บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG 2 ครั้ง ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น ได้แก่ สายพันธุ์ UUNN-1

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม สิ่งสำคัญในการคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการและประสิทธิภาพในการคัดเลือก วิธีการคัดเลือกต้องเป็นวิธีการที่ให้ผลแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว รวมทั้งคัดเลือกได้ครั้งละปริมาณมากๆ เพื่อช่วยประหยัดเวลาและแรงงาน

จากผลการทดลองสุ่มตัวอย่างจากการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG วิธีละ 50 ตัวอย่าง ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิโดยดูจาก Potency Index กับการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 6 และ 7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r) นี้ โดยปกติมีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 เป็นค่าที่บอกระดับความสัมพันธ์ของ Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสว่ามีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด กล่าวคือถ้าค่า r เข้าใกล้ +1 หรือ -1 มากเท่าใด แสดงว่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสว่ามีความสัมพันธ์กันมากเท่านั้น ซึ่งเป็นไปตามกันถ้าค่า r เข้าใกล้ +1 และเป็นไปในทางตรงกันข้ามกันถ้าค่า r เข้าใกล้ -1 ถ้าค่า r เข้าใกล้ 0 มากเท่าใด ค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะมีความสัมพันธ์กันน้อยลงเท่านั้น (จรัญ และ อนันต์ชัย, 2535)

จากการทดลองพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ; r ที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG มีค่าเท่ากับ 0.77 และ 0.82 ตามลำดับ ค่าที่ได้มีค่าเข้าใกล้ +1 แสดงว่าค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียว

กัน ดังนั้นค่าที่ได้เป็นค่าที่ยอมรับได้ว่าค่า Potency Index สามารถนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น (ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1)ในขั้นปฐมภูมิและวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส (ตามวิธีการทดลองข้อ 6.2) ในขั้นทุติยภูมิ

อย่างไรก็ตาม วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ขั้นปฐมภูมิจะได้ผลแม่นยำ ต้องอาศัยความชำนาญในการเตรียมอาหารโดยการเทอาหารลงใน Plate ควรมีความหนาของวุ้นสม่ำเสมอกันทั้งหมด ความแข็งของอาหารวุ้นพอเหมาะ การจุดเชื้อลงบนอาหารต้องให้มีขนาดและปริมาณใกล้เคียงกัน รวมทั้งป้องกันการติดเชื้อ (Contaminate)ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการจุดเชื้อลงบนแผ่นกระจกที่มีอาหารวุ้นเป็นเวลานาน ซึ่งป้องกันได้โดยทำการทดลองในตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Flow) และพยายามใช้เวลาน้อยที่สุด การทำการทดลองหลายๆซ้ำจะทำให้ได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำขึ้น

2. เปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25

สารที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียให้ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น ส่วนใหญ่จะใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG จากรายงานการทดลองที่มีผู้ทำการศึกษาไว้ (Bautz และ Freese, 1980 ; Adelberg และคณะ, 1965 ; Higerd และคณะ, 1972 ; Shah และคณะ, 1986) ไม่สามารถสรุปได้ว่าวิธีการกลายพันธุ์วิธีใดให้ผลดีกว่ากันในแง่ความเสถียร (Stability) ของเชื้อที่ถูกกลายพันธุ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองชักนำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG

การใช้แสงอัลตราไวโอเลตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความเข้มของแสง ระยะเวลาที่ได้รับแสง ระยะห่างระหว่างแสงกับจุลชีพ สภาพการเจริญของเชื้อ รวมทั้งชนิดและปริมาณของเชื้อจุลชีพ เป็นต้น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันไป แต่ปัจจัยหลักที่สำคัญ คือ ระยะเวลาในการฉายแสง จากงานวิจัยนี้ทำการแปรผันเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตตั้งแต่ 0-50 วินาที พบว่าเวลาฉายแสงที่เหมาะสม (ตารางที่ 8) พบว่าเวลาในการฉายแสง 10, 15, 20 และ 25 วินาที ได้เปอร์เซนต์รอดเป็น 32.80, 10.83, 0.099 และ 0.006 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อระยะเวลาการฉายแสงมากขึ้นเปอร์เซนต์รอดของเซลล์จะลดต่ำลง (Calam, 1970 ; Hopwood, 1970 ; Sikyta, 1983 ; Fantini, 1975) นอกจากนี้ Sikyta (1983) รายงานว่าก่อนการกลายพันธุ์ควรมีความหนาแน่นของเซลล์มากพอสมควรประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมล. จากงานวิจัยนี้ได้ใช้ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสม คือ ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมล. เนื่องจากหลังการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG ในระยะแรกอัตราการรอดจะสูง เมื่อมีการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา

นานขึ้นหรือใช้ความเข้มข้นของสารเคมี NTG สูงขึ้น เซลล์มีอัตราการตายมากขึ้นเปอร์เซนต์การรอดลดน้อยลง ดังนั้นจึงต้องมีการเจือจาง (Dilution) เซลล์อย่างเหมาะสมเพื่อหาความหนาแน่นของโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อประมาณ 50-100 โคโลนีต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน (Sikyta, 1983) ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ระยะเวลานานมากขึ้นพบว่าโคโลนีที่ขึ้นในแต่ละจานจะมีจำนวนน้อยมาก จึงต้องเพิ่มจานอาหารเพื่อทำการคัดเลือกเซลล์จำนวนมากขึ้นเป็นการเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น

สำหรับการใช้สารเคมีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปัจจัยหลักที่สำคัญคือความเข้มข้นของ NTG Hopwood (1970) รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของ NTG ยิ่งสูงขึ้นอัตราการรอดของเซลล์จะยิ่งลดต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับผลของงานวิจัย เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารเคมี NTG 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมล. สำหรับการหาปริมาณ (Dose)ความเข้มข้น NTG ที่เหมาะสม (ตารางที่ 9) ที่ความเข้มข้น NTG 10, 15, 20, 25,30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมล. เปอร์เซนต์การรอด 32.16, 23.84, 14.68, 10.64, 2.69 และ 1.04 ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเคมี NTG มากขึ้นอัตราการตายของเซลล์จะสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น NTG มากขึ้น พบว่าโคโลนีที่ขึ้นในแต่ละจานจะมีจำนวนน้อยมาก จึงต้องเพิ่มจานอาหารเพื่อทำการคัดเลือกเซลล์จำนวนมากขึ้นเป็นการเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น จากการทดลองทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ได้

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิจากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตได้สายพันธุ์ U-12 พบว่ามีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง73.83 เปอร์เซนต์ ส่วนแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิจากการกลายพันธุ์ของ NTG พบว่าได้สายพันธุ์ N-5 ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 56.28 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตมีค่าสูงกว่ามากอย่างเห็นได้ชัดและเมื่อนำมาทดสอบความเสถียรของประสิทธิภาพของแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ระยะห่างกันครั้งละ 15 วัน (ตารางที่ 8 และ 11) พบว่าสายพันธุ์ U-12 มีความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์น้อยกว่าสายพันธุ์ N-5 คิดเป็น 5.62 เปอร์เซนต์ แต่สายพันธุ์ U - 12 จะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ N-5 เท่ากับ 6.06 เปอร์เซนต์ ซึ่งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้หลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง ก็ยังมีค่าสูงกว่า N-5 เมื่อเปรียบเทียบถึงวิธีการทำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธี พบว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตซึ่งเป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำจะไม่ทำให้เกิดกระบวนการไอออนไนเซชัน (Ionization) อัตราการรอดจึงสูงเนื่องจากดีเอนเอสามารถดูดกลืนพลังงานจากแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่นิยมใช้ในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งการกลายพันธุ์วิธีนี้จะทำให้เกิดการจับตัวของ

ไพริมิดีน ไดเมอร์ (Pyrimidine dimer) ที่อยู่ชิดหรือตรงข้ามกันในสายดีเอนเอโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกันให้เข้ามาเชื่อมชิดกันด้วยพันธะโควาเลนท์ทำให้เกิดการแทนที่เบสผิดพลาดระหว่างการจำลองตัว (Fantini, 1975) ส่วน NTG เมื่อเข้าจับกับเซลล์จะให้หมู่อัลคิล (CH_3) 1 หมู่ แก่เบสเพียวรีนที่บริเวณ Replication Fork ของดีเอนเอที่กำลังจำลองตัวอยู่ จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดความผิดปกติของดีเอนเอทำให้การจับคู่ระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไปได้หลายจุด (Dale,1989)ในขณะที่แสงอัลตราไวโอเลตเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นบริเวณที่มีไพริมิดีน ไดเมอร์เท่านั้น จึงทำให้การกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG มีความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์และกลับคืนสู่สภาพปกติได้ช้ากว่าการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีพบว่าการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและปลอดภัย (Hopwood,1970 ; Fantini, 1975) ในการใช้งานมากกว่าการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ซึ่งการเตรียมการทดลองจะยุ่งยาก ซับซ้อนและเป็นสารที่มีอันตรายมากกว่า Calam (1970) และ Sikyta (1983) รายงานไว้ว่า ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นิยมใช้แสงอัลตราไวเลตเป็นสารในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตัวแรก หลังจากได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงแล้วสามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก2-3 ครั้ง โดยใช้สลับกับสารเคมีชักนำตัวอื่นๆ เช่น NTG ดังนั้นจึงเลือก U-12 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป

3. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* U-12 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

เมื่อนำ U-12 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จากตารางที่ 12 พบว่า ที่เวลาฉายแสง10 , 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 13 เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UU-15 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูง 128.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Bacillus subtilis* U-12 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 93.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 38.16 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยง UU-15 อีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน เพื่อดูความเสถียรของประสิทธิภาพของแอลคาไลน์โปรตีเอส (ตารางที่ 14) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์ U-12 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ U-12 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 ได้ไปเปลี่ยนแปลงเบสดีเอนเอที่เป็นไพริมิดิน ไดเมอร์ ซ้ำที่เดิมหรืออาจเพิ่มจำนวนมากขึ้นจึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพียงครั้งเดียว ดังนั้นจะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง ไม่มีผลต่อการลดลงของแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน

สายพันธุ์ UU-15 จะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ U-12 คิดเป็น 39.53 เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 69.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ถึง 53.45 เปอร์เซนต์

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

เมื่อนำ UU-15 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากตารางที่15 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้สายพันธุ์ที่มี Potency Index สูง อัตราการอยู่รอดของเซลล์ UU-15 ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่า Potency Index ของสายพันธุ์ UU-15 กลับลดลงมาก คือ 0.8, 1.0 และ 0.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากตารางที่ 16 เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UUN-8 ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูง 118.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ UU-15 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 96.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 22.84 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยง UUN-8 อีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน เพื่อดูความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์ (ตารางที่ 17) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์ UU-15 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ UU-15 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ได้ไปเปลี่ยนแปลงเบสดีเอนเอจุดอื่นหลายจุดด้วย จึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG 1 ครั้ง หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว 2 ครั้ง ไม่มีผลต่อการลดลงของแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส นอกจากนี้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง UUN-8 ยังคงมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ UU-15 คิดเป็น 25.17 เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 69.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ถึง 45.85 เปอร์เซนต์

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

เมื่อนำ UUN-8 มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จากตารางที่ 18 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UUN-8 ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่า Potency Index ของสายพันธุ์ UUN-8 กลับลดลงมาก คือ 0.67, 1.0 และ 0.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากตารางที่ 19 คัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ได้ UUNN-1ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงถึง 127.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ UUN-8 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 90.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซนต์สูงถึง 40.64

เปอร์เซนต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยง UUNN-1 อีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน เพื่อดูความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์ (ตารางที่ 20) พบว่า UUNN-1 มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับ UUN-8 แต่ลดลงช้ากว่าสายพันธุ์ UUN-8 อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดแรงมีประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์สูงได้ไปเปลี่ยนแปลงเบสดีเอนเอจุดอื่นหลายจุดด้วย จึงทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติของเซลล์ช้าลงกว่า UUN-8 ดังนั้นพอสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้งและกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG อีก 2 ครั้ง ก็ยังไม่มีผลต่อการลดลงของแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง สายพันธุ์ UUNN-1 ยังคงมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ UUN-8 คิดเป็น 44.38 เปอร์เซนต์ และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 (แอคติวิตี 68.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ถึง 65.13 เปอร์เซนต์

จากการทดลองทำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีต่อเนื่องกันที่ผ่านมา การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มาก ซึ่งการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะได้ผลดีในช่วงอัตราการรอดต่ำ ซึ่งมีรายงานไว้ว่าที่เปอร์เซนต์รอด 1-10 เปอร์เซนต์ เป็นช่วงที่มีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง (Hopwood, 1970 ; Fantini,1975 ; Sikyta, 1983 และ Baltz, 1986) ส่วนการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีบางชนิด จะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตเท่าไรนัก แต่จะมีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์มีความไวต่อสารก่อการกลายพันธุ์เช่น NTG ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ดีที่เปอร์เซนต์รอด 0-50 เปอร์เซนต์ (Sykita, 1983) และสารนี้ยังทำให้เกิดการกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง (Calam, 1983) จึงมีผลทำให้การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

Shah และคณะ (1986) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตพบว่าได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นแอคติวิตีสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น 106-110 เปอร์เซนต์ จากสายพันธุ์เดิม Higerd และคณะ (1972) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยการทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และ EMS แยกได้สายพันธุ์ใหม่ 18 สายพันธุ์ ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นแอคติวิตีรวมมากกว่าสายพันธุ์เดิม 16-37 เท่า แต่ทั้งหมดไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงดูความเสถียรของประสิทธิภาพของเอนไซม์ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติของสายพันธุ์ใหม่กับสายพันธุ์เดิมได้ ดังนั้นจากการทดลองที่ผ่านมาในการเพิ่มแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นโดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ควรเตรียมขึ้นใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งและพบว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และปลอดภัยต่อการเตรียมการใช้ รวมทั้งให้

แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมมาก แต่ถ้ามีการใช้การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมด้วยก็จะทำให้การคืนกลับสู่สภาพปกติช้าลงกว่าเดิมได้

6. ลักษณะเซลล์

จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยฉายแสงอัลตราไวโอเลตและทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG พบว่าลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงแตกต่างออกไปจากสายพันธุ์เดิม เช่น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบ ไม่มีเส้นรอยแตก รูปร่างค่อนข้างกลม บางโคโลนีมีขนาดเล็กมากกว่าสายพันธุ์เดิม เป็นต้น และจากการดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM และ SEM ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 พบว่าลักษณะเซลล์ของสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 มีรูปร่างสั้นกว่าเซลล์ของสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด อาจเป็นไปได้ว่าแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคู่เบสในสายดีเอนเอจึงมีผลต่อรูปร่างเซลล์ แต่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิมมาก

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

7.1 **การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ใหม่ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิด ในระดับขวดเขย่า**

จากกราฟรูปที่ 25 และ 26 แสดงการเจริญของ *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 ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (เกษม , 2536) จากกราฟ พบว่าอัตราการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับสายพันธุ์ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้เจริญได้ดีในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม ซึ่งอัตราการเจริญของ UUNN-1 เจริญดีกว่าเล็กน้อย และอัตราการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สูงสุดชั่วโมงที่ 24 และจะคงที่เล็กน้อย ส่วนสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 อัตราการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 36 และจะคงที่เล็กน้อย จากกราฟรูปที่ 27 และ

28 พบว่าอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และมีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ จะมีค่าเท่ากับ 546.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสูงสุดชั่วโมงที่ 60 ซึ่งสูงกว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาก ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 223.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสูงสุดชั่วโมงที่ 48 อาจเป็นไปได้ว่าในอาหาร Basal medium สูตรที่1 และสูตรที่ 2 ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนรวมทั้งแร่ธาตุต่าง ๆที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อมีอยู่ในระดับหนึ่งซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญของเซลล์ เมื่อใช้วัตถุดิบผสมจึงเท่ากับเสริมปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีมากขึ้นหรือมีความเหมาะสมมากขึ้น จึงมีผลทำให้เชื้อสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงขึ้น จากการรายงานของ สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้กรดอะมิโนผสม 16 ชนิดจะให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีกว่าการใช้กรดอะมิโน 4 ชนิด หรือชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น และเนื่องจากสภาวะที่ใช้เลี้ยง UUNN-1 นี้ยังไม่เหมาะสม จึงอาจมีผลทำให้อัตราการเจริญ การสังเคราะห์เอนไซม์และการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสช้ากว่าสายพันธุ์เดิมได้

7.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG พบว่าได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมากที่สุดเท่ากับ 546.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง ในระดับขวดเขย่า นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส การทดลองนี้เป็นการขยายส่วนเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ทำการวัดการเจริญ, pH และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ได้ผลดังแสดงในกราฟที่ 29 ส่วนการวัดการเจริญ, pH และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ได้ผลดังแสดงในกราฟที่ 30

จากกราฟที่ 29 จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย หรือค่อนข้างคงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 48 อัตราการเจริญจะเพิ่มสูงขึ้นอีกช่วงหนึ่งจนถึงชั่วโมงที่ 72 ส่วน pH จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง pH 6.5-7.0 และเมื่อวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้น แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะเพิ่มมากขึ้นและสูงสุดชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 300.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าคิดเป็น 34.51 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะต่ำลงเล็กน้อย ในชั่วโมงที่ 60 และ 72

จากกราฟที่ 30 จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่อยู่ระยะหนึ่ง ต่อมาอัตราการเจริญมีแนวโน้มเริ่มลดต่ำลง ส่วน pH จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย อยู่ในช่วง pH 6.5-7.0 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และเมื่อวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้น แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และสูงสุดชั่วโมงที่ 60 เช่นเดียวกับเลี้ยงในระดับขวดเขย่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 640.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าคิดเป็น 17.06 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 72 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะมีแนวโน้มต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าในระดับขวดเขย่า อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ปริมาณอาหารมีเป็นจำนวนมาก สภาวะในการเลี้ยงเชื้อมีการกวนผสมดีทำให้การถ่ายโอนของอาหารตลอดจนความเข้มข้นและการละลายของออกซิเจนในอาหารสม่ำเสมอและคงที่กว่าในระดับขวดเขย่า

การทดลองนี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเพื่อเป็นการเปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อย่างไรก็ตามสภาวะที่ใช้ดังกล่าวเป็นสภาวะที่ยังมิได้ผ่านการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ UUNN-1 นี้โดยเฉพาะ ดังนั้นจะต้องมีการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ UUNN-1 ต่อไป โดยคาดหวังว่าเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ UUNN-1 ได้แล้วแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสน่าจะสูงขึ้น

7.3 การหาอุณหภูมิ และpH ที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

ปัจจัยที่มีความสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ และ pH ซึ่งเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสม (Optimum pH) และเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum Temperature) นั้นมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาในการทำงานของเอนไซม์ กล่าวคือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของซับสเตรทมีพลังงานจลน์มากขึ้น จะไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามเพิ่มอุณหภูมิถึงช่วงหนึ่งเท่านั้น ถ้าอุณหภูมิสูงกว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมนี้ จะมีผลทำให้โปรตีนเริ่มสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Denaturation) ดังนั้นอุณหภูมิสูงๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลง (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529)

จากกราฟรูปที่ 31 และ 32 พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเนื่องจากที่อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะต่อการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจึงทำให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้มีปริมาณต่ำมาก เมื่อดูที่ pH จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 จะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุดที่ pH 10.5 แต่สายพันธุ์ UUNN-1 แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดที่ pH 7.5 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง แล้วจะเพิ่มสูงขึ้นอีกที่ pH 9.5 ซึ่ง pH profile เปลี่ยนแปลงไปจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากรายงานของ เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารเคมี EDTA ยับยั้งการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอส พบว่าในช่วงpH 8.5-11.0 มีการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้น และเนื่องจากในช่วง pH 7.5-8.5 พบว่ามีการทำงานของทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอสร่วมกัน ดังนั้นการทดลองนี้เหตุผลที่ภายหลังการกลายพันธุ์ทำให้โปรตีเอสแอคติวิตีของ UUNN-1 เพิ่มสูงขึ้น อาจมีสาเหตุเกิดขึ้นได้หลายประการ อาจเนื่องจากการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีเอสแล้วยังอาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ที่เบสซึ่งมีผลทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงขึ้น และแอคติวิตีที่สูงขึ้นนี้อาจเป็นการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่เพิ่มสูงขึ้นเพียงอย่างเดียวหรืออาจเป็นผลจากการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอสเพียงอย่างเดียวหรืออาจเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของทั้งแอลคาไลน์โปรตีเอสร่วมกันกับนิวทรัลโปรตีเอสก็ได้ แต่เนื่องจากผลการทดลองนี้ เมื่อดูผล Specific Activity ของเอนไซม์ก่อนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มสูงขึ้นถึง 2 เท่า (ตารางที่ 23) และ pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของโปรตีเอสเปลี่ยนแปลงไปจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ pH เปลี่ยนจาก 10.5 เป็น 9.5 แสดงว่าการกลายพันธุ์อาจมีผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งด้วยและมีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของโปรตีเอสมากกว่าการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีเอส ดังนั้นในการทดลองนี้ถ้าต้องการดูการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่เพิ่มสูงขึ้นอาจทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้สาร EDTA เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการทำงานของ

นิวทรัลโปรตีเอสก็จะทำให้ทราบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเพิ่มสูงขึ้นมากน้อยเพียงใด หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าหลังการกลายพันธุ์อาจมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณผนังเซลล์ (Cell membrane) เกิดเป็นรูพรุนมากขึ้นทำให้เอนไซม์ถูกขับ (Secrete) ออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น จึงทำให้วัดแอคติวิตีของโปรตีเอสได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมก็เป็นได้

8. การเตรียมเอนไซม์รูปผง

8.1 การเตรียมเอนไซม์รูปผง

โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายทำได้โดยการค่อยๆ เติมเกลือลงในสารละลายเอนไซม์ทีละน้อยจนกระทั่งถึงความเข้มข้นที่สามารถตกตะกอนเอนไซม์ออกมาได้ ตะกอนก็จะเกิดขึ้น สามารถแยกตะกอนได้โดยการกรองและทำให้แห้งโดยการอบที่ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการละลายของเอนไซม์ผงก็ละลายในน้ำได้ดี เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้มีเกลือปนอยู่จึงอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายถ้ามีความชื้นหลงเหลืออยู่มาก (เกษม พงษ์มณี, 2536) และการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตะกอนที่อบแห้งที่มีเกลือปนอยู่นั้นไม่มีผลต่อการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี

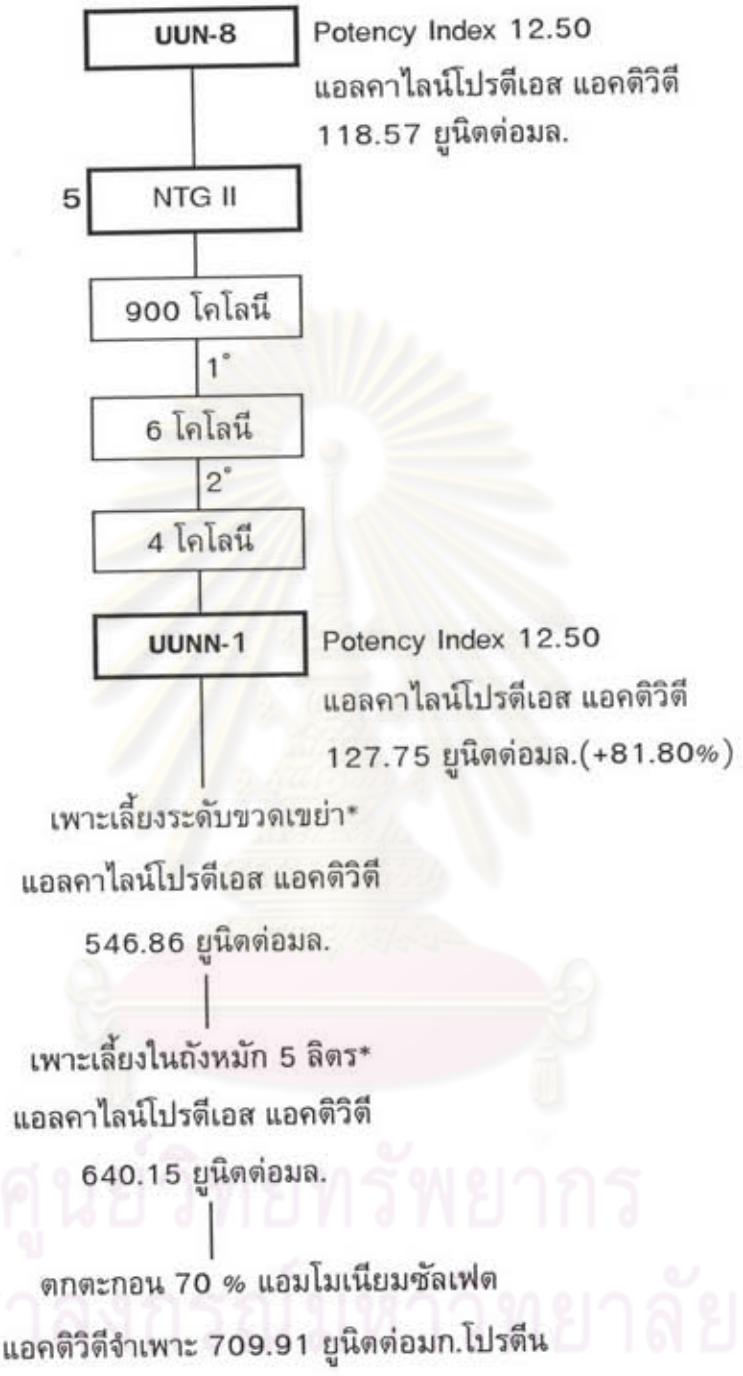
8.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆกัน

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เป็นเวลา 60 วัน (ตารางที่ 24, กราฟรูปที่ 33 และ 34) พบว่าที่อุณหภูมิ -20 ถึง 37 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงเมื่อเก็บได้ประมาณ 15 วัน แต่ลดลงเล็กน้อยเท่านั้น ภายหลังเก็บเป็นเวลานาน 60 วัน ที่อุณหภูมิดังกล่าว จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 แอคติวิตีมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เหลืออยู่ 77.26 และ 67.15 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับสายพันธุ์ UUNN-1 แอคติวิตีมีแนวโน้มลดลงเหลืออยู่ 88.52 และ 70.54 เปอร์เซนต์ จากการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิห้องได้นานพอควร โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยทำให้แอคติวิตีต่ำลงและเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บด้วย เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิสูงความร้อนจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ จึงมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ทำให้ลดลงได้

จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสต่อไป ซึ่งจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG ตลอดจนการคัดเลือกสายพันธุ์ทั้งขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิสามารถเพิ่มแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ตรงตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสายพันธุ์ควรทำอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ เพื่อเป็นการพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงยิ่งขึ้น งานวิจัยทั้งหมดพอสรุปเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่ 35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bacillus subtilis TISTR 25
ค่าเฉลี่ย Potency Index 6.67 และ
แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี70.27ยูนิตต่อมล.
2
NTG I
2360 โคโลนี
1°
20 โคโลนี
2°
7 โคโลนี
N-5
Potency Index 10.00
แอลคาไลน์โปรตีเอส แอคติวิตี
108.18 ยูนิตต่อมล.(+56.28%)
1
UV I
1370 โคโลนี
1°
18 โคโลนี
2°
7 โคโลนี
U-12
Potency Index 14.00
แอลคาไลน์โปรตีเอส แอคติวิตี
3
UV II
123.16 ยูนิตต่อมล.(+73.63%)
2000 โคโลนี
1°
17 โคโลนี
2°
10 โคโลนี
UU-15
Potency Index 13.00
แอลคาไลน์โปรตีเอส แอคติวิตี
4
NTG I
128.83 ยูนิตต่อมล.(+83.34%)
1500 โคโลนี
1°
14 โคโลนี
2°
8 โคโลนี
UUN-8
Potency Index 12.50
แอลคาไลน์โปรตีเอส แอคติวิตี
118.57 ยูนิตต่อมล.(+68.93%)
หมายเหตุ
1°การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิบน
อาหารวุ้นที่มี0.5%Skim Milk กับ
Tetracyclin12.5ไมโครกรัม/มล.
ทดสอบตามวิธีทดลอง 6.1
2°การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิใน
อาหารเหลว Basal Medium I
ทดสอบตามวิธีทดลอง 6.2
* เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบ
ผสมกากเมล็ดทานตะวันกับ
กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 35 แผนภาพแสดงขั้นตอนงานวิจัยทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย