บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ศึกษาประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งในปี พ.ศ. 2535 เกษม พงษ์มณี ได้ทำการทดลอง พบว่า สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 และบนอาหารวุ้น Skim Milk (นมผงขาดมันเนย)เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ *Bacillus subtilis*TISTR 25 นี้มาทดสอบประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารวุ้นและอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

1.1 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารวุ้น

เพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ลงบนอาหารวุ้นที่มี Skim Milk 5 เปอร์เซนต์ ผสมอยู่ตามวิธีการทดลองข้อ 1.3 โดยการใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อลงบนอาหารวุ้นเป็นจุดๆ 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 3 ส่วนค่าเฉลี่ยของ Potency Index เท่ากับ 6.63 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ภาคผนวก) เป็น 0.19

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จำนวน 100 ซ้ำที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีขนาดต่าง ๆ กัน

เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (มม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	Potency Index	ความถี่	เปอร์เซนต์
9.00	1.50	6.00	3	3.00
9.50	1.50	6.33	4	4.00
10.50	1.60	6.56	7	7.00
11.00	1.70	6.47	16	16.00
12.00	1.80	6.60	56	56.00
12.50	1.80	6.94	14	14.00

1.2 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับขวดเขย่า

นำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal Medium สูตร 1 สำหรับหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 วิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ตามวิธีการทดลองข้อ 6.2

จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 70.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.16

2. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ

หลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG จะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น โดยทำการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นปฐมภูมิ และขั้นทุติยภูมิ ซึ่งในการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิจะใช้วิธีการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสบน Skim Milk Plate อย่างคร่าวๆ สามารถทำได้คราวละมากๆ สะดวกและรวดเร็ว ส่วนการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสด้วยวิธีที่ให้ผลถูกต้องแน่นอนอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตรวจสอบในขั้นปฐมภูมิจะต้องให้ผลที่มีความสัมพันธ์กับผลที่ได้จากขั้นทุติยภูมิจึงต้องทำการทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ของวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งสองขั้นตอน

การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เป็นการตรวจสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสซึ่งสามารถทำได้โดยเพาะเชื้อลงบนอาหารวุ้นที่มีอินดิเคเตอร์อยู่ ในการทดลองนี้อินดิเคเตอร์ที่ใช้คือ นมผงขาดมันเนย (Skim Milk) ซึ่งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากเป็นสารที่หาง่ายราคาถูก ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ให้บริเวณใสที่ชัดเจน และสามารถเก็บโคโลนีที่ให้บริเวณใสกว้างได้สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาไม่นาน รวมทั้งตรวจสอบได้คราวละมากๆ จึงเป็นการประหยัดเวลาและแรงงานในการตรวจสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ดังนั้นในการเปรียบเทียบจะใช้ค่าอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือเรียกว่า Potency Index (ภาคผนวก) ในการคัดเลือกจะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index ที่สูงกว่าค่า Potency Index ของสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นจึงนำสายพันธุ์ใหม่นั้นมาทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิโดยวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ซึ่งจะให้ผลถูกต้องมากขึ้น เพื่อเป็นการทดสอบว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ทั้งสองขั้นตอนให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงทำการหาความสัมพันธ์ของ

แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้กับอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Potency Index)

2.1ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตในขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ

ทำการสุ่มตัวอย่างที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 50 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 และ 6.2 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ค่า Potency Index อยู่ในช่วง 6.00-14.00 ส่วนแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จะแตกต่างกันมากตั้งแต่ 38.05 ถึง 139.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ดังรูปที่ 6

ตารางที่4 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตโดยนำมาทำการทดสอบ 50 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
Mutant - 11	12.00	76.65

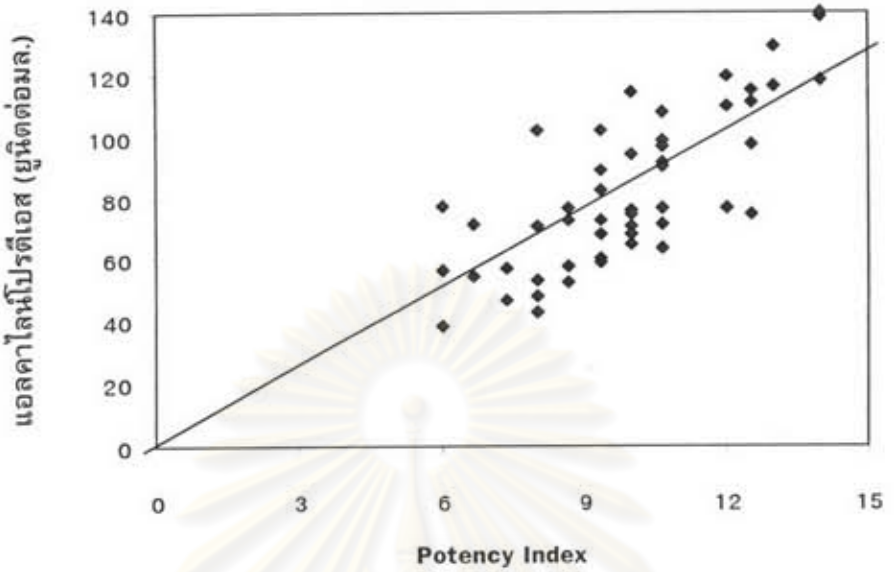
รหัสสายพันธุ์	Potency Index *	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิต/มล.)
Mutant - 12	12.00	119.23
Mutant - 13	10.67	98.39
Mutant - 14	10.67	63.42
Mutant - 15	10.67	91.33
Mutant - 16	10.67	71.39
Mutant - 17	10.67	90.24
Mutant - 18	10.67	107.45
Mutant - 19	10.67	76.65
Mutant -20	10.67	96.58
Mutant - 21	10.00	76.10
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
Mutant - 38	8.67	52.55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รหัสสายพันธุ์	Potency Index	แอลคาไลน์โปรตีเอส* (ยูนิต/มล.)
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

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

จากกราฟจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) (ภาคผนวก) เท่ากับ 0.78 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการใช้ค่า Potency Index สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและใช้การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

2.2 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์จากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในขั้นทุติยภูมิ

ทำการสุ่มตัวอย่างที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG จำนวน 50 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 และ 6.2 ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าค่า Potency Index อยู่ในช่วง 6.00-14.00 ส่วนแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จะแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 40.23 ถึง 129.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ได้ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 5 ค่า **Potency Index** จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี **NTG** โดยนำมาทำการทดสอบ 50 สายพันธุ์

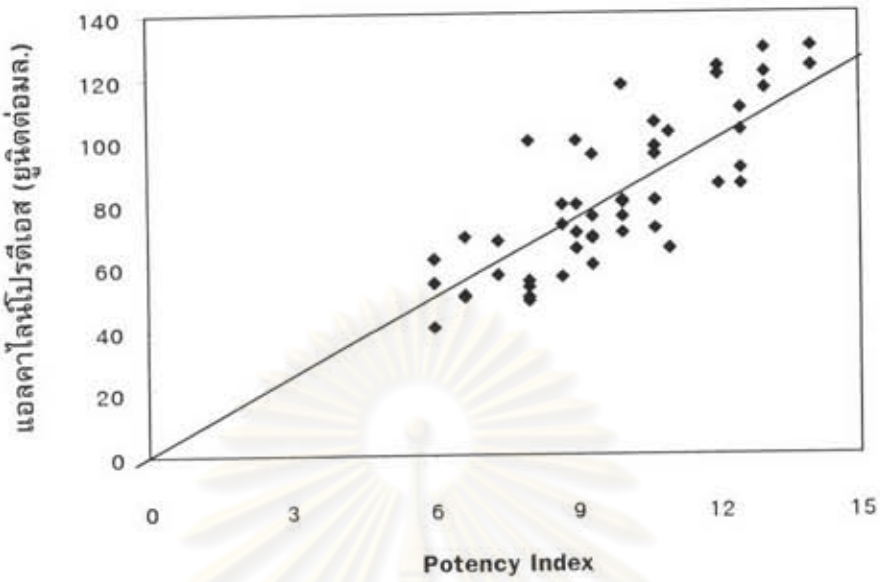
รหัสสายพันธุ์	Potency Index	แอลคาไลน์โปรตีเอส* (ยูนิต/มล.)
Mutant - 1	14.00	129.13
Mutant - 2	14.00	123.20
Mutant - 3	13.00	121.16
Mutant - 4	13.00	128.57
Mutant - 5	13.00	115.91
Mutant - 6	12.50	85.78
Mutant - 7	12.50	102.71
Mutant - 8	12.50	90.45
Mutant - 9	12.50	109.58
Mutant - 10	12.00	120.65
Mutant - 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	71.39
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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รหัสสายพันธุ์	Potency Index	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิต/มล.)
Mutant - 25	10.00	75.15
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

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^{5} เซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG

จากกราฟจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) (ภาคผนวก) เท่ากับ 0.82 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการใช้ค่า Potency Index สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและใช้การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 สำหรับนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

3. เปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG เพื่อเลือกใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25

1. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์

1.1 การหาเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กันมากทั้งนี้เพราะวิธีการทำง่าย สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อนและปลอดภัยในการใช้งาน เพียงควบคุมป้องกันตาและผิวหนังจากแสงอัลตราไวโอเลตเท่านั้น งานวิจัยนี้ได้ชักนำให้เซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง

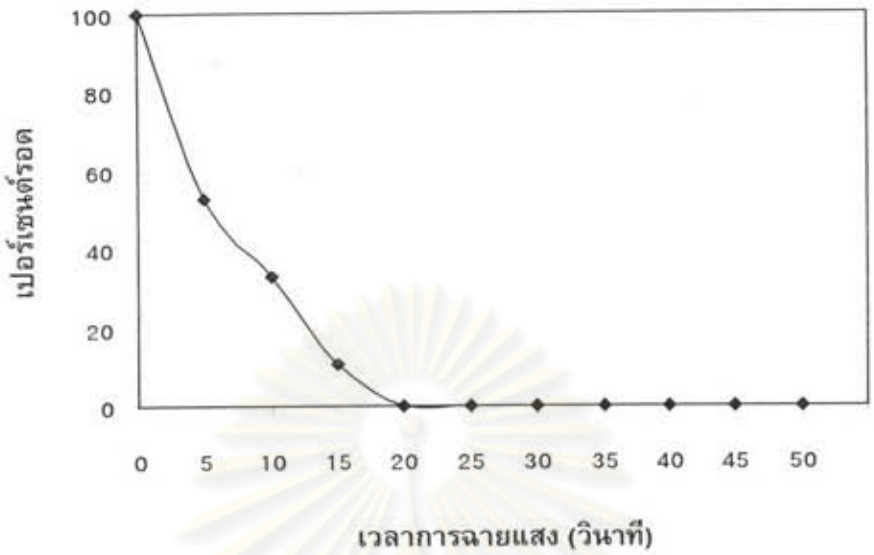
อัลตราไวโอเลต ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 ซึ่งใช้ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลอดไฟมีกำลังงาน 15 วัตต์ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างของหลอดไฟกับเซลล์ 20 เซนติเมตร การทดลองนี้ต้องทำการแปรผันเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ต้องการ หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณเปอร์เซนต์รอด แสดงผลในตารางที่ 6 นำไปเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 8

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์รอดภายหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เกิดการกลายพันธุ์และจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

เวลาฉายแสง (วินาที)	เปอร์เซนต์รอดของเซลล์♥	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ		
		จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น	เปอร์เซนต์*
0	100.00	200	0	0.00
5	52.60	200	1	0.50
10	32.80	200	4	2.00
15	10.83	200	5	2.50
20	0.0990	200	6	3.00
25	0.00600	180	2	1.10
30	0.00046	100	0	0.00
35	0.00009	50	0	0.00
40	0.00013	20	0	0.00
45	0.00009	10	0	0.00
50	0.00009	10	0	0.00

* เปอร์เซนต์ของจำนวนสายพันธุ์ที่มีค่า Potency Index สูงขึ้น

♥ การคำนวณภาคผนวก



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์

จากกราฟรูปที่ 8 จะเห็นว่าเซลล์มีการตายอย่างรวดเร็วเมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตไป 5 วินาที จากนั้นเมื่อเวลาฉายแสงเพิ่มขึ้น อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นสุ่มจำนวนโคโลนีที่ผ่านการฉายแสงแต่ละเวลา มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 หลังจากทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่าที่เวลาการฉายแสงเป็น 10, 15, 20, 25 วินาที มีสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น จำนวน 18 สายพันธุ์ จากนั้นนำสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมดที่ได้ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิต่อไป

1.2การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกใหม่หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

จากตารางที่ 6 จึงนำสายพันธุ์ใหม่ 18 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อดูว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาใดให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ทั้ง 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีผลผลิตเท่ากับ 70.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ใหม่มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ U-5, U-7, U-9, U-12, U-14, U-15 และU-17 โดย U-12

เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 123.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) คิดเป็น 73.83 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 7 ค่า **Potency Index** และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ ***Bacillus subtilis*** **TISTR 25** สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้18สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลองข้อ 6.2)

รหัสสายพันธุ์♠	Potency Index	เวลาฉายแสง (วินาที)	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.)	SD
TISTR-25	6.67	0	70.85	0.18
U-1	8.00	5	46.99	0.21
U-2	9.00	10	67.71	0.28
U-3	9.33	10	70.19	0.21
U-4	8.67	10	54.90	0.31
U-5	10.00	10	82.27	0.18
U-6	8.00	15	47.98	0.38
U-7	10.67	15	97.00	0.21
U-8	9.00	15	65.35	0.28
U-9	10.67	15	111.27	0.18
U-10	9.00	15	68.37	0.21
U-11	8.67	20	41.50	0.36
U-12	**14.00**	**20**	**123.16**	**0.21**
U-13	10.00	20	67.41	0.36
U-14	12.00	20	120.38	0.11
U-15	10.00	20	96.46	0.28
U-16	8.00	20	39.38	0.21
U-17	12.00	25	104.73	0.31
U-18	9.33	25	57.26	0.18

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25

รหัสสายพันธุ์ U-คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

เพื่อตรวจสอบความสามารถแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 7 สายพันธุ์ จากตารางที่ 7 จึงทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal Medium สูตร 1 อีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์ U-12 วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในครั้งที่ 2 และ 3 สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ได้เท่ากับ 111.13 และ 94.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าลดลงจากเดิม (ครั้งที่1) 9.77 และ 23.40 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกันแต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ U-12 ในขณะที่ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีเปอร์เซนต์ลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) เท่ากับ 1.18 และ 2.30 เปอร์เซนต์ เท่านั้น

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1 , ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 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 และ ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)

** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

2. การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

2.1 การหาความเข้มข้น NTG ที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG เป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ สำหรับการกลายพันธุ์แบคทีเรียการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้แตกต่างกันค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ใช้ละลาย NTG สภาวะและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ เวลาและอุณหภูมิในการบ่ม

ในการทดลองชักนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ใช้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ OD_{420} เท่ากับ 0.6 แปรผันความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีข้อ 5.2 ทำการแปรผันความเข้มข้นของ NTG เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเปอร์เซนต์รอดที่เหมาะสม หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (เซลล์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังแสดงในตารางที่ 9 และกราฟรูปที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

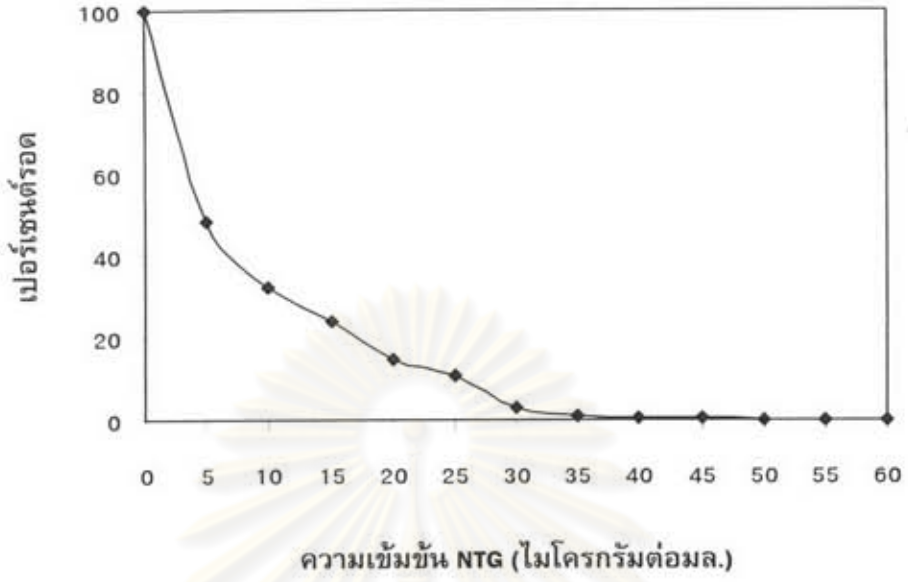
ตารางที่ 9 เปอร์เซนต์รอดภายหลังการเติมสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆเพื่อชักนำให้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เกิดการกลายพันธุ์และจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.)	เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ ♥	การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ		
		จำนวนโคโลนีที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่มีค่าPotency Indexสูงขึ้น	เปอร์เซนต์*
0	100.00	200	0	0.00
5	48.12	200	0	0.00
10	32.16	200	1	0.50
15	23.84	200	1	0.50
20	14.68	200	7	3.50
25	10.64	150	6	4.00
30	2.69	150	4	2.67
35	1.04	150	1	0.67
40	0.61	150	0	0.00
45	0.54	100	0	0.00
50	0.20	60	0	0.00
55	0.09	50	0	0.00
60	0.05	30	0	0.00
80	0.01	10	0	0.00
100	0.001	10	0	0.00

♥ การคำนวณภาคผนวก

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 กับความเข้มข้นของสารเคมี NTG เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์

จากกราฟรูปที่ 9 จะเห็นว่า เซลล์มีการตายอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ความเข้มข้น NTG 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้น NTG เพิ่มขึ้นอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นสุ่มจำนวนโคโลนีที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มาทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 หลังจากทำการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิพบว่า ที่ความเข้มข้น NTG เป็น 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 20 สายพันธุ์ จากนั้นนำสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมดที่ได้ไปทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูง

จากตารางที่ 9 ได้สายพันธุ์ใหม่ 20 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อดูว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTGที่ความเข้มข้นใดให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ทั้ง 20 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลดังแสดงในตารางที่10 พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 69.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้นมีเพียง 7 สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้แก่ สายพันธุ์ N-3, N-5, N-8, N-9, N-12, N-14และN-18 โดยสายพันธุ์ N-5 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 108.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) คิดเป็น 56.28 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ค่า **Potency Index** และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ ***Bacillus subtilis*** **TISTR 25** สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้จำนวน 20 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง 6.2)

รหัสสายพันธุ์♠	Potency Index	ความเข้มข้น NTG (ยูนิตต่อมล.)	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.)	SD
TISTR-25	6.67	0	69.22	0.18
N-1	8.00	5	52.79	0.28
N-2	9.00	10	62.33	0.36
N-3	9.33	15	105.34	0.21
N-4	8.67	15	53.21	0.28
N-5	10.00	15	108.18	0.18
N-6	8.00	15	48.50	0.28
N-7	10.67	15	56.23	0.11
N-8	9.00	15	87.76	0.21
N-9	10.67	15	70.18	0.28
N-10	9.00	20	61.13	0.38
N-11	8.67	20	51.94	0.21
N-12	14.00	20	81.96	0.21
N-13	10.00	20	46.33	0.38
N-14	12.00	20	88.06	0.18
N-15	10.00	20	53.09	0.32
N-16	8.00	25	54.54	0.18
N-17	12.00	25	47.96	0.28
N-18	9.33	25	73.21	0.18
N-19	9.00	25	52.13	0.21
N-20	9.00	30	48.80	0.38

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25

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

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง7 สายพันธุ์ จากตารางที่ 10 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ทุกสายพันธุ์มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์ N-5 วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในครั้งที่ 2 และ3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆเท่ากับ 99.13 และ 88.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 8.37 และ 17.77 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ N-5 ในขณะที่ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 0.67 และ 1.58 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1 , ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG (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 และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)
** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

จากการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTGเมื่อเปรียบเทียบกันจะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ 15 วัน พบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลง แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตคิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ลดลงเท่ากับ 23.40 เปอร์เซนต์ซึ่งต่ำกว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเท่ากับ 17.77 เปอร์เซนต์ แต่ในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะได้สายพันธุ์ใหม่ U-12 ซึ่งให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าสายพันธุ์ใหม่ N-5 คิดเป็น 6.06 เปอร์เซนต์ ได้มีผู้ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมีชนิดอื่นๆพบว่านิยมใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตัวแรก หลังจากได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงแล้วสามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง โดยใช้สลับกับสารเคมีชักนำตัวอื่นๆเช่น NTG (Calam, 1970 ; Sikyta, 1983) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสายพันธุ์ U -12 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ต่อไป

4. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* U-12 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

จากตารางที่ 8 หลังทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ U -12 ในครั้งที่ 1 , 2 และ 3 เท่ากับ123.16, 111.13 และ94.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้คัดเลือกสายพันธุ์ U-12 ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) คิดเป็น 34.27 เปอร์เซนต์ นำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จากผลการทดลองตารางที่ 7 เมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลตเวลา 10, 15, 20 และ 25 วินาที สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตดังกล่าวสำหรับการชักนำสายพันธุ์ U -12 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ตามวิธีการทดลองข้อ 5.1 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่า หลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตอัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ U -12 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (TISTR 25) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่า Potency Index ของสายพันธุ์ U-12 กลับลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ) ดังแสดงผลในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เวลาฉายแสง (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

♥ การคำนวณภาคผนวก

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

จากตารางที่ 12 ได้สายพันธุ์ใหม่ 17 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อดูว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาใดให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 17 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ทำการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า *Bacillus subtilis* U -12 มีผลผลิตเท่ากับ 93.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้นมีเพียง 10 สายพันธุ์ ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 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 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 128.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* U-12 คิดเป็น 38.14 เปอร์เซนต์

ตารางที่13 ค่า Potency Index และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* U-12 สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้จำนวน 17 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง 6.2)

รหัสสายพันธุ์ ♠	Potency Index	เวลาฉายแสง (วินาที)	แอลคาไลน์โปรตีเอส ♣ (ยูนิตต่อมล.)	SD
U-12	9.00	0	93.26	0.21
UU-1	9.33	10	98.21	0.18
UU-2	9.33	10	85.83	0.36
UU-3	10.00	15	102.02	0.31
UU-4	10.67	15	104.97	0.28
UU-5	10.00	15	85.35	0.18
UU-6	11.00	15	108.12	0.38
UU-7	10.00	15	82.99	0.18
UU-8	9.33	20	65.47	0.38
UU-9	12.00	20	112.59	0.28
UU-10	10.67	20	104.43	0.11
UU-11	9.33	20	63.96	0.31
UU-12	12.50	20	125.81	0.28
UU-13	9.33	20	84.62	0.36
UU-14	10.00	20	96.76	0.31
UU-15	**13.00**	**20**	**128.83**	**0.18**
UU-16	9.67	25	80.63	0.31
UU-17	10.50	25	100.69	0.28

♠ รหัสสายพันธุ์ TISTR-25 คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25
รหัสสายพันธุ์ U-คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 1 ครั้ง
รหัสสายพันธุ์ UU-คือ*Bacillus subtilis*TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 9สายพันธุ์ จากตารางที่ 13 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 15 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 14 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ทุกสายพันธุ์ แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์และพบว่าสายพันธุ์ UU-15 วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เท่ากับ 117.03 และ 106.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 9.16 และ 17.55 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกันแต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ UU-15 ในขณะที่ U-12 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่1) 7.64 และ 18.37 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตในครั้งที่ 2 ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่14 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1 , ครั้งที่2 และครั้งที่ 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 และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

* เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 2)

** เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ(ครั้งที่ 3)

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

ผลจากตารางที่ 14 หลังจากการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ UU -15 ในครั้งที่1, 2 และ 3 พบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 128.83, 117.03 และ 106.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้คัดเลือกสายพันธุ์ UU-15 ซึ่งให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิมซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเฉลี่ย 70.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) คิดเป็น 51.16 เปอร์เซนต์ นำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG เนื่องจากผลการทดลองตามตารางที่ 9 เมื่อใช้สารเคมี NTG ที่มีความเข้มข้น 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่ให้

แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG ดังกล่าว สำหรับชักนำสายพันธุ์ UU-15 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2 คำนวณเปอร์เซนต์รอด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UU-15 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 1 ครั้ง แต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่า Potency Index ของสายพันธุ์ UU-15 กลับลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ) ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

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

♥ การคำนวณภาคผนวก

* เปอร์เซนต์สายพันธุ์ที่ให้ค่า Potency Index สูงขึ้น

จากตารางที่ 15 ได้สายพันธุ์ใหม่ 14 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร1เพื่อดูว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTGที่ความเข้มข้นใดให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ทั้ง 14 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ทำการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่า *Bacillus subtilis* UU-15 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 96.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกนั้นมีเพียง 8 สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ UUN-3, UUN-4, UUN-5, UUN-6, UUN-8, UUN-10, UUN-11 และ UUN-13 โดยสายพันธุ์ UUN-8 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเท่ากับ 118.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า

Bacillus subtilis UU-15 คิดเป็น 22.85 เปอร์เซนต์ และมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 คิดเป็น 68.73 เปอร์เซนต์

ตารางที่16 ค่า **Potency Index** และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ ***Bacillus subtilis*** **UU-15 สายพันธุ์ตั้งต้น และสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้จำนวน 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง 6.2)**

รหัสสายพันธุ์♠	Potency Index	ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.)	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.)	SD
UU-15	8.33	0	96.52	0.21
UUN-1	9.00	20	89.94	0.28
UUN-2	9.67	20	85.35	0.36
UUN-3	10.67	20	112.16	0.18
UUN-4	10.00	20	100.87	0.28
UUN-5	12.00	25	113.80	0.31
UUN-6	10.67	25	104.92	0.18
UUN-7	10.00	25	87.22	0.28
UUN-8	**12.50**	**25**	**118.57**	**0.21**
UUN-9	11.00	25	90.90	0.28
UUN-10	9.67	25	100.32	0.21
UUN-11	10.00	25	98.81	0.11
UUN-12	11.00	30	92.65	0.28
UUN-13	12.00	30	102.62	0.21
UUN-14	9.67	30	88.97	0.18

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

รหัสสายพันธุ์ UUN-คือ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และ ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 1 ครั้ง

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ที่เลือกได้ 8 สายพันธุ์ จากตารางที่ 16 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ทุกสายพันธุ์ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์ UUN-8 วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เท่ากับ 109.33 และ 100.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่1) 7.80 และ 14.86 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกันแต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ UUN-8 ในขณะที่ UU-15 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 7.42 และ 16.44 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคติวิตี

ตารางที่ 17 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่2และครั้งที่ 3 ของ *Bacillus subtilis* UU - 15 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 3 เก็บผลชั่วโมงที่ 48

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG (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 และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

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

ผลจากการทดลองตารางที่ 17 พบว่าสายพันธุ์ UUN-8 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นจากสายพันธุ์เดิม (*Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเฉลี่ย70.27ยูนิตต่อมิลลิลิตร)คิดเป็น43.67เปอร์เซนต์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ UUN-8 ซึ่งหลังจากทำการเพาะเลี้ยงในครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 พบว่ามีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส 118.57, 109.33 และ 100.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อีก 1 ครั้ง และเนื่องจากผลการทดลองตารางที่ 9 เมื่อใช้สารเคมี NTG ที่มีความเข้มข้น 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG ดังกล่าว สำหรับชักนำสายพันธุ์ UUN-8 ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2 คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG อัตราการอยู่รอดของเซลล์สายพันธุ์ UUN-8 ใกล้เคียงกับของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 1 ครั้งแต่เปอร์เซนต์ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่า Potency Index ของสายพันธุ์UUN-8 กลับลดลงมาก (จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ) ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์รอด และจำนวนสายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ความเข้มข้น NTG (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 18 ได้สายพันธุ์ใหม่ 6 สายพันธุ์ จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการทดสอบหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เพื่อดูว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ความเข้มข้นใดให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 ทำการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลดังแสดงในตารางที่19พบว่า *Bacillus subtilis* UUN-8 มีผลผลิตเท่ากับ 90.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้นั้นมีเพียง 4 สายพันธุ์ ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ได้แก่ สายพันธุ์ UUNN-1, UUNN-4, UUNN-5 และ UUNN-6 โดยสายพันธุ์ UUNN-1 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 127.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า UUN-8 คิดเป็น 40.63 เปอร์เซนต์และมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 คิดเป็น 81.80 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 19 ค่า Potency Index และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* UUN -8 สายพันธุ์ดั้งต้นและสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้จำนวน 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 (วิเคราะห์ผลตามการทดลอง 6.2)

รหัสสายพันธุ์♠	Potency Index	ความเข้มข้น NTG (ไมโครกรัมต่อมล.)	แอลคาไลน์โปรตีเอส♣ (ยูนิตต่อมล.)	SD
UUN-8	9.00	0	90.84	0.21
UUNN-1	**12.50**	**20**	**127.75**	**0.18**
UUNN-2	9.33	20	88.45	0.28
UUNN-3	9.67	25	86.49	0.28
UUNN-4	10.67	25	110.71	0.18
UUNN-5	10.67	25	113.85	0.21
UUNN-6	10.00	30	105.70	0.15

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

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ที่เลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ จากตารางที่ 19 จึงทำการเพาะเลี้ยงอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 15 วันได้ผลดังแสดงในตารางที่ 20 จะเห็นว่าสายพันธุ์ใหม่ทุกสายพันธุ์มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงทุกสายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์ UUNN-1 วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในครั้งที่ 2 และ 3 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เท่ากับ 119.25 และ 112.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 6.65 และ 11.67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสคิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลงเช่นเดียวกันแต่มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ UUNN-1 ในขณะที่ UUN-8 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงจากเดิม (ครั้งที่ 1) 6.29 และ 13.96 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ถึง 2 ครั้งไม่มีผลต่อการลดลงของเอนไซม์แอคติวิตีเลย

ตารางที่ 20 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3ของ *Bacillus subtilis*TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม), UUN - 8 และสายพันธุ์ใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 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 และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

จากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นพบว่า หลังจากทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม)โดยทำการกลายพันธุ์ฉายแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้ง และผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 2 ครั้ง ทำการคัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 หลังจากเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ในอาหารเหลว Basal Medium สูตร1 อีก 2 ครั้งเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นเดิม *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อดูประสิทธิภาพของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลดังแสดงในตารางที่ 20 พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 68.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ UUNN-1 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 112.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม (*Bacillus subtilis* TISTR 25) คิดเป็น 65.64 เปอร์เซนต์ เพื่อดูความเสถียรของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ทั้ง 2 วิธี นำไปทำการทดลองในข้อ 7 ต่อไป

7. ความเสถียรของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG

ความเสถียรของแอคติวิตีเอนไซม์ของเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จะต้องคำนึงถึงความเสถียรของแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสด้วย การทดลองในข้อนี้จะเป็นการทดสอบความเสถียรแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยจะทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้น LB ทุกๆ 15 วัน เพาะเลี้ยงครั้งที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นเวลา 15, 30 , 45 และ 60 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่เก็บไว้ นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 ได้ผลแสดงในตารางที่ 21 และคำนวณหาเปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้แสดงผลในตารางที่ 22 นำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในแต่ละครั้งได้ดังรูปที่ 10

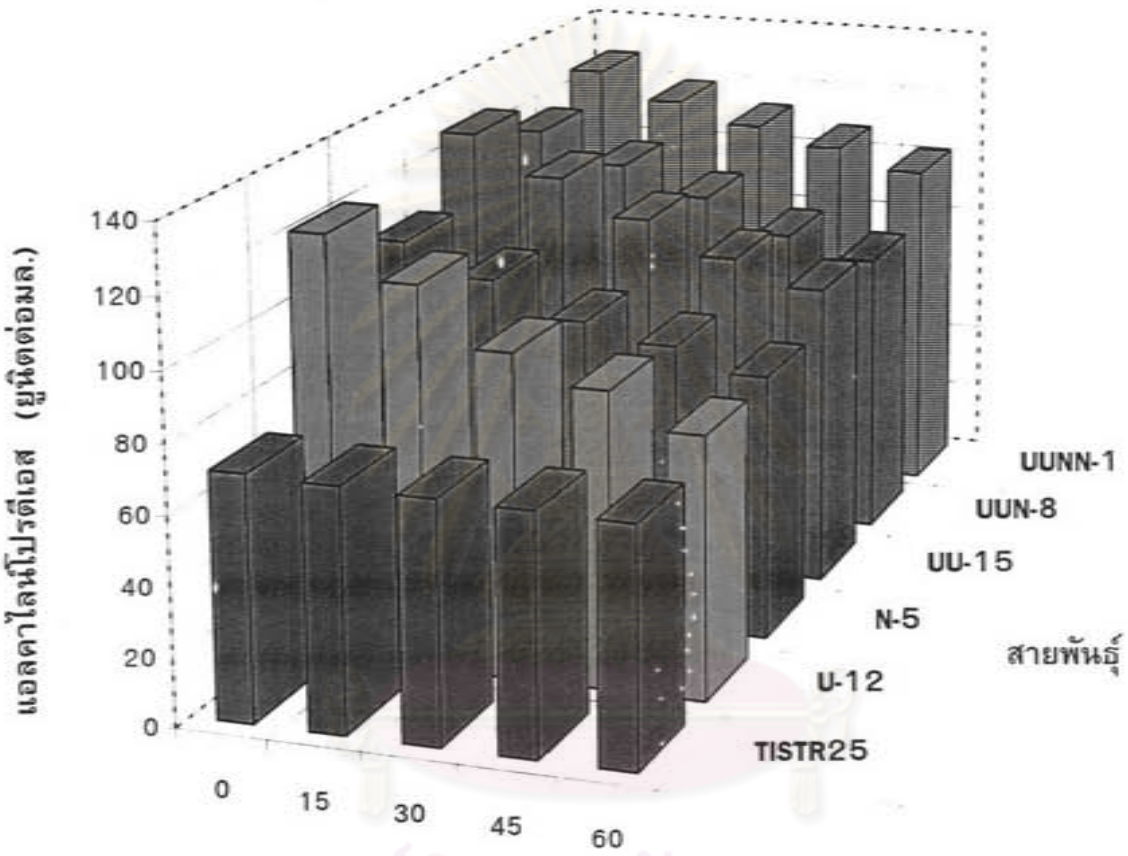
ตารางที่ 21 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในเวลาต่างกัน

ครั้งที่	จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน)	แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส (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

♣ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เมื่อใช้เซลล์ 10^8 เซลล์

ตารางที่22 เปอร์เซนต์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ลดลงของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในเวลาต่างกัน

ครั้งที่	จำนวนวันเพาะเลี้ยง(วัน)	เปอร์เซนต์ที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอส					
		TISTR-25	U-12	N-5	UU-15	UUN-8	UUNN-1
1	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
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



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

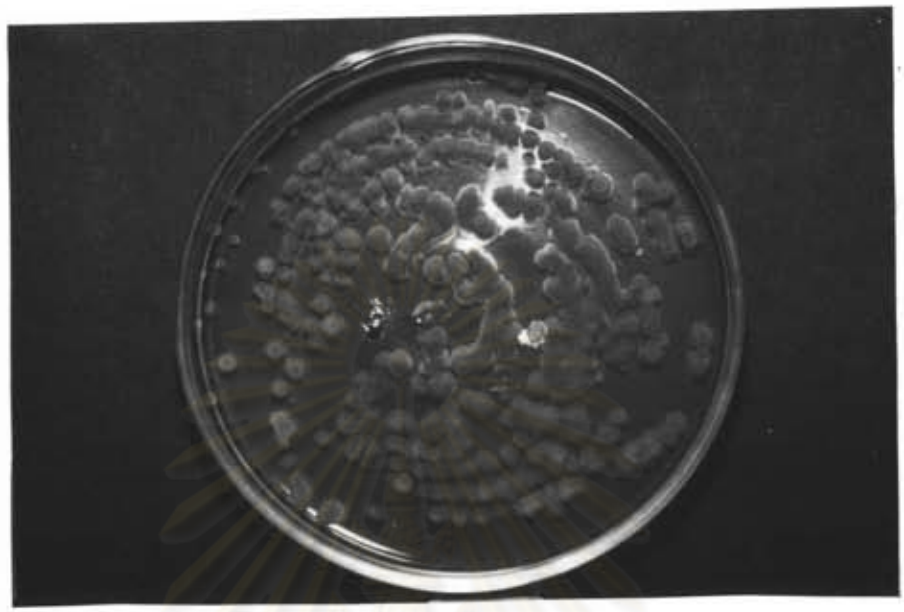
รูปที่ 10 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ เพาะเลี้ยง 5ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงและหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

จากกราฟที่ 10 จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและด้วยสารเคมี NTG นั้นไม่มีผลต่อการลดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลยไม่ว่าจะเป็นการฉายแสงอัลตราไวโอเลตซ้ำถึง 2 ครั้ง หรือด้วยสารเคมี NTG ซ้ำถึง 2 ครั้งก็ตาม แต่การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตซ้ำถึง 2 ครั้ง จะเพิ่มแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัดและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ก็สูงกว่าการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG แต่การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความเสถียรของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสมากกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการลดลงมีแนวโน้มลดลงช้ากว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากนำการกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีมาใช้กลายพันธุ์ต่อเนื่องกันได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ซึ่งแอคติวิตีของมีแอลคาไลน์โปรตีเอสแนวโน้มลดลง 20.75 เปอร์เซนต์ และยังคงเหลือแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 อยู่ 48.60 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด อัตราการลดลงก็มีแนวโน้มลดลงช้ากว่าเดิมด้วย

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

หลังการนำเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG คัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ซึ่งลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม เช่น ลักษณะผิวหน้าโคโลนีเรียบ ไม่มีรอยแตกเป็นเส้น บางโคโลนีมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์เดิม เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

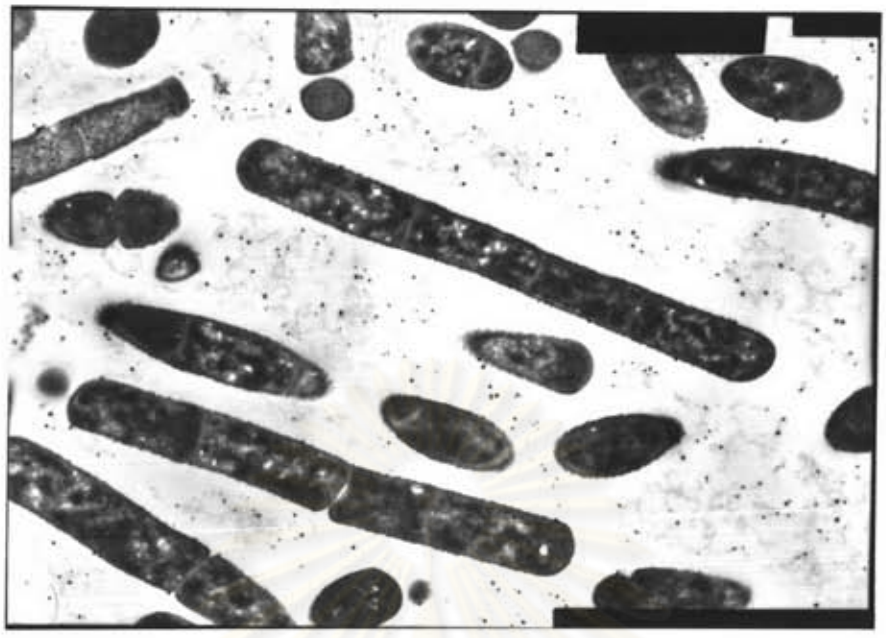
รูปที่ 12 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่เลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

8.1 ลักษณะเซลล์จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (TEM)

จากการดูลักษณะเซลล์ของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission Electron Microscope (TEM) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์บน LB plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีการทดลองข้อ 13.1 เพื่อดูลักษณะเซลล์ โดยใช้กำลังขยาย10,600,29,680 และ 59,360 เท่า ได้ถ่ายภาพ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) ดังแสดงในรูปที่ 13, 15, 17 และ 19 ตามลำดับ จะเห็นว่าลักษณะของเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้างใกล้เคียงกันประมาณ 20 มิลลิเมตร ขนาดความยาวแตกต่างกัน บางโคโลนีสั้น บางโคโลนียาว ความยาวประมาณ 30-36 มิลลิเมตร บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ

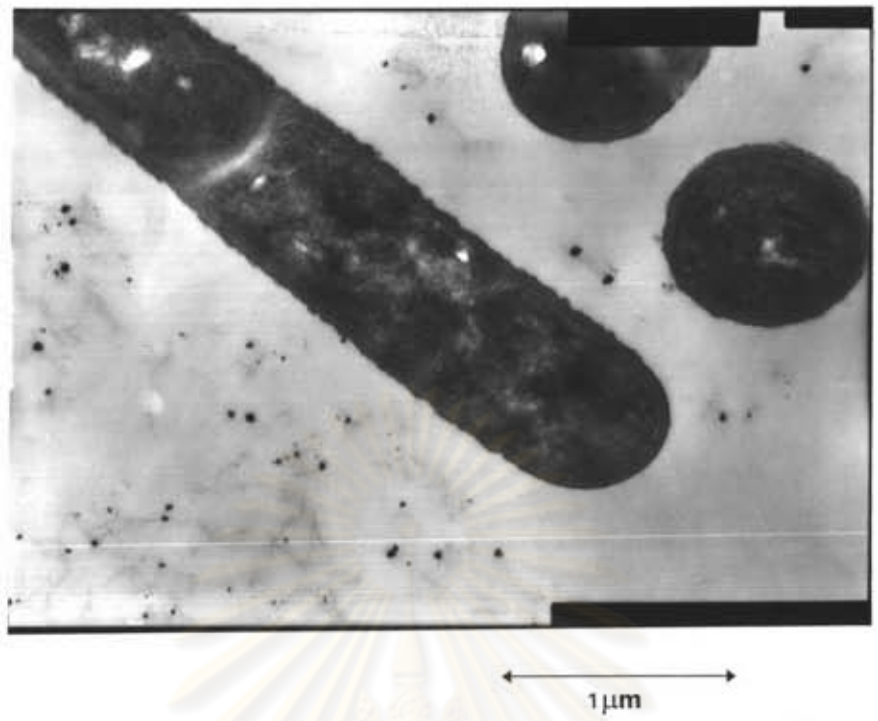
ส่วน UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) ได้ภาพถ่ายแสดงดังรูปที่ 14, 16, 18 และ 20 จะเห็นว่าลักษณะของเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้าง 20-22 มิลลิเมตร ขนาดความยาวแตกต่างกัน บางโคโลนีสั้น บางโคโลนียาว ความยาวประมาณ 22-30 มิลลิเมตร บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) จะพบว่าขนาดเซลล์ของ UUNN-1 จะมีขนาดเซลล์สั้นและกว้างกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มากอย่างเห็นได้ชัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

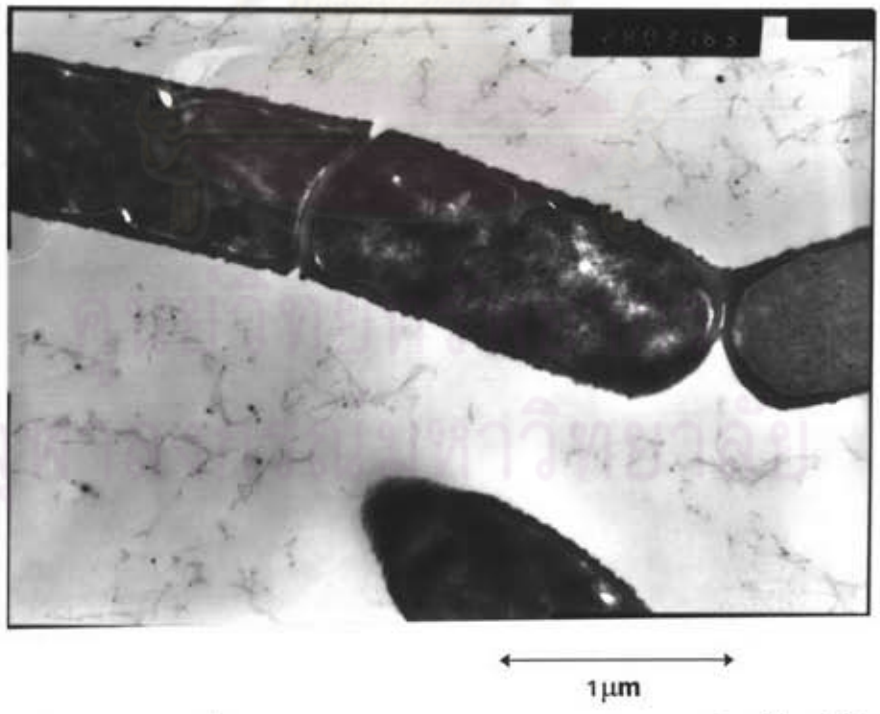


รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM กำลังขยาย 10,600 เท่า

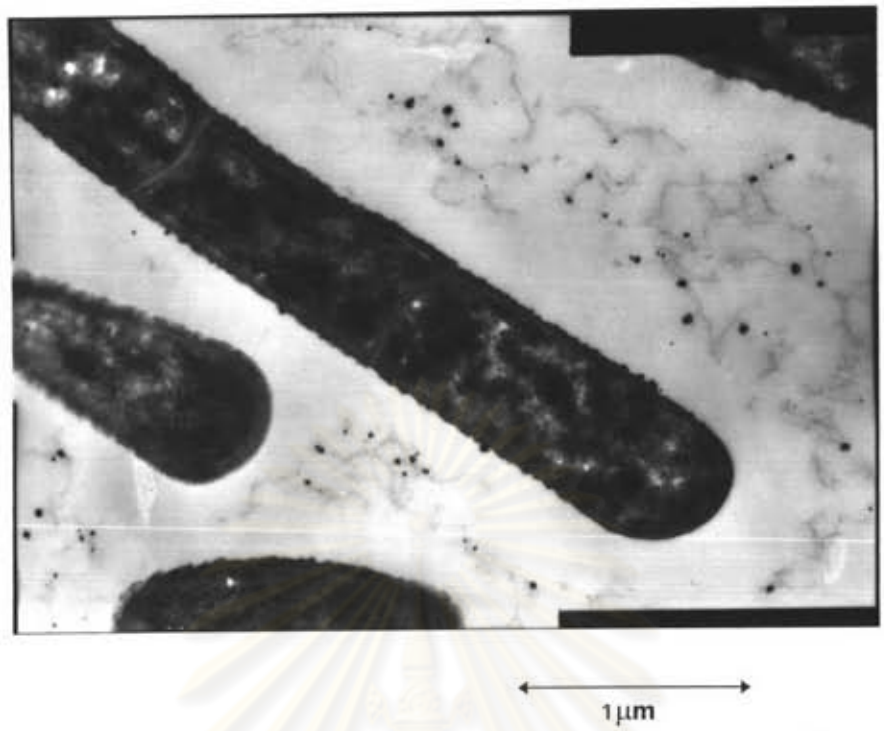
รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM กำลังขยาย 10,600 เท่า



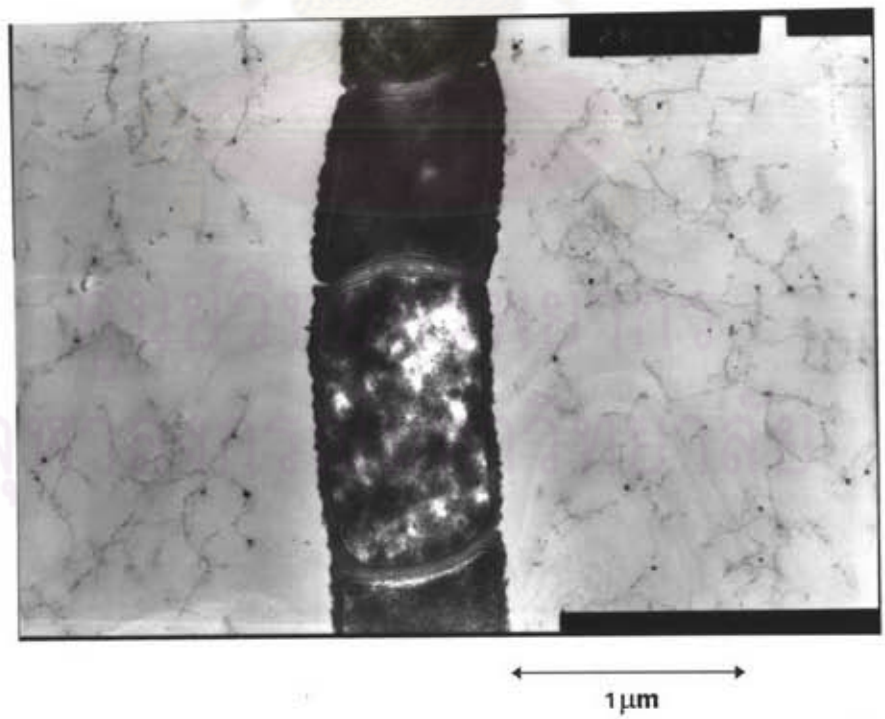
รูปที่ 15 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้องTEM กำลังขยาย 29,680 เท่า ขณะแบ่งเซลล์



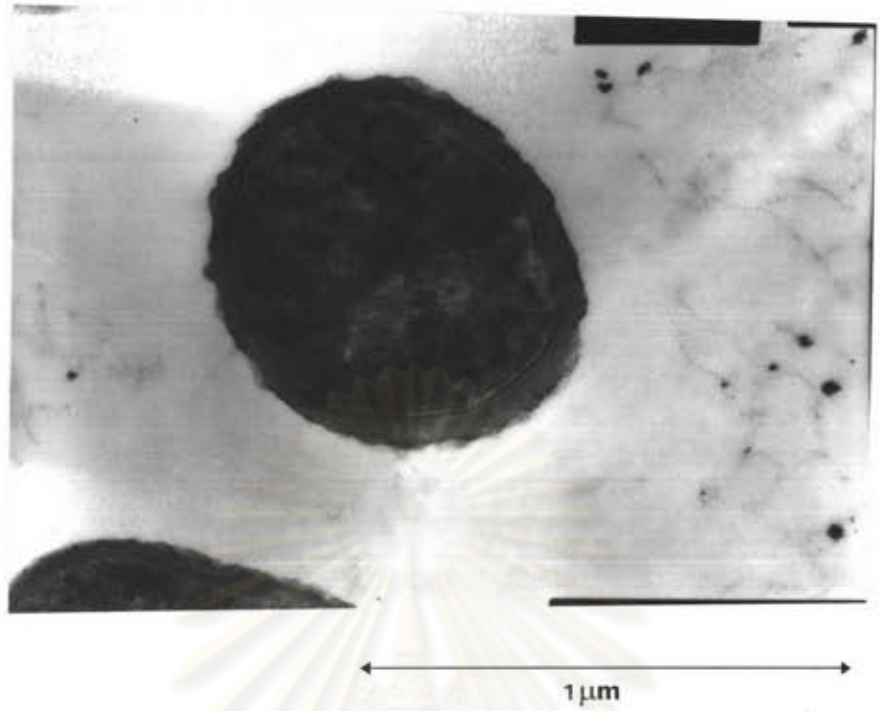
รูปที่ 16 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า ขณะแบ่งเซลล์



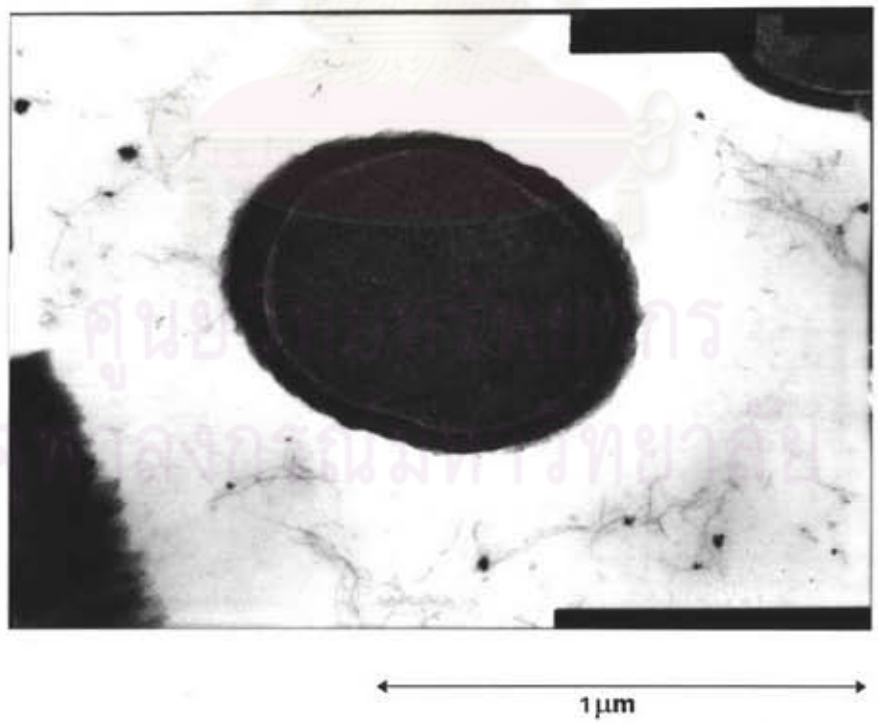
รูปที่ 17 ลักษณะเซลล์ของ ***Bacillus subtilis*** TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า แบ่งเซลล์เรียบร้อยแล้ว



รูปที่ 18 ลักษณะเซลล์ของ ***Bacillus subtilis*** UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า แบ่งเซลล์เรียบร้อยแล้ว



รูปที่ 19 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM (ภาพตัดขวาง) กำลังขยาย 59,360 เท่า



รูปที่ 20 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM (ภาพตัดขวาง) กำลังขยาย 59,360 เท่า

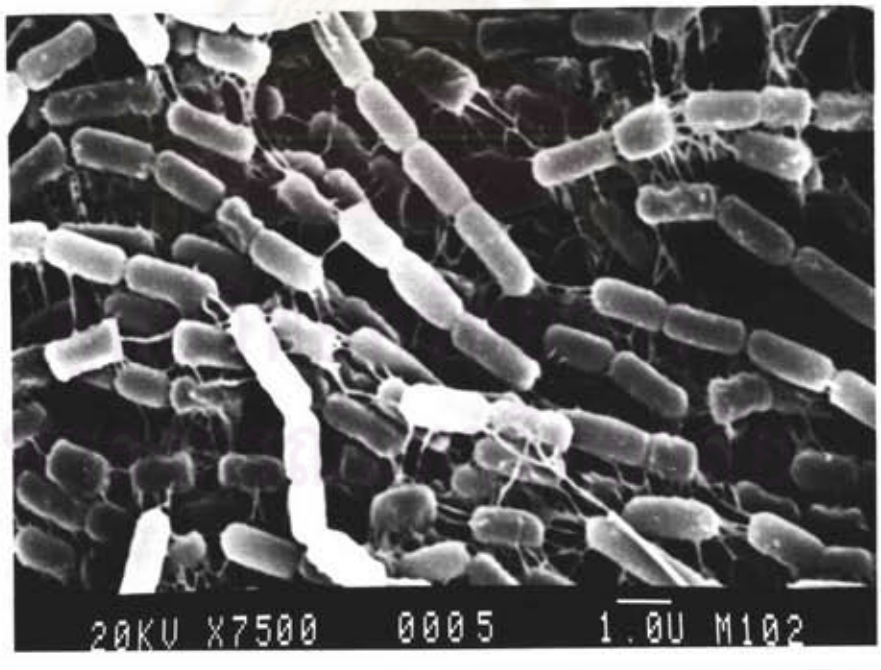
8.2 ลักษณะเซลล์จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (SEM)

จากการดูลักษณะเซลล์ของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning Electron Microscope (SEM) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์บน LB Plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีทดลองข้อ 13.2 เพื่อดูลักษณะเซลล์โดยใช้กำลังขยาย 7,500 และ 10,000 เท่า ได้ถ่ายภาพ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) ดังแสดงในรูปที่ 21 และ 23 ตามลำดับ จะเห็นว่า ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้าง 0.5 เซนติเมตร ขนาดความยาวแตกต่างกันประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว ระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์จะมีเส้นใยเกี่ยวเนื่องต่อกันทำให้เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ

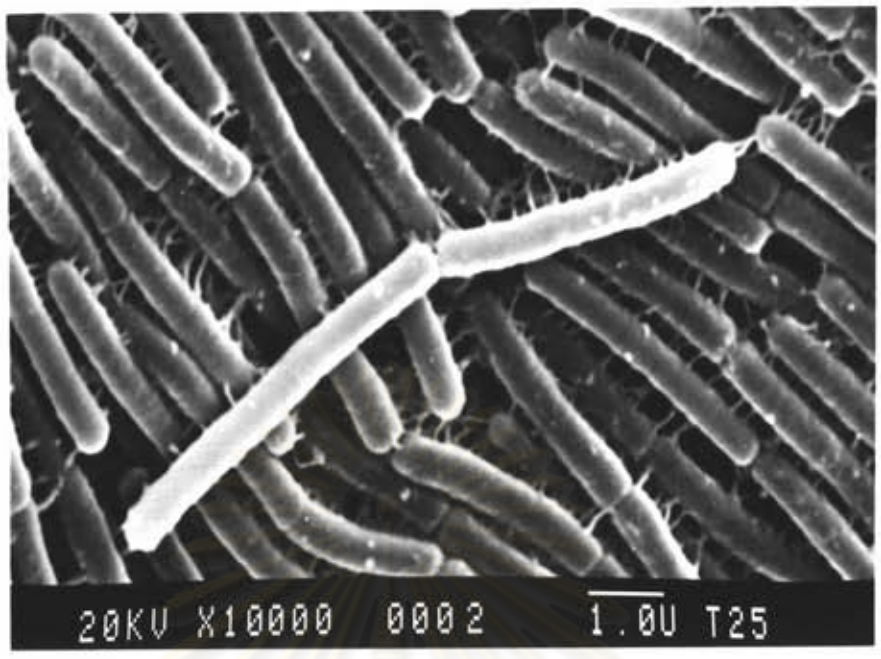
ส่วน UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) ได้ภาพถ่ายแสดงดังรูปที่ 22 และ 24 จะเห็นว่าลักษณะของเซลล์ มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Rod shape) มีขนาดความกว้าง 0.5 เซนติเมตร ขนาดความยาวใกล้เคียงกันประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) จะพบว่า ขนาดเซลล์ของ UUNN-1 จะมีขนาดเซลล์สั้นกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มากอย่างเห็นได้ชัด บางเซลล์กำลังมีการแบ่งตัว บางเซลล์แบ่งตัวเสร็จแล้ว ระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์จะมีเส้นใยเกี่ยวเนื่องต่อกันทำให้เซลล์มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบแต่จำนวนเส้นใยจะมีปริมาณน้อยกว่าสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

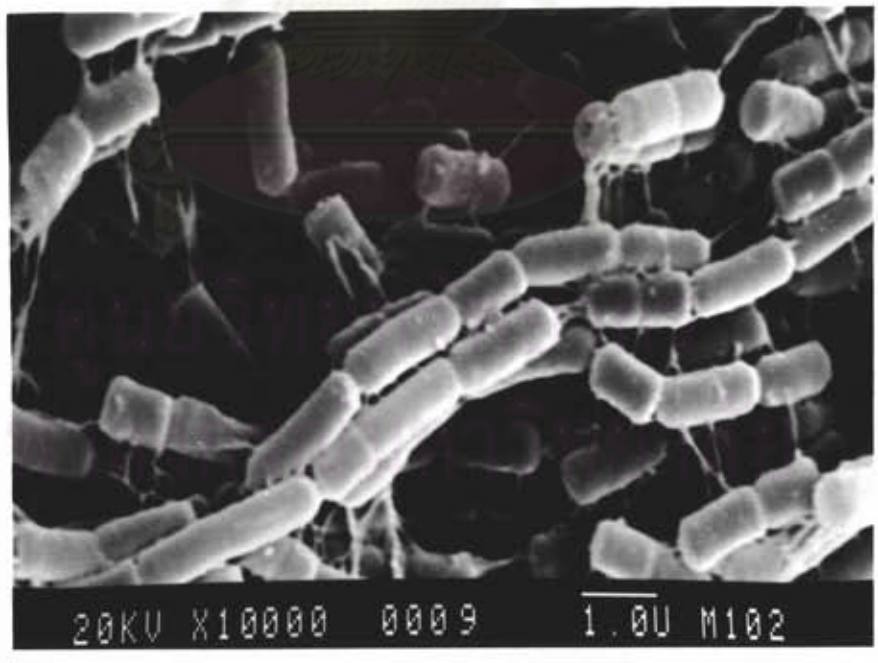
รูปที่ 21 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง SEM กำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 22 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง SEM กำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 23 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา12 ชั่วโมง จากกล้องSEM กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 24 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง SEM กำลังขยาย 10,000 เท่า

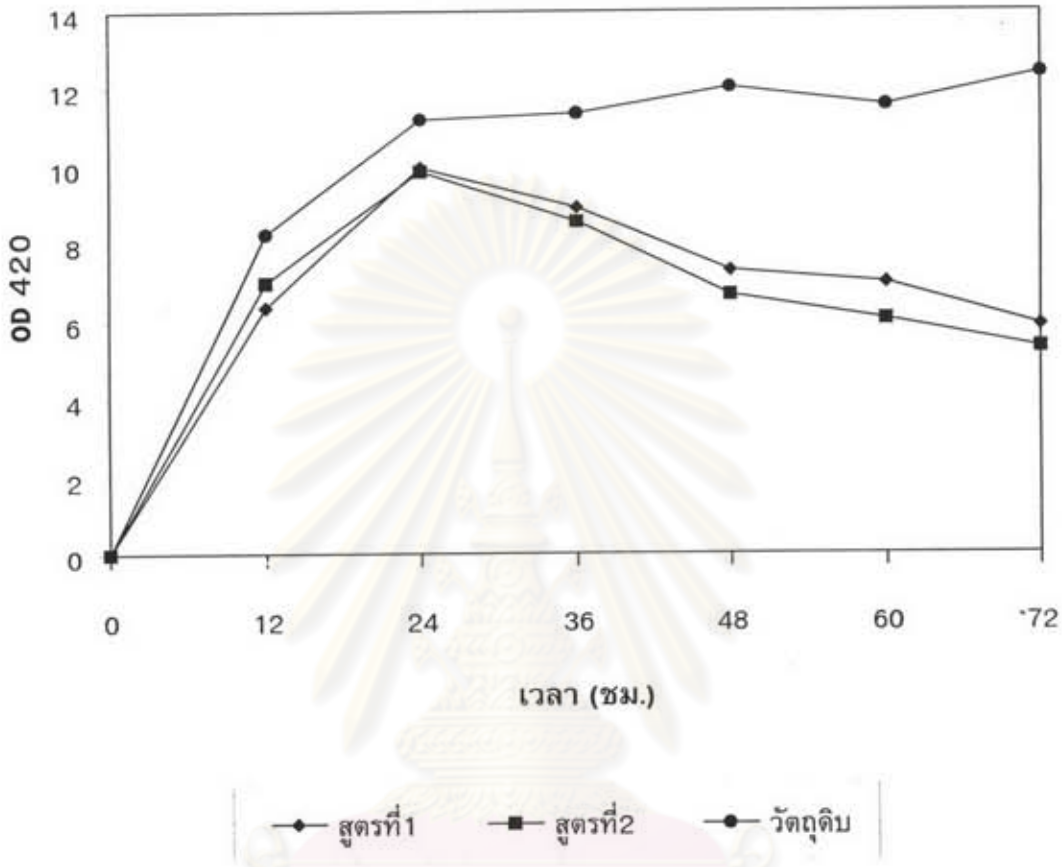
9. เปรียบเทียบประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม) และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ในสภาวะต่าง ๆ

จากผลการทดลองในตารางที่ 21 พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ UUNN-1 จะให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal Medium สูตร 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองข้อ 6.2 พบว่าสายพันธุ์ UUNN-1 มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 101.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (หลังการเพาะเลี้ยง 60 วัน) ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 (ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 68.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) คิดเป็นร้อยละ 48.60 ดังนั้นจึงเลือก UUNN-1 มาทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว 3 ชนิดได้แก่ Basal Medium สูตร 1, สูตร 2 และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันมาเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ขยายส่วนผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และเปรียบเทียบการหาอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

9.1 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยง UUNN-1 เปรียบเทียบกับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลว 3 ชนิด ระดับขวดเขย่า

การหาสูตรอาหารพื้นฐานเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยนำมาเลี้ยงในระดับขวดเขย่า เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ทำการเปรียบเทียบเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ Basal Medium สูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน อัตราส่วน 1:1 ที่ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน แทนสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันจะให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าเลี้ยงในอาหาร Basal Medium สูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์ 1 เท่า

