หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการทำบริสุทธิ์ของบีตา-แมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* M7

ผู้เขียน นายนัฐพงษ์ แซ่ตั้ง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ชาติชาย โขนงนุช

บทคัดย่อ

Bacillus subtilis M7 เป็นแบคทีเรียที่มีความบกพร่องในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากการชักนำ *B. subtilis* MR10 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีเอ็กซ์ เป็นสายพันธุ์ที่พัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์บีตา-แมนนาเนสสำหรับการผลิตแมนโนออลิโกแซ็กคาไรด์จากบีตา-แมนแนนในกากมะพร้าว จากการศึกษาแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-แมนนาเนส คือแอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลือง ตามลำดับ ในการศึกษาการคัดเลือกองค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-แมนนาเนส โดยใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบ Plackett and Burman design พบว่า กากมะพร้าวเป็นปัจจัยเชิงบวกปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-แมนนาเนส จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมะพร้าวในการผลิตเอนไซม์บีตา-แมนนาเนส พบว่า กากมะพร้าว 6 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด กับองค์ประกอบอื่นๆ ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.3 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.8 จากสูตรอาหารที่ได้เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 ชั่วโมง *B. subtilis* M7 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 12.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ เมื่อใช้โลคัสบีนกัมและผงบุกเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสูตรอาหารที่ใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 2.3 เท่า อย่างไรก็ตาม สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ที่พีเอช 6.8-7.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการในการผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่าที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 16.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และการผลิตเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ 1.26 และ 1.30 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ การเติมโซเดียมคลอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไรด์เข้มข้นร้อยละ 3 ลงในสารละลายเอนไซม์หยาบช่วยเพิ่มความเสถียรให้เอนไซม์โดยพบกิจกรรมคงเหลือ 94% ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 วัน

เอนไซม์บีตา-แมนนาเนสจาก *B. subtilis* M7 ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุและเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี เอนไซม์ที่ได้มีขนาดประมาณ 42 กิโลดาลตัน อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 50-60 องศาเซลเซียสและที่พีเอช 5.0-7.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียสและที่พีเอช 4.0-9.0 การศึกษาผลของไอออนต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า โคบอลต์ แมงกานีส เหล็ก อะลูมิเนียมไอออน และเมอร์แคปโทเอทานอล มีส่วนในการช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับโลหะ ส่วนค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ เท่ากับ 30.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1347.76 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ลักษณะแมนโนออลิโกแซ็กคาไรด์จากการไฮโดรไลซ์กากมะพร้าวโดยเอนไซม์บีตา-แมนนาเนสบริสุทธิ์คล้ายกับออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากโลคัสบีนกัม อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตแมนโนออลิโกแซ็กคาไรด์จากซับสเตรตทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Production and Purification of β-mannanase from *Bacillus subtilis* M7
Author	Mr. Nuttapong Saetang
Degree	M.S. (Biotechnology)
Advisor	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch

Abstract

Bacillus subtilis M7 is a lipase defective mutant strain obtained by X-ray mutagenesis of *B. subtilis* MR10. The bacterial strain has been developed for using as the β-mannanase producer for application in mannooligosaccharide production from β-mannan in copra meal. In this research, *B. subtilis* M7 was investigated for the capability of β-mannanase production for application in the MOS production. The most suitable inorganic nitrogen and organic nitrogen sources for β-mannanase production were ammonium sulphate and soybean meal, respectively. Screening for the influential ingredient affecting on enzyme production by Plackett and Burman experimental design was performed and the result indicated that only copra meal was the positive significant factor influenced on the β-mannanase productivity ($P< 0.05$). The optimal concentration of copra meal for enzyme production was investigated and it was found that copra meal 6.0 g/l gave the highest β-mannanase activity with other ingredients of 5 g/l soybean meal, 0.3 g/l K_2HPO_4, 1 g/l KH_2PO_4, 1 g/l $CaCl_2.2H_2O$, 0.05 g/l $ZnSO_4.7H_2O$, 2 g/l $(NH_4)_2SO_4$ and 0.2 g/l $MgSO_4.7H_2O$, initial pH 6.8. Time course study of enzyme production using the optimal medium found that the bacterial strain produced β-mannanase 12.65 U/ml at 30 h cultivation. In addition, the activities obtained from the optimized medium with locust bean gum and konjac flour were higher than the activity that of copra meal approximately 2.3 folds. The optimum condition for *B. subtilis* M7 β-mannanase production was an initial pH range of 6.8-7.0 and 37°C. Moreover, the β-mannanase production using optimized medium in a 5-L bioreactor at 37°C for 30 h found that higher agitation rate at 400 rpm gave the higher enzyme activity of 16.51

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

U/ml, which was more than the activity obtained at 200 rpm and from laboratory scale approximately 1.26 and 1.30 folds, respectively. Furthermore, addition of 3% (w/v) sodium chloride to crude β-Mannanase solution enhanced the enzyme stability as 94% of its initial activity after stored at 4°C for 42 days.

β-Mannanase from *B. subtilis* M7 was purified to apparent homogeneity by ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. The purified enzyme is a single band of protein with molecular weight of 42 kDa. The optimum temperature and pH of β-mannanase activity was 50-60°C and pH ranging from 5.0-7.0. It was stable for 24 h at 4°C between pH 4.0 and 9.0, and for 1 h up to 60°C. The enzyme showed high specific requirements for Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+} ions and mercaptoethanol, to enhance enzyme activity. It was found that the enzyme was the metal-dependent enzyme. The Michaelis-Menten constants (K_m), and maximum velocity (V_{max}) values were 30.34 mg/ml and 1347.76 μmole/min/ml, respectively. Furthermore, the pattern of MOS from copra meal hydrolysis by purified enzyme was similar to MOS obtained from locust bean gum hydrolysis. However, the quantity of MOS products from both substrates was different.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved