Thesis Title Production and Characterization of Polygalacturonase from *Bacillus subtilis* MR10

Author Miss Vivin Valentine

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Dr. Chartchai Khanongnuch

ABSTRACT

Pectinases are well described enzymes that are widely used to degrade pectic substances and applied in fruit juice extraction and clarification, degumming of plant fibers, tea and coffee fermentations, etc. This group of enzymes has been reported to have a share of 25% in the global sales of food enzymes. The main purpose of this research is to characterize the polygalacturonases produced by *Bacillus subtilis* MR10, a bacterium isolated from Tua-nao. This bacterium showed the clear zone when grown in pectin agar plate and produced pectinase activity as 0.99 U/ml in liquid medium containing 0.5% (w/v) pectin as the carbon source after cultivation at 37ºC for 15 hours with 200 rpm on rotary shaker. Medium optimization was performed using Plackett and Burman design and central composite design (CCD). The predicted optimal medium contained 2.05% (w/v) pectin, 0.03% (w/v) $Mn_2SO_4.H_2O$ and 1.68% (w/v) SBM in pectin-induced medium. Finally, the maximum pectinase activity as much as 2.08 U/ml was obtained after growing the bacteria in optimized medium for 24 hours which was calculated to be 2.1 folds of activity increase with 97% validation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

It was found that *B. subtilis* MR10 produced two isozymes of polygalacturonases (PGs) designed as PG I and PG II and both were partial purified by evaporation, DEAE Sephadex A-50 column chromatography and Sephacryl S-100 gel filtration. Partial purified PG I showed final specific activity as 0.26 U/mg and 2.7 purification folds. Whereas, the partial purified PG II was obtained with specific activity as 3.43 U/mg and 35 folds of purification. Estimated native molecular weight (MW) of PGI that was estimated by gel filtration was 84.96 kDa, in the contrary, PG II was only 12.9 kDa. SDS PAGE and zymogram (activity staining) revealed the nature of PG I as dimeric protein consisted of two identical subunits with each subunit was 47 kDa, approximately. In addition, PG II was monomeric enzyme with approximately 13.3 kDa MW. Both of PGs showed similar optimum temperature at 50ºC with half life at 70ºC of PG I was shorter than PG II. Optimum pH was at pH 10 and pH 9 for PG I and II, respectively. From the K_m and V_{max} value, PG II showed higher activity toward pectin than PG I, but all PGs had almost the same rate of reaction. Metal ion Mn^{2+} stimulated activity of both isozymes, while Cu^{2+} has inhibitory effect. The pectin hydrolysis pattern of two PGs demonstrated that both were exo-type PGs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โพลีกาแลคทู-โรเนสจาก *Bacillus subtilis* MR10

ผู้เขียน นางสาววิวิน วาเลนไทน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ชาติชาย โขนงนุช

บทคัดย่อ

เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามานานและเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสารในกลุ่มเพคติน ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้และการทำให้น้ำผลไม้ใส ใช้ในกระบวนการลอกกาวของเส้นใยพืช รวมทั้งใช้ในการหมักชาและการแฟ และอื่นๆ อีกมากมาย มีรายงานว่าปริมาณการใช้เอนไซม์ชนิดนี้สูงถึง 25 เปอร์เซนต์ของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทั้งหมดของโลกวัตถุประสงค์หลักของการวิจัยครั้งนี้คือการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ซึ่งแยกได้จากถั่วเน่า แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดวงใสในอาหารอาหารแข็งเพคติน และผลิตเอนไซม์เพตติเนส 0.99 ยูนิต/มิลลิลิตร

ทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยใช้การวางแผนการทดลอง Plackett and Burman design และ central composite design (CCD) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คือปริมาณเพคตินและแร่ธาตุบางชนิด จากการวิเคราะห์โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD surface response methodology ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วยอาหารชักนำการสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์ที่เติมเพคติน 2.05% (w/v) มังกานีสซัลเฟต 0.03% (w/v) กากถั่วเหลือง 1.68% (w/v) ทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ในปริมาณ 2.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้น 2.1 เท่า คิดเป็น 97% validation

จากการศึกษาพบว่า *Bacillus subtilis* MR10 สามารถผลิตเอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสได้ 2 ไอโซไซม์ให้ชื่อว่า PG I และ PG II และทั้งสองไอโซไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดย DEAE-Sephadex A-50 column chromatography และ Sephacryl S-100 gel filtration จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่า PG I มีความบริสุทธ์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่าและมีค่า Specific activity เท่ากับ 0.26 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในขณะที่ PG II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 35 เท่า และมีค่า Specific activity เท่ากับ 3.43 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ผลของการทำ SDS-PAGE และ Zymogram ทำให้สรุปได้ว่า PG I มีโครงสร้างเป็นดิเมอริกโปรตีนที่มีหน่วยย่อยขนาดประมาณ 47 kDa ในขณะที่ PG II เป็นโมโนเมอริกเอนไซม์ที่มีขนาดประมาณ 13.3 kDa เอนไซม์ทั้งสองไอโซไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ 50 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสค่าครึ่งชีวิตของ PG II มีค่าน้อยกว่า PG I และค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานคือ pH 10 สำหรับ PG I และ pH 9 สำหรับ PG II พิจารณาจากค่า K_m และ V_{max} พบว่า PG II สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกว่า PG I ในขณะที่อัตราการทำปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน ไอออนของ Mn^{2+} สามารถกระตุ้นการทำงานของทั้งสองไอโซไซม์ในขณะที่ Cu^{2+} มีผลในทางตรงกันข้าม จากรูปแบบการย่อยสลายเพคตินสามารถจัดไอโซไซม์ทั้งสองเป็นชนิดเอ็กโซโพลีกาแลคทูโรเนส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved