ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารจากกากมัสตาร์ดโดยแบคทีเรียที่แยกได้

ชื่อผู้เขียน นางสาวกัญญา ปรีชาศุทธิ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม ประธานกรรมการ
ดร.ไพโรจน์ กิจจนะพานิช กรรมการ
ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์ กรรมการ

## บทคัดย่อ

จากการนำแป้งมัสตาร์ดชนิด M1 M7 M10 และกากมัสตาร์ด (DMM) มาเตรียมเป็นอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข (4%(w/v)ในน้ำกลั่น) ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เป็น 0.152, 0.032, 0.051 และ0.028 มก./มล.ตามลำดับ พบว่าอาหาร M1 M7 และ DMM ที่เตรียมได้มีสีเหลือง ขุ่น ส่วนอาหารมัสตาร์ด M10 มีสีเหลืองใสใกล้เคียงอาหาร Nutrient broth และ Nutrient agar เชื้อที่ทดสอบทุกชนิดได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis, E.coli, Bacillus spp, M. luteus, B.megaterium, S.moltophilia* ยีสต์ *Rhodotorula sp.* และเชื้อรา *Aspergillus spp,* และ *Rhizopus spp.* สามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง 4 ชนิดทั้งในสภาพอาหารเหลวและอาหารแข็ง เมื่อนำแป้งและกากมัสตาร์ดมาเตรียมเป็นอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 (4%(w/v)ใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์) พบว่าอาหารเหลวที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าอาหารสูตร 1ข 4-15 เท่า (ปริมาณโปรตีน 0.292, 0.574, 0.726 และ 0.293 มก./มล.ตามลำดับ) และอาหารมีสีน้ำตาลเข้ม

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกากมัสตาร์ดจำนวน 49 ตัวอย่าง โดยสังเกตการให้วงใสรอบโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็งสกิมมิลค์ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 20 ชนิดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเมื่อนำไปคัดเลือกต่อในอาหารเหลวเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ *B. licheniformis*

เมื่อนำเชื้อ *B. licheniformis* มาผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้อาหารมัสตาร์ด สูตร 3 เปรียบเทียบกับอาหารมัสตาร์ด สูตร 4 (1-4%(w/v)ใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่แยกตะกอน) พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารมัสตาร์ด M10 สูตร 4 ความ

เข้มข้น 3 %(w/v) ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง และเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ทำงานได้ดีที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อตรวจสอบสมบัติทางจลนศาสตร์ พบว่ามีค่าความเร็วเริ่มต้น Vo เป็น 34.96 ไมโครกรัมต่อนาที ให้ค่า Km เป็น 0.144 เปอร์เซนต์ และ Vmax 39.06 ไมโครกรัมต่อนาที เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Thesis Title Protease Production in Mustard Meal-Derived Media by Isolated Bacteria

Author Miss Kanya Preechasuth

M.S. Biotechnology

Examining Committee

| | |
|---|---|
| Asst. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham | Chairman |
| Dr. Pairoje Kijjanapanich | Member |
| Dr. Hataichanoke Niamsup | Member |

## ABSTRACT

Mustard meal-derived media (Formular 1b), prepared from mustard powder M1 M7 M10 and Defated mustard meal (DMM), at concentration of 4% w/v of distilled water contained 0.152, 0.032, 0.051 and 0.028 mg soluble protein/ml respectively. Clarified mustard medium M10 was colorless, similarly to Nutrient broth and Nutrient agar while others were yellow and turbid. All of the media in liquid and solid form could support the growth of *B. subtilis*, *E. coli*, *Bacillus spp*, *M. luteus*, *B. megaterium*, *S. maltophilia*, *Rhodotorula sp*, *Aspergillus spp.* and *Rhizopus spp.*. The brownish mustard medium Formular 3 which were prepared by using 0.1 M NaOH as a solvent contained 4-15 times higher protein contents (0.292, 0.574, 0.726 and 0.293 mg/ml, respectively).

Bacteria isolated from forty-nine samples of mustard meal were screened on skim milk agar medium for their ability to produce protease. Twenty bacterial isolates producing clear zone were further examined for their extent of protease production in liquid medium. The most potent protease producer was identified as *Bacillus licheniformis*.

Therefore, *B. licheniformis* was used to produce protease in 1-4%(w/v) particle mustard media Formular 4 (in 0.1 M NaOH) compared with 4% (w/v) (Formular 3) of M1 M7 M10 and DMM. The highest yield of protease was achieved by using 3%(w/v) of M10 mustard media, (Formular 4) pH 6.0 incubated at 32 $^{0}$C for 24 h. The protease were

optimally active at pH 10.0 and 50$^{0}$C. The kinetic parameters were then measured. The initial velocity was 34.96 µg/min for 1 % casein, Michalis constant (Km) value against casein substrate was 0.144 % and maximum reaction velocity (Vmax) was 39.06 µg/min.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University