

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก
ด้วยวิธีการใช้รังสีและ/หรือสารเคมี

นายจิตติกร มหิสนันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2555

***Bacillus subtilis* PRODUCING POLY- γ -GLUTAMIC ACID
(PGA) STRAIN IMPROVEMENT BY RADIATION
AND/OR CHEMICAL**

Thitikorn Mahidsanan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2012**

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก
ด้วยวิธีการใช้รังสีและ/หรือสารเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จิตติกร มหิสนันท์ : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก
ด้วยวิธีการใช้รังสีและ/หรือสารเคมี (*Bacillus subtilis* PRODUCING POLY- γ -GLUTAMIC
ACID (PGA) STRAIN IMPROVEMENT BY RADIATION AND/OR CHEMICAL)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์กลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* เพื่อการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (PGA) โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต การใช้สารเคมี N-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine (NTG) และการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ผลการศึกษาจากการคัดกรองโดยวัดผลผลิต PGA ที่กลายพันธุ์ผลิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ใน PGA broth ณ ชั่วโมงที่ 36 โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) พบว่า การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการปรับปรุงสายพันธุ์ พบ 1 ไอโซเลต คือ UV-112 การใช้สารเคมี NTG พบ 5 ไอโซเลต ได้แก่ NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 และ NTG-146 และการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG พบ 4 ไอโซเลต ได้แก่ UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 รวมสายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลต จากนั้นนำสายพันธุ์กลายพันธุ์มาใช้เป็นกลายพันธุ์ทดสอบการเจริญและการผลิต PGA ช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ nutrient broth (อาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม) PGA broth และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง พบว่าการผลิต PGA ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้ง 10 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่ไม่มีความคงที่ สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิต PGA ใน PGA broth สูงและผลผลิต PGA มีความสม่ำเสมอว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตซึ่งสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG นี้มีความเหมาะสมในการนำไปผลิต PGA บริสุทธิ์ทางการค้าในระดับอุตสาหกรรมส่วนสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ UN-48 ที่ให้ผลการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่าหรือนัตโตะ) เท่ากับ 24.11 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ณ ชั่วโมงที่ 24 และผลผลิต PGA มีความสม่ำเสมอในระหว่างระยะเวลาการหมักถั่วเหลืองซึ่งมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นกลายพันธุ์เพื่อการผลิต PGA และลดระยะเวลาการหมักถั่วเหลืองเพื่อให้มีคุณค่าทางโภชนาการทางอาหารและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จากการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมเบื้องต้นด้วยวิธีเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. subtilis* กลายพันธุ์ทั้ง 10 ไอโซเลตให้แถบ (band) พีซีอาร์ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

THITIKORN MAHIDSANAN : *Bacillus subtilis* PRODUCING POLY- γ -
GLUTAMIC ACID (PGA) STRAIN IMPROVEMENT BY RADIATION
AND/OR CHEMICAL. THESIS ADVISOR:
ASST. PROF.PIYAWAN GASALUCK,Ph.D., 87 PP.

Bacillus subtilis/POLY- γ -GLUTAMIC ACID PRODUCTION/ULTRAVIOLET
RADIATION/NTG MUTATION/STRAIN IMPROVEMENT

The aim of this research was to improve the *Bacillus subtilis* starter culture for a high yield production of poly- γ -glutamic acid (PGA) by ultraviolet radiation (UV), N-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine (NTG) and a combined treatment of UV and NTG induced mutagenesis. The results of primary screening, based on the maximum PGA production by mutant strains were significantly different ($P < 0.05$) in PGA broth at 36 h compared to the wild type (SB-MYP-1), showed only one isolate (UV-112) UV mutant. Five NTG mutagenesis (NTG-17, NTG-53, NTG-88, NTG-132, NTG-146) and four combined treatment (UN-43, UN-48, UN-81, UN-84) isolates were found as well. Those of 10 mutant potential strains were then tested for growth profile and PGA production in nutrient broth (control medium), PGA broth and solid state soybean fermentation for 72 h. The PGA production of 10 mutant isolates in nutrient broth was higher than that of the wild type, but the PGA yields were instable during 72 h. Five NTG mutant isolates produced a higher yield of PGA and had more stable profiles in PGA broth than the wild type and the UV mutant profile, which would be suitable for PGA commercial production. There was only one UN-48 mutant by

ultraviolet radiation and NTG showing a potential 24.11 ± 0.11 mg/g PGA with the highest yield at 24 h and a stable PGA profile during soybean fermentation. It is therefore possible to use UN-48 as a starter culture for decreasing fermented soybean production time to achieve an acceptable nutritional value. The characteristics of genomic DNA by random amplified polymorphic DNA (RAPD) of 10 mutant isolates were similar to those of the wild type.



School of Food Technology

Academic Year 2012

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำ ช่วยแก้ปัญหาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ที่ร่วมเรียนระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

จิตติกร มหิสนันท์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่	

1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์	4
2.2 การกลายพันธุ์.....	5
2.3 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ.....	6
2.4 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี	8
2.5 คุณสมบัติของ PGA.....	11
2.6 การประยุกต์ใช้PGA ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร.....	12
2.7 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PGA	13
2.8 ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่า	16
2.9 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักถั่วเน่าและการผลิต PGA.....	17
3 วิธีการทดลอง.....	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1	แหล่งและการเตรียมเชื้อ <i>B. subtilis</i>	20
3.2	การศึกษาการเจริญมาตรฐานและระยะกึ่งกลางทวิคูณ (mid log phase) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1.....	20
3.3	การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว.....	21
3.4	การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง	21
3.5	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต.....	21
3.6	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG	22
3.7	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG.....	23
3.8	การคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์.....	23
3.9	การหาลักษณะการเจริญมาตรฐานของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์.....	23
3.10	การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์.....	24
3.11	การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์.....	24
3.12	การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ <i>B. subtilis</i>	24
3.13	การวิเคราะห์ปริมาณการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i>	24
3.14	การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD).....	25
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	27
4.1	การศึกษาการเจริญมาตรฐานและระยะกึ่งกลางทวิคูณ (mid log phase) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1	27
4.2	การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1	28
4.3	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต.....	30
4.4	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening).....	32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)	33
4.6	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG	35
4.7	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening)	36
4.8	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)	37
4.9	การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับสารเคมี NTG	37
4.10	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับสารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening)	38
4.11	การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>B. subtilis</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับสารเคมี NTG ที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)	39
4.12	การเจริญมาตรฐานของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์	40
4.13	การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง	42
4.14	การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD)	63
5	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	66
5.1	บทสรุป	66
5.2	ข้อเสนอแนะ	67
	รายการอ้างอิง	68
	ภาคผนวก	77
	ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	78
	ภาคผนวก ข ตัวอย่างการทำ spot test ในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์เบื้องต้นเพื่อการผลิต PGA	82

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลทางสถิติและผลการทดลอง	84
ประวัติผู้เขียน	87



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิ (primary screening) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุง สายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต..... 32
4.2	การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิ (primary screening) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุง สายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG..... 36
4.3	การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิ (primary screening) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุง สายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG 39



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	การเกิดไทมินไดเมอร์ 7
2.2	ผลของ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ต่อเบสกวีนีนและไทมิน 9
2.3	ผลของ ethyl methanesulfonate ต่อเบสกวีนีนและไทมิน 9
2.4	โครงสร้างของ poly- γ -glutamic acid..... 11
2.5	องค์ประกอบทางพันธุกรรมที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ PGA ที่แสดงออกในเชื้อ <i>B. anthracis</i> , <i>B. subtilis</i> และ <i>B. licheniformis</i> 14
2.6	กระบวนการสังเคราะห์ PGA ด้วยเอนไซม์..... 14
2.7	กระบวนการสังเคราะห์ PGA ใน TCA Cycle ของเชื้อ <i>B. subtilis</i> 15
2.8	ถั่วเหลืองหมัก (ก) ถั่วเหลืองหมักแผ่น (ข)..... 16
4.1	การเจริญมาตรฐาน (●) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (▲) ระหว่างการเจริญของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ใน nutrient broth..... 27
4.2	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และ ในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง (▲) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 28
4.3	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ที่เจริญใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และในระหว่างกระบวนการหมัก ถั่วเหลือง (▲) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 29
4.4	ความเข้มข้นของ PGA (mg/ml,g) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ที่เจริญใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง (▲) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 30
4.5	ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ที่ผ่าน การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ ไม่ได้ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (▲) ที่เวลา 0-200 วินาที 31
4.6	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ตสามารถผลิตได้..... 33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7	จำนวน (ร้อยละ) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตสามารถผลิต PGA ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ..... 34
4.8	ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ที่ผ่านการสัมผัสสารเคมี NTG เปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมี NTG (▲) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 35
4.9	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG สามารถผลิตได้..... 37
4.10	ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสัมผัสสารเคมี NTG เปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมี NTG (▲) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 38
4.11	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG สามารถผลิตได้..... 40
4.12	กราฟการเจริญมาตรฐานของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ ก) รังสีอัลตราไวโอเลต ข) สารเคมี NTG และ ค) รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) 41
4.13	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 43
4.14	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 43
4.15	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.16	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 45
4.17	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 45
4.18	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 46
4.19	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 47
4.20	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เป็นกล้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 47
4.21	ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เป็นกล้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 48
4.22	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17(◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (✕) และ NTG-146 (✱) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 49
4.23	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (✕) และ NTG-146 (✱) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.24	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 50
4.25	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 51
4.26	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 51
4.27	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 52
4.28	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 53
4.29	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.30	ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....
4.31	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....
4.32	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....
4.33	ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....
4.34	การเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
4.35	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 4.36 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 58
- 4.37 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับ สารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็น กล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 59
- 4.38 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ... 59
- 4.39 ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสี อัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่าง การหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 60
- 4.40 สรุปความเข้มข้น PGA ของกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ให้ผลการผลิตสูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (■) PGA broth (■) และในระหว่างการหมักถั่วเหลือง (■) 62
- 4.41 จีโนมิก DNA จาก *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต..... 63
- 4.42 แถบรูปแบบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการทำ PCR-RAPD จากตัวอย่างจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต 64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

α	=	Alpha
NH_4Cl	=	Ammonium chloride
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	=	Calcium (II) chloride dihydrate
CFU/ml or g	=	Colonies forming unit per milliliter or gram
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
K_2HPO_4	=	Dipotassium hydrogen orthophosphate
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
γ	=	Gamma
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	=	Iron (III) chloride hexahydrate
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	=	Manganese (II) sulfate monohydrate
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	=	Magnesium (IV) sulfate heptahydrate
mm	=	Millimeter
ug/ml	=	Microgram per milliliter
mg/g	=	Milligram per gram
mg/ml	=	Milligram per milliliter
NTG	=	N-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine
PCR	=	Polymerase chain reaction
%	=	Percent
% (w/w)	=	Percent mass/mass
% (w/v)	=	Percent mass/volume
$\times g$	=	Relative centrifugal force
RAPD	=	Random amplification of polymorphic DNA
rpm	=	Revolution per minute
UV	=	Ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแกมมาพอลิกลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid; PGA) เป็นพอลิเมอร์ของกรดกลูตามิก (glutamic acid) ที่ประกอบด้วย L และ D glutamic acid ที่เชื่อมตัวระหว่าง α -amino acid และหมู่ γ -carboxylic acid เป็นสารเหนียวที่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. ปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีความสามารถละลายน้ำได้ ย่อยสลายได้โดยชีววิธี (biodegradable) รับประทานได้ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำ PGA มาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำ PGA มาใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ พบว่า PGA มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง อิมัลซิไฟเออร์ สเตบิลไลเซอร์ และลดการดูดซับน้ำมัน (Lim et al., 2012; Shyu and Sung, 2010; Yokoigawa et al., 2006) ด้านสุขภาพพบว่า PGA ช่วยเพิ่มศักยภาพการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ช่วยในการดูแลช่องปาก ลดอัตราการเป็นโรคเบาหวาน ป้องกันการเป็นโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Tanimoto, 2010) ในการผลิต PGA เพื่อมาใช้ในการอุตสาหกรรมอาหาร จะมีการใช้กล้าเชื้อที่คัดแยกได้จากธรรมชาติคือ *Bacillus subtilis* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้กล้าเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมักเพื่อปลดปล่อย PGA แต่ปัญหาที่พบคือเชื้อที่คัดแยกได้จากธรรมชาตินั้น มีความสามารถในการผลิต PGA ได้น้อย ซึ่งทั่วไปอาจเพิ่มศักยภาพของการผลิตได้โดยเลือกใช้แหล่งสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีนี้จะถูกจำกัดความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน ซึ่งจากงานวิจัยของ Huang et al. (2011) กล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการผลิต PGA ไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอีก จำเป็นจะต้องปรับปรุงสายพันธุ์กล้าเชื้อให้มีศักยภาพดีขึ้นโดยการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อควบคุมยีนให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์มีด้วยกันหลายวิธี เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) การตัดต่อยีน (genetic recombination) และการโคลนยีน (gene cloning) แต่การตัดต่อยีนและการโคลนยีนยังมีข้อจำกัดในการนำกล้าเชื้อมาใช้ในการอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นวิธีที่นิยมมากที่สุดคือ การกลายพันธุ์ (induced mutation) ด้วยตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เช่น สารเคมีที่นิยมใช้ในการก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ N-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine (NTG) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงโดยจะเติมหมู่แอลคิลให้กับเบสแต่ละ

ชนิดที่ตำแหน่งในโครเจนหรือออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิดและมีผลทางอ้อมทำให้เกิดการซ่อมแซม DNA ผิดไป เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ นอกจากสารเคมีแล้ว รังสีจัดเป็นตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ปรับปรุงสายพันธุ์มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดจากการที่ DNA ของจุลินทรีย์ดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตเข้าไปโดยตรง ที่ช่วงความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซับไว้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสเพียวรีนและไพริมิดีน กลุ่มเบสไพริมิดีนจะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเบสเพียวรีน มีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายเดียวกันของโมเลกุล DNA ที่มาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ทำให้เบสไทมีนไม่สามารถจับกับคู่เบสอะดีนีนของสายพอลินิวคลีโอไทด์สายตรงข้ามได้ ทำให้เกิดเบสทรานซิชันขึ้น ซึ่งจะไปขัดขวางกระบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA replication) หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสาย DNA แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ DNA จะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แต่ข้อเสียของการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตคือสามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ เมื่อนำแบคทีเรียที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตแล้วไปฉายกับแสงแดดหรือแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้โครงสร้างเบสไทมีนไดเมอร์หลุดออก ในปัจจุบันก็ยังมีการนำเทคนิคการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยรังสีรวมกับการใช้สารเคมี NTG เช่น มาลินี สิงโตทอง (2551) ศึกษาการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* MF2 เพื่อเพิ่มศักยภาพในการสร้างไนซินเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี NTG ร่วมกัน พบว่าสายพันธุ์กลาย 3 ไอโซเลต สามารถสร้างไนซินในปริมาณที่สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 7 เท่า Zambare (2010) กลายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma reesei* MTCC-3929 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี NTG ร่วมกัน พบว่าสายพันธุ์กลาย NTG-17 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในระหว่างการหมักแบบ submerged เท่ากับ 318.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากรังสีอัลตราไวโอเลตแล้ว รังสีแกมมายังสามารถใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้ เช่น Iftikhar et al. (2010) ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรังสีแกมมาปริมาณ 120 กิโลแรด พบว่าสายพันธุ์กลาย IIB-63-γ-8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 6.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพียง 3.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* เพื่อเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PGA ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 2 วิธี คือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี และการใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกันเพื่อนำไปพัฒนากล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PGA ในเชิงอุตสาหกรรมอาหารหมักต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* โดยการกลายพันธุ์ เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพในการผลิต PGA

1.2.2 ศึกษาสถานะการผลิต PGA ของกล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อและกระบวนการหมักถั่วเหลือง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กล้าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงแล้ว ที่มีคุณสมบัติในการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ให้คุณภาพและมีปริมาณ PGA สูงกว่าการหมักโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้มุ่งศึกษาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-C) สารเคมี NTG และการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG โดยพิจารณาอัตราการรอดชีวิตของ *B. subtilis* และคุณสมบัติการผลิต PGA จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ นำเชื้อแต่ละไอโซเลตที่ได้มาคัดเลือกศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิต PGA

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ตามปกติแล้วจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้ค่อนข้างต่ำ แต่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจึงต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดยการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่วิธีนี้จะถูกจำกัดความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน (gene) ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรม นอกจากการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการผลิตแล้ว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังเป็นสิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกด้วย Hungund and Gupta (2010) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลส พบว่าเมื่อกลายพันธุ์เชื้อมีด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับ ethyl methanesulfonate ได้สายพันธุ์กลาย GHEM4 ที่ให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงถึง 5.96 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้ผลผลิตเพียง 3.90 กรัมต่อลิตร กล่าวคือสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้หากมีลักษณะพันธุกรรมตามที่ต้องการจะทำให้กระบวนการผลิตและผลผลิตเป็นไปตามที่วางไว้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในธรรมชาติมักต้องมีการปรับปรุงเพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าว หลักการปรับปรุงสายพันธุ์ (strain improvement) ของจุลินทรีย์แบ่งเป็น 3 วิธี (อ้างถึงในสุหทัยา จิระนนทิพร, 2543)

1. การกลายพันธุ์ (mutation) เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวก ใช้ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงแบบไม่ยุ่งยากซับซ้อน อาศัยเทคนิคที่ง่ายและมีราคาถูก ประสิทธิภาพของการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และความถูกต้องในการคัดเลือกเชื้อ แต่มักให้ผลแบบสุ่ม ต้องมีการคัดเลือกเป็นจำนวนมาก

2. การตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) เป็นวิธีที่ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทั้งทางพันธุกรรมและสรีรวิทยาของเชื้อ รวมถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ขั้นสูง ในแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ เช่น วิธี transformation, conjugation และ transduction

3. การโคลนยีน (gene cloning) เป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน เป็นการปรับปรุงระดับพันธุกรรมที่ต้องอาศัยความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้ออย่างลึกซึ้ง เป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก เทคนิค

ต่าง ๆ มีความซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในการเปลี่ยนแปลงบริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณที่เกาะของไรโบโซม หรือการลดหรือจำกัดเอนไซม์ที่มีส่วนในการยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เป็นต้น

2.2 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ การกลายพันธุ์แบ่งออกได้เป็น 2 ระดับ (Snustad and Simmons, 2000) คือ การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม หรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และการกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) โดยจะเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ใน DNA ซึ่งรวมถึงการแทนที่กันของคู่เบสและการเพิ่มหรือขาดหายไปของคู่เบสซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ในระดับของยีนในคู่เบสเดียวกันของ DNA ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

2.2.1 การแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) คือการแทนที่คู่เบสในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของ DNA แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.2.1.1 ทรานซิชัน (transition) คือการแทนที่เบสพวกพิวรีนชนิดหนึ่งด้วยเบสพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสพวกไพริมิดีนชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง เช่น คู่เบส A-T ถูกแทนที่ด้วย G-C หรือคู่เบส C-G ถูกแทนที่ด้วย T-A

2.2.1.2 ทรานสเวอร์ชัน (transversion) คือการแทนที่เบสพวกพิวรีนด้วยเบสพวกไพริมิดีนหรือเบสพวกไพริมิดีนถูกแทนที่ด้วยเบสพวกพิวรีน เช่น คู่เบส A-T ถูกแทนที่ด้วย C-G หรือคู่เบส C-G ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส A-T เป็นต้น

2.2.2 เฟรมชิฟท์ มิวเทชัน (frameshift mutation) คือการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการสูญเสียนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า หรือการที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมา 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า หรือมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในสายพอลินิวคลีโอไทด์ของ DNA ทำให้กรอบการอ่านรหัสพันธุกรรม (reading frame) เปลี่ยนแปลงไป

การเกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Snustad and Simmons, 2000) คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจาก รังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเทอโมเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบส DNA ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายพอลินิวคลีโอ

ไอโทด์ของ DNA และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ชักนำนี้ ได้แก่ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิและรังสีต่าง ๆ และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี เช่น สารเคมีต่าง ๆ ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อต่อไป

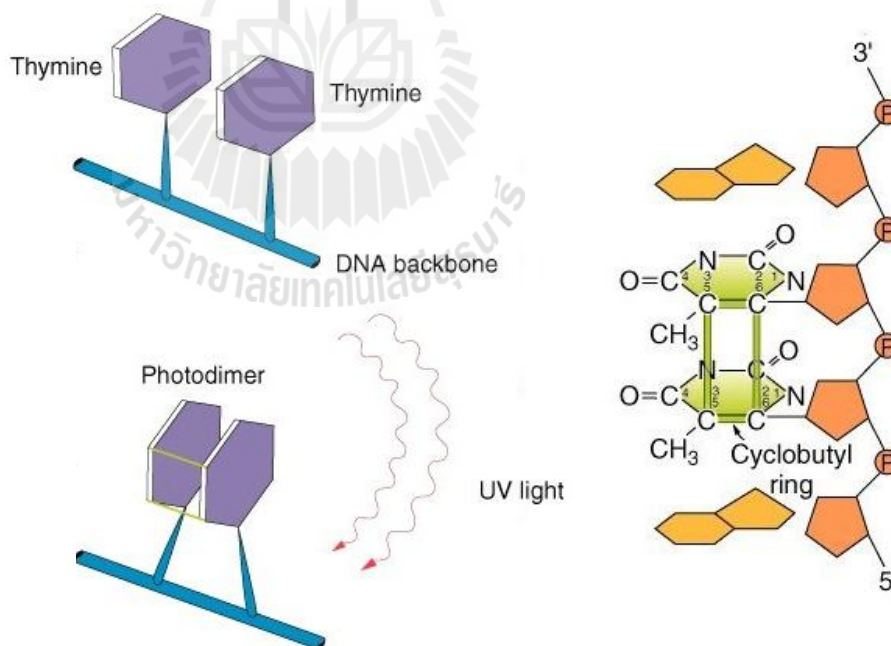
2.3 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ

รังสีเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และความยาวคลื่นของรังสีที่ต่างกันทำให้มีผลต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรูปแบบที่ต่างกัน (Weaver and Hedrick, 1977) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.3.1 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีบีตาเป็นต้น รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง โดยทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่าง ๆ และทำให้อิเล็กตรอนที่เรียวอยู่นอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดออกไป เกิดเป็นประจุไอออนบวก ส่วนอิเล็กตรอนที่หลุดออกมานี้จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงไปชนอะตอมอื่น ๆ จนพลังงานของอิเล็กตรอนลดลง จากการเกิดประจุบวกและลบทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้ประจุเป็นกลาง เพื่อให้โครงสร้างของอะตอมคงที่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด โดยบริเวณที่แตกนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้เกิดการตัดออกและการสอดแทรก ยกตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้รังสีก่อให้เกิดไอออนมาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ได้แก่ Iqbal et al. (1995) ใช้รังสีแกมมาในการกลายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* S38 เพื่อลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่จะนำไปเป็นอิมัลซิไฟเออร์ย่อยสลายไขมันในสิ่งแวดล้อม โดยพบว่าสายพันธุ์กลาย EBN-8 ใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ใช้เวลา 3-4 ชั่วโมง และ Iftikhar et al. (2010) ทำการกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการอุตสาหกรรมอาหาร ด้วยรังสีแกมมาปริมาณ 120 กิโลแรด พบว่าสายพันธุ์กลาย IIB-63-γ-8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 6.88 ยูนิตต่อมิลลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพียง 3.20 ยูนิตต่อมิลลิตร

2.3.2 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีประเภทนี้ จะไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำกว่ารังสีประเภทแรก

รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet radiation) เป็นรังสีชนิดไม่แตกตัวและเป็นถึงก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดจากการที่ DNA ของจุลินทรีย์ดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตเข้าไปโดยตรงในช่วงความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซับไว้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสพวกพิวรีนและไพริมิดีน โดยเฉพาะในกลุ่มเบสไพริมิดีนจะมีการเปลี่ยนแปลงง่ายกว่าพิวรีน โดยจะมีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายเดียวกันของโมเลกุล DNA มาเชื่อมต่อกัน ทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ขึ้น (ภาพที่ 2.1) การเกิดไทมีนไดเมอร์จะทำให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายพอลินิวคลีโอไทด์ตรงข้ามได้ มีผลทำให้เกิดเบสทรานซิชันได้ เช่น คู่เบส T-A ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส C-G นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer) ได้และมีผลก่อให้เกิดการกลายพันธุ์คือ จะเกิดปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโน (NH_2) ออกจากโมเลกุลของไซโตซีนในไซโตซีนไดเมอร์ (deamination of cytosine dimer) จะทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer) ซึ่งจะมีปฏิกิริยาเหมือนไทมีนไดเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดการทรานซิชันได้



ภาพที่ 2.1 การเกิดไทมีนไดเมอร์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Griffiths et al. (2000)

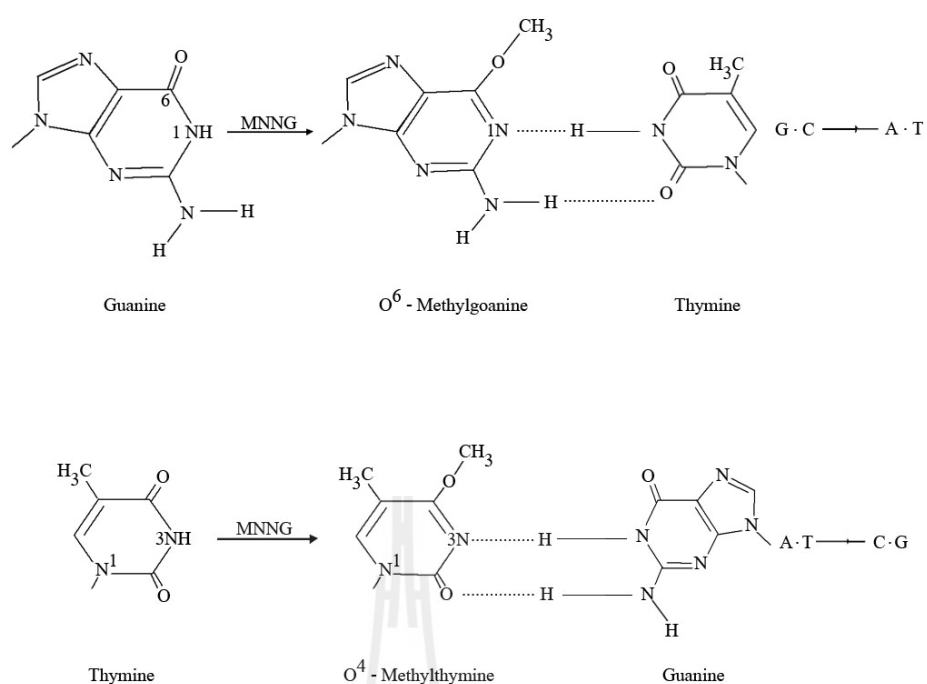
ในปัจจุบันการใช้เอนไซม์หรือผลผลิตต่าง ๆ จากจุลินทรีย์มีความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีอาหาร วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี และแหล่งเชื้อเพลิง แต่การใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติยังมีการให้ผลผลิตที่น้อย ดังนั้นจึงมีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตมาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ เช่น Toscano et al. (2011) ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ Elijah et al. (2012) กลายพันธุ์เชื้อ *Pluerotus pulmonarius*-LAU 09 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าสายพันธุ์กลาย *Pluerotus pulmonarius*-LAU 90 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสเท่ากับ 2.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้เพียง 1.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Siripong et al. (2012) ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตปรับปรุงสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าสายพันธุ์กลาย NU4-UV40-07 มีอัตราการผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 50.59 % ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม NU4 ที่มีอัตราการผลิตเพียง 39.60 % เป็นต้น

2.4 ลिंगก่อกลายพันธุ์ทางเคมี

เป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ ดังนี้

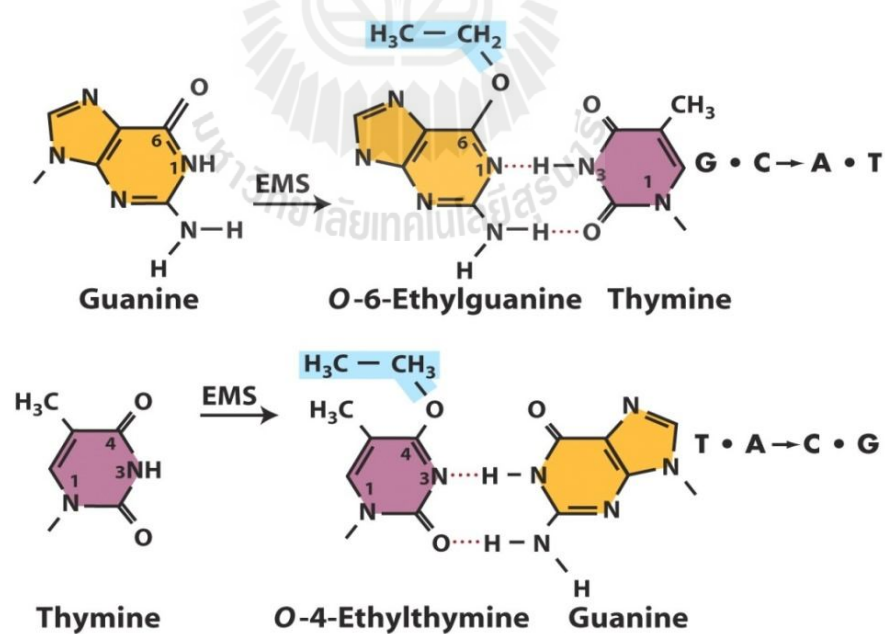
2.4.1 สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบส (base analog) เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสบางตัวในสาย DNA จึงสามารถเข้าไปแทนที่ได้ เป็นผลให้สาย DNA มีสารเคมีนั้นแทรกอยู่เมื่อเกิดการถ่ายแบบ DNA จะทำให้มีการเข้าคู่แบบสับสน ซึ่งจะทำให้สาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นผิดไปจากเดิม สารเคมีชนิดนี้ เช่น 5-โบโรโมยูราซิล ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสไทมีน 2-อะมิโนเพียวรีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสอะดีนีน และไฮดรอกซีแลมินิกเป็นต้น

2.4.2 สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส (base modifying agent) ได้แก่ กรดไนตริก ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนของเบสไซโทซีนออกไปแล้วเปลี่ยนเป็นกลุ่มคีโตแทน ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นยูราซิล และไฮดรอกซีแลมินิกซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลุ่มอะมิโนของเบสไซโทซีนเป็นกลุ่มไฮดรอกซีแทน ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นไฮดรอกซีอะมิโนไซโทซีน นอกจากนี้ยังมีสารที่ทำให้เกิดการย้ายหมู่เอธิลและเมธิลให้แก่เบส ซึ่งจัดสารประเภทนี้ในกลุ่ม alkylation agent และเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS), เอธิลอีเทนซัลโฟเนต (EES) และเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG หรือ MNNG) เป็นต้น



ภาพที่ 2.2 ผลของ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ต่อเบสกวีนีนและไทมีน

ที่มา : อ้างถึงใน สุหทัยา จิระนนทิพร. (2543)



ภาพที่ 2.3 ผลของ ethyl methanesulfonate ต่อเบสกวีนีนและไทมีน

ที่มา : Strain Development (www, 2010)

2.4.3 สารเคมีที่ทำให้เกิดการขาดหายไป หรือเพิ่มนิวคลีโอไทด์ในสาย DNA (intercalating agent) สารกลุ่มนี้ได้แก่ โพรฟลาวิน เอทิลเดียมโบรมาต และสีย้อมอะคริดีน โดยสารพวกนี้จะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเบสของสาย DNA เมื่อเกิดการถ่ายแบบ DNA จะทำให้การอ่านลำดับผิดปกติซึ่งอาจเกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของเบส

โดยทั่วไปนั้นจะนิยมใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นตัวชักนำตัวแรก ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และเมื่อคัดเลือกรหัสสายพันธุ์ที่ต้องการแล้ว ก็สามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายซ้ำอีกด้วยการใช้สารเคมีหลังจากที่มีการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตแล้ว ซึ่งในปัจจุบันยังมีการนำเทคนิคการปรับปรุงสายพันธุ์แบบทีเรียและเชื้อราด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น มาลินี สิงโตทอง (2551) ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อ *Lactococcus lactis* MF2 เพื่อเพิ่มศักยภาพในการสร้างไนซินโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและ NTG ร่วมกันพบว่าได้สายพันธุ์กลายขึ้นตอนสุดท้ายคือ MU₂NUN₂ 1, MU₂NUN₂ 2 และ MU₂NUN₂ 3 สามารถสร้างไนซินเท่ากับ 2,638.89, 2,265.45 และ 2,564.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 7 เท่า ในปี 2010 Zambare กลายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma reesei* MTCC-3929 เพื่อเพิ่มการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและ NTG ร่วมกันพบว่า สายพันธุ์กลาย UV-8 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในการหมักแบบ submerged และ solid state เท่ากับ 199.6 และ 552.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำสายพันธุ์กลาย UV-8 มากลายพันธุ์ต่อยัง NTG พบว่าสายพันธุ์กลาย NTG-17 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในการหมักแบบ submerged และ solid state เท่ากับ 318.3 และ 747.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และในปี 2012 Sangkharak et al. ปรับปรุงสายพันธุ์ *Cellulomonas* sp. TSU-03 เพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG พบว่าสายพันธุ์กลาย M23 มีค่า cellulase activity เท่ากับ 2008 หน่วยต่อมิลลิลิตรกรัมโปรตีน รองลงมาคือสายพันธุ์กลาย M17 มีค่า cellulase activity เท่ากับ 1884 หน่วยต่อมิลลิลิตรกรัมโปรตีน ซึ่งสายพันธุ์ใหม่ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่า cellulase activity เพียง 1860 หน่วยต่อมิลลิลิตรกรัมโปรตีน

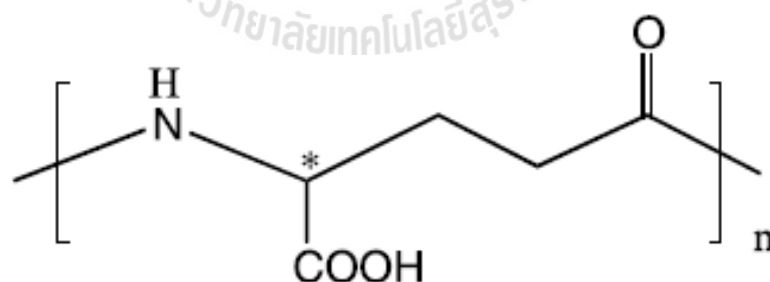
ในขณะเดียวกันยังมีงานวิจัยที่ใช้สารก่อกลายพันธุ์ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ เช่น Ranadive et al. (2011) ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและ ethyl methanesulfonate (EMS) เพื่อเพิ่มการผลิต coenzyme Q10 พบว่าสายพันธุ์กลาย EA 22 มีการผลิต coenzyme Q10 สูงขึ้นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาด สีของโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหาร yeast malt agar และรูปร่างของเซลล์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning

electron microscopic) และ Darvishi et al. (2011) ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลต และ ethyl methanesulfonate เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า ณ เวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์กลาย U6 มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส 356 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในถัง bioreactor ขนาด 20 ลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 10.5 เท่า และคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตจาก สายพันธุ์กลาย U6 มีการทำงานที่เหมาะสม ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 7.0 น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38 กิโลดาลตัน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่แตกต่างกับเอนไซม์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ ดั้งเดิม

คุณสมบัติของกลีเซอรินทรีย์อีกประการหนึ่งนอกจากการผลิตสารเมตาบอไลต์ใน ปริมาณที่มากแล้ว จะต้องมีความสามารถในการผลิตสารด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดย Krishna et al. (2011) ปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* MTCC No.10619 โดยรังสีอัลตราไวโอเลตและ สารเคมี NTG พบว่าสายพันธุ์กลายมีการผลิตสารด้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* (MTCC 96) ที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารมากขึ้น

2.5 คุณสมบัติของ PGA

Poly- γ -glutamic acid (PGA) เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ glutamic acid ที่มี amide เป็นตัวเชื่อมระหว่าง α -amino acid และหมู่ γ -carboxylic acid group ประกอบด้วย D-glutamic acid และ L-glutamic acid (ภาพที่ 2.4) โดยทั่วไปแล้วพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิต PGA ซึ่งเป็นสารเหนียวโดยขับออกมานอกเซลล์ในระยะ stationary phase



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ poly- γ -glutamic acid

ที่มา : Shih and Van. (2001)

ในปี ค.ศ. 1937 Ivanovics และคณะ ได้ค้นพบ PGA เป็นครั้งแรก พบว่าเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในแคปซูลของ *B. anthracis* ซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืดและจะปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเซลล์แก่หรือเซลล์แตก PGA ที่พบเห็นได้ง่ายเป็นสารเหนียวที่มีอยู่ใน Natto ซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักของประเทศญี่ปุ่น เป็นสารผสมระหว่าง polyglutamic acid และ fructan ซึ่งถูกผลิตโดย *B. subtilis natto* และปี ค.ศ. 1942 Bovarnick พบว่าในการหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* จะสามารถปล่อย PGA ออกมาได้อย่างอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิต PGA ได้โดยการปล่อยออกมานอกเซลล์ (Shih et al., 2001)

2.6 การประยุกต์ใช้ PGA ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร

คุณสมบัติของ PGA ที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร คือเป็นสารที่ย่อยสลายได้ในสภาพธรรมชาติ และรับประทานได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นนักวิจัยปัจจุบันจึงให้ความสนใจศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีการผลิตที่จะให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการมาก ๆ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และรวมทั้งการใช้เพื่อสิ่งแวดล้อม โดยจะเป็นสารเพิ่มความเหนียวหนืด สารดูดความชื้น สารลดความขม สารป้องกันการแข็งตัว สารช่วยลดการรั่วซึม เป็นตัวจับและพายาเข้าสู่ร่างกาย และเป็นสารดูดซับโลหะหนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านสุขภาพพบว่า PGA ช่วยเพิ่มศักยภาพการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ช่วยในการการดูแลช่องปาก ลดอัตราการเป็นโรคเบาหวาน ป้องกันการเป็นโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Shih and Van, 2001; Tanimoto, 2010)

ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารแช่แข็ง การหลอมละลายอาหารอาจส่งผลต่อเนื้อเยื่อและสภาพของอาหารเสียไปได้ หากไม่มีสารป้องกันการทำลายของผลึกน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่แข็ง สารป้องกันการทำลายของผลึกน้ำแข็งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น antifreeze protein (AEPs) ส่วนใหญ่ผลิตจากกรดอะมิโนที่มีเกลือโซเดียมเป็นองค์ประกอบหลักของพันธะเปปไทด์ เช่น oligopeptide และ PGA ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* โดยการใช้การวัดค่าสีที่แตกต่างกันในการจำแนกชนิดของสารที่เรียกว่า differential scanning calorimetry (DSC) ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของ PGA และมีทั้งแบบ α และ γ ซึ่งการเกิดไอโซเมอร์แบบนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของเกลือ โดยที่เกลือโซเดียมมีผลมากที่สุด การใช้ PGA เป็น cryoprotectant ในการแช่แข็งอาหารจะส่งผลต่อรสชาติอาหารน้อยกว่า cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ มีงานวิจัยที่นำ PGA มาใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ ได้แก่ Yokoigawa et al. (2006) เติม PGA ในผลิตภัณฑ์โดแช่แข็งที่หมักด้วย

ยีสต์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PGA ทำให้ค่าร้อยละของ freeze tolerance ratio ในโดแซ่แข็งสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกัน PGA ยังมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์และลดการดูดซับน้ำมันในเบเกอรี่ เช่น การศึกษาของ Shyu and Sung (2010) ศึกษาการเติม PGA ในแป้งสาลีเค้ก พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PGA ส่งผลให้ความคงตัวในการขึ้นโฟมและค่าความหนืดของแป้งสาลีเค้กสูงขึ้น และ Lim et al. (2012) พบว่าเมื่อเติม PGA ปริมาณ 1 กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักโดนัททอด จะทำให้ลดการดูดซับน้ำมันและทำให้มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยรวมของผู้บริโภคดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโดนัททอดที่ไม่มีการเติม PGA

นอกจากนี้ยังมีการใช้ PGA เป็นสารลดความขมของอาหาร โดยการเติมเข้าในอาหารที่มีรสขมต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ ควินิน คาเฟอีน และแร่ธาตุต่าง ๆ การเติม PGA หรือเกลือที่รับประทานได้ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อาหารที่ผลิตจากแป้งขนมอบ และการผลิตกัวยเตี้ยว เพื่อเป็นการยืดอายุการเก็บรักษา และการทำให้สภาพอาหารคงรูปร่าง นอกจากนี้ยังมีการใช้ PGA ในการทำให้ไอศกรีมคงสภาพไม่ละลาย รวมถึงการใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียวหนืดในน้ำผลไม้ และเพิ่มรสชาติกับเครื่องดื่มได้ดีขึ้น

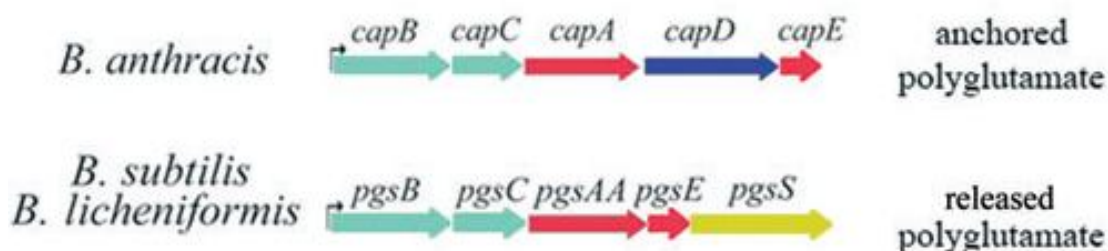
กล้าเชื้อที่คัดแยกได้จากธรรมชาติมีความสามารถในการผลิต PGA แต่ปัญหาที่พบคือความสามารถในการผลิต PGA ต่ำและไม่มีความเสถียร หากต้องการเพิ่มศักยภาพของการผลิตทำได้โดยการควบคุมแหล่งสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีนี้ถูกจำกัดปริมาณการผลิตโดยการควบคุมของยีน หากต้องการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น จำเป็นต้องปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อควบคุมยีนให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น

2.7 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PGA

PGA มีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างไปจากโปรตีนถึงแม้ว่าจะเป็นพอลิเมอร์ที่เป็น glutamate ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ γ -amide แต่การสังเคราะห์ไม่ขึ้นอยู่กับไรโบโซม ยีนมีส่วนสำคัญต่อการผลิต PGA Vietri et al. (1995) พบว่าใน *B. anthracis* ยีนอยู่บนพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ส่วนใน *B. subtilis* TAM-4 ยีนจะไม่อยู่บนพลาสมิด แต่จะอยู่บน genomic DNA

Ashiuchi et al. (1999) ได้จำลอง DNA genomic ของ *B. subtilis* IFP 3360 ใส่ใน *Escherichia coli* พบว่ามี 3 ยีนที่ควบคุมระบบ PGS (poly- γ -glutamate synthetic system; *pgs* BCA) (ภาพที่ 2.5) ได้แก่ *pgs B*, *pgs C* และ *pgs A* ซึ่งยีน *pgs BCA* มีความเหมือนกับยีน *Cap BCA* ของ *B. anthracis* ทำให้สันนิษฐานได้ว่าจะเป็นยีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อหุ้มเซลล์ที่มีความสำคัญในการสร้างแคปซูลที่ประกอบด้วย poly- γ -L-glutamic acid นอกจากนี้การทำงาน

ร่วมกันของยีน *pgs* *BCA* และ glutamate recemase gene ของ *B. subtilis* IFO 3336 สามารถผลิต PGA ได้มากกว่า *E. coli* clone ที่มียีน *pgs* *BCA* เพียงอย่างเดียว

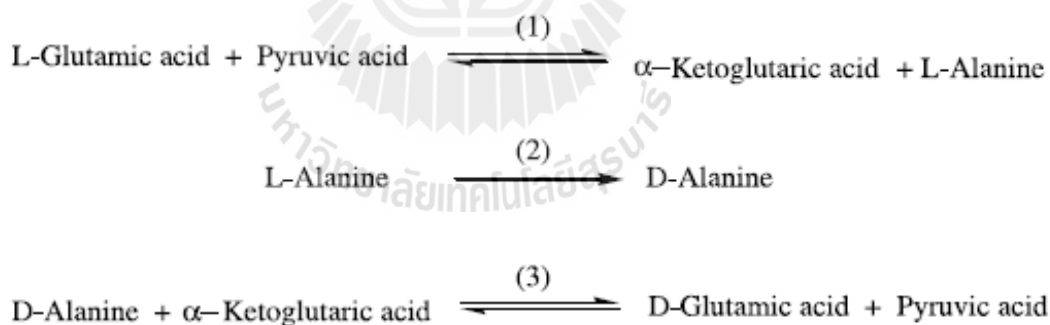


ภาพที่ 2.5 องค์ประกอบทางพันธุกรรมที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ PGA ที่แสดงออกในเชื้อ

B. anthracis, *B. subtilis* และ *B. licheniformis*

ที่มา : Candela and Fouet. (2006)

ในการผลิต PGA จะต้องอาศัยกระบวนการที่สำคัญได้แก่ transamidation และ transpeptidation ซึ่งจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย alanine recemase และ D-L glutamyl transaminase โดยจะเปลี่ยน L-glutamic acid ให้เป็น D-glutamic acid ซึ่งเป็นการเปลี่ยนทางอ้อม ดังสมการ (ภาพที่ 2.6)



(1). L-Glutamic acid : Pyruvic acid aminotransferase

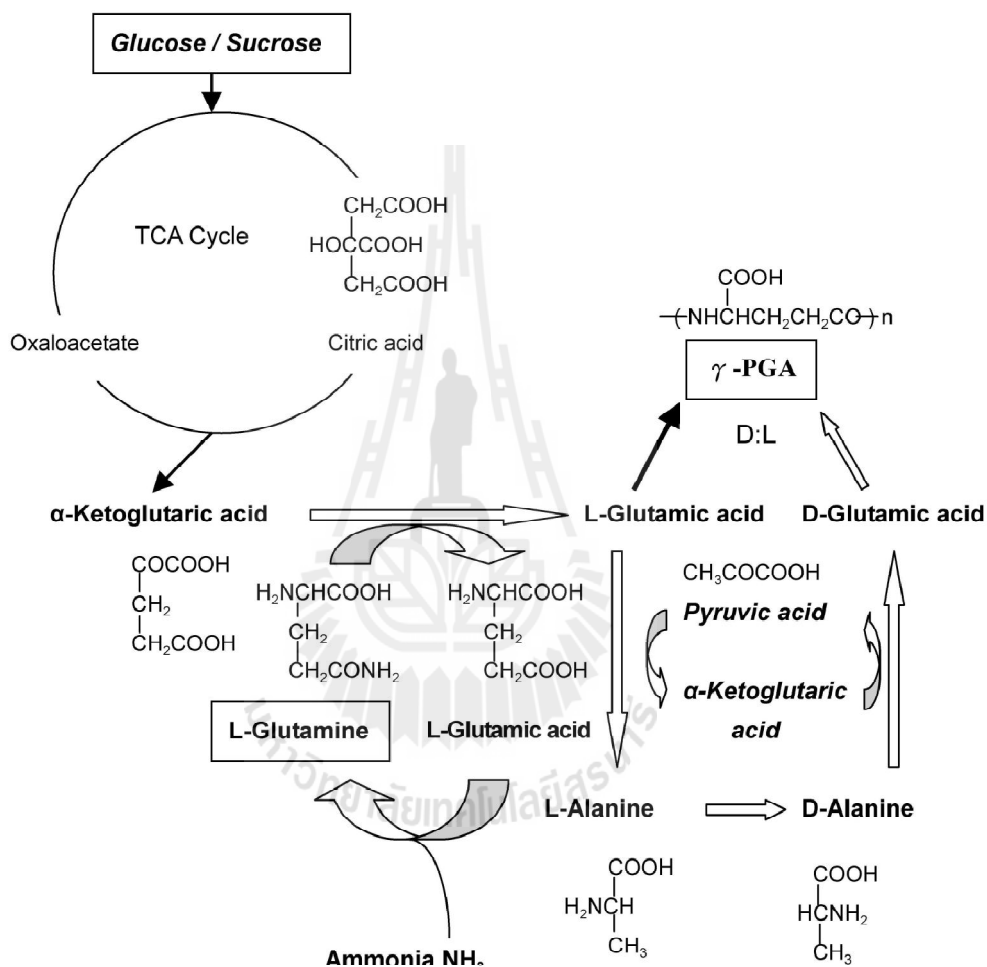
(2). Alanine recemase

(3). D-Glutamic acid : Pyruvic acid aminotransferase

ภาพที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์ PGA ด้วยเอนไซม์

ที่มา : Shih et al. (2005)

Bovarnick, 1942 (อ้างใน Shih and Van, 2001) ศึกษากระบวนการผลิต PGA เป็นคนแรก แต่ไม่ประสบความสำเร็จ จนกระทั่งปี 1954 ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PGA และหาสภาวะที่เกื้ออนินทรีย์ glutamic, citric acid, glycerol รวมถึงปริมาณเชื้อที่ใช้ แต่สารอาหารที่นักวิจัยให้ความสนใจศึกษา ได้แก่ L-glutamic acid ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญมาก โดยจะเป็นสารตั้งต้นหลักของการผลิต PGA ใน Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์ PGA ใน TCA Cycle ของเชื้อ *B. subtilis*
ที่มา : Ho et al. (2006)

2.8 ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่า

ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่า เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักทางภาคเหนือของประเทศไทยที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองโดยเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งมีรูปแบบการหมักเป็น alkaline fermentation โดยเชื้อจะปล่อยเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสออกจากเซลล์ มาย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนใน ถั่วเหลือง ทำให้ได้สารประกอบและกลิ่นต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น (Dajanta et al., 2011; Inatsu et al., 2006)

2.8.1 วิธีการหมักถั่วเหลืองหมักแบบพื้นบ้าน

ขั้นตอนแรกล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก ต้มถั่วเหลืองประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขณะต้มต้องคอยเติมน้ำให้ระดับน้ำท่วมเมล็ดถั่วเสมอ โดยมีอัตราส่วนถั่ว 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร หลังจากต้มแล้วผึ่งให้แห้ง ทำการหมักโดยการเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตอง แล้วนำถั่วเหลืองวางบนใบตอง ปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นและป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อรา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน จะได้ถั่วเน่าซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองออกน้ำตาลอ่อนเป็นสีน้ำตาลออกเทา และมีกลิ่นฉุนของแอมโมเนีย นำถั่วเน่าไปบดแล้วเติมเกลือ หรือสารปรุงรส เช่น กระเทียม หอม พริกแกง จิง เป็นต้น แล้วห่อด้วยใบตอง นำไปนึ่งหรือย่างก่อนรับประทาน วิธีนี้จะเก็บถั่วเน่าได้ 2 วัน แต่ถ้าต้องการเก็บถั่วเน่าให้นาน ๆ จะต้องนำถั่วเน่าบดมาทำให้กลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปทอดให้เป็นแผ่นบาง ๆ ผึ่งแดดให้แห้ง ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาถั่วเน่าได้นานหลายเดือน



ก



ข

ภาพที่ 2.8 ถั่วเหลืองหมัก (ก) ถั่วเหลืองหมักแผ่น (ข)

ที่มา : Natto (www, 2010) (ก)

ถั่วเน่าแผ่น (www, 2553) (ข)

2.8.2 วิธีการหมักถั่วเหลืองหมักแบบใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์

เริ่มต้นด้วยการนำถั่วเหลืองที่ล้างน้ำแล้วมาต้มเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จนเนื้อของถั่วเหลืองนุ่มและสุกจนทั่วทั้งหมด จากนั้นถ่ายเทน้ำทิ้งออกแล้วใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ลงไปให้มีการกระจายของเชื้อสม่ำเสมอทั่วถั่วเหลืองหมัก ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน จะได้ถั่วเน่าที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ๆ สีขาวหรือเทา หรืออาจไม่มีสีเกิดขึ้นบนผิวหน้าของถั่ว มีกลิ่นฉุนของแอมโมเนีย ไม่มีกลิ่นถั่ว สีของถั่วเหลืองจะเปลี่ยนจากสีเหลืองออกน้ำตาลอ่อนเป็นสีน้ำตาลเทา มีวิตามินบี 2 โปรตีนที่ละลายน้ำได้และมีการย่อยได้ง่ายขึ้น คุณสมบัติของกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมักต้องมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เพื่อย่อยสลายสเตรคทีนเป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในถั่วเหลือง ในขณะเดียวกันกล้าเชื้อต้องมีความสามารถในการผลิตสารที่เป็น antimicrobial substance เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก (Inatsu et al., 2006; Zheng et al., 1999)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสภาวะการแช่ถั่วและใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่มีผลต่อคุณภาพถั่วเหลืองหมัก ได้แก่ Wei et al. (2001) ศึกษาการแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที หมักโดยกล้าเชื้อ *B. natto* NRRL-3383 ที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส พบว่าลดระยะเวลาในการหมักเหลือเพียง 18 ชั่วโมง มีปริมาณแอมโมเนียลดลง ทำให้ได้ถั่วหมักที่มีกลิ่นและคุณภาพดี ปิยะวรรณ กาสลัก และ รัชฎาพร อุ่นศิริวิไล (2554) ได้รายงานว่าเมื่อใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่คัดแยกได้จากการหมักถั่วเหลืองแบบธรรมชาติในการหมักถั่วเหลืองที่ผ่านการทำให้สุกโดยให้หมอนึ่งภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถช่วยลดกลิ่นอับของถั่วและยังเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าการหมักด้วยธรรมชาติ

2.9 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักถั่วเน่าและการผลิต PGA

กระบวนการหมักที่ใช้ในการทำอาหารพื้นเมือง จำเป็นจะต้องอาศัยจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีบทบาทในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยการทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบให้มีมากขึ้น ทั้งยังช่วยสร้างสารที่ส่งเสริมให้อาหารมีรสชาติดี และช่วยทำลายส่วนประกอบที่ไม่ต้องการในอาหารให้หมดไป ส่งผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก อาหารหมักพื้นเมืองจากถั่วเหลืองที่มีกรรมวิธีการผลิตคล้ายคลึงกับถั่วเน่า แต่อาจแตกต่างกันที่ลักษณะของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ natto, kinema และ chungkookjang ซึ่งได้มีการรายงาน

เกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีบทบาทในการหมัก natto ที่เป็อาหารพื้นเมืองของชาวญี่ปุ่น โดยใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบและใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* (natto) ในการหมักทำให้ได้ natto ที่มีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลิ่นเหม็นอับของถั่ว และยังมีการผลิตเมือกซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ออกมา จึงทำให้ก้อน natto มีเมือกที่ผิวโดยรอบ

Kinema เป็นถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประชาชนที่อาศัยอยู่ในหิมาลัยตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัยและรัฐสิกขิม ในประเทศอินเดีย เนปาล และภูฏาน นิยมทำเป็นแ่งรับประทานกับข้าวต้ม ซึ่งกรรมวิธีการผลิตคล้ายกับ natto ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะกลิ่นและรสชาติคล้ายกับ itohiki-natto มาก และยังพบจุลินทรีย์ในการหมัก kinema แบบธรรมชาติได้แก่ *B. subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อที่เด่นและยังมีเชื้อประจำถิ่นพวก *Enterococcus faecium*, *Candida parapsilosis* และ *Geotrichum candidum* ส่วน Tamang and Nikkuni (1998) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมัก kinema พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก kinema ที่ให้คุณภาพดีที่สุดในการหมักได้ใช้เชื้อ *B. subtilis* KK2:B10 เป็นกล้าเชื้อ โดยจะทำให้ได้ในโตรเจนที่ละลายน้ำและสาร PGA เพิ่มขึ้นเมื่อบ่มถึง 24 ชั่วโมง

การศึกษาถั่วเหลืองหมักในประเทศเกาหลีที่เรียกว่า chungkookjang ที่ใช้เป็นเครื่องปรุงรส และได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีบทบาทในการหมักคือ *B. subtilis* แต่จากการทดสอบคุณสมบัติในการเกิดสปอร์พบว่า สามารถสร้างสปอร์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแมงกานีส (Mn^{2+}) ดังนั้นจึงจัดว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยมีชื่อว่า *B. subtilis* var chungkookjang และนอกจากนี้ยังสามารถผลิต PGA ได้ (Ashiuchi et al., 2001)

การศึกษาเกี่ยวกับถั่วเน่าของประเทศไทยมีรายงานการศึกษาที่น่าสนใจของ Sundhagul et al. (1972) ซึ่งได้ศึกษาแบคทีเรียในถั่วเน่าที่ผลิตในเขตจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย และได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่จำหน่ายในตลาดเขต จังหวัดลำพูน และลำปาง พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนยาว มีเอนโดสปอร์ ซึ่งเมื่อทดสอบทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* (natto) และ *B. subtilis* พบว่าเป็น *B. subtilis* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบท่อนสั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ และแบคทีเรียแกรมบวก ท่อนสั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ และเมื่อนำทั้งหมดไปใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในการหมักถั่วเน่า พบว่ามี 2 ไอโซเลต ที่เป็น *B. subtilis* และให้ผลิตภัณฑ์ที่คล้าย natto มาก ซึ่งมีโปรตีนและไขมันสูง รวมทั้งการศึกษากกรรมวิธีการเก็บรักษาให้ถั่วเน่าเก็บได้นาน ๆ โดยการทำถั่วเน่าแผ่นตากแห้ง

Inatsu et al. (2002) ได้แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักในประเทศแถบเอเชียตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้พบว่า *B. subtilis* 63 ไอโซเลต จากทั้งหมด 90 ไอโซเลต มีความสามารถในการผลิต PGA ทดสอบจากการเลี้ยงบนอาหาร GSP (glutamic acid, sucrose และ phyton) agar ที่เติม L-glutamate ในอาหาร และ Inatsu et al. (2006) ได้ทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่า

จากภาคเหนือของประเทศไทย คัดเลือกเฉพาะ *B. subtilis* นำมาเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* var natto สายพันธุ์ Miyagino ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการหมัก natto พบว่า มี 7 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต PGA บนอาหาร GSP agar และ NA plate ได้ดีกว่า *B. subtilis* var natto สายพันธุ์ Miyagino 20 สายพันธุ์ผลิต PGA บนอาหาร GSP agar และ NA plate ไม่แตกต่างกับ *B. subtilis* var natto สายพันธุ์ Miyagino และอีก 18 สายพันธุ์ไม่สามารถผลิต PGA บนอาหารทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบ



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 แหล่งและการเตรียมเชื้อ *B. subtilis*

3.1.1 แหล่งของจุลินทรีย์

B. subtilis ที่ใช้ในการศึกษา คือ *B. subtilis* SB-MYP-1 ซึ่งคัดแยกจากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก และจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E (ปิยะวรรณ กาสลักและรักษาพร อุ่นศิริไธย์, 2554) เตรียม *B. subtilis* SB-MYP-1 ให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) ใน 30% (v/v) กลีเซอรอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บในหลอดเก็บเชื้อ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส

3.1.2 การเตรียมเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงใน nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นำไปแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 1 ให้อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.2 การศึกษาระยะการเจริญมาตรฐานและระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน nutrient broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ตรวจสอบการเจริญโดยวิธี spread plate บน plate count agar และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ณ ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 สร้างกราฟการเจริญของ *B. subtilis* หาระยะกึ่งกลางทวีคูณ เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อก่อนปรับปรุงสายพันธุ์

3.3 การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ใน nutrient broth และ PGA broth (L-glutamic acid 20 กรัม, citric acid 12 กรัม, glucose 20 กรัม, NH_4Cl 7 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15 กรัม, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.10 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ซึ่งมีปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ตรวจนับปริมาณเชื้อ (CFU/ml) วัดค่า pH และความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ค่า pH การผลิต PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด และพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมของการผลิต PGA เพื่อใช้ศึกษาเป็นกรณีเดียวกันกับเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

3.4 การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง

3.4.1 ถั่วเหลืองตราไร้ทิพย์ นำมาคัดเลือกเพื่อแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด ล้างให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ข้ามคืนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง รินน้ำออกให้หมด ทิ้งให้ถั่วเหลืองสะเด็ดน้ำ จากนั้นให้ความร้อนถั่วเหลืองด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งให้เย็นและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ถ่ายใส่ตะกร้าพลาสติกที่รองด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์

3.4.2 นำ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.2 เติมน้ำลงไป 1 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลือง 150 กรัม หมักในจานแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบน plate count agar วัดค่า pH และความเข้มข้นของ PGA ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* ค่า pH และการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมักที่หมักด้วยกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์กับกล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

3.5 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่ต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีตามวิธีข้อ 3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ นำ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่เพาะเลี้ยงมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอย 50 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร จากนั้นฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (หลอด UV-C ชนิด G30T8, SANKYO DENKI) ที่มีความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร กำลังงาน 30 วัตต์ ระยะห่างจากหลอดถึงจานเพาะเลี้ยง 50 เซนติเมตร ใช้แท่งแม่เหล็กกวน (magnetic stirrer) ตลอดเวลาในระหว่างการฉายรังสี โดยที่ระยะเวลาการฉายรังสีตั้งแต่ 0-200 วินาที ทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี spread plate บน nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณร้อยละของการรอด สร้างกราฟการอยู่รอด จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่อยู่ในช่วงเวลาที่มียุทธการรอดเท่ากับ 0.1-10 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด (Siripong et al. 2012) แล้วนำไปคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นตอนต่อไป

3.6 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่ต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG (บริษัท TCI AMERICA, น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 147.09) ตามวิธีข้อ 3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ นำ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่เพาะเลี้ยงมาปั่นปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ใน Tris-maleate buffer ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยในสารละลาย NTG ที่ละลายใน Tris-maleate buffer 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง ทำการตรวจนับเชื้อด้วยวิธี spread plate บน nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ใน NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คำนวณร้อยละของการรอด สร้างกราฟการรอดเพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ คัดเลือกความเข้มข้นของ NTG ที่มียุทธการรอดเท่ากับ 0.1-10 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด (Siripong et al. 2012) แล้วนำไปคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นตอนต่อไป

3.7 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการในข้อ 3.6

3.8 การคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

3.8.1 การคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิ (primary screening)

คัดเลือกจากงานเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.5 3.6 และ 3.7 ที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1-10 นำโคโลนีจากงานเพาะเลี้ยงเชื่อดังกล่าวมาปลูกเชื้อแบบจุด (spot test) ลงบนผิวของอาหาร nutrient agar และ PGA agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนีรวมเมื่อบน PGA agar แต่ละสายพันธุ์กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) โดยใช้วิธี Fisher's least significant difference (LSD)

3.8.2 การคัดเลือกรุ่นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิแล้วเลี้ยงใน nutrient broth เพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นตามข้อ 3.1.2 นำเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน PGA broth ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของ PGA วิเคราะห์ผลทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ PGA ที่ผลิตได้ในแต่ละสายพันธุ์กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) โดยใช้วิธี Fisher's least significant difference (LSD)

3.9 การหาระยะการเจริญมาตรฐานของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

นำเชื้อกลายพันธุ์ซึ่งเตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน nutrient broth ปริมาตร 2 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ตรวจสอบการเจริญโดยวิธี spread plate บน plate count agar ณ ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 สร้างกราฟการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

3.10 การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งทำตามวิธีการในข้อ 3.3 และ 3.4 ศึกษาการเจริญของ *B. subtilis* ค่า pH และการผลิต PGA ใน nutrient broth PGA broth และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) กับสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

3.11 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

นำตัวอย่างเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ในข้อ 3.2 3.3 3.9 3.10 และตัวอย่างถั่วเหลืองหมักสด 10 กรัม ทำการเจือจางกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v) ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เลือกความเจือจางระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคโลนี นำตัวอย่างเชื้อจากแต่ละระดับความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) บน plate count agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เป็นโคโลนีต่อ มิลลิลิตรหรือกรัม (CFU/ml or g) (BAM, 2001)

3.12 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ *B. subtilis*

ตัวอย่างเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3 3.10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Meter Toledo MP220) กรณีตัวอย่างถั่วเหลืองหมักทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer โดยชั่งตัวอย่างถั่วเหลืองหมักสด 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดไอออน (deionized water) 90 มิลลิลิตร วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ซึ่งจะทำการปรับเทียบเครื่องมือก่อนใช้ทุกวัน

3.13 การวิเคราะห์ปริมาณการผลิต PGA ของ *B. subtilis*

นำตัวอย่างเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3 3.10 ไปเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรณีตัวอย่างถั่วเหลืองหมักทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer โดยการชั่งตัวอย่างถั่วเหลืองหมักสด 10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดไอออน (deionized water) 90 มิลลิลิตร แยกตะกอนและส่วนใสโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเฉพาะส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย safranin O 0.1 % (w/v) 1 มิลลิลิตร citrate buffer 0.06 โมลาร์ pH 6.0 1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v)

1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาทำการเจือจางลง 25 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (Tahara et al. 1998) คำนวณหาความเข้มข้นของ PGA โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้น PGA (บริษัท MP Biomedicals)

3.14 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

3.14.1 การสกัดจีโนมิก DNA จาก *B. subtilis* ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต ใน nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน Eppendorf tube ที่สะอาดและปลอดเชื้อ แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000×g เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ในสารละลาย EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 480 ไมโครลิตร ไลโซโซมความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 120 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000×g เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม nuclei lysis solution ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในตะกอนเซลล์ บ่มใน water bath อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม RNase solution ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำให้เย็นลง จะตกตะกอนโปรตีนด้วย protein precipitation ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000×g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนกับ DNA จากนั้นเปิดส่วนใสที่มี DNA ละลายอยู่ ล้างด้วย isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000×g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยก isopropanol ทิ้ง ล้างตะกอน DNA อีกครั้งด้วย 70% (v/v) ethanol ตากตะกอน DNA จนกว่า ethanol จะแห้งเป็นเวลา 10-15 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอนด้วย rehydration solution (Tris-Hydrochloride ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลาย DNA ไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิก DNA ที่ได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส สารละลาย DNA สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.14.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิก DNA ด้วย 1.5 % (w/v) เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยซังผงอะกาโรสหนัก 0.75 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate-EDTA (TBE) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นลงแล้วเทลงในถาดของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส ทิ้งให้เจลอะกาโรสแข็งตัว เทสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร เติม DNA ตัวอย่างและ DNA มาตรฐานที่ผสมกับ loading dye ประมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจล ปิดฝาเครื่อง agarose gel electrophoresis apparatus (Pharmacia Biotech Model HE99x-15-1-5) ต่อขั้วไฟฟ้าใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที หรือให้แถบสีเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ของความยาวเจล จากนั้นปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 15-30 นาที ล้างสารละลายส่วนเกินออก (destaining) โดยการจุ่มลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำแผ่นเจลไปวางบนกล่องที่มีรังสีอัลตราไวโอเลต (MacroVue UVIS-20 Hoefer) จะเห็นแถบ DNA เรืองแสง บันทึกภาพผลการทดลองที่ได้

3.14.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยา RAPD-PCR คือ 5'-AGTCAGCCAC-3' (Hosoi, 2010) ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10X บัฟเฟอร์ จีโนมิก DNA จากข้อ 3.14.1 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร deoxynucleoside triphosphate (dNTP) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์ RAPD ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาฟิซอร์ทั้งหมด 30 รอบ สุดท้ายของปฏิกิริยาตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ฟิซอร์มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

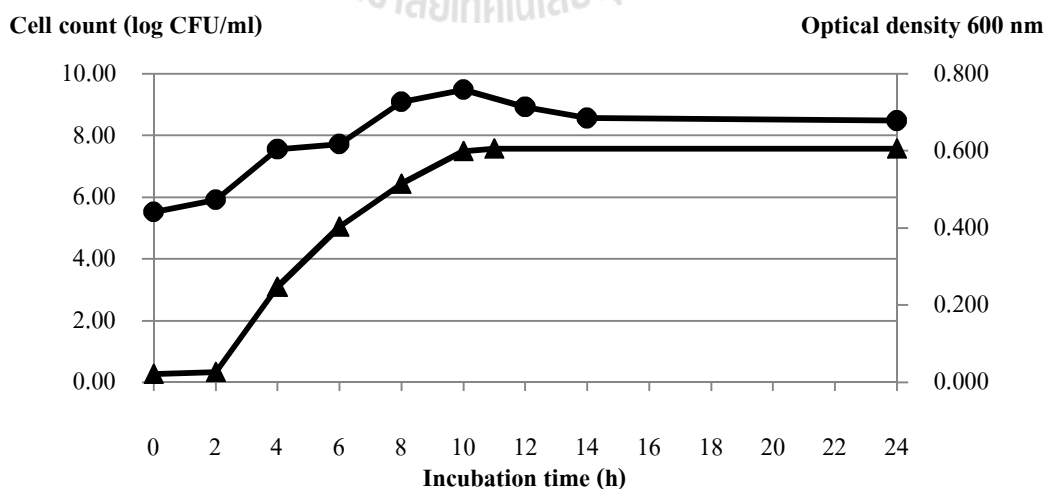
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการเจริญมาตรฐานและระยะกึ่งกลางทวิคูณ (mid log phase) ของ

B. subtilis SB-MYP-1

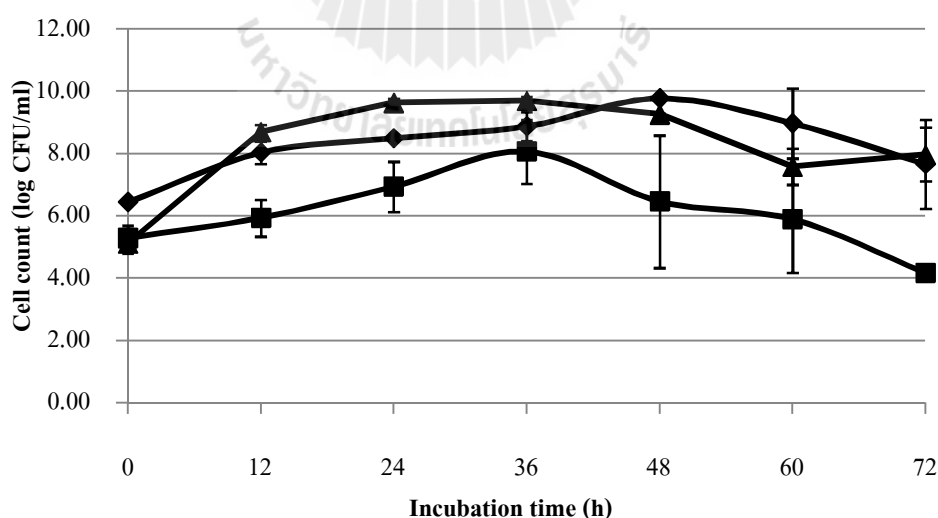
เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* SB-MYP-1 ใน nutrient broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า 200 rpm เพื่อศึกษาการเจริญมาตรฐานและระยะ mid log phase โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เพื่อศึกษาการเจริญ ณ เวลาต่าง ๆ ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่า *B. subtilis* SB-MYP-1 มีการเจริญในช่วงระยะ log phase ที่ 2-8 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ณ ชั่วโมงที่ 10 ระยะ stationary phase นี้จะเป็นระยะที่กล้าเชื้อ *B. subtilis* เริ่มมีการปลดปล่อย PGA ในระหว่างกระบวนการหมัก (Sung et al. 2005) การเจริญระยะ mid log phase ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 อยู่ชั่วโมงที่ 6-8 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ สารพันธุกรรมมีความว่องไวและมีประสิทธิภาพต่อการตอบสนองต่อสารก่อกลายพันธุ์ (Stitzel et al. 2001) ดังนั้น ณ เวลาที่ 6 ชั่วโมงจึงกำหนดให้เป็นระยะการเจริญที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. subtilis* SB-MYP-1 เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป



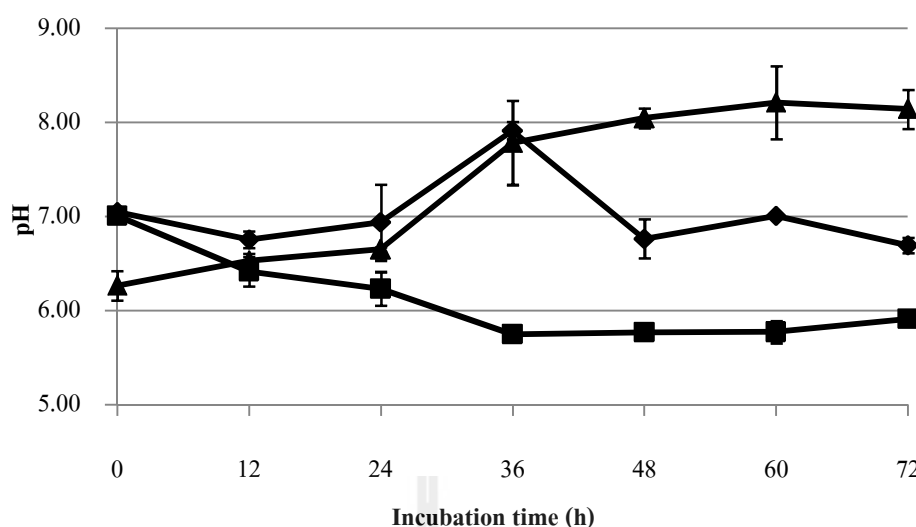
ภาพที่ 4.1 การเจริญมาตรฐาน (●) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (▲) ระหว่างการเจริญของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ใน nutrient broth

4.2 การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* SB-MYP-1

จากการศึกษาการเจริญของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ใน nutrient broth PGA broth ภายใต้สภาวะเขย่า 200 rpm และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการตรวจนับจำนวน *B. subtilis* บน plate count agar วัดค่า pH และความเข้มข้นของ PGA ที่ผลิตได้ในทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.2 พบว่ามีการเจริญของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด และในถั่วเหลืองหมักแตกต่างกันพบการเปลี่ยนแปลงค่า pH 2 ลักษณะ (ภาพที่ 4.3) คือค่า pH สูงขึ้นในกรณีถั่วเหลืองหมัก ส่วนการเจริญของ *B. subtilis* ใน PGA broth ทำให้สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดมากขึ้น แตกต่างจากใน nutrient broth พบว่าค่า pH สูงขึ้นในชั่วโมงที่ 36 อยู่ในช่วงปลาย log phase และจะค่อยๆ ลดลงจน อย่างไรก็ตามที่ชั่วโมงที่ 72 ค่า pH ในถั่วเหลืองหมัก และ PGA broth คือ pH 8.14 และ pH 5.91 ตามลำดับ ขณะที่ใน nutrient broth ต่างจาก ชั่วโมงเริ่มต้นเล็กน้อยคือ pH 6.69 ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันที่องค์ประกอบ โดย nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท non synthetic media ที่จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิด แตกต่างจาก PGA broth ที่จัดอยู่ในกลุ่ม synthetic media ที่มีการจำกัดสารอาหารหรือส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนเพื่อการผลิต PGA (Chiu et al, 2004; Ronald, 2010)



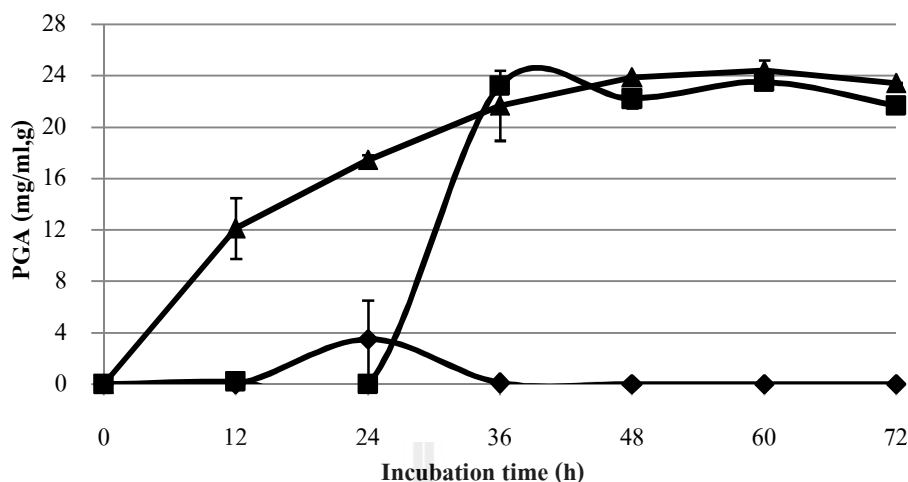
ภาพที่ 4.2 การเจริญของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง (▲) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่เจริญใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง (▲) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงทำให้ *B. subtilis* ถูกจำกัดการเจริญใน PGA broth แต่เมื่อพิจารณาสภาวะการหมักถั่วเหลืองค่า pH มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งในระหว่าง การเจริญนั้น *B. subtilis* จะมีการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส มาย่อยสลายสับสเตรทที่สำคัญในถั่วเหลือง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดยสับสเตรทที่มีปริมาณสูงสุดคือ โปรตีน จะส่งผลให้มีปริมาณแอมโมเนียและค่า pH สูงขึ้น ในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง (Allagheny et al. 1996)

จากภาพที่ 4.4 จะสังเกตได้ว่า ผลจากการเจริญของ *B. subtilis* ใน nutrient broth ถึงแม้ไม่มีสับสเตรทสำหรับผลิต PGA แต่ยังคงพบการผลิต PGA ขึ้นบ้างในชั่วโมงที่ 24 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 36 ถึง 72 ไม่พบการผลิต PGA ส่วนในระหว่างการหมักถั่วเหลืองพบว่าความเข้มข้นของ PGA เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาของการบ่มเชื้อและการผลิต PGA สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 36 ถึง 72 และใน PGA broth เริ่มพบการผลิต PGA และมีความเข้มข้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 Shih and Van (2001) และ Sung et al. (2005) ให้เหตุผลว่าการผลิต PGA ของกล้ายเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *B. subtilis* โดยการใช้ L-glutamic acid ใน PGA broth และถั่วเหลือง เป็นสับสเตรทที่สำคัญ PGA จะถูกผลิตออกมานอกเซลล์ปริมาณสูงในช่วงการเจริญระยะ stationary phase

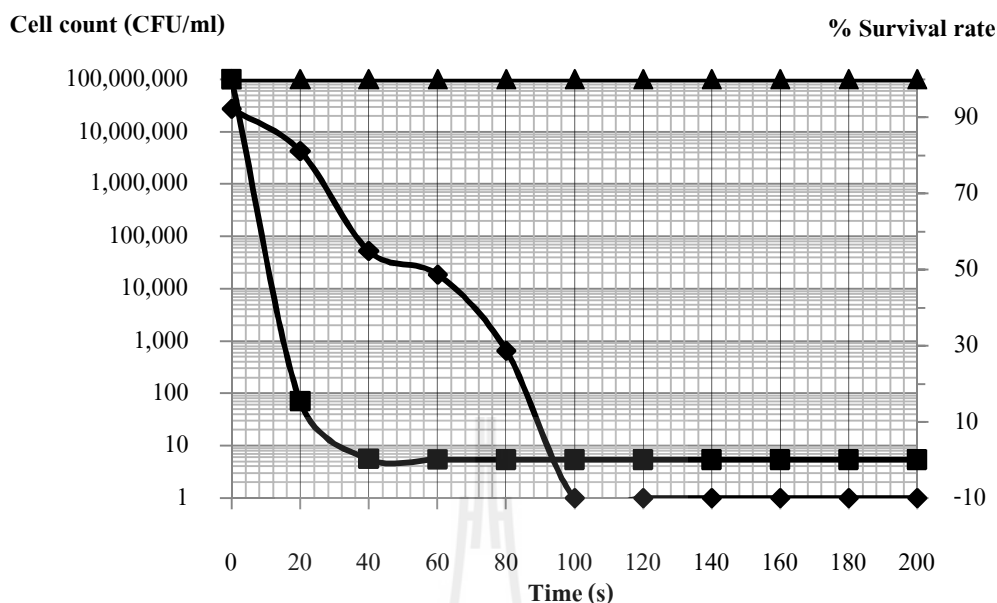


ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้น PGA (mg/ml,g) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่เจริญใน nutrient broth (◆) PGA broth (■) และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง(▲)เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ใน nutrient broth PGA broth และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง พบว่า มีความสามารถในการผลิต PGA สูงทั้งใน PGA broth และถั่วเหลืองหมัก ณ ชั่วโมงที่ 36 48 60 และ 72 ซึ่งในช่วงเวลานี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงคัดเลือกระยะเวลา 36 ชั่วโมง ไปศึกษาการผลิต PGA ใน PGA broth เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป โดยศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมี NTG และรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG เพื่อที่จะได้กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PGA มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

4.3 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

นำ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่มีอายุการเจริญในชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นระยะกึ่งกลางทวีคูณ มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ตามวิธีการในข้อ 3.5 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอด ได้ผลดังภาพที่ 4.5 คัดเลือกเก็บโคโลนีบน nutrient agar ที่อยู่ในช่วงเวลาที่มียาค่าร้อยละการรอดเท่ากับ 0.1-10 ซึ่งให้ผลการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตในช่วง 40 60 และ 80 วินาที โดยมีอัตราการรอดร้อยละ 0.19 0.0067 และ 0.0002 ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 125 ไอโซเลต



ภาพที่ 4.5 ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ไม่ได้ฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (▲) ที่เวลา 0-200 วินาที

จากภาพที่ 4.5 เมื่อ *B. subtilis* สัมผัสรังสีอัลตราไวโอเลตแต่ละช่วงเวลา พบว่า มีการลดลงของจำนวนเซลล์ ส่งผลให้อัตราการรอดลดลง ทั้งนี้เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตมีผลทำให้รหัสพันธุกรรมซึ่งเป็นบริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนเพื่อเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นมาได้ หรือสร้างขึ้นมาแล้วแต่มีองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อเซลล์ได้อีก เซลล์ก็จะตายลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลาย ๆ งานที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เช่น Toscano et al. (2011) ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า เมื่อนำสปอร์ของเชื้อรามาสัมผัสรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 160 วินาที ปริมาณสปอร์ลดลงซึ่งมีอัตราการรอดน้อยกว่าร้อยละ 1 Ranadive et al. (2011) กลายพันธุ์ยีสต์ *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 เพื่อเพิ่มการผลิต coenzyme Q10 โดยการให้เซลล์ยีสต์สัมผัสรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีอัตราการตายเท่ากับร้อยละ 90 และงานวิจัยของ Siripong et al. (2012) ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตปรับปรุงสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 เพื่อเพิ่มการผลิตเซลลูโลส พบว่าเมื่อใช้รังสีอัลตราไวโอเลตสัมผัสเซลล์ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 20 40 และ 60 นาที จะมีการลดลงของเซลล์โดยมีอัตราการรอดเท่ากับร้อยละ 5.53 5.80 และ 1.27 ตามลำดับ เป็นต้น

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

เชื้อโคโลนีเชื้อที่คัดเลือกงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1-10 มาทดสอบปลูกเชื้อแบบจุด (spot test) ลงบนผิวของอาหารชุดควบคุม nutrient agar และ PGA agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าบน nutrient agar มีเชื้อกลายพันธุ์ที่เกิดเมื่อจำนวน 125 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar พบว่ามีจำนวน 38 ไอโซเลต ที่มีขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบนใหญ่กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

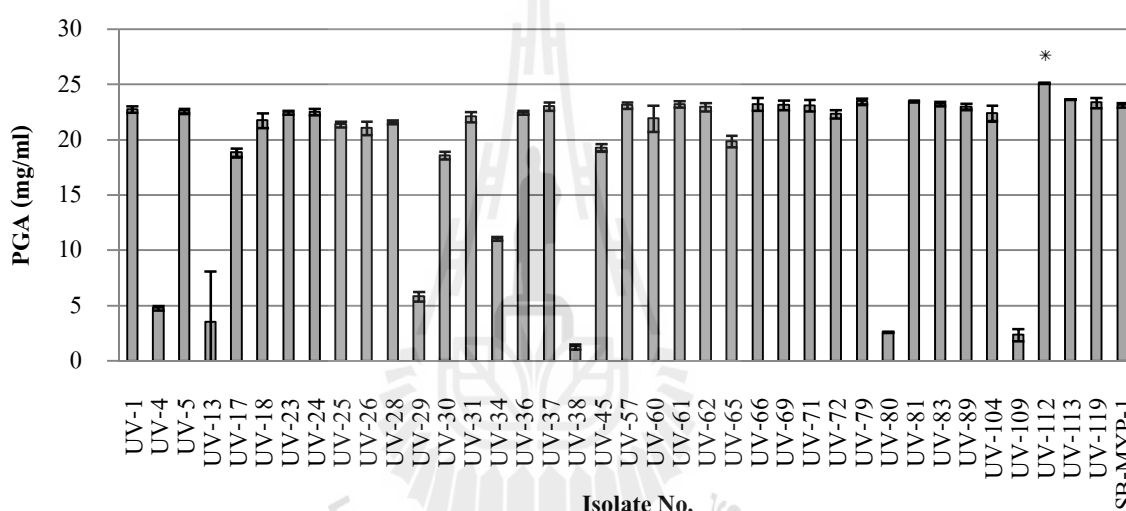
ตารางที่ 4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

ไอโซเลต	ขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar (mm)	ไอโซเลต	ขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar (mm)
SB-MYP-1 (wild type)	6.0±0.00	UV-57	9.0±0.00*
UV-1	9.5±0.71*	UV-60	11.0±0.00*
UV-4	10.5±2.12*	UV-61	10.0±2.83*
UV-5	12.0±0.00*	UV-62	12.0±2.83*
UV-13	12.5±0.71*	UV-65	9.0±0.00*
UV-17	11.5±3.54*	UV-66	11.0±1.41*
UV-18	11.5±2.12*	UV-69	9.0±0.00*
UV-23	9.5±2.12*	UV-71	9.5±0.71*
UV-24	9.0±4.24*	UV-72	9.0±1.41*
UV-25	9.5±0.71*	UV-79	9.5±4.95*
UV-26	9.0±1.41*	UV-80	9.0±0.00*
UV-28	12.5±0.71*	UV-81	9.5±0.71*
UV-29	11.5±2.12*	UV-83	9.0±1.41*
UV-30	10.0±0.00*	UV-89	9.0±0.00*
UV-31	9.5±0.71*	UV-104	9.0±0.00*
UV-34	11.0±1.41*	UV-109	11.0±0.00*
UV-36	9.5±0.71*	UV-112	11.0±0.00*
UV-37	11.0±0.00*	UV-113	10.0±1.41*
UV-38	9.0±1.41*	UV-119	9.5±0.71*
UV-45	9.5±0.71*		

* คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

4.5 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

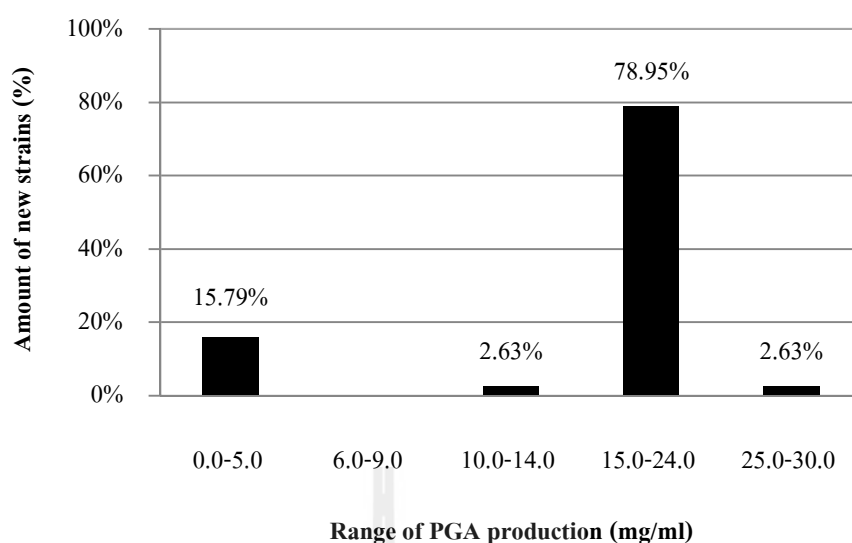
นำ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายโดยรังสีอัลตราไวโอเลตที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิซึ่งมีจำนวน 38 ไอโซเลต มาเลี้ยงใน PGA broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เพื่อทดสอบการผลิต PGA พบว่า UV-112 เพียงไอโซเลตเดียวที่มีความสามารถในการผลิต PGA เท่ากับ 25.14 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) ที่มีความสามารถในการผลิตเพียง 22.55 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตสามารถผลิตได้

* คือ สายพันธุ์กลายที่ผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เมื่อพิจารณาจากจำนวนเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตได้จำนวน 38 ไอโซเลต พบว่ามี 6 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต PGA ในช่วง 0-5 mg/ml คิดเป็น 15.79 % 1 ไอโซเลตที่สามารถผลิต PGA ในช่วง 10-14 mg/ml คิดเป็น 2.63 % 30 ไอโซเลตที่สามารถผลิต PGA ในช่วง 15-24 mg/ml คิดเป็น 78.95 % และ 1 ไอโซเลตที่สามารถผลิต PGA ในช่วง 0-5 mg/ml คิดเป็น 2.63 % (ภาพที่ 4.7) ถึงแม้ว่าสายพันธุ์กลาย (UV-112) ที่ผ่านกลายพันธุ์แล้วการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมีเพียง 2.63 % อย่างไรก็ตามยังมีสายพันธุ์ที่สามารถเลือกใช้หรือศึกษาในกลุ่มสายพันธุ์กลายที่มีการผลิต PGA ไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมมากถึง 78.95 %

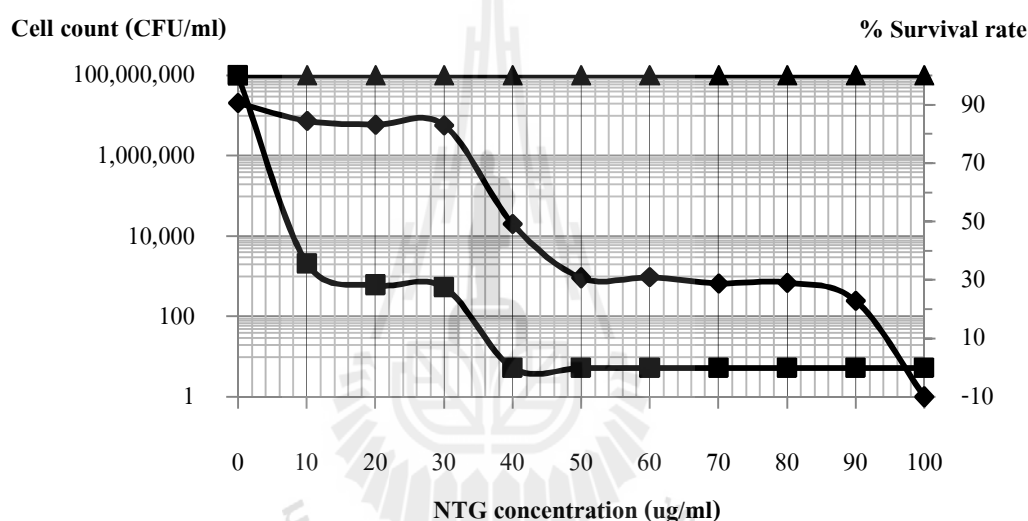


ภาพที่ 4.7 จำนวน (ร้อยละ) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถผลิต PGA ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตพบว่า สายพันธุ์กลายมีการผลิต PGA สูงขึ้น เท่าเดิมหรืออาจลดลง อันเนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต จะทำให้เกิด thymine dimer ในโมเลกุลของสายโพลินิวคลีโอไทด์ ทำให้เบสไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายโพลินิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามกันได้ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโมเลกุลของโพลินิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ DNA ทำให้ DNA ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และเมื่อเกิดการถอดรหัสขึ้น จะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป หากเกิดการกลายแล้วรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ ก็จะทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป (มาลินี สิงโตทอง, 2551; Siripong et al. 2012; Toscano et al. 2011; Zambare, 2010) ซึ่งในงานวิจัยหลาย ๆ งานในปัจจุบันได้นำเทคนิคการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตมากลายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มสารเมตาบอไลต์สำคัญมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จะทำให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารเมตาบอไลต์สูงขึ้น หรือลดลงได้ ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Iftikhar et al. (2010) ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporus* เพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า มีเชื้อรากลายพันธุ์ 6 ไอโซเลตที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง และมีเชื้อรากลายพันธุ์ 4 ไอโซเลตที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.6 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG

นำ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่มีอายุการเจริญในชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเป็นระยะกึ่งกลางทวีคูณ มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการในข้อ 3.6 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นับจำนวนโคโลนีที่รอดได้ผลดังภาพที่ 4.8 คัดเลือกเก็บโคโลนีบน nutrient agar ที่อยู่ในช่วงเวลาที่มียาร้อยละการรอดเท่ากับ 0.1-10 ซึ่งให้ผลการใช้สารเคมีในช่วงความเข้มข้น 40 50 60 70 80 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการรอดร้อยละ 0.009 0.005 0.003 0.003 0.003 และ 0.001 ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 147 ไอโซเลต



ภาพที่ 4.8 ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่ผ่านการสัมผัสสารเคมี NTG เปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมี NTG (▲) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากภาพที่ 4.8 เมื่อ *B. subtilis* สัมผัสสารเคมี NTG แต่ละความเข้มข้น พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NTG โดย NTG เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agent ที่สามารถเติมหมู่เมทิลให้กับเบส ทำให้การจับคู่เบสผิดพลาดไป เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสาย DNA แบบสุ่ม ขณะที่มีการสังเคราะห์ DNA ทำให้สาย DNA มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมื่อเกิดการถอดรหัสขึ้นจึงทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ถ้ารหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้บริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นได้ หรือสร้างขึ้นมาได้แต่องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อ

เซลล์ เซลล์นั้นจะตาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดจำนวนเซลล์ลงหลังจากใช้สารเคมี NTG ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripong et al. (2012) เมื่อใช้สารเคมี NTG ปรับปรุงสายพันธุ์ *A. xylinum* ATCC 10245 เพื่อเพิ่มการผลิตเซลลูโลส พบว่าเมื่อใช้สารเคมี NTG ณ ช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จะมีการลดลงของเซลล์ โดยมีอัตราการรอดเท่ากับร้อยละ 8.0 6.0 5.33 2.50 และ 0.2 ตามลำดับ

4.7 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

เชื้อโคโลนีเชื้อที่คัดเลือกร่วมเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1-10 มาทดสอบปลูกเชื้อแบบจุด (spot test) ลงบนผิวของอาหารชุดควบคุม nutrient agar และ PGA agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าบน nutrient agar มีเชื้อกลายพันธุ์ที่เกิดเมื่อจำนวน 147 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar พบว่ามีจำนวน 9 ไอโซเลต ที่มีขนาดโคโลนีรวมเมื่อใหญ่กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

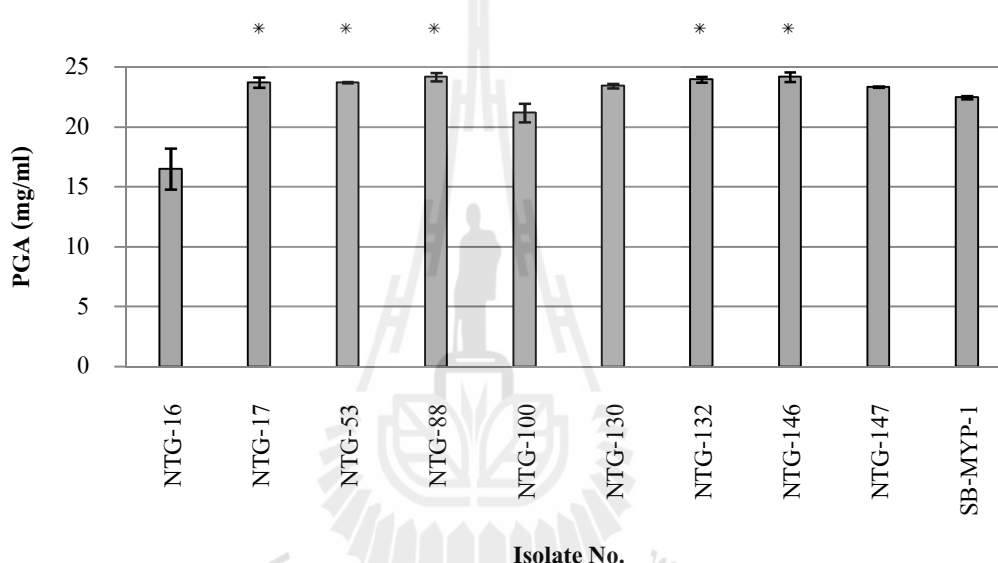
ตารางที่ 4.2 การคัดเลือกร่วมปฐมภูมิ (primary screening) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ไอโซเลต	ขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar (mm)
SB-MYP-1 (wild type)	6.0±0.00
NTG-16	8.0±0.00*
NTG-17	8.0±0.00*
NTG-53	8.0±0.00*
NTG-88	8.0±0.00*
NTG-100	8.0±1.41*
NTG-130	9.0±0.00*
NTG-132	8.5±0.71*
NTG-146	8.5±0.71*
NTG-147	10.0±1.41*

* คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

4.8 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี NTG ที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิซึ่งมีจำนวน 9 ไอโซเลต มาเลี้ยงใน PGA broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 rpm พบว่ามี 5 ไอโซเลต ได้แก่ NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 และ NTG-146 ที่มีความสามารถในการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.9



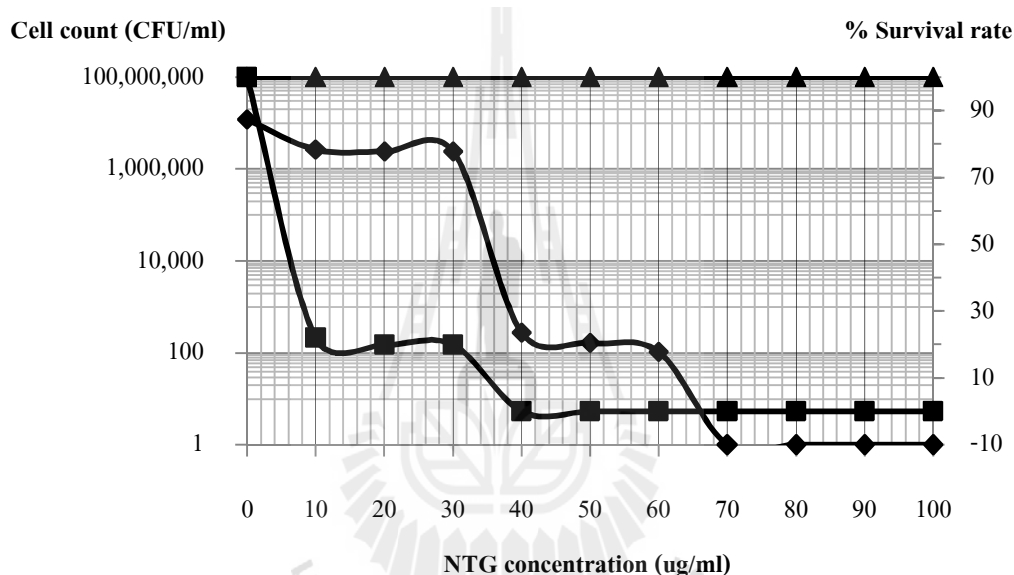
ภาพที่ 4.9 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG สามารถผลิตได้

* คือ สายพันธุ์กลายที่ผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.9 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

จากการปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* SB-MYP-1 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตในข้อ 4.3 และการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิในข้อ 4.5 พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ UV-112 ที่ให้ผลการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ณ ชั่วโมงที่ 36 ใน PGA broth อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น จึงนำเชื้อกลายพันธุ์ UV-112 มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ซ้ำร่วมกับสารเคมี NTG โดยดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีการในข้อ 3.7

การปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* UV-112 ด้วยการกลายพันธุ์ร่วมกับสารเคมี NTG โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 6 ชั่วโมงในช่วง mid log phase แล้วดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีการในข้อ 3.3 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นับจำนวนโคโลนีที่รอดได้ผลดังภาพที่ 4.10 คัดเลือกเก็บโคโลนีบน nutrient agar ที่อยู่ในช่วงเวลาที่มียาค่าร้อยละการรอดเท่ากับ 0.1-10 ซึ่งให้ผลการใช้สารเคมีในช่วงความเข้มข้น 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการรอดร้อยละ 0.002 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 84 ไอโซเลต



ภาพที่ 4.10 ปริมาณเซลล์ (◆) และร้อยละการรอด (■) ของ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสัมผัสสารเคมี NTG เปรียบเทียบกับร้อยละการรอดของเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมี NTG (▲) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.10 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ในขั้นปฐมภูมิ (primary screening)

เชื้อโคโลนีเชื้อที่คัดเลือกงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1-10 มาทดสอบปลูกเชื้อแบบจุด (spot test) ลงบนผิวของอาหารชุดควบคุม nutrient agar และ PGA agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าบน nutrient agar มีเชื้อกลายพันธุ์ที่เกิดเมือกจำนวน 84 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาขนาดโคโลนีรวมเมือกบน PGA agar พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลต ที่มีขนาดโคโลนีรวมเมือกใหญ่กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

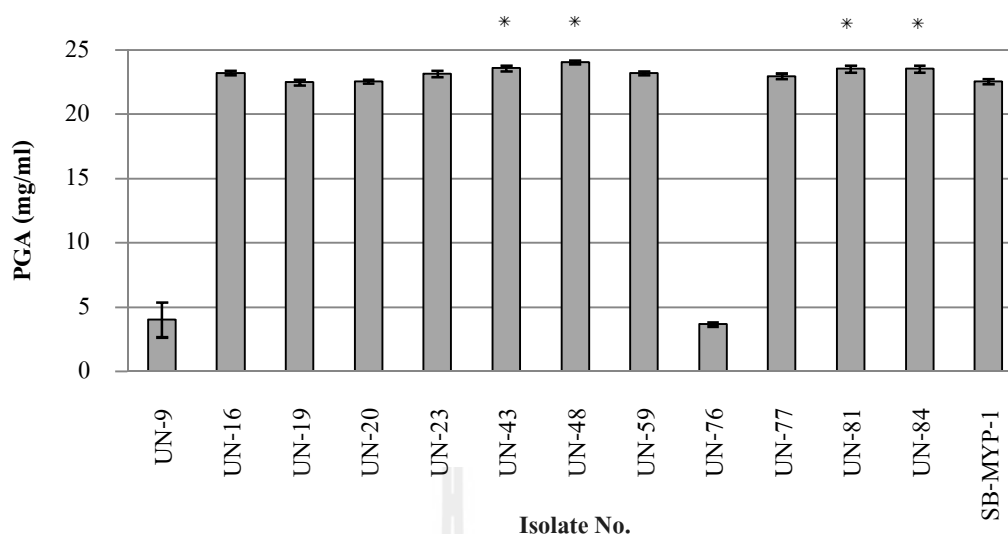
ตารางที่ 4.3 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

ไอโซเลต	ขนาดโคโลนีรวมเมื่อกบน PGA agar (mm)
SB-MYP-1 (wild type)	6.0±0.00
UN-9	9.5±3.54*
UN-16	9.5±2.12*
UN-19	9.0±0.00*
UN-20	8.0±0.00*
UN-23	10.0±0.00*
UN-43	12.0±0.00*
UN-48	9.0±0.00*
UN-59	9.0±0.00*
UN-76	10.5±0.71*
UN-77	11.0±1.41*
UN-81	9.0±0.00*
UN-84	9.0±0.00*

* คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

4.11 การคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ที่สามารถผลิต PGA ได้ในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening)

นำ *B. subtilis* สายพันธุ์กลายด้วยรังสี UV ร่วมกับสารเคมี NTG ที่คัดเลือกได้จากขั้นปฐมภูมิซึ่งมีจำนวน 12 ไอโซเลต มาเลี้ยงใน PGA broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm พบว่ามี 4 ไอโซเลต ได้แก่ UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 ที่มีความสามารถในการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.11



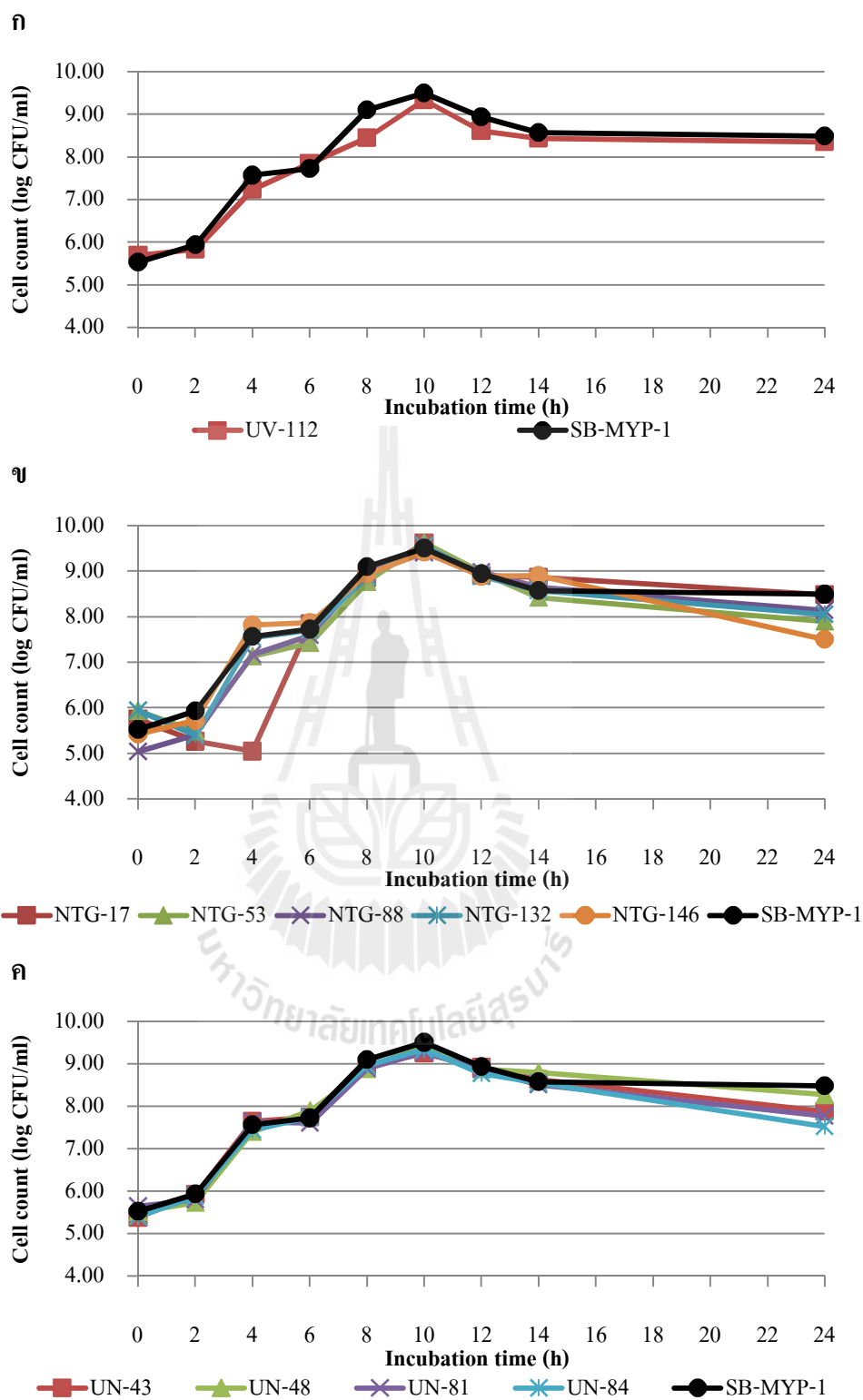
ภาพที่ 4.11 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ของเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG สามารถผลิตได้

* คือ สายพันธุ์กลายที่ผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการปรับปรุงสายพันธุ์ *B. subtilis* SB-MYP-1 โดยวิธีการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมี NTG และรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต PGA สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 36 จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ UN-112 NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 NTG-146 UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 จึงนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 10 ไอโซเลตนี้ไปศึกษากราฟการเจริญมาตรฐาน การเจริญและการผลิต PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิดคือ nutrient broth PGA broth และระหว่างกระบวนการหมักแก้วเหลืองโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ SB-MYP-1 ในขั้นตอนต่อไป

4.12 การเจริญมาตรฐานของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์

จากการศึกษาการเจริญมาตรฐานของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมี NTG และรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ใน nutrient broth โดยทำการตรวจนับการเจริญในแต่ละช่วงเวลา (ภาพที่ 4.12) พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ทุกไอโซเลตมีการเจริญในช่วงระยะ log phase ที่ 2-8 ชั่วโมง และจะเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 10 โดยระยะ stationary phase นี้จะเป็นระยะที่กล้าเชื้อ *B. subtilis* เริ่มมีการปลดปล่อย PGA ออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก (Sung et al. 2005) ซึ่งจะมีการศึกษาการผลิต PGA ในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมงระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและระหว่างการหมักแก้วเหลืองโดยจะติดตามการเจริญ ค่า pH และการผลิต PGA ทุก 12 ชั่วโมงในขั้นตอนต่อไป



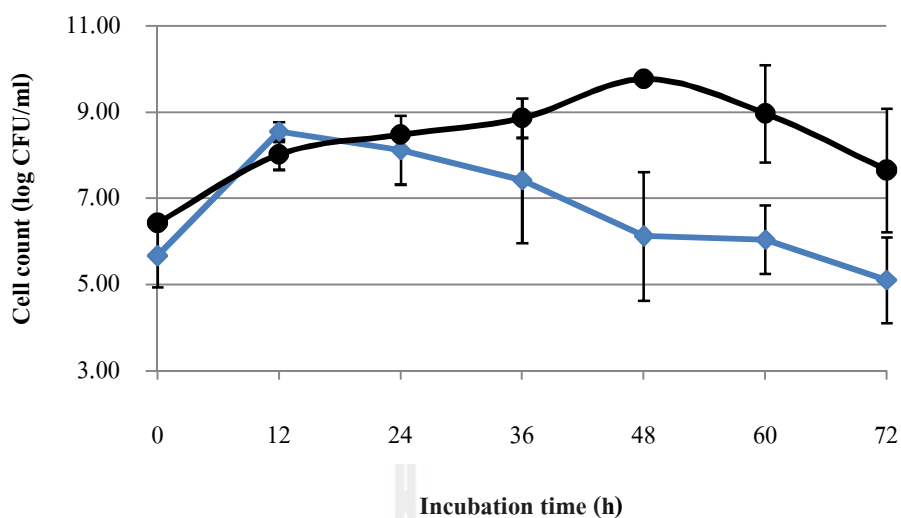
ภาพที่ 4.12 กราฟการเจริญมาตรฐานของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์
 ก) รังสีอัลตราไวโอเลต ข) สารเคมี NTG และ ค) รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

4.13 การศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง

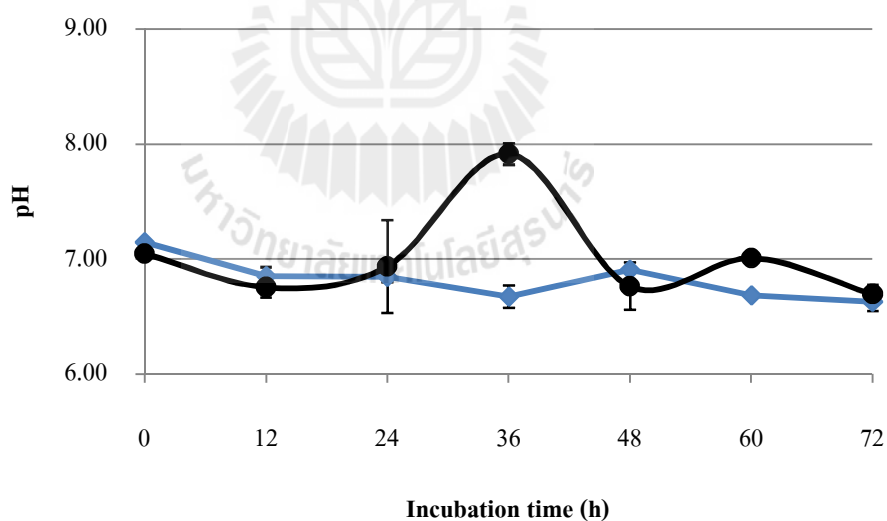
4.13.1 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตใน nutrient broth

การเจริญของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-112) ใน nutrient broth เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) ในภาพที่ 4.13 พบว่า UV-112 มีการเจริญลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 36 แต่สายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงมีการเจริญในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผลของรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้การแสดงออกทางพันธุกรรมของกลไกเชื้อกลายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kadam et al. (2006) มีการเปรียบเทียบการเจริญของ *L. delbrueckii* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า เชื้อกลายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมงแตกต่างกับ *L. delbrueckii* NCIM 2365 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม จากการเจริญนี้สามารถพิจารณาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงค่า pH พบว่า nutrient broth ที่เลี้ยงสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่า pH สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 36 คือเท่ากับ 7.91 (ภาพที่ 4.14) เนื่องจาก *B. subtilis* SB-MYP-1 มีการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนใน nutrient broth และมีสารเมตาบอไลต์ ซึ่งเป็นผลผลิตสำคัญ เช่น แอมโมเนีย ออกมาในระหว่างการเจริญส่งผลให้ทำให้สภาวะในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่าง ในขณะที่เดียวกัน nutrient broth ที่เลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ UV-112 มีค่า pH คงที่ ณ ชั่วโมงที่ 36 48 60 และ 72 คือเท่ากับ 6.67 6.91 6.69 และ 6.63 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า UV-112 มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงทำให้มีการผลิตแอมโมเนียได้น้อย

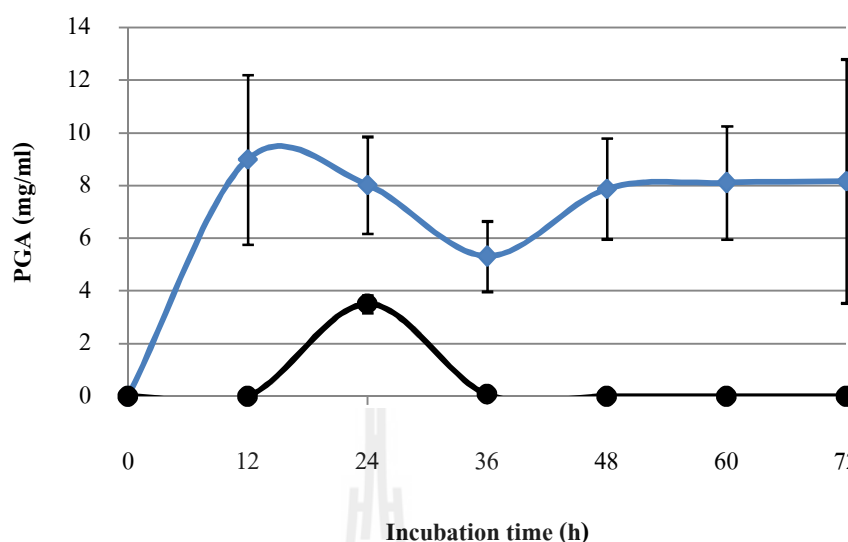
การผลิต PGA ของ *B. subtilis* UV-112 ใน nutrient broth เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ในภาพที่ 4.15 พบว่ามีความสามารถในการผลิต PGA อย่างสม่ำเสมอ และความเข้มข้น PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เป็นผลเนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตจากการปรับปรุงสายพันธุ์ ทำให้กลไกเชื้อกลายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์เพิ่มสูงขึ้น ดังเช่นตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตกลายพันธุ์ *L. delbrueckii* NCIM 2365 เพื่อปรับปรุงการผลิตกรดแลกติก พบว่า กลไกเชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์ มีการผลิตกรดแลกติกสูงและสม่ำเสมอกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (Kadam et al. 2006)



ภาพที่ 4.13 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV 112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



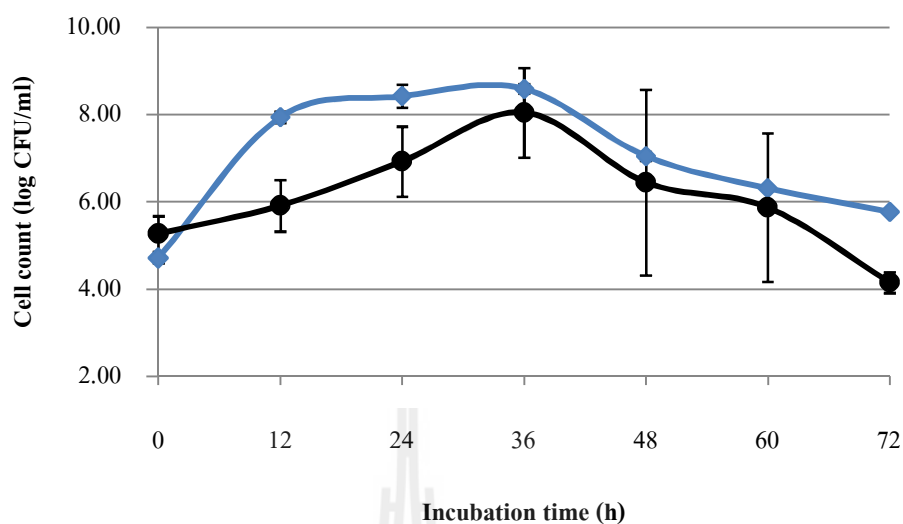
ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



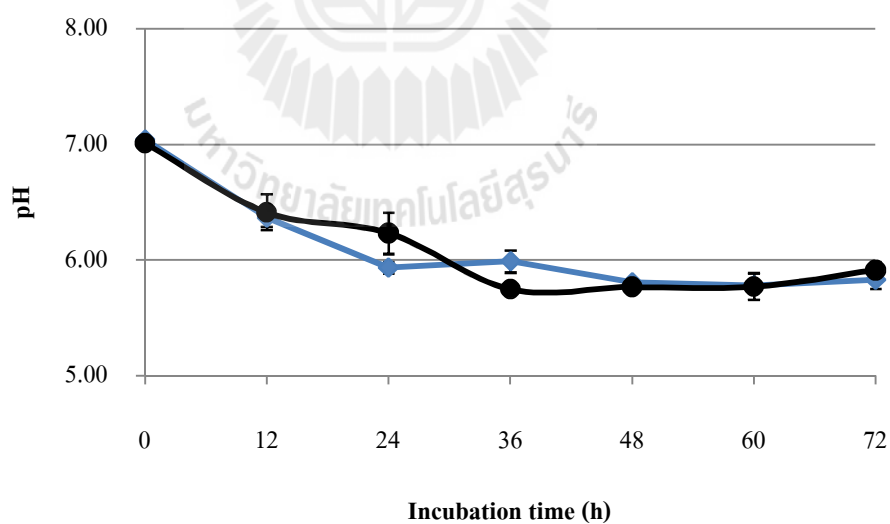
ภาพที่ 4.15 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.2 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตใน PGA broth

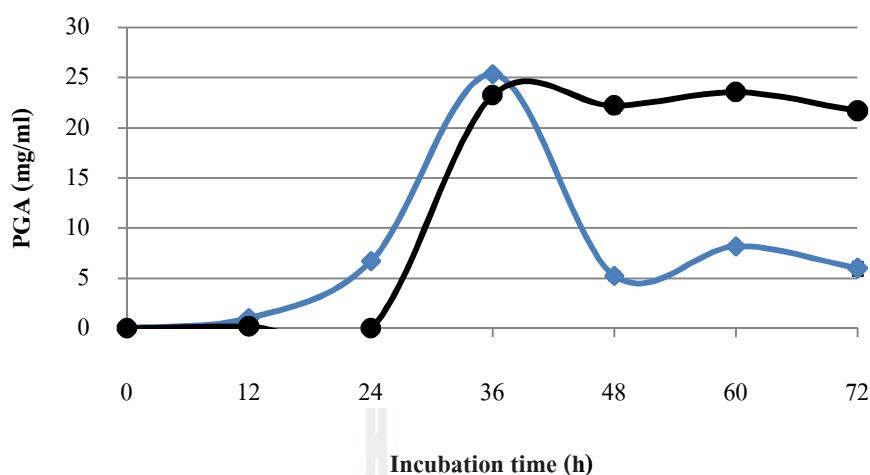
การเจริญของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-112) ใน PGA broth เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) ภาพที่ 4.16 พบว่า UV-112 มีการเจริญที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ซึ่งเป็นระยะ stationary phase สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งกล้าเชื้อสายพันธุ์อาจมีความสามารถในการใช้สารอาหารใน PGA broth ได้ดีกว่ากล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ในขณะเดียวกันค่า pH ของ PGA broth ที่เลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ดั้งเดิมและ UV-112 มีค่า pH ลดลง ณ ชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 5.75 และ 5.99 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.17) ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากกล้าเชื้อมีการใช้สารอาหารใน PGA broth เช่น L-glutamic acid น้ำตาลกลูโคส เกิดการปลดปล่อย PGA ออกมา ทำให้มีความเข้มข้น PGA สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้มีสถานะเป็นกรด (Chiu et al. 2004) แต่เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของ PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.18) พบว่า UV-112 มีการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ณ ชั่วโมงที่ 24 และ 36 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต PGA ของกล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้น UV-112 อาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ใน PGA broth



ภาพที่ 4.16 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



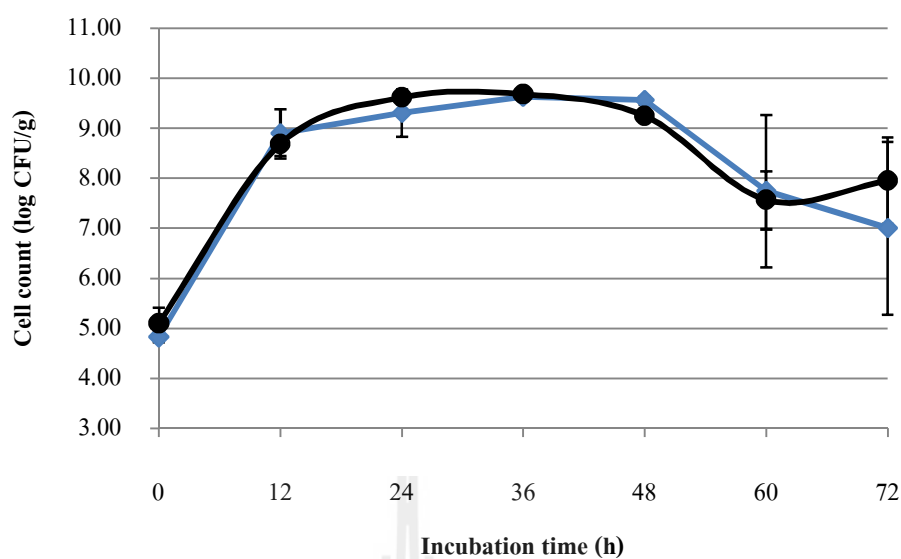
ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



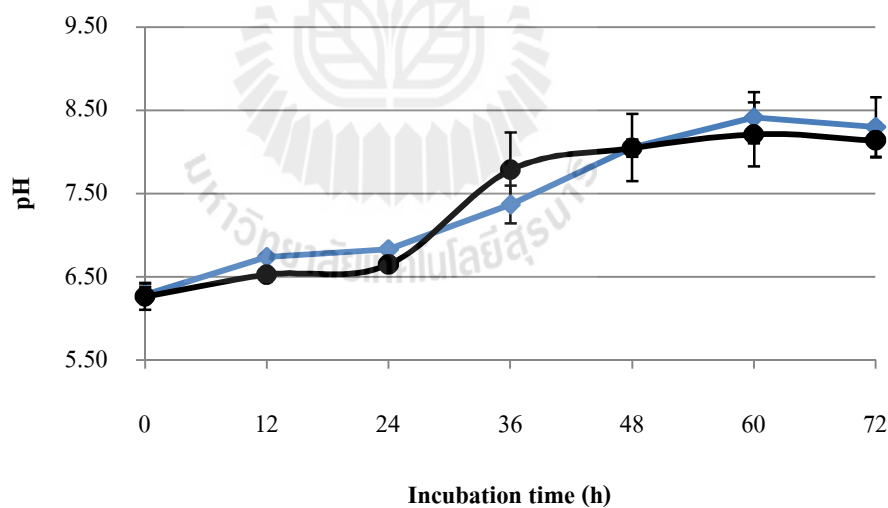
ภาพที่ 4.18 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.3 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตในระหว่างการหมักถั่วเหลือง

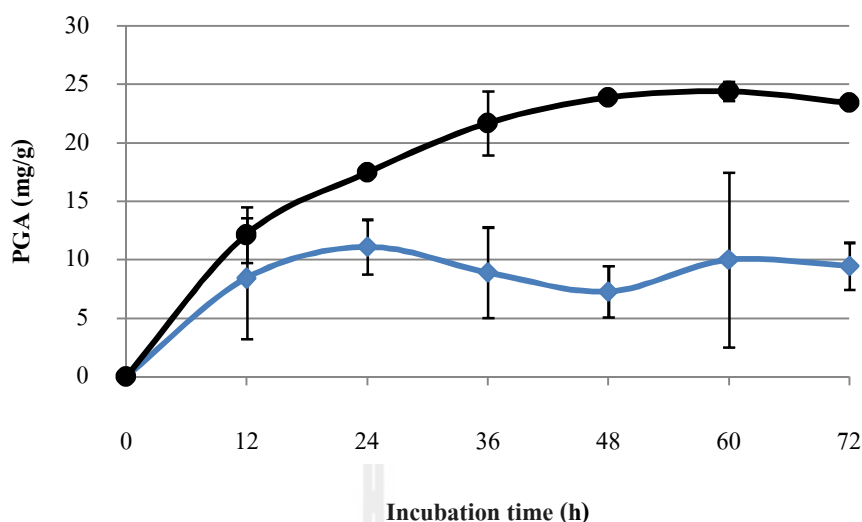
การเจริญของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-112) ในระหว่างการหมักถั่วเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) ในภาพที่ 4.19 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยจะมีระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 ค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 4.20) เนื่องจากกล้ำเชื้อ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น อะไมเลส โปรติเอส มาย่อยสลายสเตรทที่สำคัญในถั่วเหลือง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดยสเตรทที่มีปริมาณสูงสุดคือ โปรตีน ทำให้มีปริมาณแอมโมเนียและค่า pH สูงขึ้นในระหว่างการหมักถั่วเหลือง ซึ่งคุณลักษณะทางเคมีที่ดีของถั่วเหลืองหมักจะมีค่า pH จะอยู่ในช่วง 7.5-8.5 ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณแอมโมเนียในระหว่างหมักคือ 0.8 -1.0 % (Allagheny et al. 1996, Visessanguan et al. 2005) เมื่อพิจารณาการเจริญในภาพที่ 4.19 ควบคู่กับการผลิต PGA ในภาพที่ 4.21 พบว่าระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วยกล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีการผลิต PGA ที่สูงและสม่ำเสมอกว่าการใช้ UV-112 โดยกล้ำเชื้อจะมีการปลดปล่อย PGA ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นระยะ stationary phase แต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ UV-112 มีการผลิต PGA ที่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้น UV-112 อาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้ำเชื้อในการหมักถั่วเหลือง



ภาพที่ 4.19 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



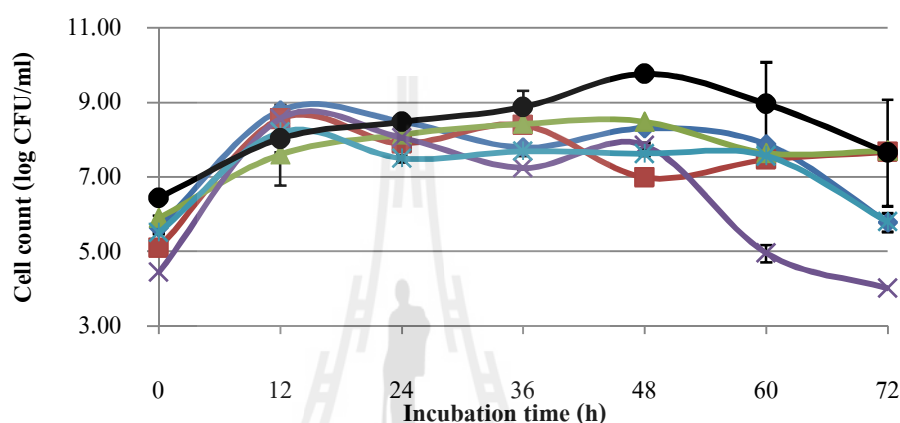
ภาพที่ 4.21 ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต UV-112 (◆) เป็นกล้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดและในระหว่างการหมักถั่วเหลือง จะได้ว่า การผลิต PGA ของกล้ำเชื้อสายพันธุ์ในแต่ละสภาวะไม่มีความสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงไม่มีความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้ำเชื้อเพื่อการผลิต PGA

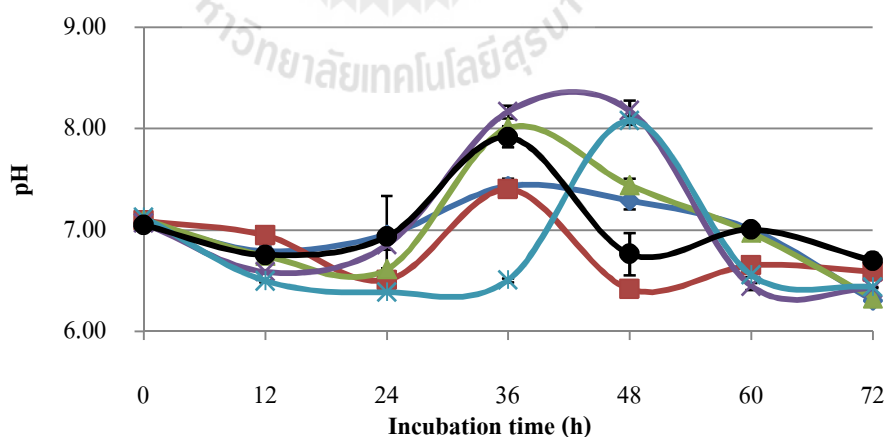
4.13.4 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ใน nutrient broth

การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 และ NTG-146 ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (ภาพที่ 4.22) พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ 5 ไอโซเลตเริ่มมีปริมาณลดลง ณ ชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่า pH ใน nutrient broth มีรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ซึ่งสภาวะการหมักของแต่ละไอโซเลตนั้นจะเริ่มเข้าสู่สภาวะต่างในแต่ละชั่วโมงที่แตกต่างกัน โดย NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 และสายพันธุ์ดั้งเดิม จะเริ่มเข้าสู่สภาวะต่างในชั่วโมงที่ 36 แต่ NTG-146 จะเข้าสู่สภาวะต่างในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.23) การผลิต PGA ของกล้ำเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 5 ไอโซเลตใน nutrient broth (ภาพที่ 4.24) พบว่ามีการผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความ

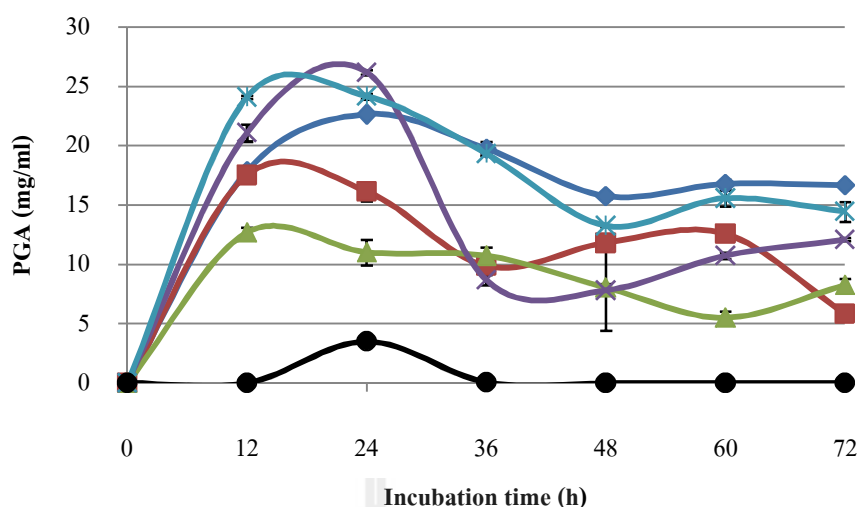
ต่อมาเสมอ จะเห็นได้ว่ารูปแบบการผลิต PGA และการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth แต่ละไอโซเลตของกล้ายเชื้อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเป็นผลของสารก่อกลายพันธุ์ NTG ที่สามารถเติมหมู่เมทิลให้กับเบสภายในสาย DNA ทำให้การจับคู่เบสผิดพลาดไป เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสาย DNA แบบสุ่ม เมื่อเกิดการถอดรหัสขึ้นจึงทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้การแสดงออกทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป (มาลินี สิงโตทอง, 2551)



ภาพที่ 4.22 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (✕) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



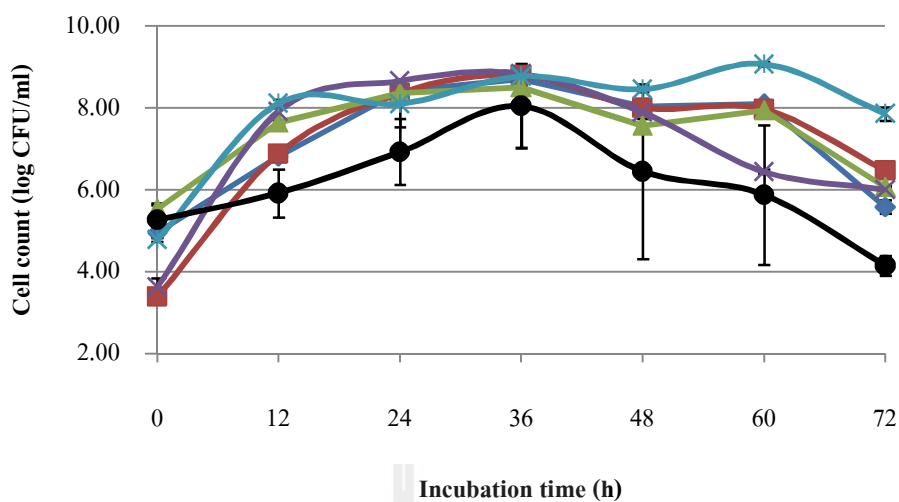
ภาพที่ 4.23 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (✕) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



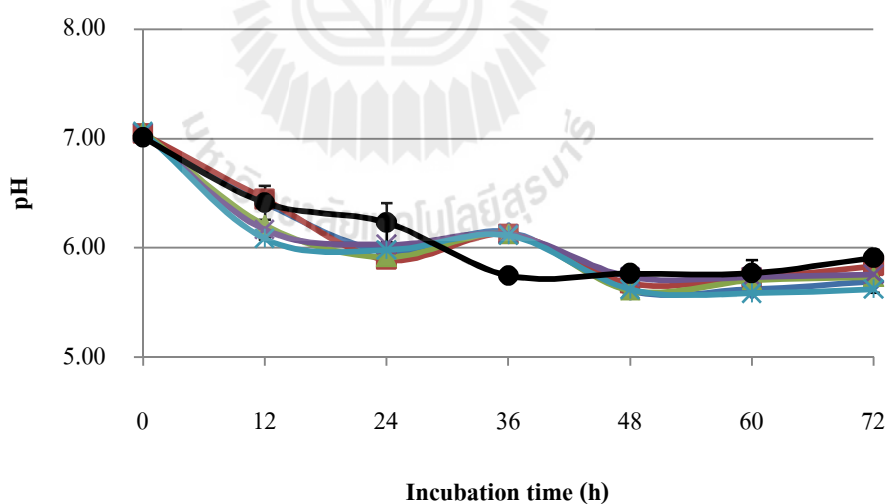
ภาพที่ 4.24 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.5 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ใน PGA broth

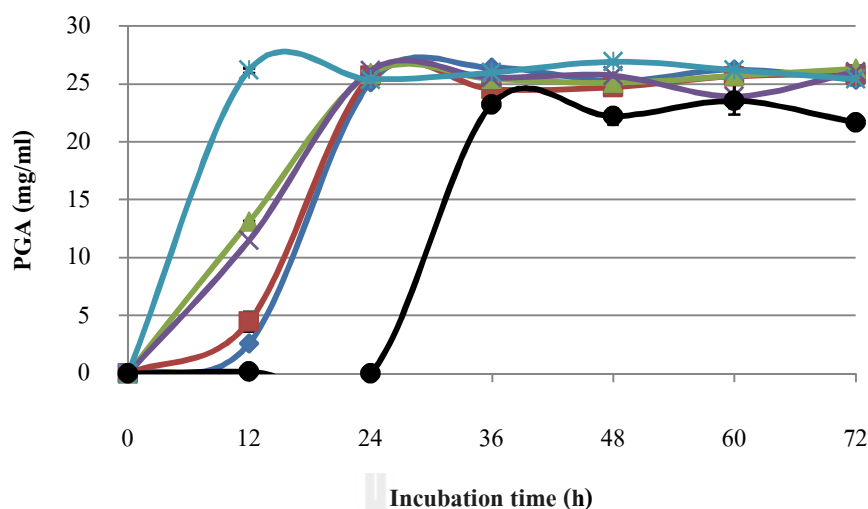
การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.25) พบว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญใน PGA broth สูงกว่ากล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ค่า pH พบว่า PGA broth ที่เลี้ยงกล้ำเชื้อกลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าลดลง ณ ชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.26 ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากกล้ำเชื้อมีการใช้สารอาหารใน PGA broth ทำให้ มีการผลิต PGA เกิดสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรด (Chiu et al. 2004) พิจารณาควบคู่กับภาพที่ 4.27 พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยทุกสายพันธุ์กลายพันธุ์มีการผลิต PGA ขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นระยะ stationary phase ของการเจริญและมีการผลิตอย่างสม่ำเสมอในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG อาจมีความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้ำเชื้อเพื่อการผลิต PGA ใน PGA broth



ภาพที่ 4.25 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



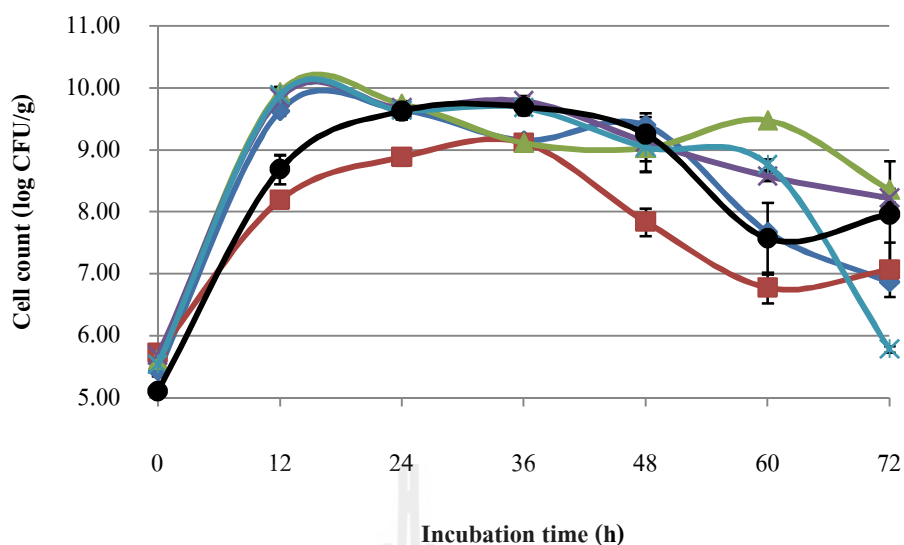
ภาพที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



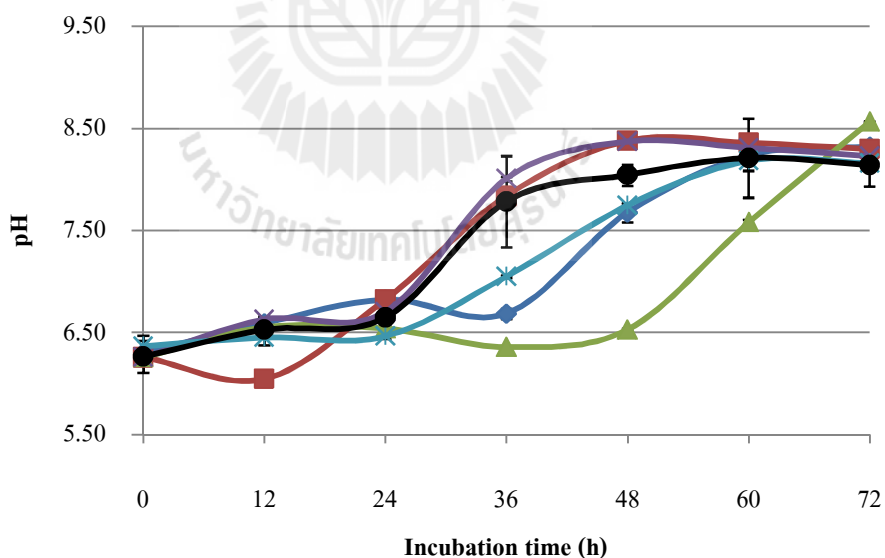
ภาพที่ 4.27 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.6 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง

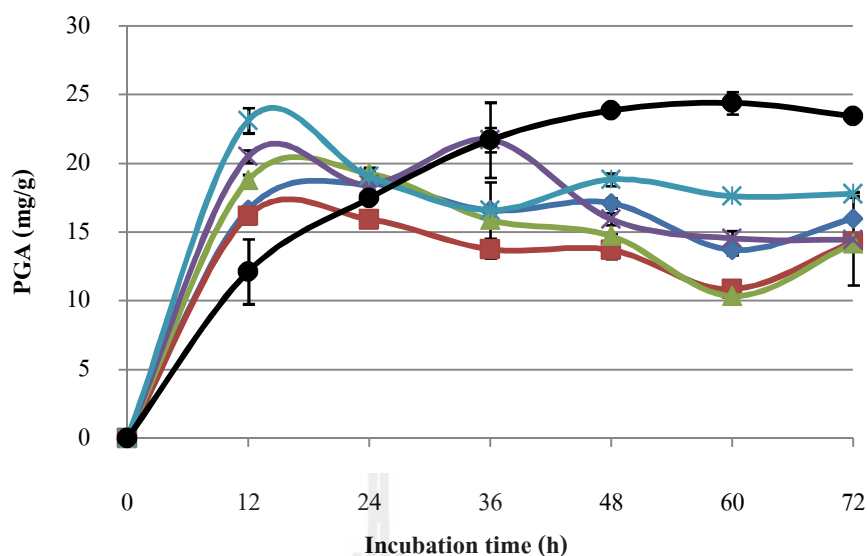
การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.28) พบว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์ NTG- 17 NTG-88 NTG-132 และ NTG-146 มีความสามารถในการเจริญในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงกว่ากล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ณ ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งแตกต่างกับ NTG-53 ที่มีความสามารถในการเจริญน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก จึงแสดงให้เห็นว่า NTG-53 มีความสามารถในการใช้สารอาหารหลักในถั่วเหลืองน้อยกว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์ตัวอื่นๆ ค่า pH (ภาพที่ 4.29) พบว่ามีกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ NTG-53 NTG-132 และสายพันธุ์ดั้งเดิม มีการหมักในสภาวะต่าง ณ ชั่วโมงที่ 36 ที่มีค่า pH เท่ากับ 7.84 8.01 และ 7.78 ตามลำดับ NTG-17 NTG-88 และ NTG-146 มีการหมักในสภาวะต่าง ณ ชั่วโมงที่ 60 ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.24 7.58 และ 8.19 ตามลำดับ เชื่อมโยงได้ว่าอัตราการผลิตแอมโมเนียของแต่ละไอโซเลตจากการใช้สารอาหารโปรตีนในถั่วเหลืองมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า pH มีความเป็นต่างแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการหมักถั่วเหลือง การผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง (ภาพที่ 4.30) พบว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 5 ไอโซเลตมีการผลิต PGA สูง ณ ชั่วโมงที่ 12 แต่ไม่มีความสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นกล้ำเชื้อสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี NTG อาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้ำเชื้อเพื่อการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมัก



ภาพที่ 4.28 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นก้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.29 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นก้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



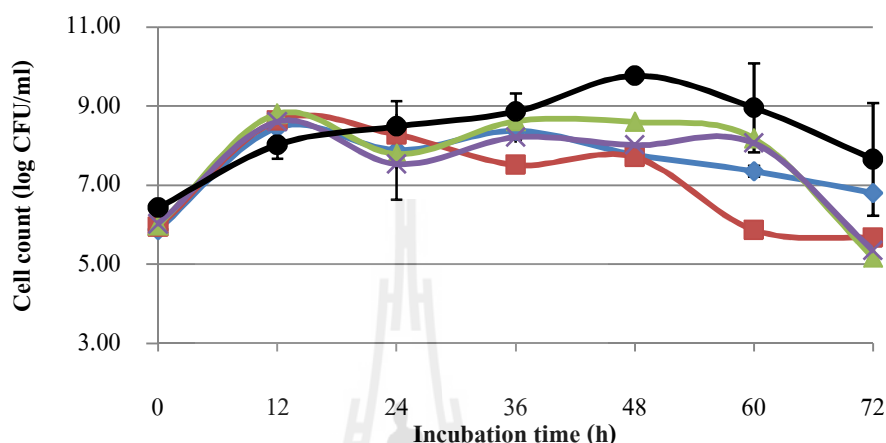
ภาพที่ 4.30 ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ได้แก่ NTG-17 (◆) NTG-53 (■) NTG-88 (▲) NTG-132 (×) และ NTG-146 (*) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดและในระหว่างการหมักถั่วเหลือง จะได้ว่า การผลิต PGA ของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PGA broth มีความเข้มข้นสูงและสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ใน PGA broth ในอุตสาหกรรมต่อไป

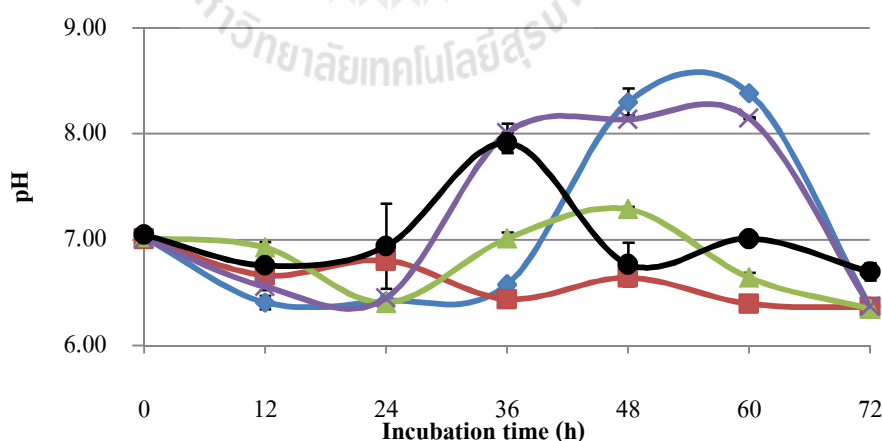
4.13.7 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ใน nutrient broth

การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (ภาพที่ 4.31) พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ 4 ไอโซเลตเริ่มมีปริมาณลดลง ณ ชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่า pH ใน nutrient broth มีรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ซึ่งสภาวะการหมักของแต่ละไอโซเลตจะเริ่มเข้าสู่สภาวะต่างใน แต่ละชั่วโมงที่แตกต่างกัน โดย UN-84 และสายพันธุ์ดั้งเดิม เริ่มเข้าสู่สภาวะต่างใน ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 8.01 และ 7.91 ตามลำดับ UN-43 จะเข้าสู่สภาวะต่างในชั่วโมงที่

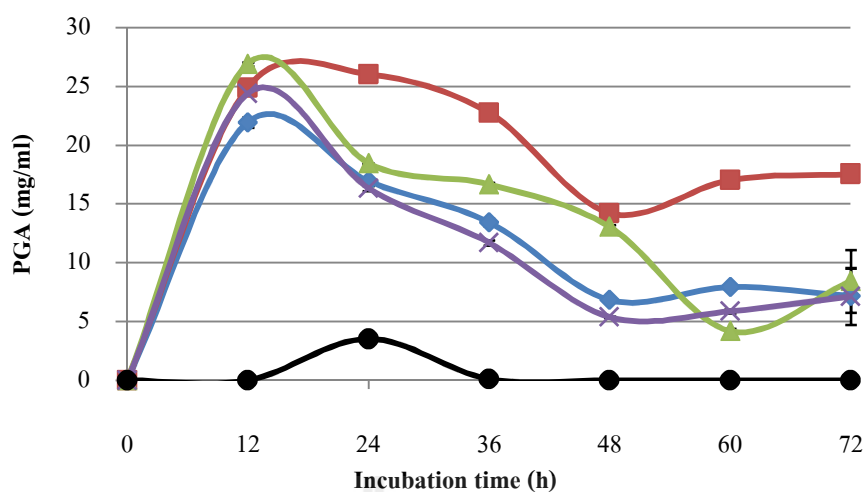
48 ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 8.30 แต่มี 2 ไอโซเลต คือ UN-48 และ UN-81 ที่มีค่า pH คงที่และมีสภาพเป็นกลาง (ภาพที่ 4.32) การผลิต PGA ของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 4 ไอโซเลตใน nutrient broth (ภาพที่ 4.33) พบว่ามีการผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 ความเข้มข้นของ PGA ที่กล้าเชื้อผลิตออกมานั้นไม่มีความสม่ำเสมอ



ภาพที่ 4.31 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



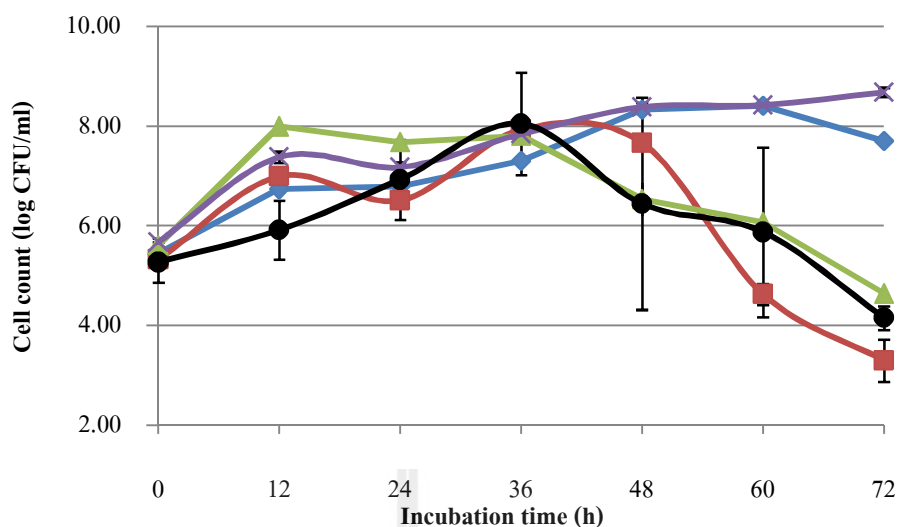
ภาพที่ 4.32 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ nutrient broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



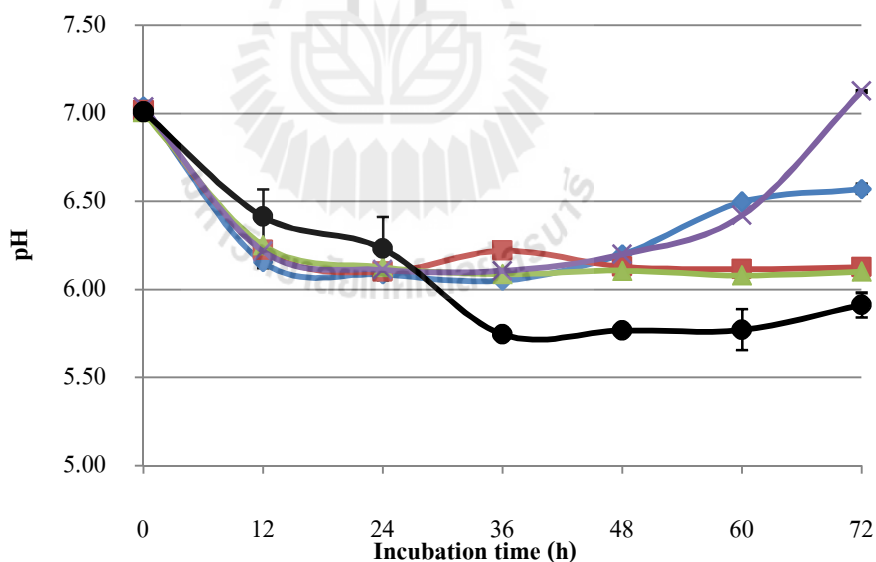
ภาพที่ 4.33 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.8 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ใน PGA broth

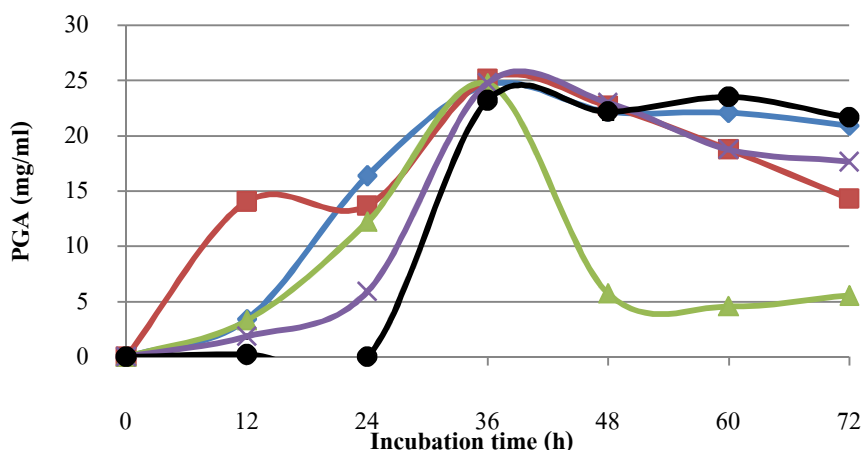
การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ทั้ง 4 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.34) พบว่ากล้าเชื้อกลายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญใน PGA broth สูงกว่ากล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 12 ชั่วโมง ค่า pH ในอาหาร PGA broth ที่ใช้กล้าเชื้อกลายพันธุ์ (ภาพที่ 4.35) มีค่า pH คงที่หรือสูงขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้ว การเลี้ยง *B. subtilis* ใน PGA broth ค่า pH จะลดลงเนื่องจาก *B. subtilis* มีการใช้แหล่งไนโตรเจนในอาหาร PGA broth ที่สำคัญ คือ L-glutamic acid และแหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลกลูโคส เพื่อการผลิต PGA ส่งผลให้ความเข้มข้น PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นสถานะในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นกรด (Chiu et al. 2004) เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับการผลิต PGA (ภาพที่ 4.36) พบว่าการผลิต PGA ของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มีความสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับกล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่ากล้าเชื้อกลายพันธุ์มีความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นในอาหาร PGA broth เพื่อการผลิต PGA น้อยกว่ากล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงทำให้การผลิต PGA นั้นไม่มีความสม่ำเสมอในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นกล้าเชื้อสายพันธุ์กลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG อาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ใน PGA broth



ภาพที่ 4.34 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (♦) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



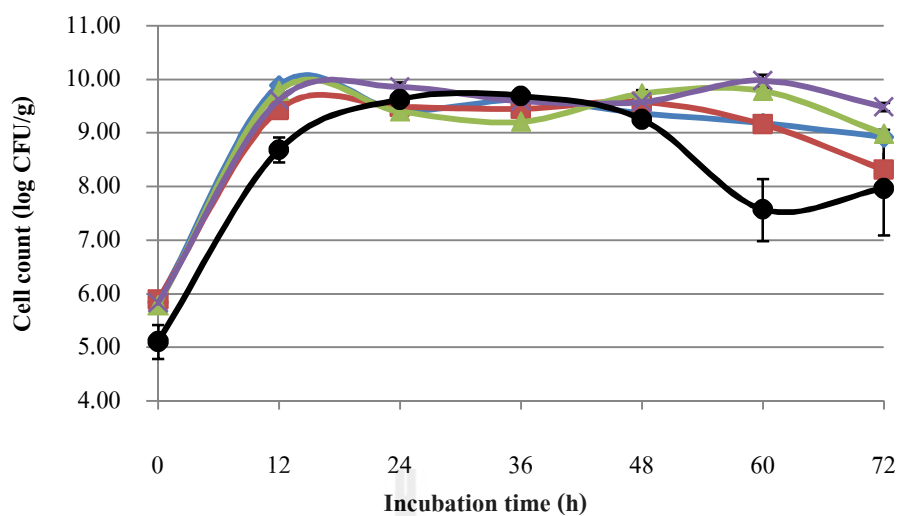
ภาพที่ 4.35 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ PGA broth เมื่อมีการเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (♦) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



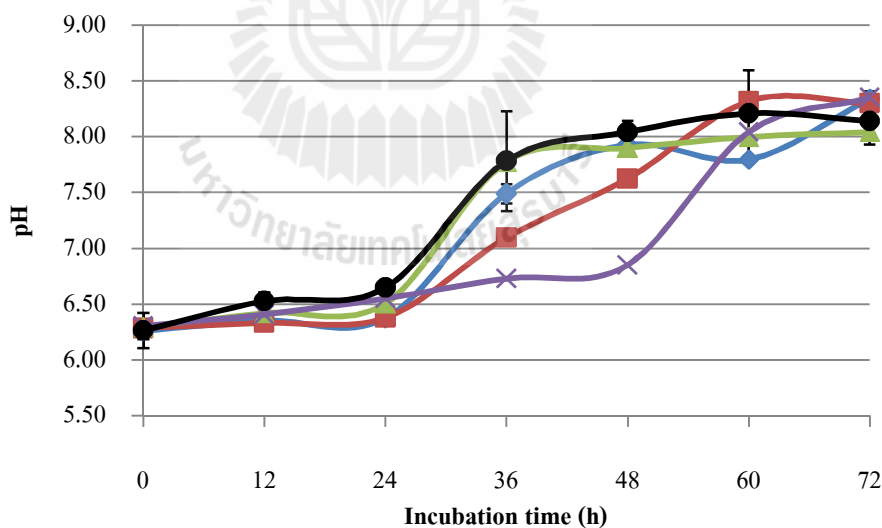
ภาพที่ 4.36 ความเข้มข้น PGA (mg/ml) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ใน PGA broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.13.9 ศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง

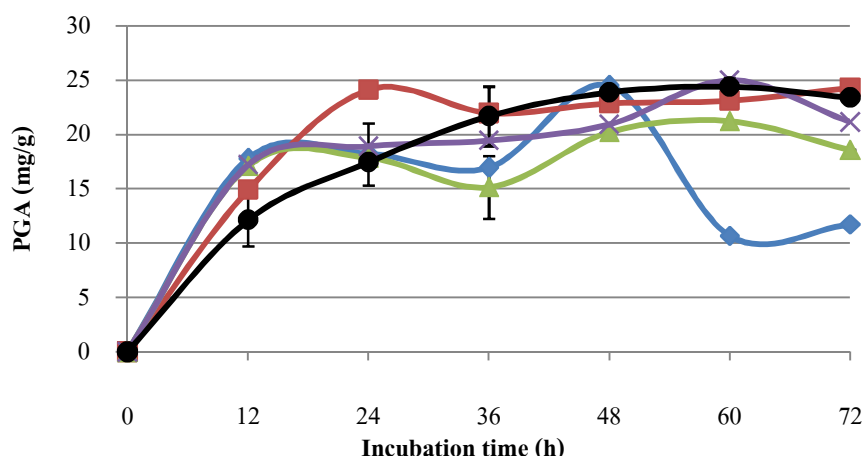
การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ทั้ง 4 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.37) พบว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงกว่ากล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 12 ชั่วโมง และมีการเจริญคงที่ในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับกล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ณ ชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก ค่า pH (ภาพที่ 4.38) พบว่ามีรูปแบบของการหมักเป็นสภาวะต่าง เมื่อพิจารณาแต่ละไอโซเลตจะเห็นได้ว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์ UN-84 มีการหมักในสภาวะต่าง ณ ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งเข้าสู่สภาวะต่างช้ากว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์ UN-43 UN-48 UN-81 และกล้ำเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่มีการหมักในสภาวะต่าง ณ ชั่วโมงที่ 36 และ 48 เชื่อมโยงได้ว่าอัตราการผลิตแอมโมเนียของแต่ละไอโซเลตจากการใช้สารอาหารโปรตีนในถั่วเหลืองมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า pH มีความเป็นต่างแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการหมักถั่วเหลือง และจากการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง (ภาพที่ 4.39) พบว่ากล้ำเชื้อกลายพันธุ์เพียงไอโซเลตเดียว (UN-48) ที่มีความสามารถในการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ณ ชั่วโมงที่ 24 และมีความสม่ำเสมอไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก ดังนั้น UN-48 อาจมีความเป็นไปได้ในการนำกล้ำเชื้อเพื่อการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมัก



ภาพที่ 4.37 การเจริญของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็นกล้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.38 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็นกล้ำเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.39 ความเข้มข้น PGA (mg/g) ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ได้แก่ UN-43 (◆) UN-48 (■) UN-81 (▲) และ UN-84 (×) เป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 (●) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

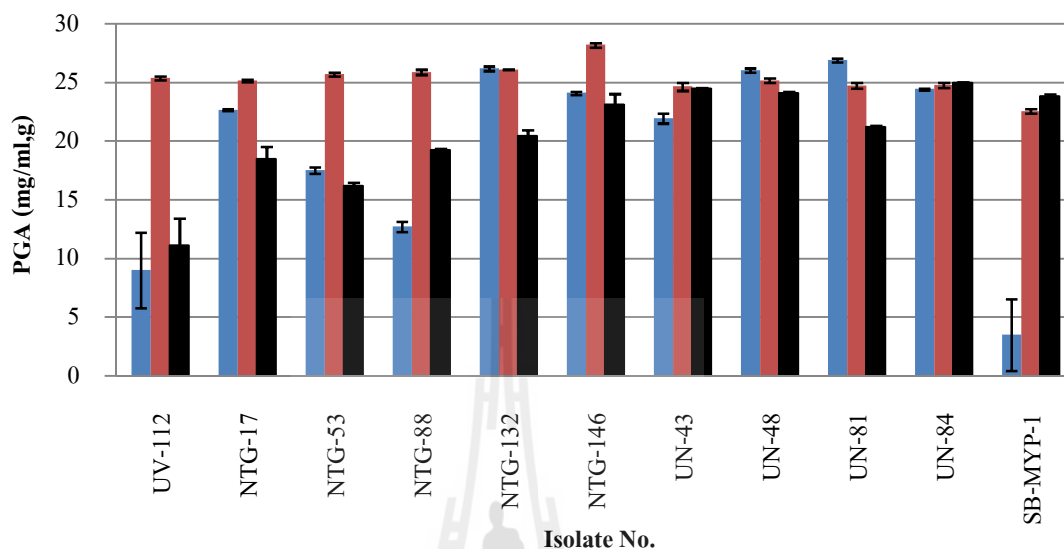
จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดและในระหว่างการหมักถั่วเหลือง จะได้ว่าการผลิต PGA ของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ UN-48 มีความเข้มข้นสูงและสม่ำเสมอเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมักและเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักต่อไป

กล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าการเจริญ การผลิต PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในระหว่างการหมักถั่วเหลืองช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) การใช้สารก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV-C) สารเคมี NTG ทำให้เกิดลักษณะทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* ที่แสดงออกมาในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยกลไกของรังสีอัลตราไวโอเลต คือ การทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ โดยเบสไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ตรงข้ามกันได้ ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเลตชนิด UV-C นี้จะเป็นรังสีคลื่นสั้นในช่วง 253.7 นาโนเมตร มีพลังงาน 4.43-12.4 อิเล็กตรอนโวลต์ ซึ่งมีพลังงานสูงและมีประสิทธิภาพการกลายพันธุ์กว่ารังสีอัลตราไวโอเลตชนิดอื่น สำหรับกลไกของสารเคมี NTG ซึ่งเป็น alkylating agent จะไปเติมหมู่เมทิลให้กับเบส ดังนั้นผลของสารก่อกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในโมเลกุลของสายโพลีนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม (random mutagenesis)

เมื่อเกิดการสังเคราะห์ DNA ทำให้ได้ DNA ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมื่อเกิดการถอดรหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ถ้าการเปลี่ยนแปลงนั้นอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ จะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือผลผลิตที่เปลี่ยนแปลงไป โดยอาจทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้นหรือน้อยลงได้ในระหว่างการหมัก (พิสุทธิ พวงนาค, 2542; มาลินี สิงห์โตทอง, 2551; Ranadive et al. 2011; Sher et al. 2012)

เมื่อสรุปความเข้มข้น PGA ใน nutrient broth (อาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม) PGA broth และระหว่างการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมงของกล้าเชื้อแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (ภาพที่ 4.40) จะเห็นได้ว่ากล้าเชื้อกลายพันธุ์ให้ผลการผลิต PGA ในความเข้มข้นที่ สูงที่สุด ณ ชั่วโมงแตกต่างกัน ดังนี้คือ UV-112 NTG-53 NTG-88 NTG-146 UN-43 UN-81 และ UN-84 ให้ผลการผลิต PGA ใน nutrient broth สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 NTG-17 NTG-132 และ UN-48 ให้ผลการผลิต PGA ใน nutrient broth สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 NTG-146 ให้ผลการผลิต PGA ใน PGA broth สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 NTG-17 NTG-53 NTG-88 และ NTG-132 ให้ผลการผลิต PGA ใน PGA broth สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 UV-112 UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 ให้ผลการผลิต PGA ใน PGA broth สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 36 NTG-53 NTG-132 และ NTG-146 ให้ผลการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 UV-112 NTG-17 NTG-88 และ UN-48 ให้ผลการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 UN-43 ให้ผลการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 48 UN-81 และ UN-84 ให้ผลการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการสรุปผลความเข้มข้น PGA ที่ผลิตได้ในแต่ละไอโซเลตของเชื้อกลายพันธุ์ จะสามารถทำให้ควบคุมการผลิต PGA ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในระหว่างการผลิตถั่วเหลืองหมักได้ ซึ่งกล้าเชื้อกลายพันธุ์แต่ละไอโซเลตสามารถนำไปใช้เพื่อการผลิต PGA แตกต่างกันในแต่ละสภาวะ โดยกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความเหมาะสมในการนำไปเลี้ยงเพื่อการผลิต PGA บริสุทธิ์ทางการค้าในระดับอุตสาหกรรม ส่วนกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ UN-48 ที่ให้ผลการผลิต PGA สูงกว่ากล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมในชั่วโมงที่ 24 ระหว่างการหมักถั่วเหลืองและมีความสามารถในการผลิต PGA อย่างสม่ำเสมอไม่แตกต่างกับกล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้น UN-48 อาจมีความเป็นไปได้ในการนำกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองเพื่อให้มีคุณค่าทางโภชนาการอาหารต่อไป แต่อย่างไรก็ตามอาจจะต้องมีการศึกษาผลของการนำกล้าเชื้อไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเกี่ยวกับการผลิตสารที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เพื่อให้มีความมั่นใจได้ว่า

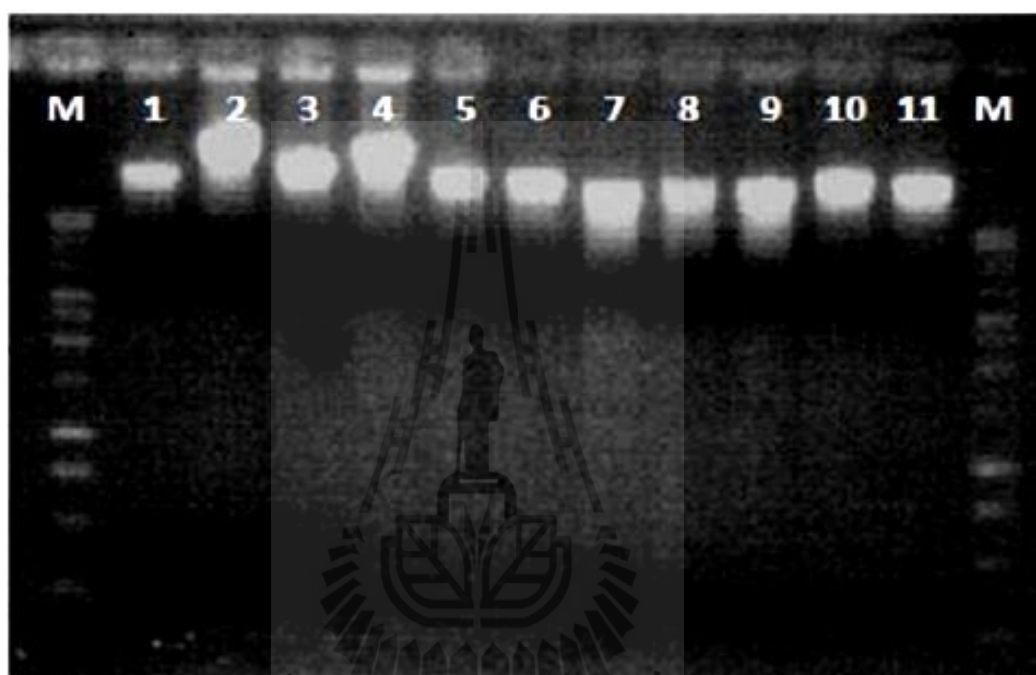
กล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มีความปลอดภัยที่จะไม่ผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค
ในระหว่างกระบวนการหมัก



ภาพที่ 4.40 สรุปความเข้มข้น PGA ของกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ให้ผลการผลิตสูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (■) PGA broth (■) และในระหว่างการหมักข้าวเหลือง (■)

4.14 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

จากการสกัดจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification kit ทำการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิก DNA ที่สกัดได้โดยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.41

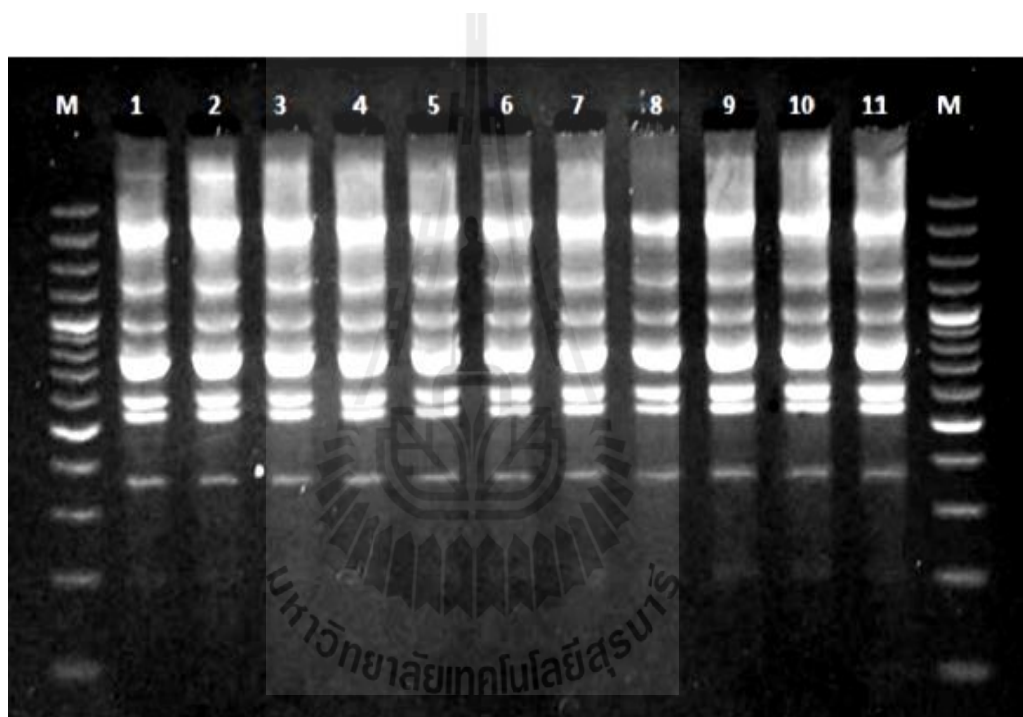


ภาพที่ 4.41 จีโนมิก DNA จาก *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต

Land M= DNA มาตรฐาน (100 base pairs)	Land 6= <i>B. subtilis</i> NTG-132
Land 1= <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 (wild type)	Land 7= <i>B. subtilis</i> NTG-146
Land 2= <i>B. subtilis</i> UV-112	Land 8= <i>B. subtilis</i> UN-43
Land 3= <i>B. subtilis</i> NTG-17	Land 9= <i>B. subtilis</i> UN-48
Land 4= <i>B. subtilis</i> NTG-53	Land 10= <i>B. subtilis</i> UN-81
Land 5= <i>B. subtilis</i> NTG-88	Land 11= <i>B. subtilis</i> UN-84

พบว่า จีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลตที่สกัดได้มีแถบจีโนมิก DNA เพียงแถบเดียว สรุปได้ว่า จีโนมิก DNA ที่ได้มีคุณภาพที่ดี ซึ่งไม่พบแถบที่แสดงถึงการแตกหักของ DNA ปราศจากการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ซึ่ง DNA ที่สกัดได้นี้เหมาะสมนำไปเป็น แม่แบบในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCR-RAPD ของ *B. subtilis* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ

เมื่อนำจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลตที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์ เมื่อใช้ไพรเมอร์แบบคู่ พบว่าจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต ให้รูปแบบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) ดังภาพที่ 4.42



ภาพที่ 4.42 แถบรูปแบบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการทำ PCR-RAPD จากตัวอย่างจีโนมิก DNA ของ *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต

Land M= DNA มาตรฐาน (100 base pairs)	Land 6= <i>B. subtilis</i> NTG-132
Land 1= <i>B. subtilis</i> SB-MYP-1 (wild type)	Land 7= <i>B. subtilis</i> NTG-146
Land 2= <i>B. subtilis</i> UV-112	Land 8= <i>B. subtilis</i> UN-43
Land 3= <i>B. subtilis</i> NTG-17	Land 9= <i>B. subtilis</i> UN-48
Land 4= <i>B. subtilis</i> NTG-53	Land 10= <i>B. subtilis</i> UN-81
Land 5= <i>B. subtilis</i> NTG-88	Land 11= <i>B. subtilis</i> UN-84

จากภาพที่ 4.42 จะเห็นได้ว่า แถบรูปแบบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของจีโนมิก DNA *B. subtilis* ทั้ง 11 ไอโซเลต ให้รูปแบบที่ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาขยายปริมาณ DNA แบบสุ่ม ยังไม่สามารถตรวจจับตำแหน่ง DNA ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากผลกระทบของสารก่อกลายพันธุ์ จึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อกลายพันธุ์กับสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ยกตัวอย่างงานวิจัยที่ปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์แล้ววิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-RAPD ได้แก่ Jetawattana (2001) ใช้เทคนิค PCR-RAPD ตรวจสอบวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี MNNG พบว่า ทั้ง 8 ไอโซเลตให้แถบรูปแบบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นอาจมีการศึกษาชนิดและความเหมาะสมของไพรเมอร์หลาย ๆ ตัวที่นำมาใช้ทำปฏิกิริยาขยายปริมาณ DNA แบบสุ่มดูความแตกต่างของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต เพื่อให้แยกความแตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น (Hosoi, 2010)



บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

การปรับปรุงสายพันธุ์กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักโดยธรรมชาติ ด้วยการใส่รังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมี NTG และการใส่รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG เพื่อการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (Poly- γ -glutamic acid; PGA) ซึ่งแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ คัดเลือกสายพันธุ์กลายเบื่องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PGA agar ที่ให้ผลการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม SB-MYP-1 ซึ่งด้วยวิธีการใส่รังสีอัลตราไวโอเลตพบ 1 ไอโซเลต คือ UV-112 การใช้สารเคมี NTG มี 5 ไอโซเลต คือ NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 NTG-146 และการใส่รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG มี 4 ไอโซเลต คือ UN-43 UN-48 UN-81 UN-84 จากนั้นนำเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 10 ไอโซเลตมาศึกษาการเจริญและการผลิต PGA ใน nutrient broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม PGA broth และในกระบวนการหมักถั่วเหลืองในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแต่ละไอโซเลตให้ผลความเป็นไปได้ในการผลิต PGA แต่ละสภาวะแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลต มีความสามารถในการผลิต PGA ใน PGA broth สูงและความเข้มข้นของการผลิต PGA มีความสม่ำเสมอกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำกล้าเชื้อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG นี้ไปใช้เพื่อการผลิต PGA บริสุทธิ์ทางการค้า ส่วนสายพันธุ์กลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ UN-48 ที่ให้ผลการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและความเข้มข้นของการผลิตมีความสม่ำเสมอในระหว่างระยะเวลาการหมัก ซึ่งเชื้อกลายพันธุ์ UN-48 นี้มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA ในระหว่างการหมักถั่วเหลือง ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์แต่ละวิธีมีความเป็นไปได้ในการได้กล้าเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ผลการผลิต PGA แต่จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันในแต่ละสภาวะจึงสามารถเลือกวิธีการปรับปรุงที่เหมาะสม เพื่อนำกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพไปใช้ในการยกระดับสภาวะการผลิต PGA ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ความเข้มข้นของ PGA ที่กล้าเชื้อกลายพันธุ์แต่ละไอโซเลต ณ เวลาที่ให้ผลการผลิต PGA สูงที่สุด (ตารางภาคผนวกที่ ค 7) พบว่ากล้าเชื้อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีความสามารถในการผลิต PGA สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและมีความเข้มข้น PGA คงที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PGA broth ซึ่งมี

ความเหมาะสมในการนำไปเลี้ยงเพื่อการผลิต PGA บริสุทธิ์ทางการค้าในระดับอุตสาหกรรม ส่วนกล้าเชื้อกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG พบ 1 ไอโซเลตคือ UN-48 ที่ให้ผลการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมักมีความเข้มข้นเท่ากับ 24.11 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 และมีความสม่ำเสมอ แต่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีการผลิต PGA เข้มข้นเท่ากับ 23.85 ± 0.16 มิลลิกรัมต่อกรัม สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 48 ดังนั้น UN-48 อาจมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA โดยลดระยะเวลาการหมักถั่วเหลือง ซึ่งตามปกติการใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมต้องใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมง เพื่อให้มีคุณค่าทางโภชนาการและมีคุณภาพตรงกับความต้องการของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลของการนำกล้าเชื้อกลายพันธุ์ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเกี่ยวกับการผลิตสารที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เพื่อให้มีความมั่นใจได้ว่ากล้าเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มีความปลอดภัยที่จะไม่ผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในระหว่างกระบวนการหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาวิธีการเก็บรักษากล้าเชื้อสายพันธุ์กลายในสถานะต่างๆ เช่น การใช้ freeze-dried หรือ spray-dry เพื่อเก็บรักษากล้าเชื้อให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PGA และมีอายุการเก็บที่ยาวนานสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป (Burgain et al. 2011, Santivarangkna et al. 2007)

5.2.2 ควรมีการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์กลายต่อคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เช่น สี กลิ่น เนื้อสัมผัส เปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ (SB-MYP-1)

5.2.3 ควรมีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนและตำแหน่งที่กลายพันธุ์ของสายพันธุ์กลายด้วยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Marty et al. 2012)

รายการอ้างอิง

- ถั่วเน่าแผ่น. (2553). [On-line]. Available: <http://www.oknation.net/blog/print.php?id=659706>
- ปิยะวรรณ กาสลัก และ รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์. (2554). รายงานการวิจัย การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล่าเชื้อในการหมัก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พิชามญช์ น้อยสุวรรณ. (2545). การผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกโดย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ถั่วเน่า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิสุทธิ พวงนาค. (2542). การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัศมิกร สิงห์เจริญ. (2544). การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนจากถั่วเน่าที่สามารถผลิต กรดแกมมาพอลิกลูตามิก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มาลินี สิงห์โตทอง. (2551). การกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อเพิ่มการสร้าง ไนจีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วาสนา กิตติกันกรัตน์. (2546). การศึกษาสูตรและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* TISTR 001. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สมบูรณ์ ชนาศุภวัฒน์. (2553). เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.
- สมใจ ศิริโชค. (2537). เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สุหทัย จิระนนทิพร. (2543). การกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้าง เดกซ์แทรนเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทาง อุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Varma, A. J. and Gokhale, D. V. (2007). Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresource Technology**. 98: 1467-1473.
- Ali, A. and Dahot, M. U. (2009). Characterization of crude alkaline protease of soybean (Glycine Max) Seeds. **Sindh University Research Journal** 41: 7-14.
- Allagheny, N., Obanub, Z. A., Campbell-Plattc, G. and Owens, J. D. (1996). Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. **International Journal of Food Microbiology**. 29: 321-333.
- Ashiuchi, M., Soda, K. and Misono, H. (1999). A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 263: 6-12.
- Ashiuchi, M., Nakamura, H., Yamamoto, T., Kamei, T., Soda, K., Park, C., Sung, M. H., Yagi, T. and Misono, H. (2003). Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 23: 249-255.
- Ashiuchi, M., Nawa, C., Kamei, T., Song, J. J., Hong, S. P., Sung, M. H., Soda, K., Yagi, T. and Misono, H. (2001). Physiological and biochemical characteristics of poly γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. **European Journal of Biochemistry**. 268: 5321-5328.
- BAM. (2001). **Bacteriological Analytical Manual Online Edition 2001 (US-FDA)**. Aerobic plate count. Chapter 3.
- Bertram, J. (2000). The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. 21: 167-223.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**. 104: 467-483.
- Burrus, V. and Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. **Research in Microbiology**. 155: 376-386.

- Candela, T. and Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**. 60: 1091-1098.
- Champagne, C. P., Mondou, F., Raymond, Y. and Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International**. 29: 555-562.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. and Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**. 28: 241-245.
- Chiu, C. S., Ho, P. L. and Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology**. 107: 1031-1041.
- Choi, S. H., Park, J. S., Whang, K. S., Yoon, M. H. and Choi, W. Y. (2004). Production of microbial biopolymer, poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* BS 62. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**. 47: 60-64.
- Chukeatirote, E., Chainum, C., Siengsubchart, A., Moukamnerd, C., Chantawannakul, P., Lumyong, S., Boontim, N. and Thakang, P. (2006). Microbiological and biochemical changes in Thua nao fermentation. **Research Journal of Microbiology**. 1: 38-44.
- Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., Chukeatirote, E. and Frazier, R. A. (2011). Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean. **Food Chemistry**. 125: 342-247.
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. and Zarkesh-Esfahani, H. (2011). High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New Biotechnology**. 28: 756-760.
- Drake, J. W. and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 96: 13910-13913.
- Elijah, A. A., Kola, O. J., Yadav, A. and Chandral, B. T. (2012). Improvement of laccase production in *Phuerotus pulmonarius*-LAU 09 by mutation. **Journal of Microbiology Research**. 2: 11-17.
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H. and Sawayama, S. (2009). Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulose production by mutation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 107: 256-261.

- Fu, Y. Q., Xu, Q., Li, S., Chen, Y. and Huang, H. (2010). Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of fumaric acid by reducing ethanol synthesis pathway. **Korean Journal Chemical Engineering**. 27: 183-186.
- Genckal, H. (2004). Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. **Department: Biotechnology and Bioengineering**. Izmir Institute of Technology
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. and Gelbart, W. M. (2000). **An Introduction to Genetic Analysis**. 7th edition. W. H. Freeman: New York.
- Hadden, C. T., Foote, R. S. and Mitra, S. (1983). Adaptive response of *Bacillus subtilis* to N-methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine. **Journal of Bacteriology**. 153: 756-762.
- Ho, G. H., Ho, T. I., Hsieh, K. H., Su, Y. C., Lin, P. Y., Yang, J., Yang, K. H. and Yang, S. C. (2006). γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**. 53: 1363-1384.
- Hosoi, T. (2010). Strain typing of *Bacillus subtilis* (natto) using a modified randomly amplified polymorphic DNA method. **Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center**. 5: 45- 48.
- Huang, J., Du, Y., Xu, G., Zhang, H., Zhu, F., Huang, L. and Xu, Z. (2011). High yield and cost-effective production of poly (γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*. **Engineering in Life Sciences**. 11: 291-297.
- Hungund, B. S. and Gupta, S. G. (2010). Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**. 9: 5170-5172.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Abbas, Q. S., Anjum, Z. M., Ashraf, I., Lee, K. J. and Haq, U. I. (2010). Mutation induced enhanced biosynthesis of lipases by *Rhizopus oligosporus* var. *Microsporus*. **Pakistan Journal of Botany**. 42: 1235-1249.
- Inatsu, Y., Kimura, K. and Itoh, Y. (2002). Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast asia: Comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains. **Japan Agricultural Research Quarterly**. 36: 169-175.

- Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L. and Kawamoto, S. (2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Letters in Applied Microbiology**. 43: 237-242.
- Iqbal, S., Khalid, Z.M. and Malik, K. A. (1995). Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**. 21: 176-179.
- Jetawattana, S. (2001). **Selection and characterization of mutants deficient in ethanol oxidizing ability from *Acetobacter pasteurianus* SKU1108**. Master of science (Microbiology) Kasetsart University.
- John, R. P. and Nampoothiri, K. M. (2008). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 3105-3109.
- Joshi, D. S., Singhvi, M. S., Khire, J. M. and Gokhale, D. V. (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. **Biotechnology Letters**. 32: 517-520.
- Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. and Gokhale, D. V. (2006). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. **Process Biochemistry**. 41: 120-126.
- Karmaker, S., Saha, T. K., Yoshikawa, Y. and Sakurai, H. (2009). A zinc (II)/poly (γ -glutamic acid) complex as an oral therapeutic for the treatment of type-2 diabetic KKA^y mice. **Macromolecular Bioscience**. 9: 279-286.
- Krishna, E. R., Kumar, P. S. and Kumar, B. V. (2011). Strain improvement of selected strain *Bacillus subtilis* (MTCC No.10619) for enhanced production of antimicrobial metabolites. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. 1: 32-38.
- Lim, S. M., Kim, J., Shim, J. Y., Imm, B. Y., Sung, M. H. and Imm, J. Y. (2012). Effect of poly- γ -glutamic acids (PGA) on oil uptake and sensory quality in doughnuts. **Food Science and Biotechnology**. 21: 247-252.
- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E. Lacroix, C. and Meile, L. (2012). Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. **Food Microbiology**. 29: 157-166.

- Natto. (2010). [On-line]. Available: <http://boingboing.net/2009/11/20/taste-test-natto.html>
- Patel, R. K. (2006). Purification and Charecterization of alkaline protease from a newly isolate haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Process Biochemistry**. 41: 2002-2009.
- Patil, S. V., Bathe, G. A., Patil, A. V., Patil, R. H. and Salunkea, B. K. (2009). Production of bioflocculant exopolysaccharide by *Bacillus subtilis*. **Advanced Biotech**. 4: 4-7.
- Prestidge, L., Gage, V. and Spizizen, J. (1971). Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. 107: 815-823.
- Rakariyatham, N., Butr-Indr, B., Niamsup, H. and Shank, L. (2006). Improvement of myrosinase activity of *Aspergillus* sp. NR4617 by chemical mutagenesis. **Electronic Journal of Biotechnology**. 9: 379-385.
- Ranadive, P., Mehta, A. and George, S. (2011). Rational selection and screening of mutant strains of *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 for improved production of coenzyme Q10. **International Conference on Life Science and Technology**. 3: 141-145.
- Ronald, M. A. (2010). **Handbook of microbiological media**. (4th ed). USA: CRC Press.
- Sangkharak, K., Vangsirikul, P. and Jantachai, S. (2012). Strain improvement and optimization for enhanced production of cellulase in *Cellulomonas* sp. TSU-03. **African Journal of Microbiology Research**. 6: 1079-1084.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**. 23: 302-315.
- Saurabh, S., Jasmine, I., Pritesh, G. and Rajendra, K. S. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. using soybean as substrate. **Malaysian Journal of Microbiology**. 3: 1-6.
- Sawyer, S. A., Parsch, J. and Zhang Z, Hartl, D. L. (2007). Prevalence of positive selection among nearly neutral amino acid replacements in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104: 6504-6510.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**. 50: 1-17.

- Sharma, A. D., Gill, P. K., Bhullar, S. S. and Singh, P. (2005). Improvement in inulinase production by simultaneous action of physical and chemical mutagenesis in *Penicillium purpurogenum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 21: 929-932.
- Sher, M. G., Nadeem, M., Syed, Q., Irfan, M. and Baig, S. (2012). Protease production from UV mutated *Bacillus subtilis*. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**. 47: 69-76.
- Shih, I. L. and Van, Y. T. (2001). The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various application. **Bioresource Technology**. 79: 207-225.
- Shih, I. L., Wu, P. J. and Shieh, C. J. (2005). Microbial production of a poly (γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. 40: 2827-2832.
- Shyu, Y. S. and Sung, W. C. (2010). Improving the emulsion stability of sponge cake by the addition of γ -polyglutamic acid. **Journal of Marine Science and Technology**. 18: 895-900.
- Shyu, Y. S., Hwang, J. Y. and Hsu, C. K. (2008). Improving the rheological and thermal properties of wheat dough by the addition of γ -polyglutamic acid. **LWT**. 41: 982-987.
- Siripong, P., Chuleekorn, S. and Duangporn, P. (2012). Enhanced cellulose production by ultraviolet (UV) irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis of an *Acetobacter* species isolate. **African Journal of Biotechnology**. 11: 1433-1442.
- Snustad, D. P. and Simmons, M. J. (2000). Mutation DNA repair and recombination. In H. David (ed.), **Principles of Genetics**. pp. 358-390. New York: John Wiley & Sons.
- Stephen, I. B., Wang, J. S., Lu, J. F., Siao. and Chen, B. H. (2009). Adsorption of toxic mercury (II) by an extracellular biopolymer poly (γ -glutamic acid). **Bioresource Technology**. 100: 200-207.
- Stitzel, M. L., Durso, R. and Reese, J. C. (2001). The proteasome regulates the UV-induced activation of the AP-1-like transcription factor Gcn4. **Genes & Development**. 15: 128-133.
- Strain Development. (2010). [On-line]. Available:
www.cheric.org/ippage/e/ipdata/2004/02/file/e200402-401.pdf

- Sundhagul, M., Samanmarthroj, P. and Bhodacharoen, W. (1972). Thua-nao: A fermented soybean food of northern Thailand. **Thai Journal of Agricultural Science**. 5: 43-56.
- Sung, M. H., Park, C., Kim, C. J., Poo, H., Soda, K. and Ashiuchi, M. (2005). Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: Synthesis, production, and applications. **The Japan Chemical Journal Forum and Wiley Periodicals**. 5: 352-366.
- Tahara, Y., Urushibata, Y., Terahara, H. and Tokuyama, S. (1998). γ -polyglutamic acid biosynthesis and metabolic pathway in *Bacillus subtilis* NR-1. **International Conference on Bacilli**. Japan.
- Tamang, J. P. and Nikkuni, S. (1998). Effect of temperatures during pure culture fermentation of Kinema. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 14: 847-850.
- Tanimoto, H. (2010). Food applications of poly-gamma-glutamic acid. **Microbiology Monographs**. 15: 156-168.
- Toscano, L., Gochev, V., Montero, G. and Stoytcheva, M. (2011). Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. 25: 2243-2247.
- Vietri, N. J., Marrero, R., Hoover, T. A. and Welkos, S. L. (1995). Identification and characterization of trans-activator involved in the regulation of encapsulation by *Bacillus anthracis*. **Gene**. 152: 1-9.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Potachareon, W., Panya, A. and Riebroy, S. (2005). Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of thua-nao inoculated with *Bacillus subtilis*. **Journal of Food Biochemistry**. 29: 349-366.
- Wang, H. W., Liu, D. M., Liu, Y., Cheng, C. F., Ma, Q.Y., Huang, Q. and Zhang, Y. Z. (2007). Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. **Letters in Applied Microbiology**. 44: 1-6.
- Weaver, R. F. and Hedrick, P. W. (1997). **Genetics**. 3rd ed., pp. 311-345. U.S.A.: W.M.C., Brown Publishers.
- Wei, Q., Wolf-Hall, C. and Chang, K. C. (2001). Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. **Journal of Food Science**. 66: 167-173.

- Weng, T. M. and Chen, M. T. (2012). Effect of drying methods on PGA, isoflavone contents and ACE inhibitory activity of natto (A fermented soybean food). **Journal of Food Processing and Preservation**. 10: 1-6.
- Xu, H., Jiang, M., Li, H., Lu, D. and Ouyang, P. (2005). Efficient production of poly (γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**. 40: 519-523.
- Xu, H., Jia, S. and Liu, J. (2011). Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. **African Journal of Biotechnology**. 10: 779-788.
- Yang, L. C., Wu, J. B., Ho, G. H., Yang, S. C., Huang, Y. P. and Lin, W. C. (2008). Effect of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 72: 3084-3090.
- Yokoigawa, K., Sato, M. and Soda, K. (2006). Simple improvement in freeze-tolerance of bakers' yeast with poly- γ -glutamate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 102: 215-219.
- Yoon, S. H., Do, J. H., Lee, S. Y. and Chang, H. N. (2000). Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**. 22: 585-588.
- Yossan, S., Reungsang, A. and Yasuda, M. (2006). Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. **ScienceAsia**. 32: 377-383.
- Zambare, V. (2010). Strain improvement of alkaline protease from *Trichoderma Reesei* MTCC-3929 by physical and chemical mutagen. **The IIOAB Journal**. 1: 25-28.
- Zheng, G. and Slavik, M. F. (1999). Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Letters in Applied Microbiology**. 28: 363-367.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Plate count agar (PCA)

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose	1 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครึ่งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ
15 มิลลิลิตร

1.2 Nutrient agar (NA)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครึ่งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ
15 มิลลิลิตร

1.3 Nutrient broth (NB)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครึ่งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 PGA agar

L-glutamic acid	20 กรัม
Citric acid	12 กรัม
Glucose	20 กรัม
NH ₄ Cl	7 กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 กรัม
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.04 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15 กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.104 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร

1.5 PGA broth

L-glutamic acid	20 กรัม
Citric acid	12 กรัม
Glucose	20 กรัม
NH ₄ Cl	7 กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 กรัม
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.04 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15 กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.104 กรัม

ละลายส่วนผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2. สารเคมี

2.1 Tris-maleate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris-hydroxymethyl amino methane 12.1 กรัม

Maleic acid 11.6 กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง และนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris-hydroxymethyl amino methane 1.21 กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.4 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก ถ่ายใส่ขวดและนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3 Tris-borate-EDTA ความเข้มข้น 10X

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris-hydroxymethyl amino methane 108 กรัม

Boric acid 55 กรัม

EDTA 9.3 กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่ขวดและนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.4 Sodium citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Citric acid 21.01 กรัม

Sodium citrate 29.41 กรัม

ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง และนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.5 Sodium chloride ความเข้มข้น 0.85 % (w/v)

Sodium chloride 8.5 กรัม

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

2.6 Safranin O ความเข้มข้น 0.1 % (w/v)

Safranin O 1 กรัม

ละลาย safranin O ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ่ายใส่ขวดสีชา

2.7 EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

EDTA 18.61 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

2.8 Loading dye

ประกอบด้วย

Urea 2.4 กรัม

Sucrose 5 กรัม

Bromophenol blue 1 มิลลิลิตรจาก 0.5 % ของ stock

Xylene cyanol 1 มิลลิลิตรจาก 0.5 % ของ stock

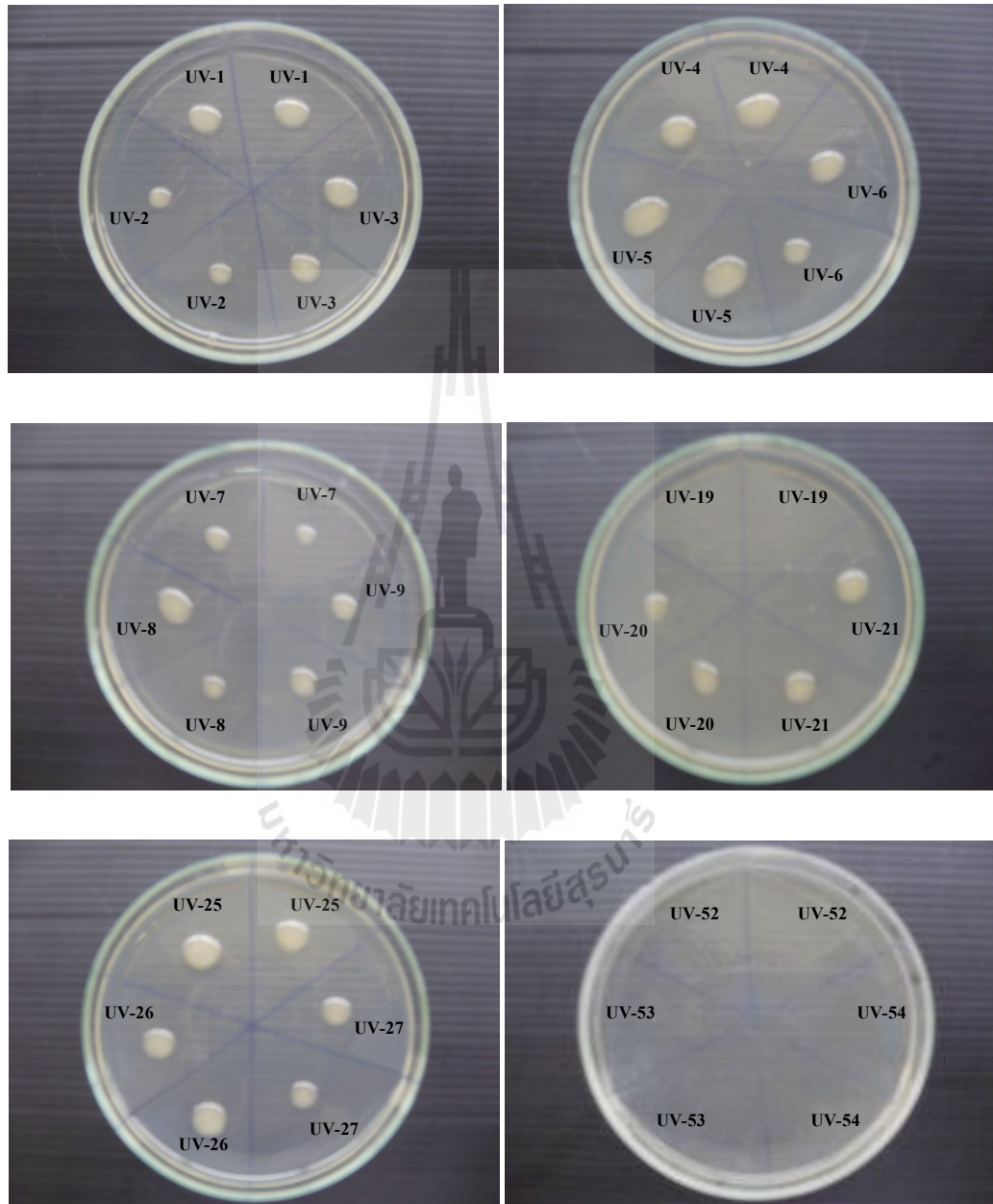
0.5M EDTA 2 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

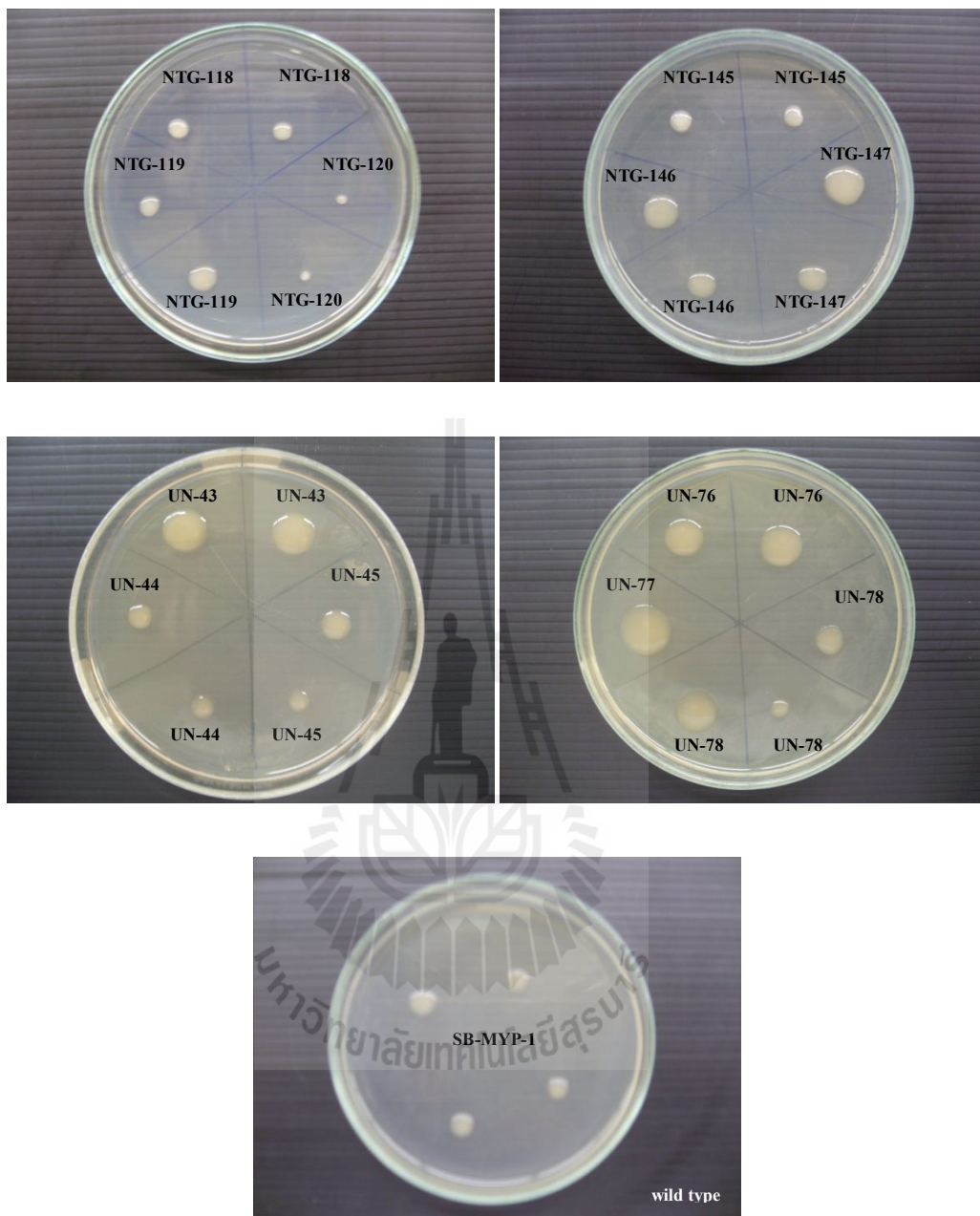
ตัวอย่างการทำ spot test ในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์เบื้องต้นเพื่อการผลิต PGA



UV คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

NTG คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยสารเคมี NTG

UN คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG



UV คือ ไอโซเลตของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

NTG คือ ไอโซเลตของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยสารเคมี NTG

UN คือ ไอโซเลตของกล้าเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลทางสถิติและผลการทดลอง

ตารางภาคผนวก ค 1 การวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการผลิต PGA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ 36 ใน PGA broth จากการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ทีปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5867.208	38	154.400	220.137	.000
Within Groups	54.708	78	.701		
Total	5921.916	116			

ตารางภาคผนวก ค 2 การวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการผลิต PGA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ 36 ใน PGA broth จากการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ทีปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	148.926	9	16.547	39.777	.000
Within Groups	8.320	20	.416		
Total	157.246	29			

ตารางภาคผนวก ค 3 การวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการผลิต PGA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ 36 ใน PGA broth จากการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1902.901	12	158.575	874.186	.000
Within Groups	4.716	26	.181		
Total	1907.617	38			

ตารางภาคผนวก ค 4 การวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ปริมาณการผลิต PGA สูงสุดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เจริญใน Nutrient broth ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1485.361	10	148.536	60.566	.000
Within Groups	29.430	12	2.452		
Total	1514.790	22			

ตารางภาคผนวก ค 5 การวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ปริมาณการผลิต PGA สูงสุดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เจริญใน PGA broth ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18.001	10	1.800	51.066	.000
Within Groups	.423	12	.035		
Total	18.424	22			

ตารางภาคผนวก ค 6 การวิเคราะห์ห้ำาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ปริมาณการผลิต PGA สูงสุดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	360.046	10	36.005	51.363	.000
Within Groups	7.711	11	.701		
Total	367.757	21			

ตารางภาคผนวก ค 7 สรุปความเข้มข้นของการผลิต PGA สูงสุดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เจริญใน nutrient broth PGA broth และระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ความเข้มข้น PGA (mg/ml , g) (ชั่วโมงที่มีการผลิต PGA สูงสุด)		
	nutrient broth	PGA broth	ถั่วเหลืองหมัก
SB-MYP-1 (wild type)	3.50±3.04(24) ^b	22.55±0.20(36) ^a	23.85±0.16(48) ^a
UV-112	8.99±3.21(12) ^{b, *}	25.35±0.17(36) ^{a, *}	11.10±2.34(24) ^{b, *}
NTG-17	22.64±0.08(24) ^{b, *}	25.14±0.11(24) ^{a, *}	18.48±1.03(24) ^{c, *}
NTG-53	17.52±0.28(12) ^{b, *}	25.69±0.17(24) ^{a, *}	16.18±0.28(12) ^{c, *}
NTG-88	12.71±0.42(12) ^{c, *}	25.88±0.22(24) ^{a, *}	19.24±0.11(24) ^{b, *}
NTG-132	26.18±0.19(24) ^{ab, *}	26.10±0.03(24) ^{ab, *}	20.48±0.47(12) ^{b, *}
NTG-146	24.10±0.14(12) ^{b, *}	26.18±0.19(12) ^{a, *}	23.11±0.92(12) ^b
UN-43	21.94±0.42(12) ^{b, *}	24.63±0.33(36) ^{a, *}	24.49±0.03(48) ^a
UN-48	26.04±0.17(24) ^{a, *}	25.16±0.19(36) ^{b, *}	24.11±0.11(24) ^c
UN-81	26.90±0.17(12) ^{a, *}	24.72±0.25(36) ^{b, *}	21.21±0.11(60) ^{c, *}
UN-84	24.41±0.08(12) ^{b, *}	24.78±0.22(36) ^{ab, *}	24.98±0.06(60) ^a

UV คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

NTG คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยสารเคมี NTG

UN คือ ไอโซเลตของกล้ำเชื้อกลายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG

* คือ มีความแตกต่างกันในแนวตั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1)

a, b, c คือมีความแตกต่างกันในแนวนอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

นายจิตติกร มหิสนันท์ เกิดเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 จากนั้นสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตโปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร (เกียรตินิยมอันดับ 2) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2553

ประสบการณ์ทำงาน

- ผู้ช่วยสอนวิชา 315212 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร 1 ในภาคการศึกษา 1/2554 1/2555 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ผู้ช่วยสอนวิชา 315214 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร 2 ในภาคการศึกษา 2/2554 2/2555 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ผู้ช่วยสอนวิชา 315232 ปฏิบัติการการแปรรูปอาหาร 1 ในภาคการศึกษา 3/2554 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี