การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

นางสาว จันทิมา จิรนุชนาฏ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-750-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18938106

MUTAGENESIS OF *Bacillus subtilis* TISTR 25 TO INCREASE ALKALINE PROTEASE PRODUCTION

Miss Jantima Jiranutchanat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-633-750-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส
โดย	นางสาว จันทิมา จิรนุชนาฏ
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ กุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

_____ กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จันทิมา จิรนุชนาฏ : การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส (MUTAGENESIS OF *Bacillus subtilis* TISTR 25 TO INCREASE ALKALINE PROTEASE PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษา :ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ , อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ , 126 หน้า. ISBN 974-633-750-5

งานวิจัยนี้จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTGโดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิใช้โพเทนซีอินเดกซ์ (Potency Index)ซึ่งตรวจดูบริเวณใสรอบๆโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Skim Milk และเตตร้าไซคลินจากนั้นทำการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิโดยวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในน้ำหมักโดยใช้เคซีนเป็นซับสเตรทพบว่าโพเทนซีอินเดกซ์มีความสัมพันธ์กับแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นแบบเส้นตรงจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต 20 นาที ถึง 2 ครั้ง ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร มีเปอร์เซนต์รอด 0.1 เปอร์เซนต์ และใช้ความเข้มข้น NTG ปริมาณ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการกลายพันธุ์ 2 ครั้ง ผลการทดลองทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่สามารถผลิตแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ถึง 81.80 เปอร์เซนต์ ในการทดสอบการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับขวดเขย่า พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 พบว่าอยู่ที่ pH 9.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจาก *Bacillus subtilis* TiSTR 25 ตรง pH ของการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้น เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ของสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 พบว่า สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงถึง 640.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีไนโตรเจน 0.3 กรัมเปอร์เซนต์ และแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากนั้นทำการผลิตเอนไซม์ผงแอลคาไลน์โปรตีเอสโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 เท่ากับ 709.91 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีแอคติวิตีที่สูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR 25 ถึง 85.25 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสผงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C626653 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: MUTAGENESIS / ALKALINE PROTEASE / ULTRAVIOLET / NTG
JANTIMA JIRANUTCHANA : MUTAGENESIS OF *Bacillus subtilis* TISTR 25 TO INCREASE ALKALINE PROTEASE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON , THESIS CO-ASSIST. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT , Ph.D.,126 pp. ISBN.974-633-750-5

The purpose of this work is to obtain alkaline protease overproducing strain *Bacillus subtilis* TISTR 25 by using UV light and NTG as mutagens. Potency Index was used for primary screening. The rapid primary screening for alkaline protease overproducing mutants from the parental strain on skim milk plate are typical for identification of each mutant by halo formation. After that secondary screening was done by determination of alkaline protease activity in fermentation broth by casinolysis method. This experiment showed that the correlation between potency Index and alkaline protease activity was linear . Mutagenesis was performed using the two consecutive 20 seconds irradiation time at wavelength 254 nm and a distance 20 cm from the UV lamp. The survival rate was found to be 0.1 %. The two consecutive NTG concentration for the induction was 25 µg/ml. A mutant named "UUNN-1" was selected producing alkaline protease at 81.80 % higher than that produced by *Bacillus subtilis* TISTR 25. Cultivation of UUNN-1 in shaking flask, the alkaline protease activity was at pH at 9.5 and showed optimal temperature of 45 °C and optimal pH of 9.5, the latter differed from the enzyme produced by *Bacillus subtilis* TISTR 25 . Cultivation in 5L fermenter containing the mixture of soy bean meal and sunflower meal and 0.3 g% as nitrogen source and 0.5 % casava starch as carbon source gave maximum alkaline protease activity of 640.15 units/ml after 60 hours. The UUNN-1 broth was precipitated with 70 % ammonium sulfate and over dried at 45 °C . The alkaline protease powder had the specific activity of 709.91 units/mg protein, 85.25 % higher than that produced by *Bacillus subtilis* TISTR 25. The alkaline protease powder extracted from UUNN-1 broth was stable below 37 °C within 60 days.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนวความคิด และความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำงานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมี ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำหรับทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณแกล้วกล้า แก้วไทยในการจัดทำสไลด์ประกอบการเสนอวิทยานิพนธ์ คุณกนกพร สมพรไพลิน สำหรับฝีมือการถ่ายสไลด์ที่ยอดเยี่ยม คุณรสวันต์ สุวรรณนภาศรี ที่ให้คำแนะนำ และโดยเฉพาะ คุณนารถนารี รัฐปัตย์และครอบครัวแสนสนุกทุกท่าน สำหรับกำลังใจ กำลังกาย ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณ อลิสา วังใน ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และ นิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรัก และญาติพี่น้องที่รักทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้าที่

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูป ..... ณ
คำย่อ ..... ท
บทที่
1 บทนำ 1
วัตถุประสงค์ 23
2 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์
1. ครุภัณฑ์ 24
2. เคมีภัณฑ์ 25
3. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 26
4. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 26
3 วิธีการทดลอง
1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
2. การเตรียมสารละลาย 29
3. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 32
4. การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 32
5. การกลายพันธุ์เชื้อด้วยสารซักนำให้เกิดการกลายพันธุ์
5.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 33
5.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 33
6. การเลือก *Bacillus subilis* ที่กลายพันธุ์
6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 34
6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ 35
7. การหาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl 36
8. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี 37
9. การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ 37
10. การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด5 ลิตร 37
11. การหาpHที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส 38

บทที่ หน้าที่

12. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส 38
13. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์
13.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย TEM 38
13.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย SEM 39
14. การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงและทดสอบความเสถียร
14.1 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผง 40
14.2 การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ 40
4 ผลการทดลอง
1. การศึกษาประสิทธิภาพแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 41
1.1 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารวุ้น 41
1.2 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสระดับขวดเขย่า 42
2. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นในขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับขั้นทุติยภูมิ 42
2.1 จากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 43
2.2 จากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG 46
3. การเปรียบเทียบวิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG เพื่อใช้เป็นวิธีเริ่มต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 49
3.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์ 49
3.2 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์ 54
4. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* U-12 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 60
5. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* UU-15 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG 64
6. การชักนำให้ *Bacillus subtilis* UUN-8 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG 68
7. ความเสถียรของแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ 71

บทที่ หน้าที่

8. ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25และสายพันธุ์ใหม่ UUNN-1 ที่คัดเลือกได้ 73
8.1 ลักษณะเซลล์จากกล้อง TEM 75
8.2 ลักษณะเซลล์จากกล้อง SEM 80
9. เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ UUNN-1 83
9.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า 83
9.2 การขยายส่วนเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร 89
9.3 การหาอุณหภูมิและpH ที่เหมาะสม 93
10. การเตรียมเอนไซม์ในรูปผง 95
10.1 การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีเอสในรูปผง 95
10.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ 96
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 101
รายการอ้างอิง 115
ภาคผนวก
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน 122
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี 124
สูตรคำนวณ 125
ประวัติผู้เขียน 126

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้าที่

1 แสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของเอนไซม์ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 1991-1995 11

2 ความสามารถในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG 22

3 แสดงความถี่ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 จำนวน 100 ซ้ำที่ให้ความกว้างบริเวณใสและความกว้างโคโลนีขนาดต่าง ๆกัน 41

4 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 43

5 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิของสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG 46

6 เปอร์เซนต์รอดหลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆเพื่อชักนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เกิดการกลายพันธุ์และโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 50

7 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 18 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 52

8 แอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ครั้งที่ 1, ครั้งที่2 และ 3 ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 53

9 เปอร์เซนต์รอดหลังเติมสารเคมีNTGที่ความเข้มข้นต่าง ๆเพื่อชักนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25เกิดการกลายพันธุ์และโคโลนีที่คัดเลือกขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 55

10 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 20 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 58

ตารางที่ หน้าที่

11 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1 ครั้งที่2 และ 3 ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และสายพันธุ์ใหม่ ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 59
12 เปอร์เซนต์รอดหลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆเพื่อชักนำ *Bacillus subtilis* U-12 เกิดการกลายพันธุ์และโคโลนีที่คัดเลือก ขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 61
13 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* U-12 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 17 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 62
14 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1, ครั้งที่2 และ3 ของ *Bacillus subtilis* U-12 และสายพันธุ์ใหม่ ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 64
15 เปอร์เซนต์รอดหลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ เพื่อชักนำ *Bacillus subtilis* UU-15 เกิดการกลายพันธุ์และโคโลนีที่คัดเลือก ขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 65
16 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* UU-15 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 66
17 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1, ครั้งที่2 และ3 ของ *Bacillus subtilis* UU-15 และสายพันธุ์ใหม่ ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 67
18 เปอร์เซนต์รอดหลังเติมสารเคมี NTGที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำ *Bacillus subtilis* UUN-8 เกิดการกลายพันธุ์และโคโลนีที่คัดเลือก ขั้นปฐมภูมิแล้วให้ค่า Potency Index สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น 68
19 ค่า Potency Index จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบ *Bacillus subtilis* UUN-8 สายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เลือกไว้ 14 สายพันธุ์ เก็บผลชั่วโมงที่ 48 69
20 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิครั้งที่ 1, ครั้งที่2 และ3 ของ *Bacillus subtilis* UUN-8 และสายพันธุ์ใหม่ ผ่านการคัดเลือกครั้งที่ 1 เก็บผลชั่วโมงที่ 48 70

ตารางที่ หน้าที่

21 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในเวลาต่างกัน 72
22 เปอร์เซนต์แอคติวิตีที่ลดลงของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้ในการกลายพันธุ์แต่ละครั้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในเวลาต่างกัน 72
23 เปรียบเทียบแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีก่อนและหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ระหว่าง *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 96
24 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 และ UUNN-1 จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ 97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้าที่

1 Thymine-Thymine-Cyclobutane Dimer ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 14

2 แผนภาพการทำงานของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการเกิด T^T Dimer บนสาย DNA และการซ่อมแซมตัวเอง ภายหลังถูก Visible Light 16

3 สูตรโครงสร้างโมเลกุล NTG สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 19

4 การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีน ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG 20

5 แสดงความกว้างบริเวณใสรอบ ๆโคโลนี (Clear Zone)จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ 35

6 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต 45

7 แสดงความสัมพันธ์ของค่า Potency Index กับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG 49

8 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR25 กับระยะเวลาฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ 51

9 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์รอดของ *Bacillus subtilis* TISTR25 กับความเข้มข้นสารเคมี NTG เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ 56

10 แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้นเดิม)และสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยง 5 ครั้งเป็นเวลา 60 วันเก็บผลชั่วโมงที่ 48และหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ 72-1

11 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* TISTR 25(สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 74

12 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 74

13 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ตั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง TEM กำลังขยาย 10,600 เท่า 76

รูปที่ หน้าที่

14 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 (สายพันธุ์ใหม่) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 10,600 เท่า 76
15 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า 77
16 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่)หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า 77
17 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย 29,680 เท่า 78
18 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่)หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง TEM กำลังขยาย29,680 เท่า 78
19 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง(ภาพตัดขวาง) จากกล้อง TEM กำลังขยาย 59,360 เท่า 79
20 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่)หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง(ภาพตัดขวาง) จากกล้อง TEM กำลังขยาย 59,360 เท่า 79
21 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง SEM (กำลังขยาย 7,500 เท่า) 81
22 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่)หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้องSEM (กำลังขยาย 7,500 เท่า) 81
23 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 (สายพันธุ์ดั้งต้น) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากกล้อง SEM (กำลังขยาย 10,000 เท่า) 82

รูปที่ หน้าที่

24 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* UUNN-1(สายพันธุ์ใหม่)หลัง
การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น LB เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากกล้อง SEM
(กำลังขยาย 10,000 เท่า) 82
25 อัตราการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
พื้นฐานสูตร1, สูตร 2 มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัด
จากยีสต์ 2.0 %เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่าง
กากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน มีไนโตรเจน
0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %เป็นแหล่งคาร์บอน..... 84
26 อัตราการเจริญของ *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
พื้นฐานสูตร1, สูตร 2 มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัด
จากยีสต์ 2.0 %เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่าง
กากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน มีไนโตรเจน
0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %เป็นแหล่งคาร์บอน..... 85
27 แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตร1, สูตร 2 มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน
และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 %เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบ
ผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน
มีไนโตรเจน 0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %เป็นแหล่งคาร์บอน..... 87
28 แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* UUNN-1 ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตร1, สูตร 2 มีกลูโคส 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอนและ
สารสกัดจากยีสต์ 2.0 %เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหารที่มีวัตถุดิบ
ผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน
มีไนโตรเจน 0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %เป็นแหล่งคาร์บอน..... 88
29 การเจริญ,การเปลี่ยนแปลง pHและแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์จาก
Bacillus subtilis TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารวัตถุดิบ
ผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน
มีไนโตรเจน 0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %เป็นแหล่งคาร์บอน..... 91
30 การเจริญ,การเปลี่ยนแปลง pHและแอคติวิตีของแอลคาไลน์จาก *Bacillus*
subtilis UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหารวัตถุดิบผสมระหว่าง
กากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจน มีไนโตรเจน
0.3 g% และใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน 92

รูปที่ หน้าที่

31 แสดงอุณหภูมิและpHที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง 93-1
32 แสดงอุณหภูมิและpHที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* UUNN-1 เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมกากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บผลชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง 93-2
33 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 60 วัน 98
34 ผลการเก็บรักษาแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* UUNN-1 โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 60 วัน 99
35 แผนภาพแสดงขั้นตอนงานวิจัยทั้งหมด 113

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
µg	=	ไมโครกรัม
rpm	=	จำนวนรอบต่อนาที
NTG	=	N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine
UV	=	Ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย