

Thesis Title	Alkaline Pectinase Production by Bacterial Strain Isolated from Thua Nao
Author	Miss Potchanan Kruetatch
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai

ABSTRACT

Thua nao samples from various locations in the northern part of Thailand were collected. For isolation, samples were cultivated in liquid medium and 24 isolates which produced visible halo around the colony were obtained. After screening by spot plate technique, ten isolates were found to be good and moderate pectinase producing strains. These isolates were tested for capability of enzyme production by cultivation in a modified JG liquid medium. It was found that isolate SN24 produced the highest alkaline pectinase activity (0.82 U/ml) after cultivation for 24 hours. Morphological and biochemical studies showed that isolate SN24 was *Bacillus subtilis*. To enhance the alkaline pectinase production by the isolate SN24, the fermentation parameters were optimized, and the optimal conditions were as the follows: yeast extract pectin (YEP) medium as inoculum medium, pectin K as carbon sources, yeast extract as nitrogen source and glucose as supplementary carbon

source. Plackett-Burman design was applied to find out for other variables factors affected on alkaline pectinase production. The results indicated that glucose and ammonium sulfate significantly affected on alkaline pectinase production at the level above 95%. The central composite design (CCD) was used to determine the optimal concentrations and interactions between experimental variables. The optimum level of each variable was as follows: 11.69 g/l pectin, 1.0 g/l yeast extract, 1.49 g/l glucose, 0.90 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/l K_2HPO_4 , 0.1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l NaCl and 0.01 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The alkaline pectinase production yield at the optimum condition was 1.98 U/ml. The optimal physiological factors on alkaline pectinase production were pH 10.0, 37°C and 12 hours and found that the activity of alkaline pectinase were increased to 3.37 U/ml. The optimum pH and temperature for maximum alkaline pectinase activity were 9.5 and 37°C, respectively. It retained 90-98% of its activity over a broad pH range and 98% of its maximum activity at 37°C for 1 hour.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอสโดยเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดแยกจากถั่วเน่า
ผู้เขียน	นางสาว พงษ์นันทน์ เครือเทศน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ หาญเมืองใจ
	บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าจากแหล่งต่างๆ ในภาคเหนือของประเทศไทยเพื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอสโดยบดตัวอย่างถั่วเน่าผสมในอาหารเหลว พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค Spot plate ทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้ขนาดของวงใสในกลุ่มกว้างและปานกลางจำนวน 10 ไอโซเลต นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว modified JG เพื่อทดสอบการผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอส โดยวัดค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์เพคตินเอสที่เชื้อสร้างขึ้น พบว่าไอโซเลต SN24 ให้ค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์เพคตินเอสสูงสุด (0.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ที่ 24 ชั่วโมง จากโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลต SN24 คือ *Bacillus subtilis* ในการเพิ่มการผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอสโดยเชื้อไอโซเลต SN24 ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการหมัก โดยพบว่าอาหารที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อ แหล่งเพคติน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนเสริม ได้แก่ อาหาร yeast extract pectin (YEP) เพคติน K สารสกัดจากยีสต์ และกลูโคส ตามลำดับ เป็นปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอส จากนั้นใช้แผนการทดลองแบบ Plackett - Burman เพื่อคัดเลือกปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอส จากผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส และแอมโมเนียซัลเฟตเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตอัลคาไลน์เพคตินเอส ในการหาความเข้มข้นที่

เหมาะสม และความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ถูกคัดเลือกโดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite (CCD) พบว่าไอโซเลต SN24 ผลิตอัลคาไลน์เพคตินได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นเพคติน 11.69 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร กลูโคส 1.49 กรัมต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.90 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.5 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร NaCl 0.2 กรัมต่อลิตร และ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดสอบปรากฏว่าอัลคาไลน์เพคตินมีค่ากิจกรรม 1.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์เพคติน พบว่าที่ pH 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 12 ชั่วโมง จะผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ 3.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือที่ pH 9.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าอัลคาไลน์เพคตินมีความคงตัว 90-98 เปอร์เซ็นต์ที่ pH ในช่วงกว้าง และมีความคงตัวสูงสุด 98 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาการทดสอบ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved