

นิตา ร่มสันทา 2552: สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกขาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขา จุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปทุมพร ฉิมเอนก, Dr.Eng. 152 หน้า

Bacillus sp. C4 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นไหม ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกขาวไหมได้ดีที่สุด วัตถุประสงค์ของการศึกษารังนี้ ก็เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอสจาก C4 โดยเริ่มจากการคัดเลือกวัตถุดิบ และพบว่าแป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวที่เหมาะสมตามลำดับ จากนั้นทำการกลั่นกรองปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ Plackett-Burman design ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษามี 7 ชนิด คือ แป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง skim milk พีเอช เริ่มต้น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น พบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน Modified BSM medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยปัจจัยที่นำมาศึกษา คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง ปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า พบว่าแบบจำลองมีความแม่นยำสูงสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 91.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้ค่าทำนาย (จากแบบจำลอง) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (1,575.5 units/ml) คือ แป้งถั่วเหลือง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) skim milk 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และความเร็วรอบในการเขย่า 280 rpm ส่วนค่าสังเกตของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,536.9 units/ml ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (729.0 units/ml) ถึง 2.2 เท่า นอกจากนี้ยังได้เพาะเลี้ยง C4 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร เพื่อเป็นการยืนยันความสำคัญของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก C4 โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่พีเอช 7.5 อัตราการกวน 350 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm และค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้คงที่ตลอดการทดลอง สามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเป็น 1,898.1 units/ml โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM ที่เหมาะสมในฟลาสก์ (1,575.5 units/ml)

Nisa Romsomsa 2009: Optimized Conditions for Silk Degumming Protease Production from *Bacillus* sp. C4 by Response Surface Methodology. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Patoomporn Chim-anage, Dr.Eng. 152 pages.

Bacillus sp. C4 was isolated from waste water of Thai silk industry, and determined as a potential protease producer for silk degumming process. The objective of this research is to optimize the medium and cultivation condition for growth and protease production from C4. The prior selection of raw materials suited for protease production was employed by simple screening method in BMSM broth as a basal medium. Hydrolyzed cassava starch, soy flour and skim milk were selected to be suitable carbon, nitrogen sources and the enzyme inducer, respectively. Plackett-Burman design was introduced for screening of seven variables for protease production, i.e., hydrolyzed cassava starch, soy flour, skim milk, initial pH, temperature, shaker speed and inoculum size. The results indicated that soy flour and skim milk were significant variables on protease production ($P \leq 0.05$). Hence soy flour, skim milk and shaker speed were further optimized via central composite design (CCD) and response surface methodology for potential use on an industrial scale. The analysis of variance (ANOVA) showed the adequacy of the model ($R^2 = 0.912$) and verification experiments confirmed its validity. According to the model, the predicted maximal protease production was 1,575.5 units/ml and the corresponding concentrations of soy flour and skim milk were 2.0% (w/v), 0.1% (w/v) and 280 rpm of shaker speed, respectively. However the observed value of maximum protease production was 1,536.9 units/ml which was a 2.2-fold increase as compared to that of unoptimized condition in shake flask (729.0 units/ml). To emphasize the aeration necessity, C4 was cultivated in 2 liter stirred tank reactor containing the optimized BMSM medium and controlling pH, agitation rate, temperature, aeration rate and dissolved oxygen at 7.5, 350 rpm, 30°C, 2 vvm and 70% air saturation, respectively. Accordingly, the result obtained was 1,898.1 units/ml of enzyme which was an about 1.2-fold increase as compared to that in the shake flask with optimized BMSM medium (1,575.5 units/ml).