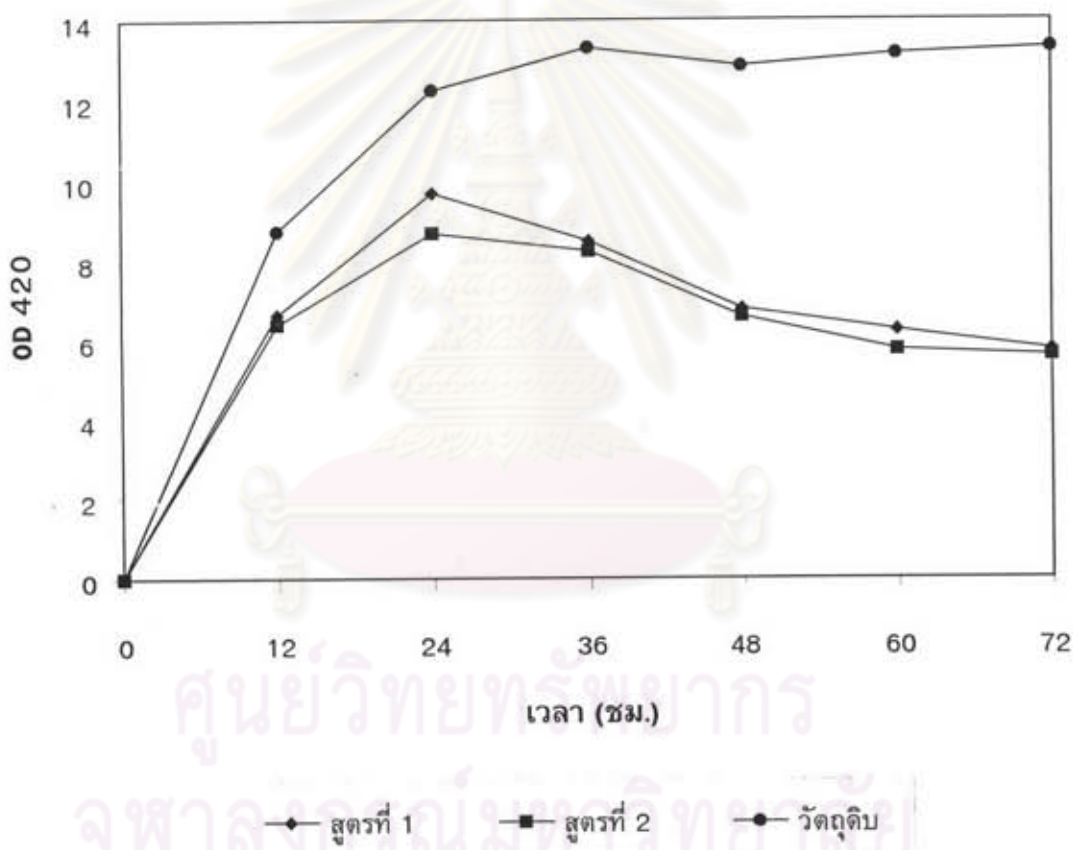
ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบเลี้ยง UUNN-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้กับ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเหลว 3 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น ในระดับขวดเขย่า เพื่อดูอัตราการเจริญของเชื้อ และประสิทธิภาพของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อทั้งสองชนิด นำผลมาเขียนกราฟแสดงดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 25 อัตราการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1 , สูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 25 แสดงการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมัน

สำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่1 และสูตรที่ 2 อัตราการเจริญจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆ ส่วนเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม จะเห็นว่าหลังชั่วโมงที่ 24 อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หรือค่อนข้างคงที่และจะเห็นว่าอัตราการเจริญของ UUNN-1 จะเจริญได้ดีกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 เล็กน้อย

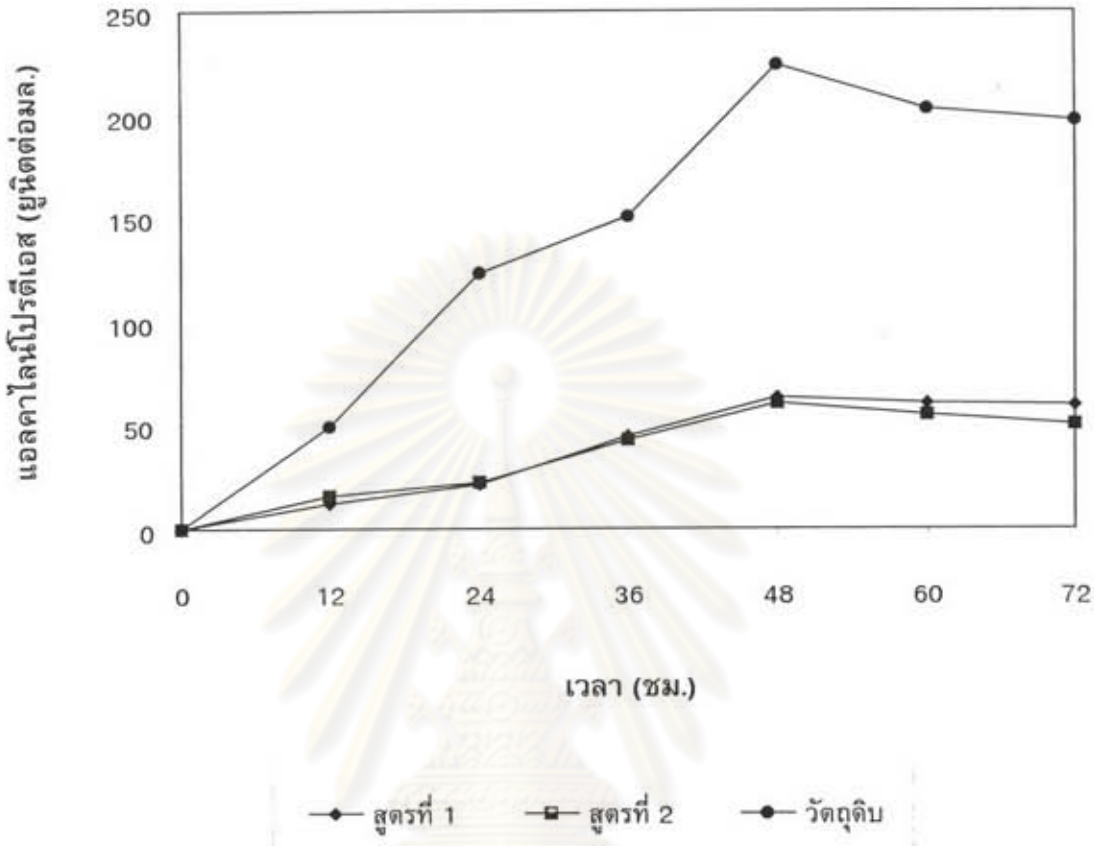


รูปที่ 26 อัตราการเจริญของ UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 26 แสดงการเจริญของ UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Basal Medium สูตรที่1 และสูตรที่ 2 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ส่วนเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสม จะเห็นว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้ออัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่ในการทดลองนี้ได้นำน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์หาแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสดังแสดงผลในรูปที่ 27 และ 28

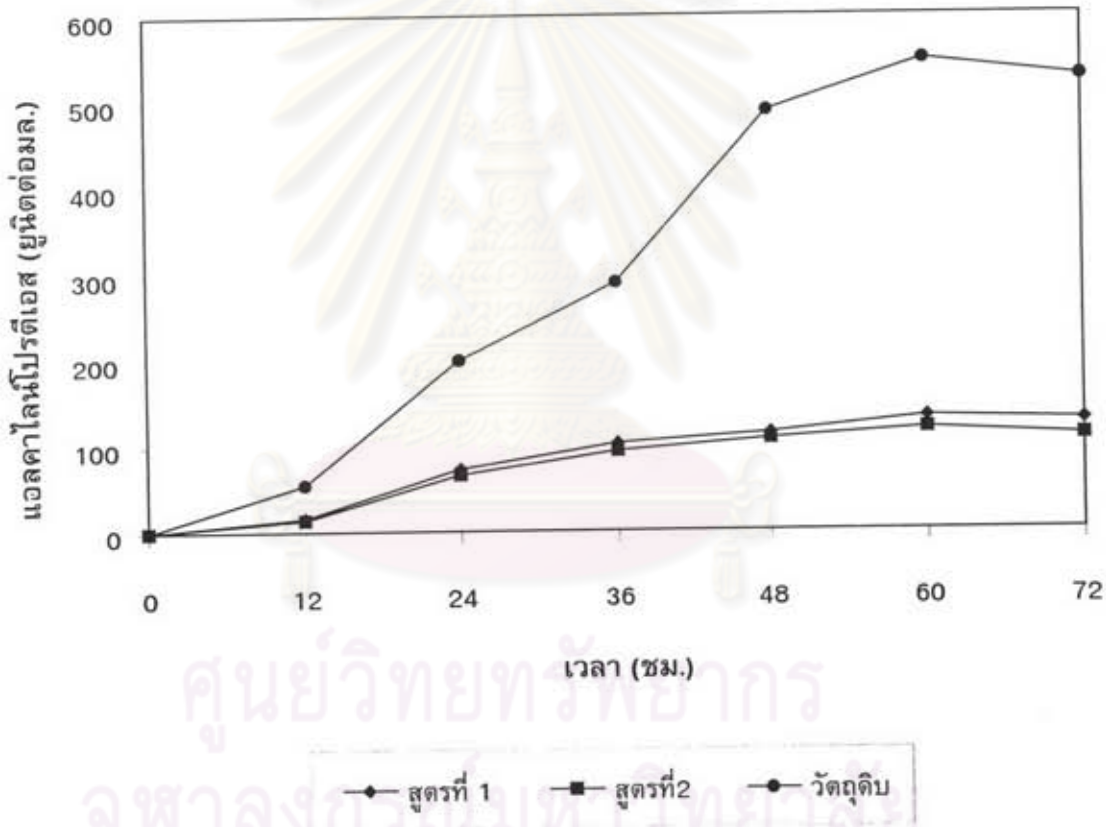
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์

จากรูปที่ 27 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าในช่วง 10 ชั่วโมงแรกยังไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เลย จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้นจะเริ่มมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น และพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดชั่วโมงที่ 48 แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสูตรที่1, สูตรที่ 2 เท่ากับ 63.84 และ 60.64 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตาม

ลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกันอาจเนื่องจากปริมาณแร่ธาตุในอาหารทั้ง 2 สูตร มีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงทำให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าในช่วง 8 ชั่วโมงแรกยังไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญมากขึ้นจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และพบว่าจะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรแรก แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงเท่ากับ 223.66 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2



รูปที่ 28 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสม ระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

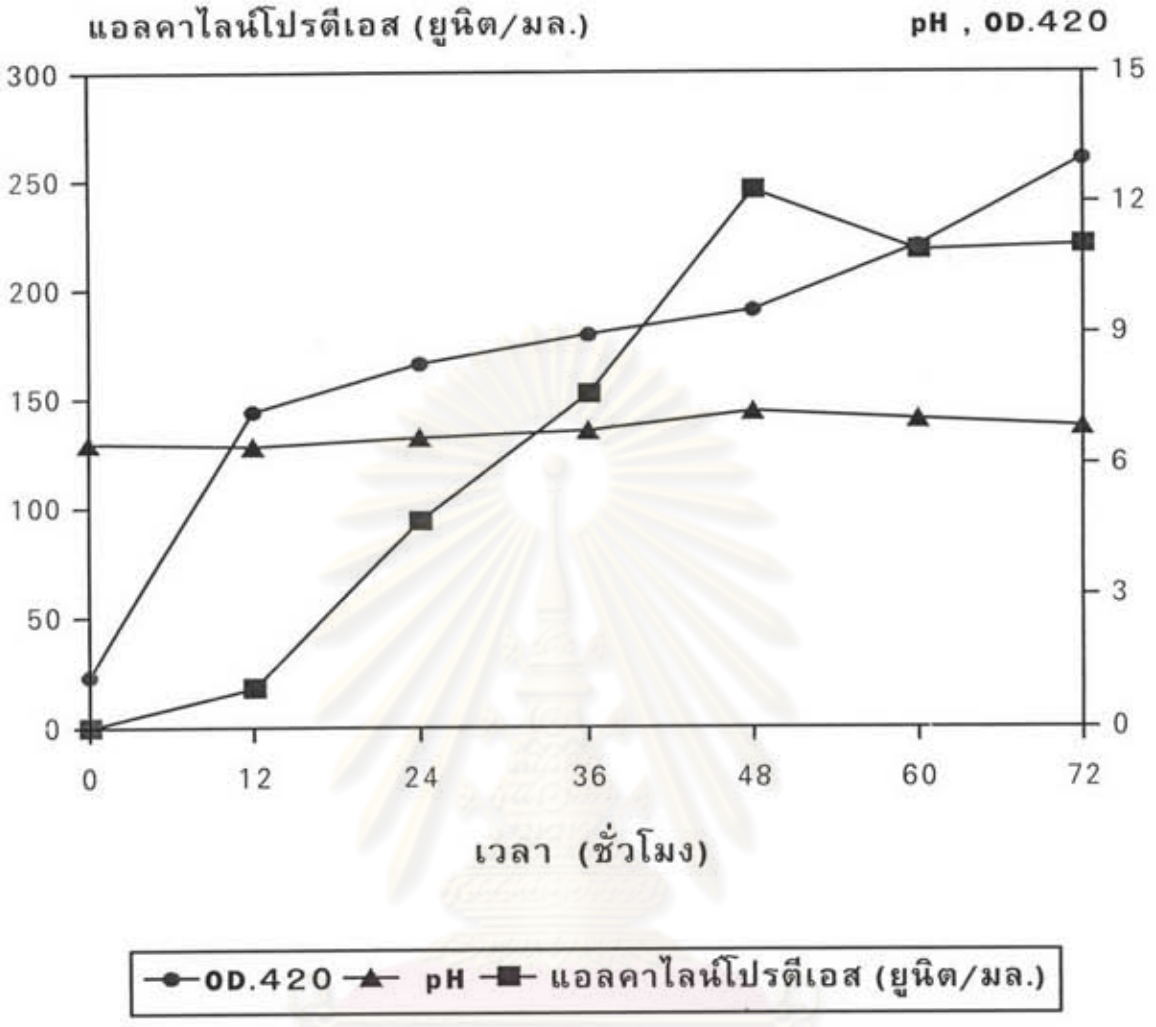
จากรูปที่ 28 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ UUNN-1 (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 2 ครั้งและสารเคมี NTG 2 ครั้ง) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้นจะเริ่มวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นและจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดชั่วโมงที่ 60 แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสูตรที่1,สูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 131.13 และ118.02 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเนื่องจากปริมาณแร่ธาตุในอาหารทั้งสองสูตรมีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงทำให้แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ พบว่าในช่วง 10 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญมากขึ้นจะวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดชั่วโมงที่ 60 เช่นเดียวกับเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรแรก แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 546.86 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่า UUNN-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ซึ่งมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน มากอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเลือกการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน นำไปเลี้ยงขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร และนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำเป็นรูปผงต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.2 ประสิทธิภาพของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการทดลองนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้เท่ากับ 223.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในระดับขวดเขย่า หลังทำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG พบว่า ได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 หลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง ในระดับขวดเขย่า นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส และวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสได้มากที่สุดเท่ากับ 546.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การทดลองนี้เป็นการขยายส่วนเพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1ในถังหมักขนาด 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 และวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 29 ส่วนการเจริญ, pH และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 30

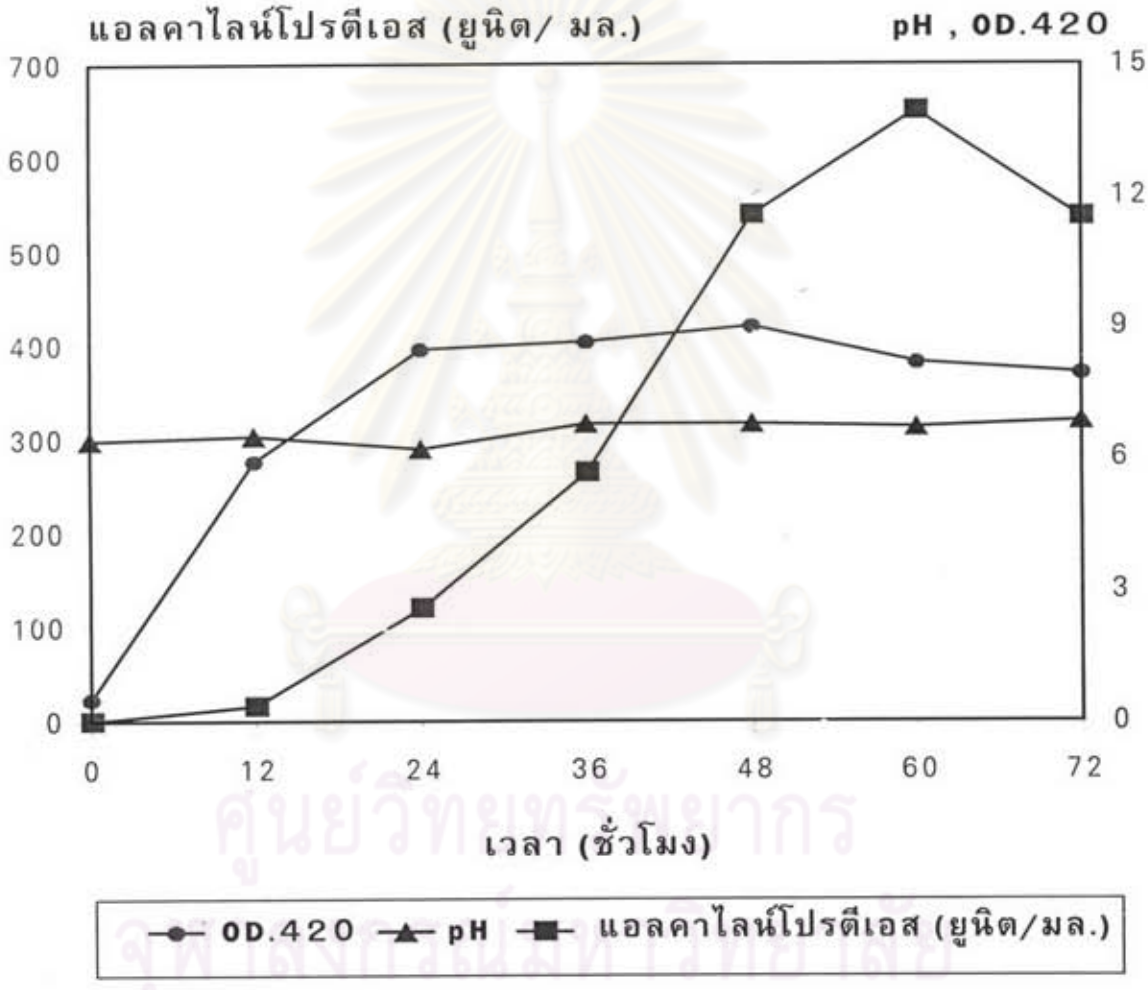
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 การเจริญ, รูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารที่มีวัตถุดิบผสม ระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากกราฟที่ 29 จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย หรือค่อนข้างคงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 48 อัตราการเจริญจะเพิ่มสูงขึ้นอีกช่วงหนึ่งจนถึงชั่วโมงที่ 72 ส่วน pH จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง pH 6.5-7.0 และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ยังไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นจะมีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเพิ่มมากขึ้นและวัดแอคติวิตีของ

แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุดชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 300.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าคิดเป็น 34.51 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 60 และ 72

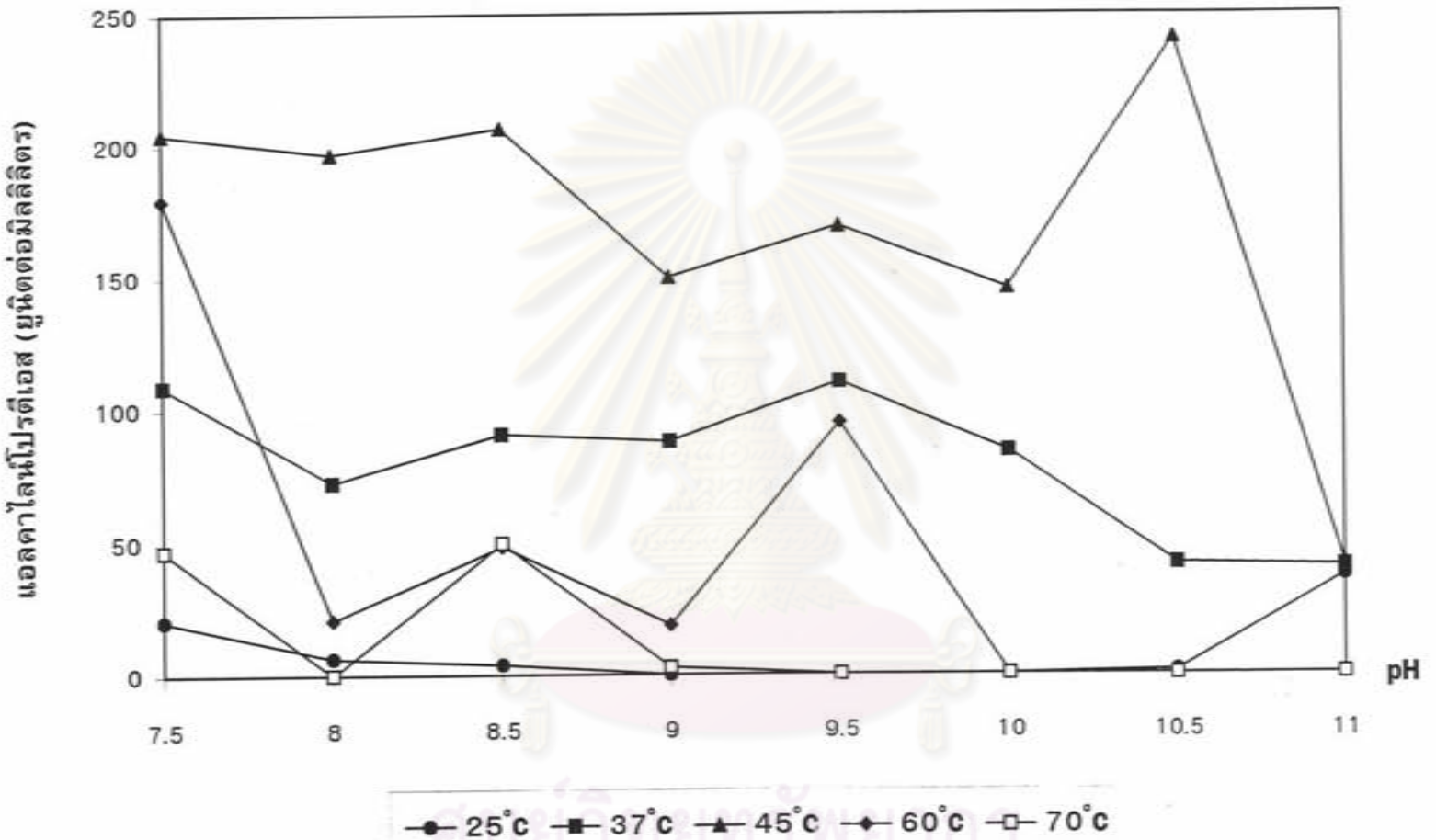


รูปที่ 30 การเจริญ , รูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเมื่อเลี้ยง ***Bacillus subtilis*** **UUNN-1** ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารที่มีวัตถุดิบผสม ระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์และใช้แป้งมันสำปะหลัง0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากกราฟที่ 30 จะเห็นว่า *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่อยู่ระยะหนึ่ง จากนั้นอัตราการเจริญมีแนวโน้มเริ่มลดต่ำลง ส่วน pH จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง pH 6.5-7.0 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสพบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกยังไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เลย จากนั้นเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดชั่วโมงที่ 60 เช่นเดียวกับเลี้ยงในระดับขวดเขย่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงสุดเท่ากับ 640.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้สูงกว่าเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าคิดเป็น 17.06 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 72 แอคติวิตีของเอนไซม์จะมีแนวโน้มต่ำลง

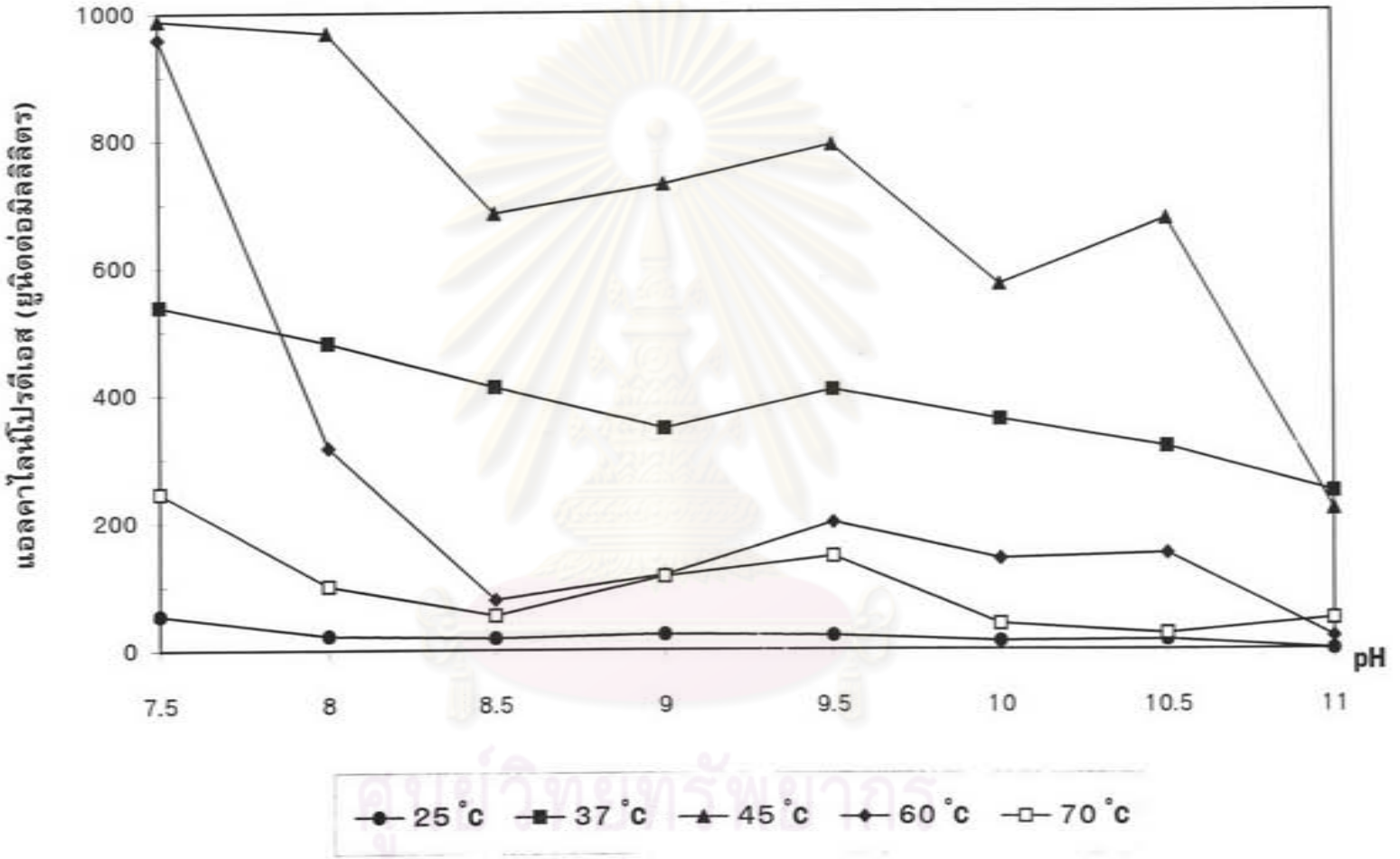
9.3 การหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

การหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส (ตามวิธีการทดลองข้อ 6.2) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออกแล้วนำไปบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ (pH 7.5 -11.0 ตามวิธีการทดลองข้อ 11) และนำตัวอย่างที่บ่มกับบัฟเฟอร์ทุก pH แยกไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25, 37, 45, 60 และ70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที(ตามวิธีการทดลองข้อ12) คำนวณแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 นำมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 31 และคำนวณหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก UUNN-1 สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ นำมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 32



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 แสดงอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 แสดงอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus subtilis* UUNN-1 เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง

จากกราฟรูปที่ 31 แสดงการหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะเห็นว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *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 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูง 60 และ70 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มีปริมาณต่ำอย่างเห็นได้ชัด เมื่อดูจากกราฟจะเห็นว่าอุณหภูมิและpH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่ pH 10.5

จากกราฟรูปที่ 32 แสดงการหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จาก UUNN-1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา48 ชั่วโมง จะเห็นว่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ผลิตได้จาก UUNN-1 วัดแอคติวิตีสูงสุดได้เท่ากับ 988.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7.5 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่ค่อนข้างจะเป็นกลาง อุณหภูมิในการบ่ม 45 องศาเซลเซียส โดยที่แอคติวิตีจะสูงที่ pH 7.5-8.0 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 แอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก UUNN-1 มีปริมาณต่ำอย่างเห็นได้ชัด เมื่อดูจากกราฟจะเห็นว่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก UUNN-1 คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 9.5 และพบว่า UUNN-1 จะมีแอคติวิตีของโปรตีเอสในช่วง pH 7.5 สูงกว่าโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม) ถึง 5 เท่า นอกจากนี้สายพันธุ์UUNN-1 จะให้แอคติวิตีของโปรตีเอสที่ pH 9.5 สูงกว่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ถึง 4 เท่า แต่ UUNN-1 ให้แอคติวิตีของโปรตีเอส ที่ pH 10.5 สูงกว่าแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพียง 2 เท่า เท่านั้น

10. การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีเอสในรูปผงและการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

10.1การเตรียมเอนไซม์ผง

เกษม มณีพงษ์ (2536)ได้ทดลองทำการเปรียบเทียบการเตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีต่างๆ ได้แก่ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์, โซเดียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์,เอธานอล 70 เปอร์เซนต์ และวิธีไลโอฟิไลซ์เซชั่น(Lyophilization)(การทำให้เข้มข้นก่อนโดยการกรองด้วยอัลตรา-ฟิวเตรชั่นแล้วทำให้แห้งเป็นผง) พบว่าปริมาณยูนิตทั้งหมดและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ ดังนั้นในการเตรียมเอนไซม์ผงของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และ UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่ที่กลายพันธุ์) จึงเลือกใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวกัน

การเตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ จากการหาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีจากน้ำเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) และUUNN-1(สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์)ในสูตรอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน มีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และมีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 พบว่าน้ำเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25(สายพันธุ์เดิม)มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่ากับ 251,506 ยูนิตต่อลิตร และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 167.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 316.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ Activity Yield สูงขึ้น 89.04 เปอร์เซนต์

ส่วนน้ำเลี้ยง UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) มีแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีเท่ากับ 651,477 ยูนิตต่อลิตร และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 383.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 709.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ Activity Yield สูงขึ้น 85.25 เปอร์เซนต์ แสดงผลในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 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)	167.67	383.22	316.97	709.91

10.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยนำเอนไซม์ผงมาวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีก่อน ซึ่ง *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงเท่ากับ 316.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วน UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงเท่ากับ 709.91 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นแบ่งเอนไซม์ผงที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ -20, 4, 25, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผง เก็บห่างกันครั้งละ 15 วันจำนวน 4 ครั้ง รวมเป็นเวลาทั้งหมด 60 วัน เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 24

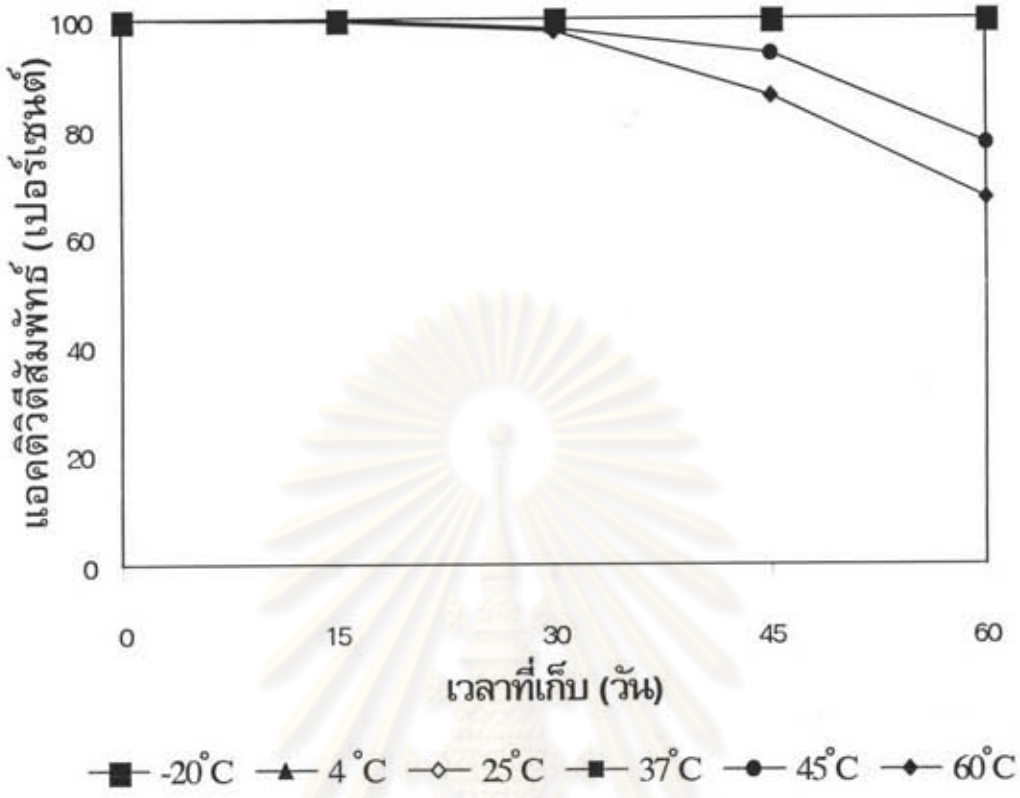
ตารางที่ 24 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม)และสายพันธุ์ใหม่ NNUU -1ซึ่งเตรียมโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์

อุณหภูมิที่ใช้เก็บ (°C)	Relative Activity (%)									
	Bacillus subtilis TISTR 25					UUNN-1				
	0 วัน	15 วัน	30 วัน	45วัน	60 วัน	0 วัน	15 วัน	30 วัน	45วัน	60 วัน
-20	100.00	100.16	100.64	100.24	100.11	100.00	100.10	100.24	100.16	100.10
4	100.00	100.32	100.32	99.94	100.15	100.00	100.37	100.12	100.31	100.22
25	100.00	100.50	99.81	100.12	99.84	100.00	100.12	99.88	100.12	99.96
37	100.00	100.29	99.68	100.13	100.24	100.00	99.88	100.12	99.95	100.21
45	100.00	99.81	98.24	93.45	77.26	100.00	99.63	99.39	95.12	88.52
60	100.00	99.68	97.75	85.96	67.15	100.00	99.51	97.18	87.36	70.54

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

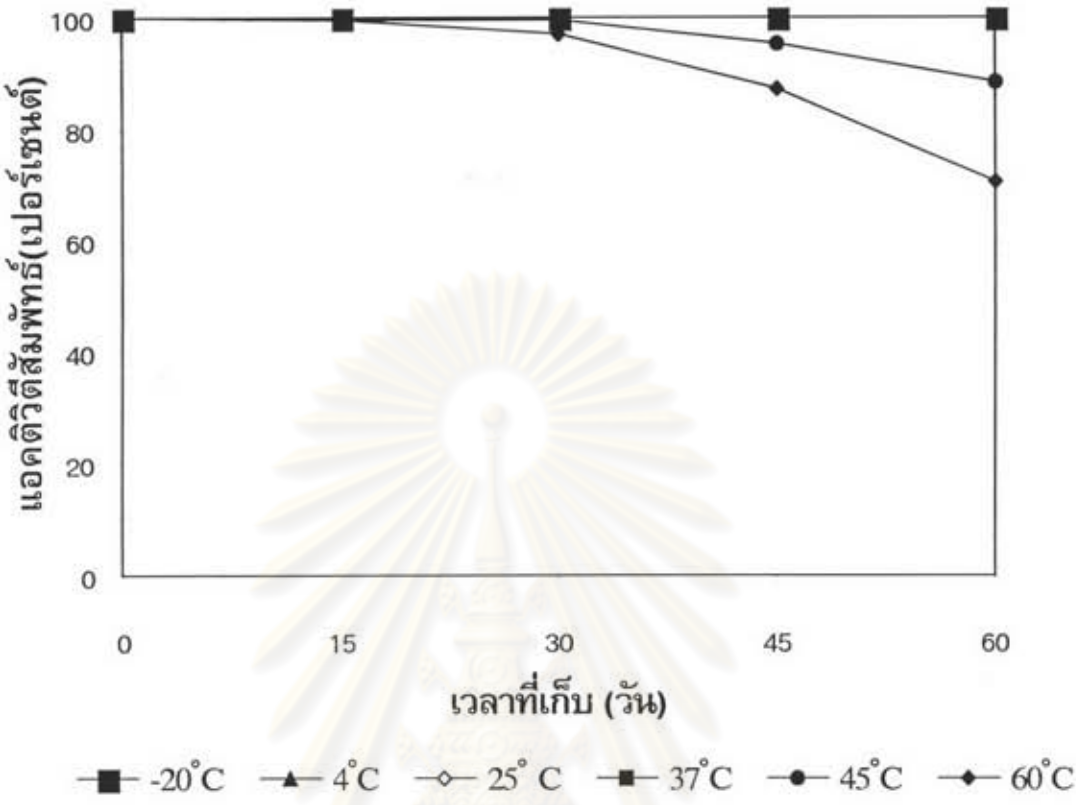
** Crude enzyme powder ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์) 68,861 ยูนิตต่อกรัม เท่ากับ 100 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย ***Bacillus subtilis*** **TISTR 25 (สายพันธุ์เดิม) ซึ่งเตรียมโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 60 วัน**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้) ซึ่งเตรียมโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 60 วัน

จากตารางที่ 24 และกราฟรูปที่ 32 และ 33 จะเห็นว่าเอนไซม์ผงทั้งสองสายพันธุ์เก็บที่อุณหภูมิ -20, 4, 25, 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน ยังไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสเลย แต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลง ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส ในช่วง 30 วันแรก *Bacillus subtilis* TISTR 25 คิดเป็นเปอร์เซนต์ลดลง 1.76 และ 2.25 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และ แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสลดลงเหลือประมาณ 98.24 และ 97.75 เปอร์เซนต์ตามลำดับ หลังจากเก็บไว้นาน 60 วันพบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ แอคติวิตีของเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ลดลง 22.74 และ 32.85 เปอร์เซนต์ ตามลำดับและแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 77.26 และ 67.15 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

ส่วน *Bacillus subtilis* UUNN-1 ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส ในช่วง 30 วันแรก แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงคิดเป็น 0.61 และ 2.82 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 99.39 และ 97.18 เปอร์เซนต์ตามลำดับ หลังจากเก็บไว้นาน 60 วัน พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงคิดเป็น 12.64 และ 29.46 เปอร์เซนต์ตามลำดับ และแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 88.52 และ 70.54 เปอร์เซนต์ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิห้องได้นานพอควรโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งถ้าเก็บเป็นเวลานานจะทำให้มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์มากขึ้นด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย