

ต้นสนีย์ ฤณกลาง : การสกัดแอลคาไลน์โปรทีเอสจากน้ำหมักของ *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลูรูชตัน (EXTRACTION OF ALKALINE PROTEASE FROM FERMENTATION BROTH OF *Bacillus subtilis* TISTR 25 USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM IN OLDSHUE-RUSHTON COLUMN) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร.สิริรุ่ง ปริชานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. นภา ศิวรังสรรค์, 122 หน้า ISBN 974-14-2176-1

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลูรูชตันขนาด 5.7 ลิตร โดยวัฏภาคต่อเนื่องมีองค์ประกอบของ ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 19.65%(w/w) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.35%(w/w) และ น้ำกรอง 72 % (w/w) วัฏภาคกระจายตัวมีองค์ประกอบของ พอลิเอทิลีนไกลคอล 1000 42.5%(w/w) ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75%(w/w) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.75%(w/w) และน้ำกรอง 55%(w/w) ซึ่งการทดลองจะประกอบด้วยการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยจะทำการหาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง (20 40 และ 55 %)(w/w) อิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว โดยกำหนดให้สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวคงที่ ที่ 3:1 (42/12, 69/28 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที) และอิทธิพลของการปั่นกววนของใบพัด (100 และ 140 รอบนาที) โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการสกัดได้แก่ จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสระหว่างวัฏภาค และโปรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด รวมถึงจะทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้ จากการวิจัยพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลูรูชตันขนาด 5.7 ลิตร คือ ที่ค่าความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที และที่การปั่นกววนของใบพัดที่อยู่ในช่วง 100-140 รอบต่อนาที โดยจะให้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสระหว่างวัฏภาคเท่ากับ 1.39-1.43 เท่า 52.14 - 51.78 เปอร์เซ็นต์ และ $4.49-4.52 \times 10^{-4}$ นาที⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรนี้สามารถสกัดน้ำหมักได้ 76.82 ลิตรในระยะเวลาสกัด 1 วัน ส่วนการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรทีเอสที่ผ่านการสกัดแล้วซึ่งกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคกระจายตัวที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาเก็บ 3 สัปดาห์ พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงจากเริ่มต้นเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์

4770473421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT

KEY WORD: AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM(ATPS)/ALKALINE PROTEASE /
OLDSHUE RUSHTON

SANSANEE KOONKLANG: EXTRACTION OF ALKALINE PROTEASE
FROM FERMENTATION BROTH OF *Bacillus subtilis* TISTR 25 USING
AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM IN OLDSHUE-RUSHTON COLUMN.
THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SEEROONG PRICHANONT, Ph.D.,
THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF. NAPA SIWARUNGSON. Ph.D. 122
pp. ISBN 974-14-2176-1

The aim of this research was to determine optimal conditions for extraction of alkaline protease from *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth using aqueous two-phase system in Oldshue-Rushton column 5.7 liter. Extraction was done in continuous mode with dispersed phase composed of (by weight) PEG 1000 42.5%, dipotassiumhydrogenphosphate 1.75%, potassiumdihydrogen phosphate 0.75%, water 55% flowing upwards and continuous phase of dipotassium hydrogenphosphate 19.65%, potassium dihydrogenphosphate 6.35%, water 55% flowing downwards. The research was to study effects of fermentation broth concentration(20,40 and 55% w/w), continuous/dispersed flow rates(42/12, 69/20 and 97/28 ml/min),and impeller revolution speed(100 and 140 rpm) on purification factor, yield percent, over all mass transfer coefficient, and enzyme activity in continuous phase profile in extraction column. The stability of the extracted alkaline protease in PEG rich-phase was also studied. It was found that the optimal conditions for alkaline protease extraction in Oldshue-Rushton column 5.7 liter were 55% w/w fermentation broth, continuous/dispersed phase flow rate of 97/28 ml/min, and impeller speed of 100-140 rpm. These conditions gave purification factor, yield percent, and overall mass transfer coefficient of 1.39-1.48, 52.14 - 51.78 % and $4.49-4.52 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, respectively. with this volumetric flow rate, fermentation broth of 76.82 l could be extracted within one day of operation.. It was also found that the activity of the extracted alkaline protease dissolve in PEG 1000 rich phase system reduced its initial activity from 14.3 percent after keeping at $30 \pm 2^\circ \text{C}$ for 3 weeks.