**Thesis Title** Screening and Optimization of Protease Production by Proteolytic Bacteria for Deproteinization of Crab Shell for Green Chitin Production

**Author** Miss Chonlachat Jaihao

**Degree** Master of Science (Biotechnology)

**Advisor** Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai

## ABTRACT

The production of chitin by using enzyme producing microorganism is a green technology in the utilization of shellfish processing wastes. In this study, protease-producing microorganism were isolated from soil samples in four areas of Thailand in a medium containing 2% crab shell powder, 0.1% $K_2HPO_4$, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ and 2% agar. Forty-five isolates were obtained from the first screening and twenty-nine strains formed clear zone on such medium. These isolates will be used for study protease production in liquid medium containing crab shell powder and the deproteinization of crab shell wastes. After shaken at 37°C for 2 days 2 isolates from Suratthani's soil and 2 isolates from Chiang Mai's soil can produced the high protease activity. The ECM04 isolate produced highest protease activity (2.64 unit/ml). This isolate was used for study the optimization condition for deproteinization for chitin production. The optimize conditions for protease production was shaken at 37°C for 36 hours in 100 ml of liquid medium containing 7% crab shell powder, 0.1% $K_2HPO_4$, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ and 3% carboxymethyl cellulose (CMC) pH 8.0. In the application of remove protein from crab shell wastes, it was found that isolate ECM04 can deproteinize protein 63.78% on the 3rd day. On this day, maximum protease activity appeared also (3.74 unit/ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การคัดกรองและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยแบคทีเรียย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้ในการกำจัดโปรตีนในเปลือกปูสำหรับการผลิตไคตินเพื่อสิ่งแวดล้อม

**ผู้เขียน** นางสาวชลฉัตร ใจห้าว

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ผศ. ดร. ประเสริฐ หาญเมืองใจ

## บทคัดย่อ

การผลิตไคตินโดยการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เป็นเทคโนโลยีสะอาดในการใช้ประโยชน์ของเสียทางกระบวนการผลิตอาหารทะเล การศึกษานี้ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินตัวอย่างใน 4 พื้นที่ของประเทศไทยโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของ ผงเปลือกปู 2 เปอร์เซ็นต์, $K_2HPO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ จากการคัดเลือกครั้งแรกพบว่ามีจุลินทรีย์ 45 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ และมีจุลินทรีย์ 29 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างวงใสได้ในอาหารนี้ จุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้เพื่อศึกษากระบวนการผลิตโปรติเอสในอาหารเหลวที่มีเปลือกปูเป็นส่วนประกอบ และการกำจัดโปรตีนจากของเสียประเภทเปลือกปู ภายหลังจากการเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์จากดินจังหวัดสุราษฎร์ธานี และเชื้อ 2 สายพันธุ์จากดินจังหวัดเชียงใหม่สามารถสร้างกิจกรรมของเอนไซม์โปตีเอสได้สูง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ผงเปลือกปู 2 เปอร์เซ็นต์, $K_2HPO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 2 สายพันธุ์จากดินในพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี และได้เชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์จากดินในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตโปรติเอสได้ในปริมาณสูง จุลินทรีย์สายพันธุ์ ECM04 ผลิตโปรติเอสได้ในปริมาณมากที่สุดคือ (2.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้จะถูกใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อผลิตไคตินต่อไป สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์คือ การเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยผงเปลือกปู 7 เปอร์เซ็นต์, $K_2HPO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ carboxymethyl cellulose (CMC) 3 เปอร์เซ็นต์ และ pH 8.0 ความสามารถในการกำจัดโปรตีนออกจากเปลือกปูพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ ECM04 สามารถกำจัดโปรตีนได้ 63.78 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง และในวันเดียวกันนี้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสก็สูงสุดเช่นเดียวกัน (3.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved