.00 | 65.28 |
| Mutant - 33 | 9.00 | 70.32 |
| Mutant - 34 | 9.00 | 99.75 |
| Mutant - 35 | 8.67 | 73.12 |
| Mutant -36 | 8.67 | 79.20 |
| Mutant - 37 | 8.67 | 56.14 |
| Mutant - 38 | 8.00 | 55.17 |
| Mutant - 39 | 8.00 | 99.59 |
| Mutant - 40 | 8.00 | 50.19 |
| Mutant - 41 | 8.00 | 52.91 |
| Mutant - 42 | 8.00 | 48.55 |
| Mutant - 43 | 7.33 | 67.59 |
| Mutant - 44 | 7.33 | 57.19 |
| Mutant - 45 | 6.67 | 50.11 |
| Mutant - 46 | 6.67 | 50.82 |
| Mutant - 47 | 6.67 | 69.23 |
| Mutant - 48 | 6.00 | 54.55 |
| Mutant - 49 | 6.00 | 40.23 |
| Mutant - 50 | 6.00 | 61.95 |

* $\frac{\text{ความกว้างบริเวณใส}}{\text{ความกว้างโคโลนี}}$

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ




**รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับ ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG**

จากกราฟจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)(ภาคผนวก) เท่ากับ 0.8154 ซึ่งเป็นค่าที่พอยอมรับได้ในการใช้ค่า Potency Index* สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ และ ใช้การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2 สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

## 3. เปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25

### 1. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์

#### 1.1 การหาเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เป็นวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมาก ทั้งนี้เพราะ วิธีการทำง่าย สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน และปลอดภัยในการใช้งาน เพียงควบคุมป้องกันตาและผิวหนังจากแสงอุลตราไวโอเลต เท่านั้น ส่วนใหญ่นิยมใช้ Bactericide Lamp ซึ่งเป็นหลอดไฟเมอคิวรี่ที่ปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่น

253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของเบสในกรดนิวคลีอิก จึงสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ คือ ความยาวคลื่นของแสง ความเข้มของแสง ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงกับเซลล์ ระยะเวลาที่ฉายแสง ความหนาแน่นของเซลล์ อายุและสภาวะการเจริญของเซลล์ เป็นต้น ((Sykita B. ,1983 ) สำหรับการกลายพันธุ์แบคทีเรีย หลอดไฟมีกำลังงาน 15 วัตต์ ระยะห่างของหลอดไฟกับเซลล์ควรเริ่มประมาณ 20 เซนติเมตร ความหนาแน่นของเซลล์ $10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาที่ใช้ในการฉายแสงอยู่ระหว่าง 30 วินาที ถึง 20 นาที ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นกับ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย และวิธีการกลายพันธุ์ (Fantini AA. , 1975) ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำการแปรผันเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ต้องการ

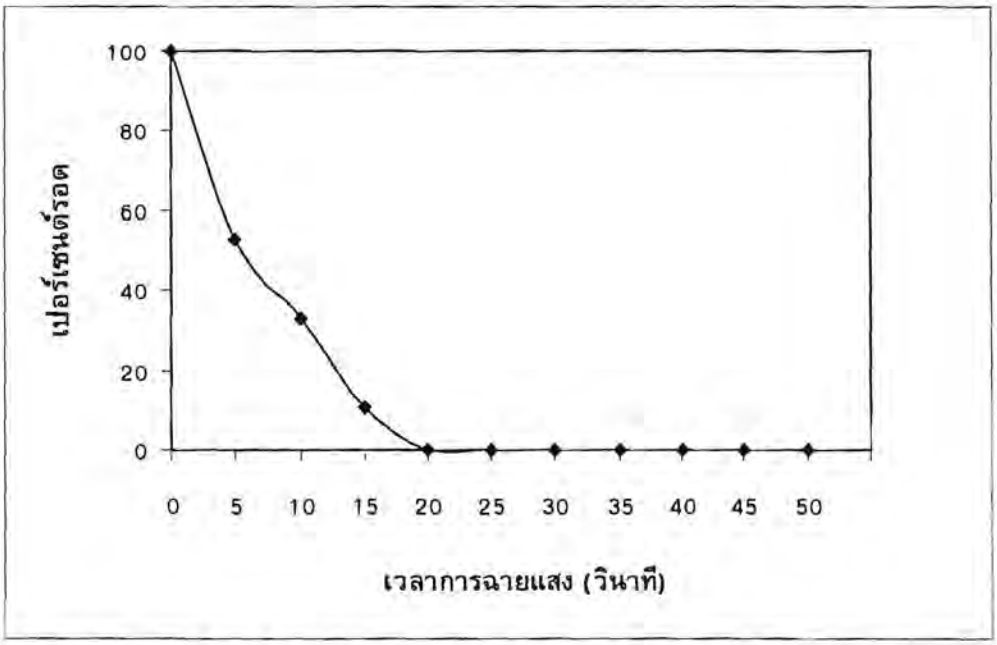
งานวิจัยนี้ได้ชักนำให้เซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 หลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลต แล้ว นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 นำไปเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 3

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์รอดภายหลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เกิดการกลายพันธุ์ และจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น

| เวลาการฉายแสง (วินาที) | เปอร์เซนต์รอดของเซลล์♥ | การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น | เปอร์เซนต์* |
| 0 | 100.00 | 200 | 0 | 0.0 |
| 5 | 52.60 | 200 | 1 | 0.5 |
| 10 | 32.80 | 200 | 4 | 2.0 |
| 15 | 10.83 | 200 | 5 | 2.5 |
| 20 | 0.099 | 200 | 6 | 3.0 |
| 25 | 0.00600 | 180 | 2 | 1.1 |
| 30 | 0.00046 | 100 | 0 | 0.0 |
| 35 | 0.00009 | 50 | 0 | 0.0 |
| 40 | 0.00013 | 20 | 0 | 0.0 |
| 45 | 0.00009 | 10 | 0 | 0.0 |
| 50 | 0.00009 | 10 | 0 | 0.0 |

* เปอร์เซนต์ของจำนวนสายพันธุ์ที่มีค่า Potency Index สูงขึ้น

♥ การคำนวณภาคผนวก




**รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtills* TISTR 25 กับระยะเวลาในการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์**

จากกราฟ จะเห็นว่าเซลล์มีการตายอย่างรวดเร็ว เมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเลตไป 5 วินาที จากนั้นเมื่อเวลาฉายแสงเพิ่มขึ้น อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นสุ่มจำนวนโคโลนีที่ผ่านการฉายแสงแต่ละเวลามาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 หลังจากทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่า ที่เวลาการฉายแสงเป็น 10, 15, 20, 25 วินาที มีสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จำนวน 18 สายพันธุ์ จากนั้นนำสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมดที่ได้ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

จากการกลายพันธุ์โดยฉายแสงอุลตราไวโอเลต พบว่าลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงแตกต่างออกไปจากสายพันธุ์เดิม เช่น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบ ไม่มีเส้นรอยแตก รูปร่างค่อนข้างกลม บางโคโลนีมีขนาดใหญ่มากกว่าสายพันธุ์เดิม เป็นต้น

## 1.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต

จากตารางที่ 4 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ 18 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Mediumสูตร 1เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาใดให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีผลผลิตเท่ากับ 70.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้น มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ U-5, U-7, U-9, U-12, U-14, U-15 และU-12โดยสายพันธุ์ U-12 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ123.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ค่า **Potency Index*** และปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25สายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 18 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลองข้อ 5.2)

| รหัสสายพันธุ์♠ | Potency Index | เวลาที่ฉายแสง (วินาที) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | SD |
|---|---|---|---|---|
| TISTR-25 | 6.67 | 0 | 70.85 | 0.1812 |
| U-1 | 8.00 | 5 | 46.99 | 0.2092 |
| U-2 | 9.00 | 10 | 67.71 | 0.2767 |
| U-3 | 9.33 | 10 | 70.19 | 0.2092 |
| U-4 | 8.67 | 10 | 54.90 | 0.3138 |
| U-5 | 10.00 | 10 | 82.27 | 0.1812 |
| U-6 | 8.00 | 15 | 47.98 | 0.3772 |
| U-7 | 10.67 | 15 | 97.00 | 0.2092 |
| U-8 | 9 | 15 | 65.35 | 0.2767 |
| U-9 | 10.67 | 15 | 111.27 | 0.1812 |
| U-10 | 9 | 15 | 68.37 | 0.2092 |
| U-11 | 8.67 | 20 | 41.50 | 0.3624 |
| U-12 | 14 | 20 | 123.16 | 0.2092 |
| U-13 | 10 | 20 | 67.41 | 0.3624 |
| U-14 | 12 | 20 | 120.38 | 0.1046 |
| U-15 | 10 | 20 | 96.46 | 0.2767 |
| U-16 | 8 | 20 | 39.38 | 0.2092 |
| U-17 | 12 | 25 | 104.73 | 0.3138 |
| U-18 | 9.33 | 25 | 57.26 | 0.1812 |

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25
รหัสสายพันธุ์ U- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 1 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 7 สายพันธุ์ จากตารางที่ 5 จึงทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium สูตร 1อีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ทุกสายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์U-12 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิตได้ 111.13 และ 94.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่1)9.77 และ 23.40 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า สายพันธุ์ U-12 ในขณะที่ TISTR 25 มีเปอร์เซนต์ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) เท่ากับ 1.18 และ 2.30 เปอร์เซนต์เท่านั้น

**ตารางที่ 6 ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1 , ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48**

| รหัสสายพันธุ์ | เวลาฉายแสง (วินาที) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | | | เปอร์เซนต์* | เปอร์เซนต์** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ครั้ง1(0 วัน) | ครั้ง2(15 วัน) | ครั้ง3(30 วัน) | | |
| TISTR-25 | 0 | 70.85 | 70.01 | 69.22 | 1.18 | 2.30 |
| U-5 | 10 | 82.27 | 75.10 | 70.13 | 8.71 | 14.75 |
| U-7 | 15 | 97.00 | 85.74 | 73.16 | 11.61 | 24.58 |
| U-9 | 15 | 111.26 | 99.45 | 83.42 | 10.61 | 25.02 |
| U-12 | 20 | 123.16 | 111.13 | 94.35 | 9.77 | 23.39 |
| U-14 | 20 | 120.38 | 108.69 | 90.15 | 9.71 | 25.11 |
| U-15 | 20 | 96.46 | 87.44 | 73.58 | 9.33 | 23.72 |
| U-17 | 25 | 104.73 | 96.51 | 80.94 | 7.85 | 22.72 |

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)

** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

## 2. การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

### 2.1 การหาความเข้มข้นNTGที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG เป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ สำหรับการกลายพันธุ์แบคทีเรีย การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น มีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้แตกต่างกัน ค่าความเป็น กรด-ด่าง ของสารละลายที่ใช้ละลาย NTG สภาวะและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ เวลาและอุณหภูมิในการบ่ม ดังมีผู้รายงานว่า แบคทีเรีย *E. coli* จะกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ ความเข้มข้น NTG 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 เวลาในการบ่ม 30 นาที และ *Saccharomyces cerevisiae* จะกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ ความเข้มข้น NTG 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 เวลาในการบ่ม 30 นาที เป็นต้น (Fantani AA. ,1975) เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ที่ใช้ประมาณ 10-30 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจึงทำการแปรผันความเข้มข้นของ NTG เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเปอร์เซนต์รอดที่เหมาะสม

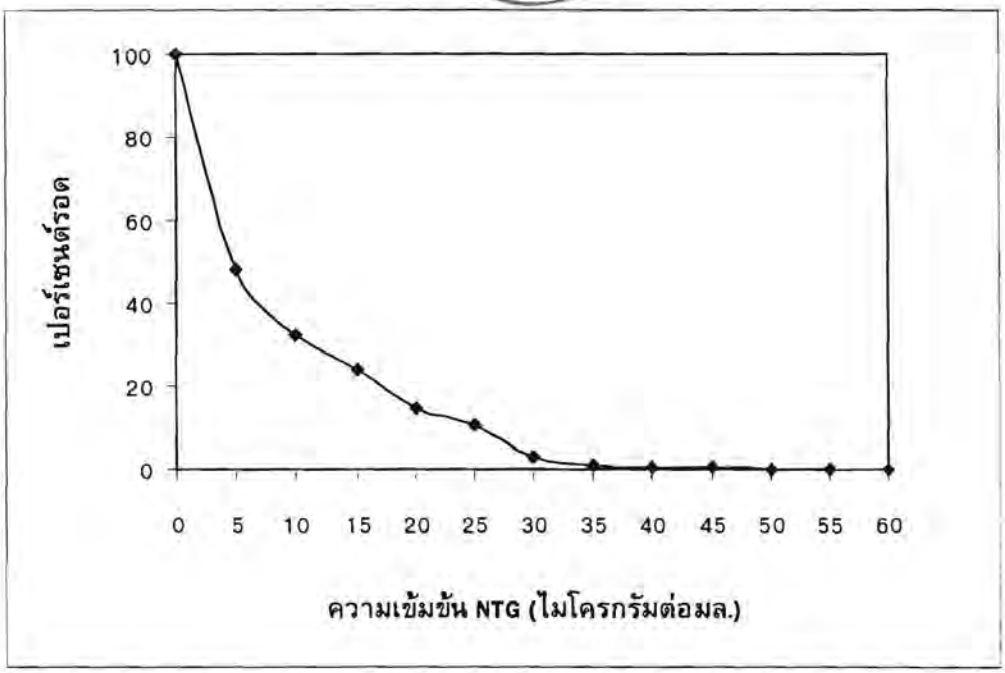
ในการทดลองชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ใช้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ $OD_{600}$ = 0.6 แปรผันความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 4.2 หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (เซลล์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังตารางที่ 7 และกราฟรูปที่ 4

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์รอดภายหลังการเติมสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เกิดการกลายพันธุ์ และ จำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

| ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ ♥ | การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น | เปอร์เซนต์* |
| 0 | 100 | 200 | 0 | 0.00 |
| 5 | 48.120 | 200 | 0 | 0.00 |
| 10 | 32.160 | 200 | 1 | 0.50 |
| 15 | 23.840 | 200 | 1 | 0.50 |
| 20 | 14.680 | 200 | 7 | 3.50 |
| 25 | 10.640 | 150 | 6 | 4.00 |
| 30 | 2.689 | 150 | 4 | 2.67 |
| 35 | 1.036 | 150 | 1 | 0.67 |
| 40 | 0.602 | 150 | 0 | 0.00 |
| 45 | 0.538 | 100 | 0 | 0.00 |
| 50 | 0.195 | 60 | 0 | 0.00 |
| 55 | 0.090 | 50 | 0 | 0.00 |
| 60 | 0.045 | 30 | 0 | 0.00 |
| 80 | 0.013 | 10 | 0 | 0.00 |
| 100 | 0.0006 | 10 | 0 | 0.00 |

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

♥ การคำนวณภาคผนวก




**รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับความเข้มข้นของสารเคมี NTG เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์**

จากกราฟรูปที่ 4 จะเห็นว่า เซลล์มีการตายอย่างรวดเร็ว เมื่อใช้ความเข้มข้น NTG 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้น NTG เพิ่มขึ้น อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นสุ่มจำนวนโคโลนีที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 หลังจากทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิพบว่า ที่ความเข้มข้น NTG เป็น 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งดัน จำนวน 20 สายพันธุ์ จากนั้นนำสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมดที่ได้ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

จากการใช้ NTG ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม เช่น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบไม่มีรอยแตกเป็นเส้นขนาดโคโลนีเล็ก เป็นต้น

## 2.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูง

จากตารางที่ 8ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ 20 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นใดให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 20 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 69.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อสายใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้น มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ N-3, N-5, N-8, N-9, N-12, N-14, และ N-18 โดยสายพันธุ์ N-5 เป็นสายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 108.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 8 ค่า **Potency Index*** และปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ ***Bacillus subtilis*** **TISTR 25 สายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ จำนวน 20 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลองข้อ 5.2)**

| รหัสสายพันธุ์ | Potency Index | ความเข้มข้นNTG (ยูนิตต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส (ยูนิตต่อมล.) | SD |
|---|---|---|---|---|
| TISTR-25 | 6.67 | 0 | 69.22 | 0.1812 |
| N-1 | 8.00 | 5 | 52.79 | 0.2767 |
| N-2 | 9.00 | 10 | 62.33 | 0.3624 |
| N-3 | 9.33 | 15 | 105.34 | 0.2092 |
| N-4 | 8.67 | 15 | 53.21 | 0.2767 |
| N-5 | 10.00 | 15 | 108.18 | 0.1812 |
| N-6 | 8.00 | 15 | 48.50 | 0.2767 |
| N-7 | 10.67 | 15 | 56.23 | 0.1046 |
| N-8 | 9.00 | 15 | 87.76 | 0.2092 |
| N-9 | 10.67 | 15 | 70.18 | 0.2767 |
| N-10 | 9.00 | 20 | 61.13 | 0.3772 |
| N-11 | 8.67 | 20 | 51.94 | 0.2092 |
| N-12 | 14.00 | 20 | 81.96 | 0.2092 |
| N-13 | 10.00 | 20 | 46.33 | 0.3772 |
| N-14 | 12.00 | 20 | 88.06 | 0.1812 |
| N-15 | 10.00 | 20 | 53.09 | 0.3138 |
| N-16 | 8.00 | 25 | 54.54 | 0.1812 |
| N-17 | 12.00 | 25 | 47.96 | 0.2767 |
| N-18 | 9.33 | 25 | 73.21 | 0.1812 |
| N-19 | 9.00 | 25 | 52.13 | 0.2092 |
| N-20 | 9.00 | 30 | 48.80 | 0.3772 |

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25
รหัสสายพันธุ์ N- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 1 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 7 สายพันธุ์ จากตารางที่ 8 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นว่า สายพันธุ์ใหม่ ทุกสายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์ N-5 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิตได้ 99.13 และ 88.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 8.37 และ 17.77 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์ ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า สายพันธุ์ N-5 ในขณะที่ TISTR-25 มีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 0.67 และ 1.58 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 9 ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48

| รหัสสายพันธุ์ | ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | | | เปอร์เซนต์* | เปอร์เซนต์** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ครั้ง1(0 วัน) | ครั้ง2(15 วัน) | ครั้ง3(30 วัน) | | |
| TISTR-25 | 0 | 69.22 | 68.75 | 68.13 | 0.67 | 1.58 |
| N-3 | 10 | 105.34 | 96.12 | 83.65 | 8.75 | 20.59 |
| N-5 | 15 | 108.18 | 99.13 | 88.95 | 8.37 | 17.77 |
| N-8 | 15 | 87.76 | 82.01 | 71.25 | 6.55 | 18.81 |
| N-9 | 15 | 70.19 | 68.57 | 64.89 | 2.30 | 7.54 |
| N-12 | 20 | 81.96 | 75.95 | 68.13 | 7.34 | 16.88 |
| N-14 | 20 | 88.06 | 81.74 | 70.46 | 7.18 | 19.99 |
| N-18 | 25 | 73.21 | 69.86 | 65.85 | 4.57 | 10.04 |

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)

** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

จากการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG เมื่อเปรียบเทียบกันจะเห็นว่า สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์ ทั้งสองวิธี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ 15 วัน พบว่าการผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลง คิดเป็นเปอร์เซนต์ในการผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะลดลง เท่ากับ 23.39 เปอร์เซนต์ ซึ่งต่ำกว่า การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG คิดเป็นเปอร์เซนต์ในการผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 17.77 เปอร์เซนต์ แต่ในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะได้สายพันธุ์ใหม่ U -12 ซึ่งผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงกว่า สายพันธุ์ใหม่ N-5 คิดเป็น 6.06 เปอร์เซนต์ มีผู้ศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และ สารเคมีชนิดอื่นๆ พบว่า ในการกลายพันธุ์ครั้งแรกๆ ควรเริ่มการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 90 -99 เปอร์เซนต์ การกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้อาจจะทำให้ได้ผลผลิต

ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 90 -99 เปอร์เซนต์ การกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้อาจจะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น และควรทำซ้ำ 2 - 3 ครั้ง ต่อจากนั้นจึงทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีอื่นๆ หลังจากนั้นอาจจะกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต อีกก็ได้ ( Sykata B. , 1983 )ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสายพันธุ์ U -12 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป

4. <u>การชักนำให้ *Bacillus subtilis* U-12 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต</u>

จากการทดลองที่ 4 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ U -12 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในครั้งที่ 1 , 2 และ 3 เท่ากับ 123.16, 111.13 และ 94.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เนื่องจากผลการทดลองที่ 3 เมื่อใช้แสงอุลตราไวโอเลตเวลา 10, 15, 20 และ 25 วินาที สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น (ตารางที่ 4) ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ดังกล่าว สำหรับการชักนำสายพันธุ์ U -12 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ตามวิธีในข้อ 4.1 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ U -12 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (TISTR 25) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น ลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ) ดังแสดงผลในตารางที่ 10

**ตารางที่ 10 เปอร์เซนต์รอด และ จำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ**

| เวลาการฉายแสง (วินาที) | เปอร์เซนต์รอดของเซลล์♥ | การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น | เปอร์เซนต์* |
| 10 | 21.63 | 500 | 2 | 0.40 |
| 15 | 8.26 | 500 | 5 | 1.00 |
| 20 | 0.41 | 500 | 7 | 1.40 |
| 25 | 0.003 | 500 | 3 | 0.60 |

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

♥ การคำนวณภาคผนวก

จากตารางที่ 10 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่17 สายพันธุ์จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร1 เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาใดให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 17 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* U -12 มีผลผลิตเท่ากับ 93.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้น มีเพียง 10 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ UU-1, UU-3, UU-4, UU-6, UU-9, UU-10, UU-12, UU-14, UU-15 และ UU-17 โดยสายพันธุ์ UU-15 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 128.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 11 ค่า Potency Index* และปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ *Bacillus subtilis* U-12 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ จำนวน 17 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง ข้อ 5.2)

| รหัสสายพันธุ์ ♠ | Potency Index | เวลาที่ฉายแสง (วินาที) | แอลคาไลน์โปรตีเอส* (ยูนิตต่อมล.) | SD |
|---|---|---|---|---|
| U-12 | 9.00 | 0 | 93.26 | 0.2092 |
| UU-1 | 9.33 | 10 | 98.21 | 0.1812 |
| UU-2 | 9.33 | 10 | 85.83 | 0.3624 |
| UU-3 | 10.00 | 15 | 102.02 | 0.3138 |
| UU-4 | 10.67 | 15 | 104.97 | 0.2767 |
| UU-5 | 10.00 | 15 | 85.35 | 0.1812 |
| UU-6 | 11.00 | 15 | 108.12 | 0.3772 |
| UU-7 | 10.00 | 15 | 82.99 | 0.1812 |
| UU-8 | 9.33 | 20 | 65.47 | 0.3772 |
| UU-9 | 12.00 | 20 | 112.59 | 0.2767 |
| UU-10 | 10.67 | 20 | 104.43 | 0.1046 |
| UU-11 | 9.33 | 20 | 63.96 | 0.3138 |
| UU-12 | 12.50 | 20 | 125.81 | 0.2767 |
| UU-13 | 9.33 | 20 | 84.62 | 0.3624 |
| UU-14 | 10.00 | 20 | 96.76 | 0.3138 |
| UU-15 | 13.00 | 20 | 128.83 | 0.1812 |
| UU-16 | 9.67 | 25 | 80.63 | 0.3138 |
| UU-17 | 10.50 | 25 | 100.69 | 0.2767 |

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25
รหัสสายพันธุ์ U- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 1 ครั้ง

♠ รหัสสายพันธุ์ UU- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 9 สายพันธุ์ จากตารางที่ 11 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 จะเห็นว่า สายพันธุ์ใหม่ ทุกสายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์และพบว่า สายพันธุ์ UU-15 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆโดยผลิตได้ 117.03 และ 106.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 9.16 และ 17.55 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า สายพันธุ์ UU-15 ในขณที่ U-12มีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 7.64 และ 18.37 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอุลตราไวโอเลตครั้งที่2ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคติวิตี

ตารางที่12 ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* U-12 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 2 เก็บผลชั่วโมงที่ 48

| รหัสสายพันธุ์ | เวลาฉายแสง (วินาที) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | | | เปอร์เซนต์* | เปอร์เซนต์** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ครั้ง1(0 วัน) | ครั้ง2(15 วัน) | ครั้ง3(30 วัน) | | |
| U-12 | 20 | 93.26 | 86.14 | 76.13 | 7.64 | 18.37 |
| UU-1 | 10 | 98.27 | 89.16 | 80.41 | 9.27 | 18.17 |
| UU-3 | 15 | 102.02 | 93.33 | 82.35 | 8.52 | 19.28 |
| UU-4 | 15 | 104.98 | 95.13 | 86.30 | 9.38 | 17.79 |
| UU-6 | 15 | 108.82 | 99.10 | 88.19 | 8.93 | 18.96 |
| UU-9 | 20 | 112.53 | 102.34 | 92.73 | 9.05 | 17.60 |
| UU-10 | 20 | 104.31 | 91.65 | 84.13 | 12.13 | 19.35 |
| UU-12 | 20 | 125.69 | 114.02 | 103.10 | 9.28 | 17.97 |
| UU-14 | 20 | 96.82 | 85.13 | 77.11 | 12.08 | 20.36 |
| UU-15 | 20 | 128.83 | 117.03 | 106.22 | 9.16 | 17.55 |
| UU-17 | 25 | 100.81 | 90.66 | 82.02 | 10.07 | 18.64 |

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)

** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

5. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* UU-15 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG

จากการทดลองที่ 5 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ UU -15 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการเพาะเลี้ยงในครั้งที่1, 2 และ 3 เท่ากับ 128.83, 117.03 และ 106.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับนำมาเป็นสายพันธุ์ดั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG เนื่องจากผลการทดลองที่ 4 เมื่อใช้สารเคมี NTG ที่มีความเข้มข้น 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG ดังกล่าว

สำหรับการชักนำสายพันธุ์UU-15 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีในข้อ 4.2 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่13พบว่าหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UU-15 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย สารเคมี NTG 1 ครั้ง แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น ลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ) ดังแสดงในตารางที่ 13

**ตารางที่ 13 เปอร์เซนต์รอด และ จำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ**

| ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | เปอร์เซนต์รอดของเซลล์♥ | การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น | เปอร์เซนต์* |
| 20 | 9.42 | 500 | 4 | 0.80 |
| 25 | 5.13 | 500 | 7 | 1.40 |
| 30 | 1.06 | 500 | 3 | 0.60 |

♥ ดูคำนวณจากภาคผนวก

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

จากตารางที่ 13 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่14 สายพันธุ์จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้นใดให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 14 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* UU-15 มีผลผลิตเท่ากับ 96.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้น มีเพียง 8 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ UUN-3, UUN-4, UUN-5, UUN-6, UUN-8, UUN-10, UUN-11, และ UUN-1โดยสายพันธุ์ UUN-8 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 118.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่14 ค่า **Potency Index*** และปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ ***Bacillus subtilis*** **UU -15 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ จำนวน 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง ข้อ 5.2)**

| รหัสสายพันธุ์♠ | Potency Index | ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | SD |
|---|---|---|---|---|
| UU-15 | 8.33 | 0 | 96.52 | 0.2092 |
| UUN-1 | 9.00 | 20 | 89.94 | 0.2767 |
| UUN-2 | 9.67 | 20 | 85.35 | 0.3624 |
| UUN-3 | 10.67 | 20 | 112.16 | 0.1812 |
| UUN-4 | 10.00 | 20 | 100.87 | 0.2767 |
| UUN-5 | 12.00 | 25 | 113.80 | 0.3138 |
| UUN-6 | 10.67 | 25 | 104.92 | 0.1812 |
| UUN-7 | 10.00 | 25 | 87.22 | 0.2767 |
| UUN-8 | 12.50 | 25 | 118.57 | 0.2092 |
| UUN-9 | 11.00 | 25 | 90.90 | 0.2767 |
| UUN-10 | 9.67 | 25 | 100.32 | 0.2092 |
| UUN-11 | 10.00 | 25 | 98.81 | 0.1046 |
| UUN-12 | 11.00 | 30 | 92.65 | 0.2767 |
| UUN-13 | 12.00 | 30 | 102.62 | 0.2092 |
| UUN-14 | 9.67 | 30 | 88.97 | 0.1812 |

♠ รหัสสายพันธุ์ UU- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง
รหัสสายพันธุ์ UUN- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และ ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 1 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ จากตารางที่ 14 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 จะเห็นว่า สายพันธุ์ใหม่ ทุกสายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์ UUN-8 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิตได้ 109.33 และ 100.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 7.80 และ 14.86 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์ ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า สายพันธุ์ UUN-8 ในขณะที่ UU-15มีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 7.42 และ 116.44 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคดิวิตี

**ตารางที่ 15 ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* UU - 15 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 3 เก็บผลชั่วโมงที่ 48**

| รหัสสายพันธุ์ | ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | | | เปอร์เซนต์* | เปอร์เซนต์** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ครั้ง1(0 วัน) | ครั้ง2(15 วัน) | ครั้ง3(30 วัน) | | |
| UU-15 | 0 | 96.52 | 89.36 | 80.65 | 7.42 | 16.44 |
| UUN-3 | 20 | 112.16 | 103.65 | 92.85 | 7.59 | 17.22 |
| UUN-4 | 20 | 100.87 | 92.16 | 82.35 | 8.64 | 18.36 |
| UUN-5 | 25 | 113.79 | 103.29 | 95.13 | 9.24 | 16.40 |
| UUN-6 | 25 | 104.92 | 96.542 | 88.19 | 7.98 | 15.95 |
| UUN-8 | 25 | 118.58 | 109.33 | 100.95 | 7.79 | 14.86 |
| UUN-10 | 25 | 100.32 | 90.74 | 82.69 | 9.55 | 17.58 |
| UUN-13 | 25 | 102.62 | 89.33 | 81.26 | 12.96 | 20.81 |
| UUN-14 | 30 | 102.50 | 91.36 | 83.43 | 10.86 | 18.61 |

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

6. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* UUN-8 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG

จากการทดลองที่ 6 พบว่า สายพันธุ์ใหม่ UUN-8 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นจากสายพันธุ์เดิม (*Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสเฉลี่ย 70.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ) คิดเป็น 43.67 เปอร์เซนต์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ให้สูงขึ้น จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ UUN-8 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส 118.57, 109.33 และ 100.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อีก 1 ครั้ง และ เนื่องจากผลการทดลองที่ 4 เมื่อใช้สารเคมี NTG ที่มีความเข้มข้น 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น (ตารางที่ 7 ) ดังนั้นจึงเลือกใช้ ความเข้มข้น NTG ดังกล่าว สำหรับการชักนำสายพันธุ์ UUN-8 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีในข้อ 4.2 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่16พบว่าหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UUN-8 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย สารเคมี NTG 1 ครั้ง แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น ลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ) ดังแสดงในตารางที่ 16

**ตารางที่ 16 เปอร์เซนต์รอด และ จำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ**

| ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ ♥ | การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น | เปอร์เซนต์* |
| 20 | 7.95 | 300 | 2 | 0.67 |
| 25 | 3.67 | 300 | 3 | 1.00 |
| 30 | 0.09 | 300 | 1 | 0.33 |

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

♥ การคำนวณภาคผนวก

จากตารางที่ 16 ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ 6 สายพันธุ์จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร1 เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้นใดให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* UUN-8 มีผลผลิตเท่ากับ 90.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้นมีเพียง 4 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ UUNN-1, UUNN-4, UUNN-5 และ UUNN-6 โดยสายพันธุ์ UUNN-1 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 127.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

**ตารางที่ 17 ค่า Potency Index* และปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ *Bacillus subtilis* UUN-8 สายพันธุ์ตั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้จำนวน 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลองข้อ 5.2)**

| รหัสสายพันธุ์♠ | Potency Index | ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | SD |
|---|---|---|---|---|
| UUN-8 | 9.00 | 0 | 90.84 | 0.2092 |
| UUNN-1 | 12.50 | 20 | 127.75 | 0.1812 |
| UUNN-2 | 9.33 | 20 | 88.45 | 0.2768 |
| UUNN-3 | 9.67 | 25 | 86.49 | 0.2768 |
| UUNN-4 | 10.67 | 25 | 110.71 | 0.1812 |
| UUNN-5 | 10.67 | 25 | 113.85 | 0.2092 |
| UUNN-6 | 10.00 | 30 | 105.70 | 0.1046 |

♠ รหัสสายพันธุ์ UUN- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และ ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG 1 ครั้ง
รหัสสายพันธุ์ UUNN- คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และ ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG 2 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ จากตารางที่ 17 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 จะเห็นว่า สายพันธุ์ใหม่ ทุกสายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์ UUNN-1 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยผลิตได้ 119.25 และ 112.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 6.65 และ 11.67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์ ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ UUNN-1 ในขณะที่ UUN-8 มีค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 6.29 และ 13.96 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ถึง 2 ครั้งไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคดิวิตีเลย

**ตารางที่ 18 ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3ของ *Bacillus subtilis*TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) UUN - 8 และ สายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 4 เก็บผลชั่วโมงที่ 48**

| รหัสสายพันธุ์ | ความเข้มข้นNTG (ไมโครกรัมต่อมล.) | แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.) | | | เปอร์เซนต์* | เปอร์เซนต์** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ครั้ง1(0 วัน) | ครั้ง2(15 วัน) | ครั้ง3(30 วัน) | | |
| TISTR-25 | 0 | 69.28 | 68.75 | 68.13 | 0.76 | 1.67 |
| UUN-8 | 0 | 90.84 | 85.13 | 78.16 | 6.29 | 13.96 |
| UUNN-1 | 20 | 127.75 | 119.25 | 112.84 | 6.65 | 11.67 |
| UUNN-4 | 25 | 110.71 | 101.95 | 96.84 | 7.92 | 12.53 |
| UUNN-5 | 25 | 113.85 | 104.15 | 98.43 | 8.52 | 13.55 |
| UUNN-6 | 30 | 105.70 | 98.96 | 92.16 | 6.38 | 12.81 |

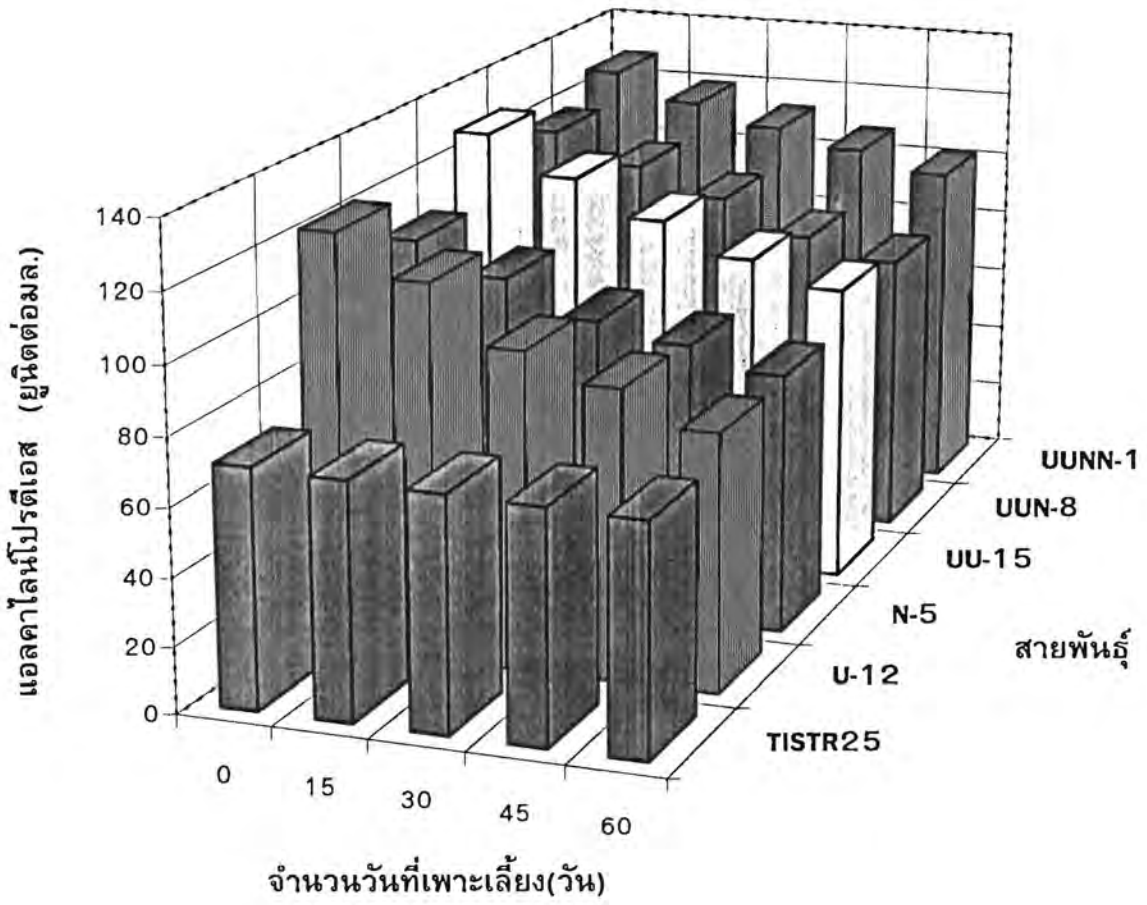
♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

จากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นพบว่า หลังจากทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม)โดยทำการกลายพันธุ์ฉายแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 2 ครั้ง หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นเดิม *Bacillus subtilis*

TISTR 25 เพื่อดูประสิทธิภาพในผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีผลผลิตเท่ากับ 68.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ UUNN-1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 112.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม (*Bacillus subtilis* TISTR 25) คิดเป็น 65.64 เปอร์เซนต์ เพื่อดูความเสถียรของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้ จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ทั้ง 2 วิธี นำไปทำการทดลองในข้อ 7

7. **ความเสถียรในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ทั้ง 2 วิธี**

ความเสถียรในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อเป็นสิ่งสำคัญมาก สำหรับในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จะต้องคำนึงถึงความเสถียรในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสด้วย การทดลองในข้อนี้จะเป็นการทดสอบความเสถียรในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส โดยจะทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้น LB ทุกๆ 15 วัน เพาะเลี้ยง ครั้งที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นเวลา 15, 30 , 45 และ 60 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่เก็บไว้ นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium สูตร 1 เก็บผลซั่วโมงที่ 48 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาหาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2 ได้ผลแสดงในตารางที่ 19 คำนวณหาเปอร์เซนต์ที่ลดลงของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ดั้งต้นกับสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้แสดงผลในตารางที่ 20 นำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในแต่ละครั้ง ได้ดังรูปที่ 5




รูปที่ 5 ผลผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยง 5ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง และหาปริมาณ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

ตารางที่19 ผลผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์

| ครั้งที่ | จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน) | ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส (ยูนิตต่อมล.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TISTR-25 | U-12 | N-5 | UU-15 | UUN-8 | UUNN-1 |
| 1 | 0 | 70.85 | 123.16 | 108.18 | 128.83 | 118.57 | 127.75 |
| 2 | 15 | 70.01 | 111.13 | 99.13 | 117.03 | 109.33 | 119.25 |
| 3 | 30 | 69.22 | 94.35 | 88.95 | 106.22 | 100.95 | 112.84 |
| 4 | 45 | 68.75 | 86.14 | 84.24 | 96.52 | 90.84 | 107.42 |
| 5 | 60 | 68.13 | 76.13 | 77.66 | 89.36 | 85.13 | 101.24 |

ตารางที่ 20 เปอร์เซนต์ที่ลดลงของผลผลิตปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtills* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในแต่ละครั้งของการกลายพันธุ์

| ครั้งที่ | จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน) | เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอส | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TISTR-25 | U-12 | N-5 | UU-15 | UUN-8 | UUNN-1 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 15 | 1.18 | 9.77 | 8.37 | 9.16 | 7.79 | 6.65 |
| 3 | 30 | 2.30 | 23.39 | 17.77 | 17.55 | 14.86 | 11.67 |
| 4 | 45 | 2.96 | 30.06 | 22.13 | 25.08 | 23.38 | 15.91 |
| 5 | 60 | 3.84 | 38.19 | 28.21 | 30.64 | 28.20 | 20.75 |

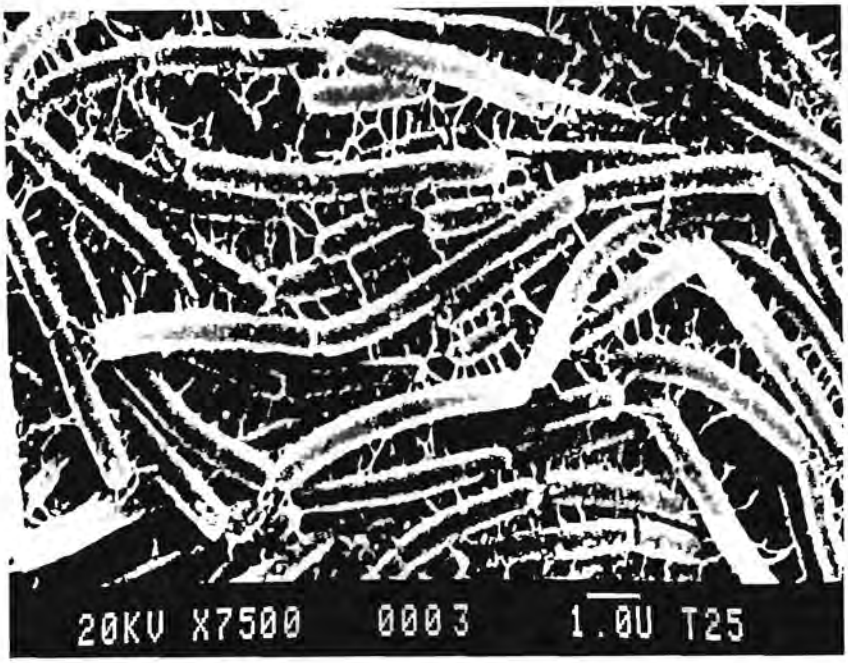
จากกราฟที่ 5 จะเห็นว่า การกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตและด้วยสารเคมี NTG นั้นไม่มีผลต่อการลดแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ไม่ว่าจะเป็นการฉายแสงอุลตราไวโอเลตซ้ำถึง 2 ครั้ง หรือด้วยสารเคมี NTG ซ้ำถึง 2 ครั้งก็ตาม

แอคติวิตีของเอนไซม์ก็ยังมีแนวโน้มลดลง แต่การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตซ้ำถึง 2 ครั้ง จะเพิ่มปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด และผลผลิตเอนไซม์ที่ได้ก็สูงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG แต่การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความเสถียรมากกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการลดลงมีแนวโน้มลดลงช้ากว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต หลังจากนำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีมาใช้กลายพันธุ์ต่อเนื่องกัน จะเห็นว่าผลผลิตปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด อัตราการลดลงก็มีแนวโน้มลดลงช้ากว่าเดิมด้วย

## 8. ลักษณะของเซลล์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้

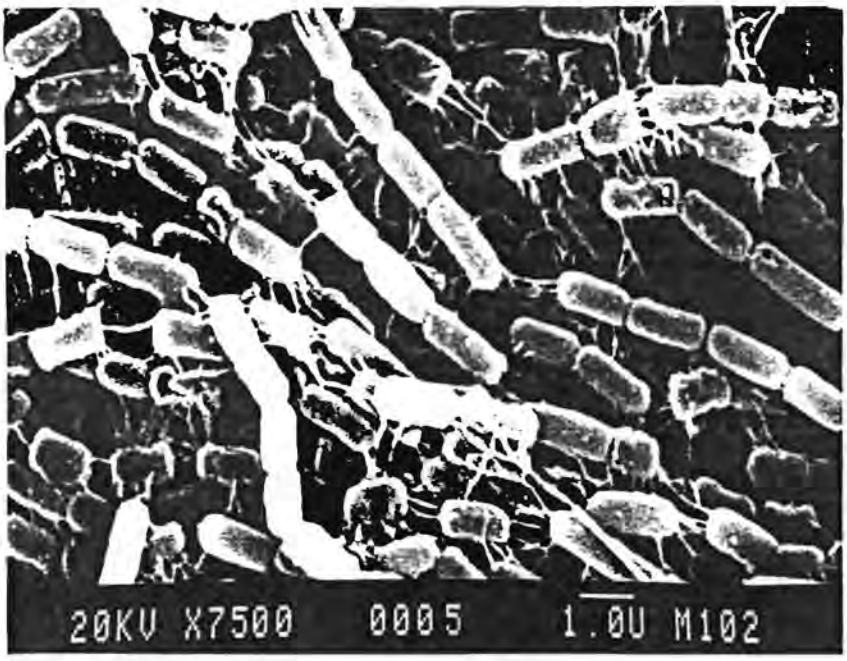
จากการดูลักษณะเซลล์ของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนไมโครสโคป Scanning Electron Microscope (SEM) โดยใช้กำลังขยาย 7,500 เท่า ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ บน LB plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีการทดลองข้อ 11 เพื่อดูลักษณะเซลล์ ได้ถ่ายภาพเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ดังแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นว่า ลักษณะของเซลล์ มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้าง 0.5 เซนติเมตร ขนาดความยาวแตกต่างกันประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว ระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์จะมีเส้นใยเกี่ยวเนื่องต่อกันทำให้เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ (รูปที่ 6 )

ส่วนเชื้อ UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) ได้ภาพถ่ายแสดงดังรูปที่ 7 จะเห็นว่า ลักษณะของเซลล์ มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้าง 0.5 เซนติเมตร ขนาดความยาวใกล้เคียงกันประมาณ 1 เซนติเมตรเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) จะพบว่า ขนาดเซลล์ของ UUNN-1 จะมีขนาดเซลล์สั้นกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มากอย่างเห็นได้ชัด บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว ระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์จะมีเส้นใยเกี่ยวเนื่องต่อกันทำให้เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ แต่จำนวนเส้นใยจะมีปริมาณน้อยกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ( รูปที่ 7)




กองบรรณสาร สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ลักษณะเซลล์ของ Bacillus subtilis TISTR 25 ดูจากกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป กำลังขยาย 7,500 เท่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง




รูปที่ 7 ลักษณะเซลล์ของ Bacillus subtilis UUNN-1 ดูจากกล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป กำลังขยาย 7,500 เท่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

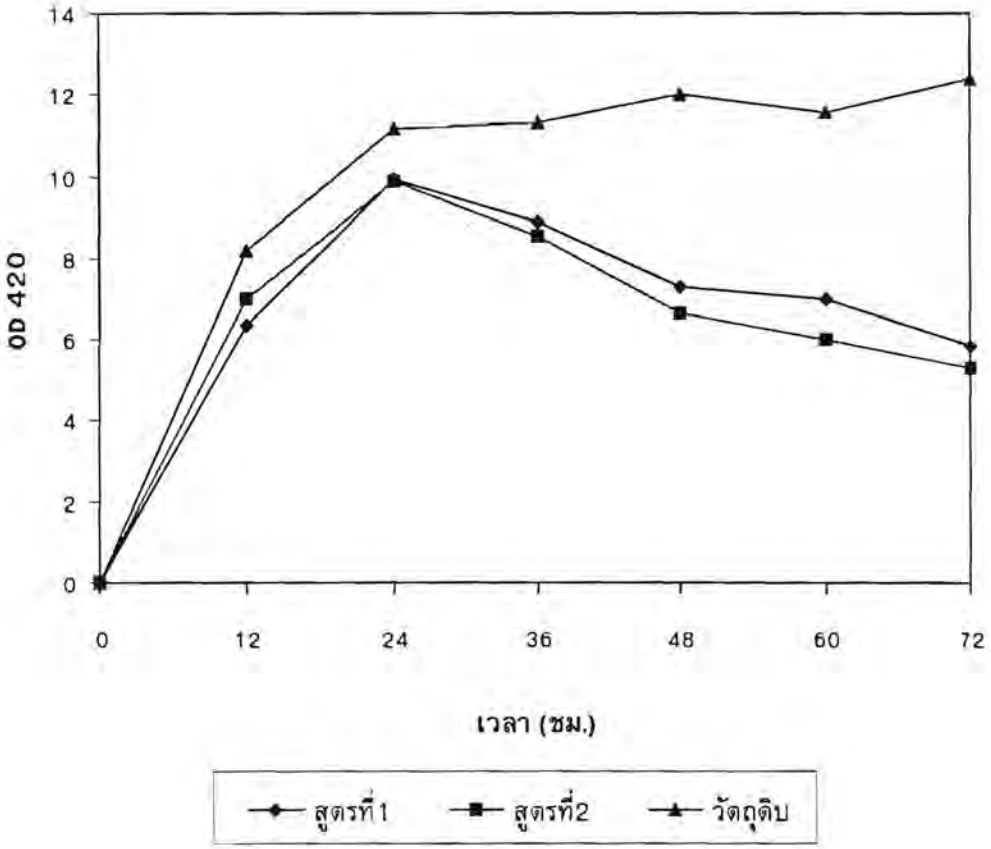
9. <u>เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพิ่มมากที่สุด</u>

จากผลการทดลองในตารางที่ 19 พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ UUNN-1 จะให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามการทดลองที่ 5.2 พบว่าสายพันธุ์ UUNN-1 สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้เท่ากับ 101.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (หลังการเพาะเลี้ยง 60 วัน) ซึ่งผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น คิดเป็นร้อยละ 48.60 ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ UUNN-1 มาทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว3ชนิดได้แก่ Basal Medium สูตร 1, สูตร 2 และ อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน มาเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

1. <u>การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ UUNN-1 เปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิด ระดับขวดเขย่า</u>

การหาสูตรอาหารพื้นฐานเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มาเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยเปรียบเทียบระหว่าง Basal Medium สูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน แทนสารสกัดจากยีสต์ ( Yeast extract) มาทดลองเปรียบเทียบด้วย โดยใช้ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ และเปรียบเทียบผลจากสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ (กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันอัตราส่วน 1:1ที่ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก) พบว่าจะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากวัตถุดิบกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันได้สูงกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ (เกษม พงษ์มณี , 2536)

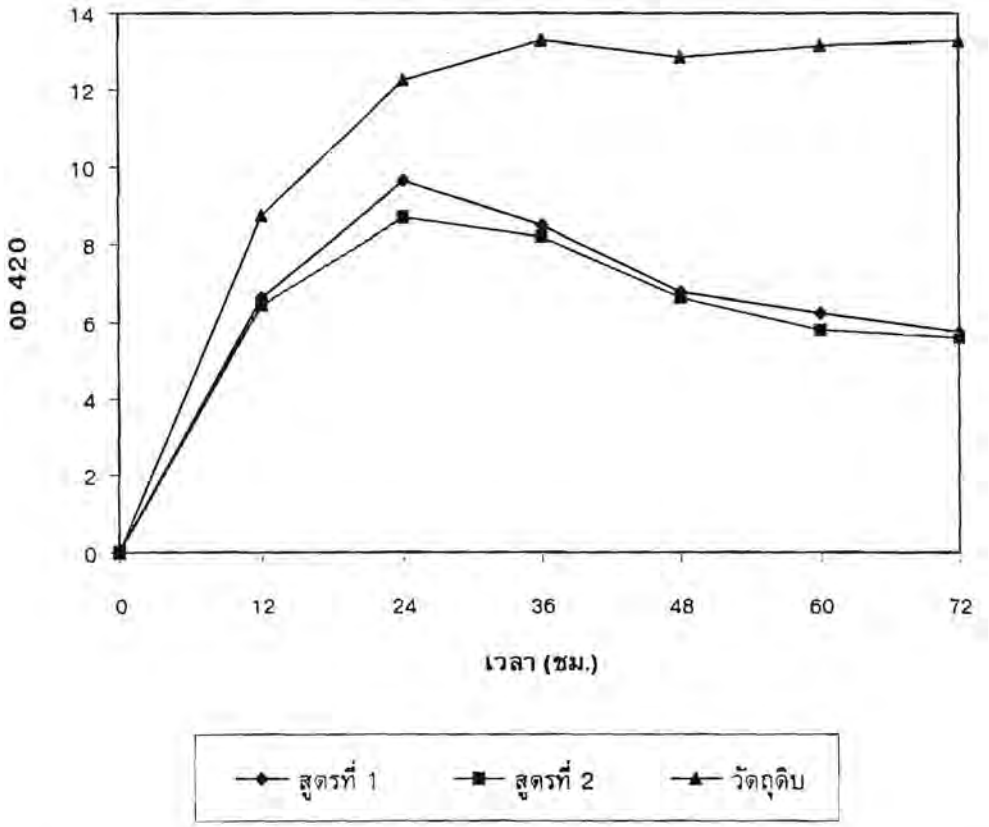
ได้ทำการทดลองหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ UUNN-1 เปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิด ระดับขวดเขย่า นำผลมาเขียนกราฟแสดงดังรูปที่ 8




**รูปที่ 8 อัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1 , สูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์**

จากรูปที่ 8 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้น เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่1 และ สูตรที่ 2 อัตราการเจริญจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆ

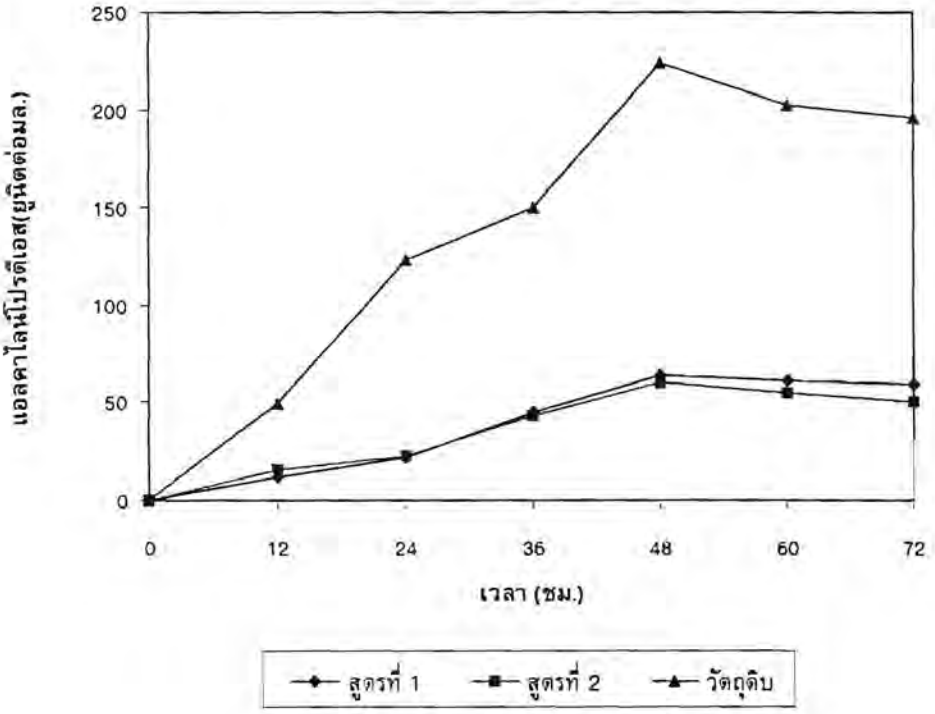
ส่วนเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม จะเห็นว่า หลังชั่วโมงที่ 24 อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หรือค่อนข้างคงที่และจะเห็นว่าอัตราการเจริญของเชื้อ UUNN-1 จะเจริญได้ดีกว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เล็กน้อย




**รูปที่ 9อัตราการเจริญของเชื้อUUNN-1ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่1,สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และ อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์**

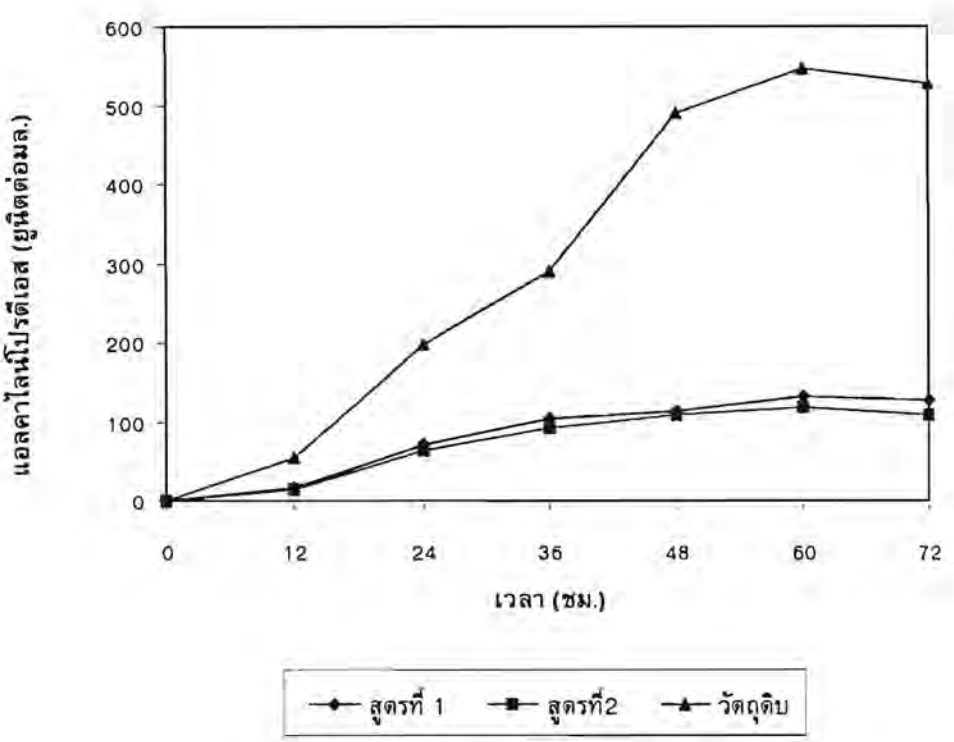
จากรูปที่ 9 แสดงการเจริญของเชื้อ UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)2.0เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และ ใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Basal Medium สูตรที่1 และ สูตรที่ 2 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่

ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้น อัตราการเจริญจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆส่วนเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม จะเห็นว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้น อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่ในการทดลองนี้ ได้นำน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ มาวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสดังแสดงผลในรูปที่ 10 และ 11




รูปที่ 10ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อ ***Bacillus subtilis*** **TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน0.3เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์**

จากรูปที่10 การสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 และ อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันแหล่งไนโตรเจน พบว่า ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีการสร้างเอนไซม์ จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้น จะเริ่มมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น และจะมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 แอคติวิตีเอนไซม์ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสูตรที่1, สูตรที่ 2 เท่ากับ 63.84 และ 60.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกันอาจเนื่องจากปริมาณแร่ธาตุในอาหารทั้ง 2 สูตรมีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงทำให้การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไม่แตกต่างกันมากนักส่วนในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ในช่วง 8 ชั่วโมงแรกยังไม่มีการสร้างเอนไซม์ จากนั้นเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญมากขึ้น จะมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น อย่างเห็นได้ชัดและจะมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรแรกแอคติวิตีเอนไซม์ที่วัดได้สูงเท่ากับ 223.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2



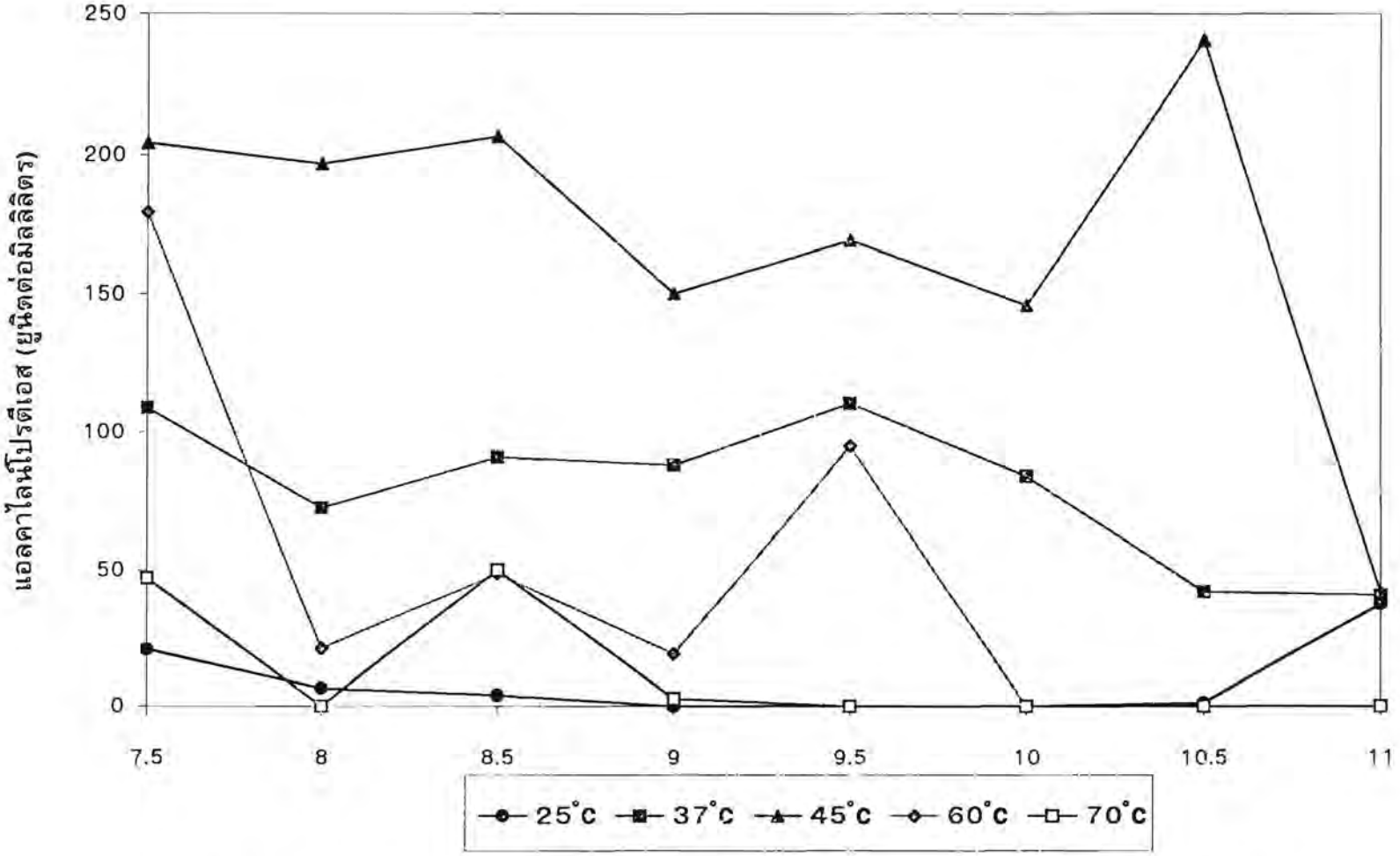

**รูปที่11ปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากเชื้อUUNN-1ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่1,สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์**

จากรูปที่ 11 การสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อ UUNN-1 (ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และสารเคมี NTG 2 ครั้ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และ อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่า ในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีการสร้างเอนไซม์ จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้นจะเริ่มมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นและจะมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก อาหารสูตรที่1,สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0

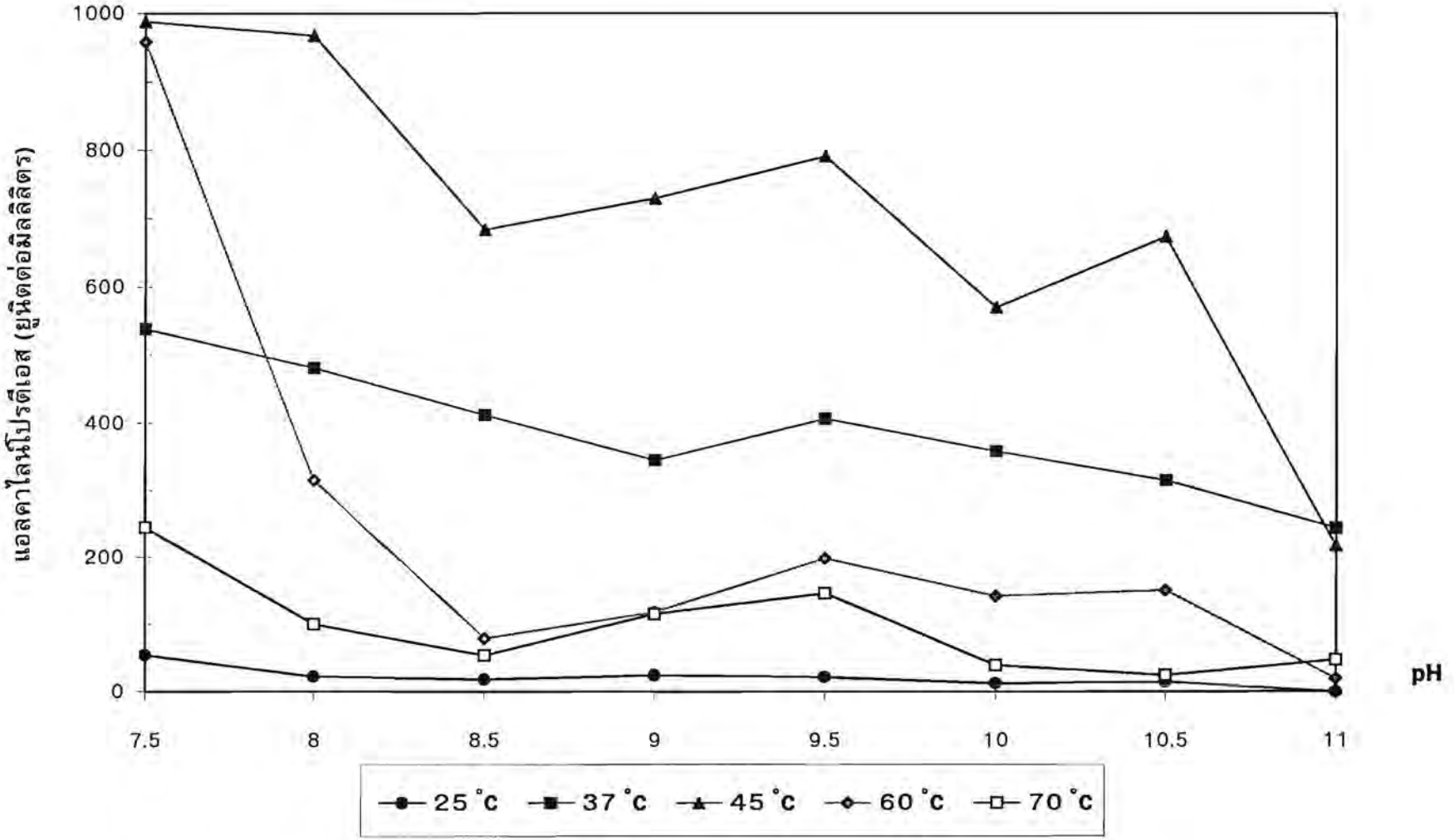
เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 131.13 และ 118.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเนื่องจากปริมาณแร่ธาตุในอาหารทั้ง 2 สูตรมีปริมาณใกล้เคียงกันจึงทำให้การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไม่แตกต่างกันมากนักส่วนในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ พบว่าในช่วง 10 ชั่วโมงแรกยังไม่มีการสร้างเอนไซม์ จากนั้นเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญมากขึ้น จะมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และจะมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 เช่นเดียวกับเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรแรก แอคติวิตีเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุด เท่ากับ 546.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่า เชื้อ UUNN-1 สามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ดีกว่าอาหารสูตรที่1 และ สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มากอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเลือกการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีนี้เพื่อนำเอนไซม์ไปทำเป็นรูปผงต่อไป

## 10. <u>การหา อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส</u>

การหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน เท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส (ตามการทดลองข้อ 5.2) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงดกตะกอนแยกเซลล์ออก แล้วนำไปบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ( pH 7.5 - 11.0 ตามวิธีการทดลองข้อ 6) และนำตัวอย่างที่บ่มกับบัฟเฟอร์ทุก pH แยกไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25, 37, 45, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ตามวิธีการทดลองข้อ 7) คำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 นำมาเขียนกราฟได้ ดังรูปที่ 12 และคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ UUNN-1 เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ นำมาเขียนกราฟได้ ดังรูปที่ 13




รูปที่ 12 แสดงอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน ในอัตราส่วน1;1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง




รูปที่ 13 แสดงอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อ ***Bacillus subtilis*** **UUNN-1** ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน ในอัตราส่วน1;1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง

จากกราฟรูปที่ 12 แสดงการหา อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะเห็นว่า แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 วัดแอคติวิตีสูงสุดได้เท่ากับ 240.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 10.5 อุณหภูมิในการบ่ม 45 องศาเซลเซียส โดยที่แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ pH 7.5-8.5 และจะลดลงที่ pH 9.0-10.0 จากนั้นจะขึ้นสูงสุดที่ pH 10.5 และที่ pH 11.0 จะลดลงต่ำมากจนเห็นได้ชัด จากกราฟจะเห็นว่าที่อุณหภูมิห้อง คือ 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิสูง 60และ 70องศาเซลเซียสแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีปริมาณต่ำอย่างเห็นได้ชัด เมื่อดูจากกราฟ จะเห็นว่าอุณหภูมิและpH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือที่อุณหภูมิ45 องศาเซลเซียส และที่ pH 10.5

จากกราฟรูปที่ 13 แสดงการหา อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ UUNN-1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะเห็นว่า แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ UUNN-1 วัดแอคติวิตีสูงสุดได้เท่ากับ 988.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7.5 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่ค่อนข้างจะเป็นกลาง อุณหภูมิในการบ่ม 45 องศาเซลเซียส โดยที่แอคติวิตีจะสูงที่ pH 7.5-8.0 (ซึ่งในช่วง pH นี้จะเป็นการวัดเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส ) และจะลดลงที่ pH 8.5 จากนั้นจะขึ้นสูงที่ pH 9.5 วัดแอคติวิตีได้เท่ากับ 791.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่pH 10.0-11.0 จะลดต่ำลงจนเห็นได้ชัด จากกราฟจะเห็นว่าที่อุณหภูมิห้อง คือ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูง 60 และ 70 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ UUNN-1 มีปริมาณต่ำอย่างเห็นได้ชัด เมื่อดูจากกราฟ จะเห็นว่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ UUNN-1 คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่ pH 9.5 และพบว่าเชื้อ UUNN-1 จะผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสได้สูงกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งต่างจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งดันเดิม) จะให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส

## 11. การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผง และการเก็บรักษาเอนไซม์ที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

### 11.1 การเตรียมเอนไซม์ผง

เกษม มณีพงษ์ (2536)ได้ทดลองทำการเปรียบเทียบการเตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีต่างๆ ได้แก่ การตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์, โซเดียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์, เอธานอล 70 เปอร์เซนต์ และ วิธีไลโอฟิไลซ์เซชั่น (การทำให้เข้มข้นก่อนโดยการกรองด้วย อัลตรา-ฟิวเดรชั่น แล้วทำให้แห้งเป็นผง)พบว่าปริมาณยูนิตทั้งหมดและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ ดังนั้นในการเตรียมเอนไซม์ผงของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) จึงเลือกใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์

การเตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์จากการหาแอลคาไลน์โปรตีเอสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) ในสูตรอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับ กากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วน 1:1 มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ และ มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) มีแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีเท่ากับ 251,506 ยูนิตต่อลิตร และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 167.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 316.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ Activity Yield สูงขึ้น 89.04 เปอร์เซนต์

ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) มีแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี เท่ากับ 651,477 ยูนิตต่อลิตร และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 383.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 709.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ Activity Yield สูงขึ้น 85.25 เปอร์เซนต์ แสดงผลในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีก่อนและหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ระหว่าง *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์)

| แอคติวิตี | ก่อนตกตะกอน | | หลังตกตะกอน | |
|---|---|---|---|---|
| | ***B. subtilis* TISTR 25** | **UUNN-1** | ***B. subtilis* TISTR 25** | **UUNN-1** |
| **ยูนิตทั้งหมด** (ยูนิต/1ลิตร) | 251,506 | 651,477 | 316,968 | 688,610 |
| **ปริมาณโปรตีน** (มก./1ลิตร) | 1500 | 1700 | 1000 | 970 |
| **แอคติวิตีจำเพาะ** (ยูนิต/มก.โปรตีน) | 167.671 | 383.222 | 316.968 | 709.907 |

## 11.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ โดยวิธีตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยนำเอนไซม์ผงมาวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีก่อน ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงเท่ากับ 316.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนเชื้อ UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงเท่ากับ 709.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นแบ่งเอนไซม์ผงที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ -20, 4, 25, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผง เก็บห่างกันครั้งละ 15 วัน จำนวน 2 ครั้ง รวมเป็นเวลาทั้งหมด 30 วัน เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และสายพันธุ์ใหม่ NNUU-1 ซึ่งเตรียมโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์

| Relative Activity (%) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | *Bacillus subtilis* TISTR 25 | | | UUNN-1 | | |
| | 0 วัน | 15 วัน | 30 วัน | 0 วัน | 15 วัน | 30 วัน |
| -20 | 100.00 | 100.16 | 100.64 | 100.00 | 100.10 | 100.24 |
| 4 | 100.00 | 100.32 | 100.32 | 100.00 | 100.37 | 100.12 |
| 25 | 100.00 | 100.50 | 99.81 | 100.00 | 100.12 | 99.88 |
| 37 | 100.00 | 100.29 | 99.68 | 100.00 | 99.88 | 100.12 |
| 45 | 100.00 | 99.81 | 98.24 | 100.00 | 99.63 | 99.39 |
| 60 | 100.00 | 99.68 | 97.75 | 100.00 | 99.51 | 97.18 |

* Crude enzyme powder ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) 26,414 ยูนิต/กรัม เท่ากับ 100 %

**Crude enzyme powder ของ UUNN-1(สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) 68,861 ยูนิตต่อกรัมเท่ากับ 100 %

จากตารางที่ 22 จะเห็นว่า เชื้อสายพันธุ์ทั้งสอง เก็บที่อุณหภูมิ -20, 4, 25, 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ยังไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลยแต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส *Bacillus subtilis* TISTR 25 คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลง 1.76 และ 2.25 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 98.24 และ 97.75 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อ UUNN-1 ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลง 0.61 และ 2.82 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 99.39 และ 97.18 เปอร์เซนต์ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำจนจากการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน จนถึงอุณหภูมิห้องได้นานพอควรโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของ

เอนไซม์เลย แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งถ้าเก็บเป็นเวลานานจะทำให้มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์มากขึ้นด้วย

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น ได้แก่ สายพันธุ์ UUNN-1

## 1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ

จากผลการทดลองสุ่มตัวอย่างจากการกลายพันธุ์โดยแสงอุลตราไวโอเลตและ NTG วิธีละ 50 ตัวอย่าง ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น ในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ โดยดูจากอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (Potency Index) กับการวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 1 และ 2 คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r) ซึ่งโดยปกติมีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 เป็นค่าที่บอกระดับความสัมพันธ์ของ Potency Index กับ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ว่ามีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด กล่าวคือ ถ้าค่า r เข้าใกล้ +1หรือ -1มากเท่าใดแสดงว่า Potency Index กับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ว่ามีความสัมพันธ์กันมากเท่านั้น ซึ่งเป็นไปดามกัน ถ้าค่า r เข้าใกล้ +1 และเป็นไปในทางตรงกันข้ามกัน ถ้าค่า r เข้าใกล้ -1 ถ้าค่า r เข้าใกล้ 0 มากเท่าใดค่าPotency Index กับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยลงเท่านั้น

จากการทดลองพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ; r ที่ได้จากการกลายพันธุ์ โดยแสงอุลตราไวโอเลตและ NTG มีค่าเท่ากับ 0.7747 และ 0.8154 ตามลำดับ ค่าที่ได้มีค่าเข้าใกล้ +1 แสดงว่าค่า Potency Index กับ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ว่ามีความสัมพันธ์กันไปในทางเดียวกัน ดังนั้นค่าที่ได้เป็นค่าที่พอจะยอมรับได้ ค่า Potency Index มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส สูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิและใช้ค่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ในขั้นทุติยภูมิ

## 2. เปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ โดยแสงอุลตราไวโอเลตและ NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis TISTR* 25

จากการทดลอง เมื่อนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต และ NTG ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ได้พบว่าอัตราการรอดของการกลายพันธุ์โดยอุลตราไวโอเลต จะสูงกว่าอัตราการรอดของการกลายพันธุ์โดยใช้ NTG และการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตจะสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 73.83 % ส่วนการกลายพันธุ์ของ NTG จะสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 คิดเป็น 56.28 % ซึ่งจะเห็นว่า ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตจะสูงกว่าการกลายพันธุ์ของ NTG มากอย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำมา ทดสอบความเสถียรโดยการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ระยะห่างกันครั้งละ 15 วัน (จากตารางที่ 6 และ 9 ) พบว่าสายพันธุ์ U -12 มีความเสถียรน้อยกว่าสายพันธุ์ N -5 คิดเป็น 5.62 % แต่สายพันธุ์ U - 12 จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ N-5 เท่ากับ 6.06 % ซึ่งเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ที่ได้หลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง ก็ยังมีค่าสูงกว่า N-5 เมื่อเปรียบเทียบถึงวิธีการทำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีพบว่าการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตซึ่งเป็นรังสีที่มีพลังงานระดับต่ำไม่ทำให้เกิดกระบวนการไอออนไนเซชัน (Ionization) อัตราการรอดสูง เนื่องจาก DNA สามารถดูดกลืนพลังงานจากแสงอุลตราไวโอเลตได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่นิยมใช้ ในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะทำให้เกิดการจับตัวของไพริมิดิน ไดเมอร์ (Pyrimidine dimer ) ในสาย DNA โพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกัน ทำให้เกิดการแทนที่เบสผิดพลาด ระหว่างการจำลองดัว (Fantini , 1975 ) ส่วน NTG เป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดความผิดปกติของ DNA ทำให้การจับคู่ระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไปได้หลายจุดในขณะที่ แสงอุลตราไวโอเลตเกิดขึ้นบริเวณที่มีไพริมิดิน ไดเมอร์ เท่านั้น จึงทำให้มีความเสถียรและกลับคืนสู่สภาพปกติได้ช้ากว่าการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต เมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธี พบว่าการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและปลอดภัย ในการใช้งานมากกว่าการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ซึ่งการเตรียมการทดลองจะยุ่งยากซับซ้อนและมีอันตรายมากกว่า ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ U-12 เป็นสายพันธุ์ดั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป

## 3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย แสงอุลตราไวโอเลต

เมื่อนำ U-12 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จากตารางที่ 10 พบว่าที่เวลาฉายแสง 10 , 15 , 20 และ 25 วินาที อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ U-12 ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้นลดลงมาก คือ

0.4, 1.0, 1.4 และ 0.6 ตามลำดับ และจากตารางที่ 11 เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UU-15 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูง 128.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 93.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 38.16 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน เพื่อดูความเสถียร (ตารางที่ 12) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์ U-12 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ U-12 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 ได้ไปเปลี่ยนแปลงเบส DNAที่เป็นไพริมิดิน ไดเมอร์ เพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตเพียงครั้งเดียวจะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต 2 ครั้งไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส อย่างไรก็ตามผลผลิตสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง สายพันธุ์ UU-15จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่า สายพันธุ์ U-12 คิดเป็น 39.53 เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 69.218 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ) ถึง 53.45 เปอร์เซนต์

**4. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UU-15 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG**

เมื่อนำ UU-15 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากตารางที่ 13 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UU-15 ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้นลดลงมาก คือ 0.8, 1.0 และ 0.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากตารางที่ 14 เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UUN-8 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูง 118.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ UU-15 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 96.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 22.84 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน เพื่อดูความเสถียร (ตารางที่ 15) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน กับสายพันธุ์ UU-15 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ UU-15 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ได้ไปเปลี่ยนแปลงเบส DNA จุดอื่นหลายจุดด้วย จึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG 1 ครั้ง ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส อย่างไรก็ตาม ผลผลิตสุดท้าย หลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง สายพันธุ์ UUN-8 จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงกว่า สายพันธุ์ UU-15 คิดเป็น 25.17 เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 69.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ) ถึง 45.85 เปอร์เซนต์

5. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUN-8 กลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG

เมื่อนำ UUN-8 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากตารางที่ 16 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UUN-8 ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้นลดลงมาก คือ 0.67, 1.0และ 0.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากตารางที่ 17 เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UUNN-1 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูง 127.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ UUN-8 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เท่ากับ 90.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 40.62 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ห่างกัน 15 วัน เพื่อดูความเสถียร (ตารางที่ 18) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน กับสายพันธุ์ UUN-8 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ UUN-8 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ได้ไปเปลี่ยนแปลงเบส DNA จุดอื่นหลายจุดด้วย จึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG 1 ครั้ง ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส อย่างไรก็ตาม ผลผลิตสุดท้าย หลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง สายพันธุ์ UUN-8 จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงกว่า สายพันธุ์ UUN-8 คิดเป็น 44.38เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 68.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ) ถึง 65.13 เปอร์เซนต์

จากการทดลองทำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีที่ผ่านมาการทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตจะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มากซึ่งจะได้ผลดีในช่วงอัตราการรอดต่ำ ซึ่ง Fantini AA. ได้รายงานไว้ว่า ที่เปอร์เซนต์รอด 1-5 เปอร์เซนต์ เป็นช่วงที่มีการเกิดการกลายพันธุ์สูง ส่วนการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Sykita B. ได้รายงานว่าจากการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ จะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตเท่าไรนัก แต่จะมีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์มีความไวต่อสารก่อการกลายพันธุ์เช่น NTG ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ดีที่เปอร์เซนต์รอด 0-50 เปอร์เซนต์ และสารนี้ยังทำให้เกิดการกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง (Calam C.T. , 1983) ดังนั้นจึงมีผลทำให้การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความเสถียรกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

Shah D.N. และคณะ ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus licheniformis* โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต ผลได้สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นแอคติวิตีสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น 100-110 เปอร์เซนต์ จากสายพันธุ์เดิม แต่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงดูความเสถียรจึงไม่สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติของสายพันธุ์ใหม่กับสายพันธุ์เดิมได้ ดังนั้นจากการทดลองที่ผ่านมาในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตและการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ควรเตรียมขึ้นใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง และพบว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตเป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก

และปลอดภัยต่อการเตรียมการใช้ รวมทั้งให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมมาก แต่ถ้ามีการใช้การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมด้วยก็จะทำให้การคืนกลับสู่สภาพเดิมช้าลงกว่าเดิมได้

6. ลักษณะเซลล์

เมื่อดูลักษณะเซลล์ของเชื้อ สายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 พบว่าลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ UUNN-1 มีรูปร่างสั้นกว่าเซลล์ของสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด อาจเนื่องจากแสงอุลตราไวโอเลตและสาร NTG มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคู่เบสใน สาย DNA จึงมีผลต่อรูปร่างเซลล์ แต่ให้ผลผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมมาก

7. เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก สายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้

7.1 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิดในระดับขวดเขย่า

จากกราฟรูปที่ 8 และ 9 แสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ ตามลำดับ ในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ Basal Medium สูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจน เท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และมีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จากกราฟ พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ เจริญได้ดีในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม แต่อัตราการเจริญของ UUNN-1 เจริญดีกว่าเล็กน้อย และอัตราการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 24 และจะคงที่เล็กน้อย จากนั้นจะค่อยๆลดลง และจากกราฟรูปที่ 10 และ 11 พบว่าอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจน เท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และมีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจากสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ จะมีค่าสูงกว่า*Bacillus subtilis* TISTR 25 สูงมาก อาจเป็นไปได้ว่า การใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว ปริมาณและชนิดของ

กรดอะมิโนที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อมีอยู่ในระดับหนึ่ง เมื่อใช้วัตถุดิบผสมจึงเท่ากับเสริมปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีมากขึ้นหรือมีความเหมาะสมมากขึ้น จากการรายงานของ สนธยา ( 2533) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้กรดอะมิโนผสม 16 ชนิด จะให้ผลการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีกว่าการใช้กรดอะมิโน 4 ชนิด หรือชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

### 7.2 การหา อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

จากกราฟรูปที่ 12 และ 13 พบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หา หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากที่อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้ เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้มีปริมาณต่ำมาก เมื่อดูที่ pH จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ได้สูงสุดที่ pH 10.5 ส่วนที่ pH 7.5-8.5 เป็นช่วงการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอสจะมีปริมาณต่ำลงมา แต่สายพันธุ์ UUNN-1 แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดที่ pH 7.5 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง แล้วจะเพิ่มสูงขึ้นอีกที่ pH 9.5 ซึ่งเป็นช่วงการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ ที่หลังการกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงดรงเบสที่ผลิดทั้งนิวทรัลโปรตีเอส และแอลคาไลน์โปรตีเอสจึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสมีแนวโน้มสูงขึ้นกว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 นอกจากนี้ แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสก็มีแนวโน้มสูงขึ้นกว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยและมีผลต่อ pH สูงสุดของการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสเปลี่ยนแปลงจาก pH 10.5 เป็น 9.5 แสดงว่าการกลายพันธุ์อาจมีผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งด้วย

## 8. การเตรียมเอนไซม์รูปผง

### 8.1 การเตรียมเอนไซม์รูปผง

โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายทำได้โดยการค่อยๆเติมเกลือลงในสารละลายเอนไซม์ทีละน้อยจนกระทั่งถึงความเข้มข้นที่สามารถตกตะกอนเอนไซม์ออกมาได้ ตะกอนก็จะเกิดขึ้น สามารถแยกตะกอนได้โดยการกรองและทำให้แห้งโดยการอบที่ 45 องศาเซลเซียส และความ

สามารถในการละลายของเอนไซม์ผง ก็ละลายในน้ำได้ดี เนื่องจาก เอนไซม์ที่ได้มีเกลือปนอยู่ จึงอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายถ้ามีความชื้นหลงเหลืออยู่มาก (เกษม พงษ์มณี, 2536)

## 8.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆกัน

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิต่างๆกัน เป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่22) พบว่าที่อุณหภูมิ -20 ถึง 37 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย แต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงเมื่อเก็บได้ประมาณ 15 วัน แต่ลดลงเล็กน้อยเท่านั้น จะเห็นว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 97.75 เปอร์เซนต์ ส่วน UUNN-1 จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 97.18 เปอร์เซนต์ ภายหลังเก็บเป็นเวลานาน 30 วัน ที่อุณหภูมิดังกล่าว

# เอกสารอ้างอิง


1. เกษม พงษ์มณี, 2536, การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. Fox, J.W., Shannon, J.D. and Bjarnason, J.B., 1991, Proteinases and Their Inhibitors in Biotechnology, In G.F. Leatbam and M.E. Himmel (eds.), Enzyme in Biomass Conversion, American Chemical Society, Washington DC., pp.63-66.
3. Rehm, H.J. and Reed, G., 1987, Proteolytic Enzymes,Biotechnology Volume 7a, Enzyme Technology, VCH Publishers, pp.156-157.
4. Helle, O. and Boyce, C.O., 1990, Microbial Proteinase and Biotechnology, In W.M. Fogarty and C.T. Kelly (eds.), Microbial Enzyme and Technology 2nd edition, pp.240-251.
5. Aunstrup, K., 1980, Proteinases, In A.H.Rose (ed.), Economic Microbiology Volume 5, Microbial Enzymes and Bioconversion, academic Press, London, pp.50-110.
6. Ward, O.P., 1983, Proteinase, Microbial Enzymes and Biotechnology, In Forarty, W.M (ed.), Applied Science Publishers, London and New York, pp.251-317.
7. Baltz, R., 1986, Strain Improvement, In A.L. Demain and N.A. Solomon, (eds.), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington DC., pp.154-169.
8. Jacobson, G.K., 1980, Mutation, Biotechnology Volume I,Microbial Fundamental, pp.288-301.
9. Sikyta, B.,1983, Genetic of Industrial Microorganisms, Methods in Industrial Microbiology, Ellis Horwood Limited, pp.218-241.
10. Richard, J.H., 1991, Cassette mutagenesis, In M.J. Mc Pherson, Directed Mutagenesis A Practical Approach, ILR Press, New York, pp.147.
11. Shah, D.N., et.al., 1986, Isolation of *Bacillus Licheniformis* Mutants for Stable Production Profiles of Alkaline Protease Biotechnology Letter, 8, 2, pp.107-110.

12. Morohoshi, F. and Munakata, N.,1985, *Bacillus subtilis* Mutants Deficient in the Adaptive Response to Simple Alkalating Agents Journal of Bacteriology, 161, 3, pp.825-830.

13. Morohoshi, F. and Munakata, N., 1986, Two classes of *Bacillus subtilis* mutants deficient in the adaptive response to simple alkylating agents, Molecular General Genetic, 202, pp.200-206.

14. ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ 2532, การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

15. สนธยา ศรีเมฆ, 2533, ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน ต่อการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจน เมแทบอลิซึม ของ บาซิลลัส สับติลิส TISTR 25, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

16. สมศักดิ์ นาคซื่อตรง, 2537, การปรับปรุงสายพันธุ์ Candida oleophila C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว,วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

17. โชตนา ประมวลวัลลิกุล, 2534, การกลายพันธุ์ Penicillium chrysogenum เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลลิน จี, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

18. Fantini A.A., 1975, Strain Development. Methods in Enzymology. ,vol. 43,pp.24-41. New York: Academic Press.

19. Joseph D. Mandell and Joseph Greenberg,1960, A new mutagen for bacteria, 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidine, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 3, No. 6.

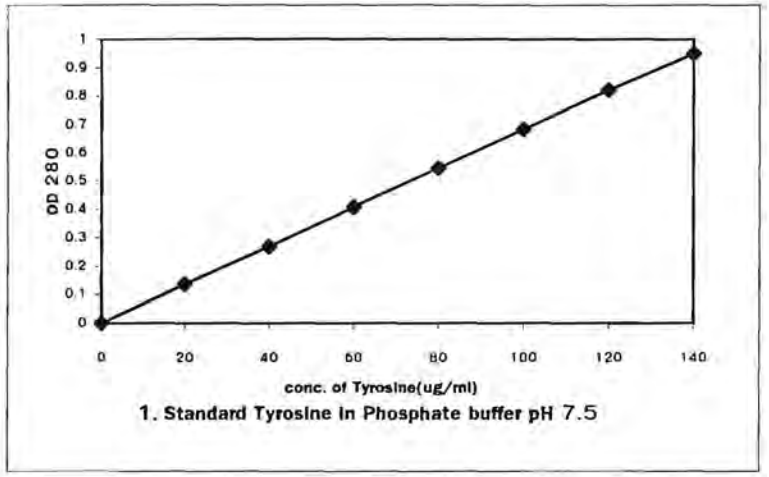
20. Thomas B. Higerd, James A. Hoch, and John Spizizen, Hyperprotease-Producing Mutants of *Bacillus subtilis*., Journal of Bacteriology, Nov. 1972, pp. 1026-1028.

21. James A. Hoch, 1991, Genetic Analysis in *Bacillus subtilis*, Methods in Enzymology, vol. 204.

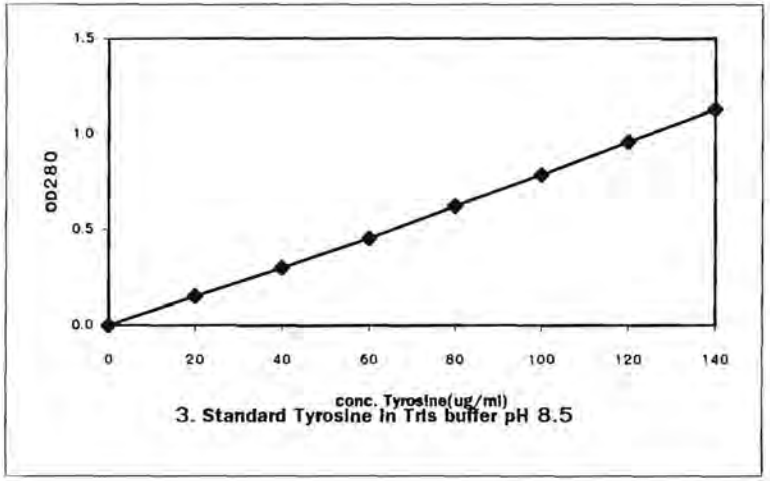
22. Patricia L. Foster, 1991, In Vivo Mutagenesis, Methods in Enzymology, vol. 204.

23. Sermonti G., 1978, Mutation and Microbial Breeding, Genetic of Industrial Microorganism,302, 11.

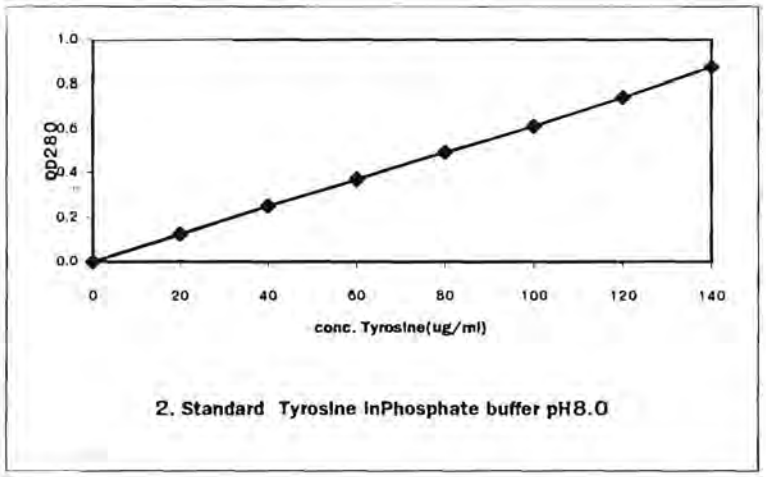
24. Cerda-Olmedo E., and Ruiz- Vazquez, 1978, Nitrosoguanidine Mutagenesis. Genetic of Industrial Microorganism,302, 11.



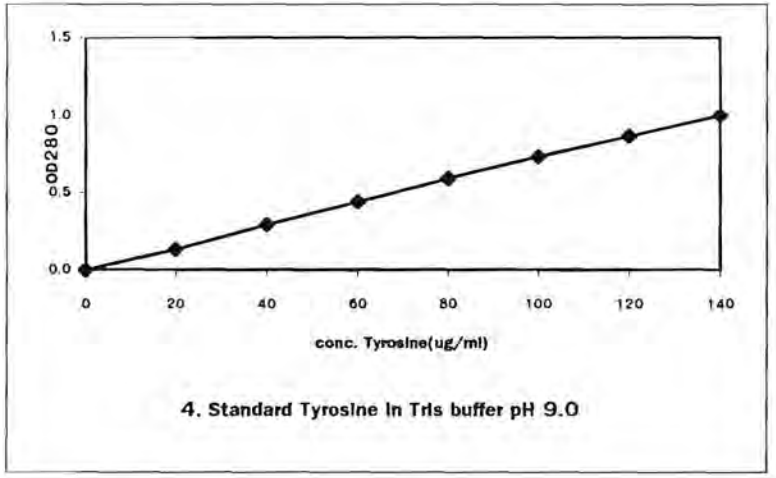

1. Standard Tyrosine in Phosphate buffer pH 7.5




3. Standard Tyrosine in Tris buffer pH 8.5

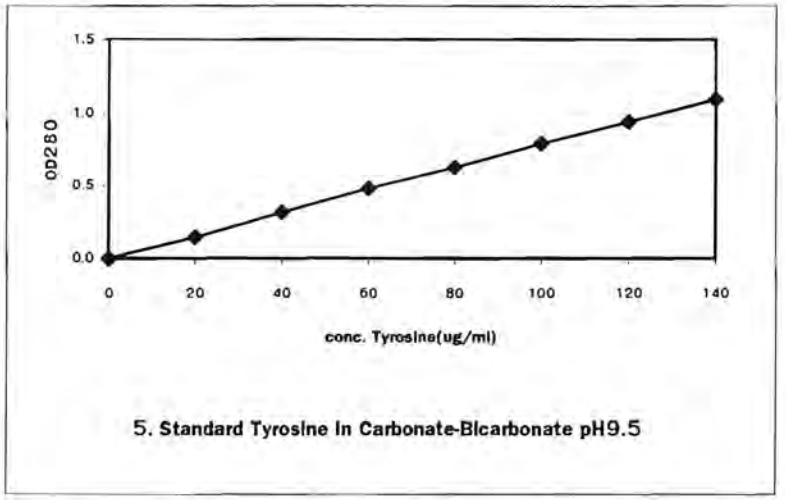



2. Standard Tyrosine inPhosphate buffer pH8.0

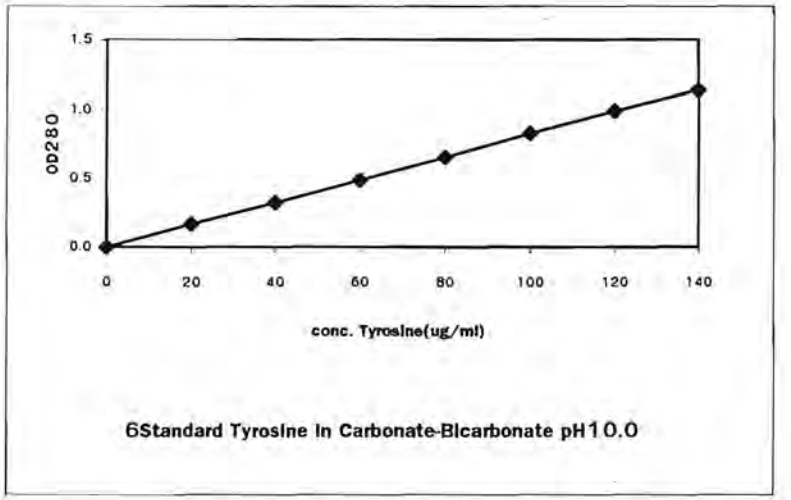



4. Standard Tyrosine in Tris buffer pH 9.0

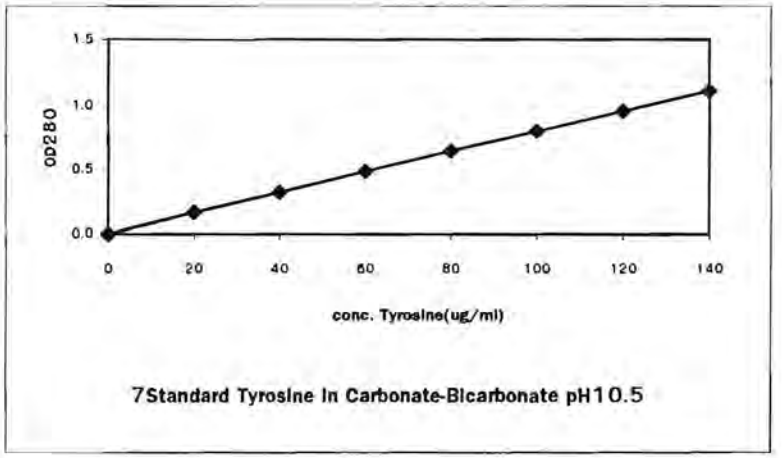
รูปที่ 1-4 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
กับความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน ความเข้มข้น 0-120 นาโนเมตร
ในสารละลาย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 - 8.0 และ ในสารละลาย ทรีส บัฟเฟอร์ pH8.5-9.0



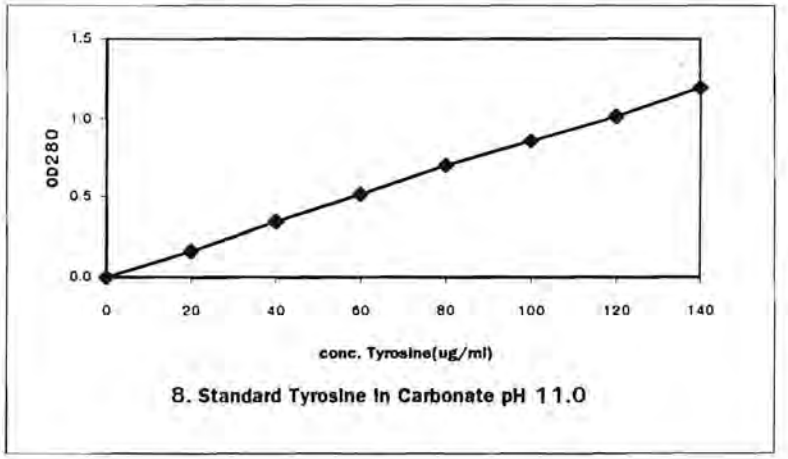

5. Standard Tyrosine In Carbonate-Bicarbonate pH9.5




6Standard Tyrosine In Carbonate-Bicarbonate pH10.0

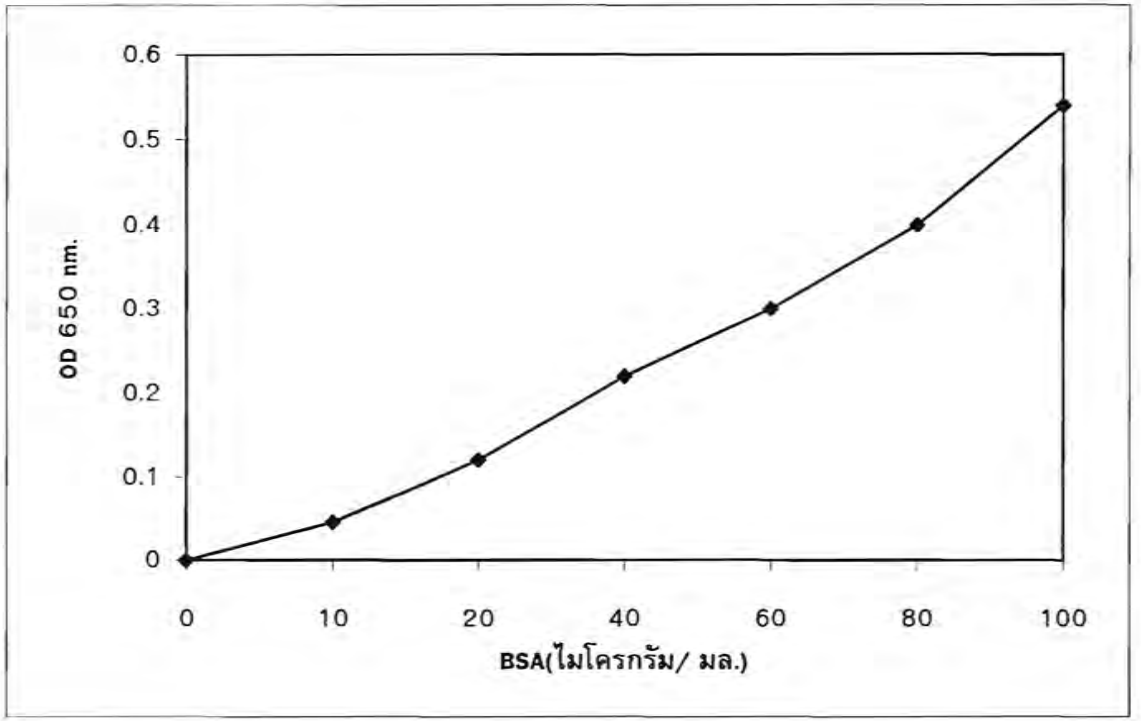



7Standard Tyrosine In Carbonate-Bicarbonate pH10.5




8. Standard Tyrosine In Carbonate pH 11.0

รูปที่ 5-8 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
กับความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน ความเข้มข้น 0-120 นาโนเมตร
ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 9.5 - 10.5
และในสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 11.0




กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน แปรความเข้มข้นของ
**Bovine Serum Albumin (BSA)** 0-100 ไมโครกรัม (วิธีการทดลองตามข้อ 7.)

# สูตรคำนวณ

**1.โพเทนซี อินเดกซ์ (Potency Index)**

$$\text{โพเทนซี อินเดกซ์} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส(มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี(มิลลิเมตร)}}$$

**2.เปอร์เซนต์รอด**

$$\frac{\text{โคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหาร X Dilution factor}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้นทั้งหมด}}$$

**3.สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( Correlation coefficient ; r )**

ค่า r นี้มีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 เป็นค่าที่ไม่มีหน่วยจะบอกระดับความสัมพันธ์ของ X และ Y ว่ามีมากน้อยเพียงใด กล่าวคือ ถ้าค่า r เข้าใกล้ +1 หรือ -1 มากเพียงใด แสดงว่าค่า X และ Y มีความสัมพันธ์กันมากเท่านั้น โดยอาจเป็นไปในทางตามกันถ้าเข้าใกล้ +1 และเป็นไปในกลับกันถ้าเข้าใกล้ -1 และถ้าค่า r เข้าใกล้ 0 มากเท่าใด แสดงว่า X และ Y มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อกันน้อยลงเท่านั้น

$$\text{สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์}(r) = \frac{\sum_{i=1}^{N}(X_i-\mu_X)(Y_i-\mu_Y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N}(X_i-\mu_X)^2 \sum_{i=1}^{N}(Y_i-\mu_Y)^2}}$$

โดย N = จำนวนข้อมูลทั้งหมดในประชากรของ X และของ Y

$\mu$ = ค่าเฉลี่ย (mean)

4. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน } (s) = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}\frac{(X_i-\bar{X})^2}{n-1}}$$

n = จำนวนข้อมูลทั้งหมด