ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียโดยการหมักบนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

ชื่อผู้เขียน นางสาวมธุรส ชัยหาญ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิญญา ผลิโกมล	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ลำยอง	กรรมการ
อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียจากดินในนาข้าวของจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 220 ไอโซเลท ที่สามารถใช้ไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MC176 ที่แยกได้จาก อ.แม่ริม มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงโดยวิธีการหมักในสภาพแข็งที่มีเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียดเป็นสับสเตรทโดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 1.59U/gIDS (Unit/gram Initial Dried Substrate) และ specific activity เท่ากับ 0.70 U/mg protein จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียไอโซเลท MC176 พบว่าเป็น *Bacillus thuringiensis* เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *B. thuringiensis* MC176 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส คือ เมื่อใช้เปลือกกุ้งผสมกับฟางข้าว อัตราส่วน 1:1 ที่มีอาหารพื้นฐาน 10 มิลลิลิตร มี ball-milled chitin 1.0% น้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน การผลิตไคติเนสมีปริมาณสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร pH ของอาหารหมักเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน โดยมีเชื้อตั้งต้นเป็น bacteria suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการใช้รังสีอัตตลาไวโอเลตกำลังไฟ 30 วัตต์ ระยะห่าง 30 เซนติเมตร ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 27 ชั่วโมง พบว่าสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* MC176 นี้ ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 1.80

U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.54 U/mg protein จากการศึกษาคุณสมบัติของ crude enzyme ของ *B. thuringiensis* MC176 ที่กลายพันธุ์ พบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C pH เท่ากับ 7.0 เวลาที่เหมาะสมในการบ่มคือ 1 ชั่วโมง มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C สับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คือ dialyzed colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง pH เท่ากับ 7.0 เอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* MC176 ที่กลายพันธุ์ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, hydrophobic chromatography, ion-exchange chromatography และ gel filtration พบว่าค่า chitinase activity มีค่า เท่ากับ 3.0 U/ml และค่า specific activity เท่ากับ 10.0 U/mg protein ความบริสุทธิ์ของ chitinolytic enzyme เพิ่มขึ้น 6.6 เท่า ปริมาณเอนไซม์ที่เหลือเท่ากับ 3% ผลการทำ SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 2 แถบ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 40 kDa และ 47 kDa

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Thesis Title	Production of Bacterial Chitinase by Solid Substrate Fermentation of Shrimp Shells
Author	Miss Mathurot Chaiharn
M.S.	Biology
Examining Committee	Assistant Professor Abhinya Plikomol — Chairperson Associate Professor Dr. Saisamorn Lumyong — Member Dr. Dararat Tongkao — Member

Abstract

Two hundred and twenty bacterial isolates capable of using chitin from shrimp shells as carbon source were isolated from paddy soil samples in Chiang Mai province. The isolate MC176 from Mae Rim district gave the highest chitinase activity of 1.59 U/gIDS (Unit/gram Initial Dried Substrate) and specific activity of 0.70 U/mg protein when cultured by solid state fermentation using fine grounded shrimp shells as substrate. Morphological and some biochemical properties revealed that MC176 was *Bacillus thuringiensis*. The optimal conditions for chitinase production by *B. thuringiensis* MC176 were investigated. The most suitable conditions were to use fine grounded shrimps shell : rice straw 1:1 in 10 ml of modified basal medium containing 1.0% (w/v) ball-milled chitin as carbon source without adding nitrogen source. The highest yield of chitinase was obtained when cultivated in 125 ml Erlenmeyer flask, initial pH of medium was 7.0, incubated at 37°C for 14 days using 1 ml of bacterial suspension. Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* MC176 was carried out by using 30 watts ultraviolet radiation at the distance of 30 centimeters, every 3 hours for 27 hours. The highest chitinase activity produced by the mutant was 1.80 U/gIDS and specific activity was 0.54 U/mg protein. Characterization of crude enzyme produced by the mutant of *B. thuringiensis* MC176 indicated. The optimum conditions for the

enzyme reaction were 37°C, pH 7.0 and incubation time 1 hr. The stability of the crude enzyme was found at 4°C. The suitable substrate for the mutant was dialyzed colloidal chitin from shrimp shells at pH 7.0. The crude enzyme of *B. thuringiensis* MC176 mutant was purified by precipitation with ammonium sulfate, followed by hydrophobic chromatography, ion-exchange chromatography and gel filtration. The chitinase activity of purified enzyme was 3.0 U/ml and specific activity was 10.0 U/mg protein. A typical procedure provided 6.6-fold purification with 3% yield .The molecular mass of the chitinolytic enzymes was found to be approximately 40 kDa and 47 kDa by SDS-PAGE.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University