ฐิติกร มหิสนันท์ : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกด้วยวิธีการใช้รังสีและ/หรือสารเคมี (*Bacillus subtilis* PRODUCING POLY-γ-GLUTAMIC ACID (PGA) STRAIN IMPROVEMENT BY RADIATION AND/OR CHEMICAL) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*เพื่อการผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (PGA) โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต การใช้สารเคมีN-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine (NTG) และการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมีNTG ผลการศึกษาจากการคัดกรองโดยวัดผลผลิต PGAที่กล้าเชื้อผลิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ใน PGA broth ณ ชั่วโมงที่ 36 โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SB-MYP-1) พบว่า การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการปรับปรุงสายพันธุ์ พบ 1 ไอโซเลต คือ UV-112 การใช้สารเคมี NTG พบ 5 ไอโซเลต ได้แก่ NTG-17 NTG-53 NTG-88 NTG-132 และ NTG-146 และการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG พบ 4 ไอโซเลต ได้แก่ UN-43 UN-48 UN-81 และ UN-84 รวมสายพันธุ์กลายทั้งสิ้น 10 ไอโซเลต จากนั้นนำสายพันธุ์กลายนี้มาใช้เป็นกล้าเชื้อทดสอบการเจริญและการผลิต PGA ช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ nutrient broth (อาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม) PGA broth และในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง พบว่าการผลิต PGA ของสายพันธุ์กลายทั้ง 10 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่ไม่มีความคงที่ สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิต PGA ใน PGA broth สูงและผลผลิต PGA มีความสม่ำเสมอกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตซึ่งสายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี NTG นี้มีความเหมาะสมในการนำไปผลิต PGA บริสุทธิ์ทางการค้าในระดับอุตสาหกรรมส่วนสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี NTG มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ UN-48 ที่ให้ผลการผลิต PGA ในถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่าหรือนัตโตะ) เท่ากับ 24.11±0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมณ ชั่วโมงที่ 24 และผลผลิต PGA มีความสม่ำเสมอในระหว่างระยะเวลาการหมักถั่วเหลืองซึ่งมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อการผลิต PGA และลดระยะเวลาการหมักถั่วเหลืองเพื่อให้มีคุณค่าทางโภชนาการทางอาหารและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จากการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมเบื้องต้นด้วยวิธีเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์จากการใช้ไพร์เมอร์แบบสุ่มพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *B. subtilis* กลายพันธุ์ทั้ง 10ไอโซเลตให้แถบ(band) พีซีอาร์ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

THITIKORN MAHIDSANAN : *Bacillus subtilis* PRODUCING POLY-γ-GLUTAMIC ACID (PGA) STRAIN IMPROVEMENT BY RADIATION AND/OR CHEMICAL. THESIS ADVISOR: ASST. PROF.PIYAWAN GASALUCK,Ph.D., 87 PP.

Bacillus subtilis/POLY-γ-GLUTAMIC ACIDPRODUCTION/ULTRAVIOLET RADIATION/NTGMUTATION/STRAIN IMPROVEMENT

The aim of this research was to improve the *Bacillus subtilis* starter culture for a high yield production of poly-γ-glutamic acid (PGA) by ultraviolet radiation (UV), N-methyl-N-nitro-nitroso-guanidine (NTG) and a combined treatment of UV and NTG induced mutagenesis. The results of primary screening, based on the maximum PGA production by mutant strains were significantly different ($P< 0.05$) in PGA broth at 36 h compared to the wild type (SB-MYP-1),showed only one isolate (UV-112) UV mutant. Five NTG mutagenesis (NTG-17, NTG-53, NTG-88, NTG-132,NTG-146) and four combined treatment (UN-43, UN-48, UN-81, UN-84) isolates were found as well. Those of 10 mutant potential strains were then tested for growth profile and PGA production in nutrient broth (control medium), PGA broth and solid state soybean fermentation for 72 h. The PGA production of 10 mutant isolates in nutrient broth was higher than that of the wild type, but the PGA yields were instable during 72 h. Five NTG mutant isolates produced a higher yield of PGA and had more stable profiles in PGA broth than the wild type and the UV mutant profile, which would be suitable for PGA commercial production. There was only one UN-48 mutant by

ultraviolet radiation and NTG showing a potential 24.11±0.11mg/g PGA with the highest yield at 24 h and a stable PGA profile during soybean fermentation. It is therefore possible touseUN-48 as a starter culture for decreasing fermented soybean production time to achieve an acceptable nutritional value. The characteristics of genomic DNA by random amplified polymorphic DNA (RAPD) of 10 mutant isolateswere similar to those ofthe wild type.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____