ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตไคติเนสโดยเชื้อราในการหมักแบบแห้งบนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

ชื่อผู้เขียน นางสาวนารีลักษณ์ นาแก้ว

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิญญา	ผลิโกมล	**ประธานกรรมการ**
รองศาสตราจารย์วันชัย	สนธิไชย	**กรรมการ**
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชชา	สอาดสุด	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนจากตัวอย่างดิน เห็ด แมลง เปลือกกุ้ง และเชื้อราบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้อาหารที่มีคอลลอยดอลล์ไคติน (colloidal chitin) เป็นสับสเตรท สามารถแยกเชื้อราได้ 106 ไอโซเลท ทดสอบการผลิตไคติเนสโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) เป็นระยะเวลา 5 วัน นำเชื้อราที่ให้ค่า enzyme activity สูง 20 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตไคติเนสบนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เชื้อราไอโซเลท CK_{44} ซึ่งจัดจำแนกได้ว่าเป็นจีนัส *Basipitospora* sp. ที่แยกได้จากเปลือกกุ้ง ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด เท่ากับ 81.5 milliunit/ml (mU/ml) และ specific activity เท่ากับ 3.86×10^{-3} mU/mg เชื้อราไอโซเลท CK_{44} เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง Malt extract yeast extract glucose agar (MYG) pH 8 ที่อุณหภูมิ 30 °C

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราไอโซเลท CK_{44} ในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง คือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) ความชื้น 67% pH 5 มี colloidal chitin 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ 2% เป็นแหล่งไนโตรเจน สกัดเอนไซม์ด้วย 0..2 M phosphate buffer pH 7

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำแข็ง โดยใช้ spore suspension ที่ได้จากเชื้อราอายุ 7 วัน บนอาหารวุ้นเอียงเป็นเชื้อตั้งต้น เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง เป็นเวลา 16 วัน ให้ค่า enzyme activity สูงสุดเท่ากับ 34.5 mU/ml และ specific activity 14.5×10^{-4} mU/mg เอนไซม์ไคติเนสทำงานได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 40°C pH 5 โดยใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์ 30 นาที

จากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 214.73 เท่า จาก culture filtrate

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Thesis Title Chitinase Production by Mold in Solid-Substrate Fermentation of Prawn and Shrimp Shells

Author Ms. Nareeluk Nakaew

M.S. Biology

Examining Committee :

Assist. Prof. Abhinya Plikomol	**Chairman**
Assoc. Prof. Wanchai Sonthichai	**Member**
Assist. Prof. Dr. Vicha Sardsud	**Member**

Abstract

One hundred and six isolates of moulds capable of using colloidal chitin as carbon source were isolated from soil, mushrooms, insect, shrimp shells and stock cultures of the Microbiological Laboratory, Faculty of Science, Chiang Mai University. Each isolate was tested for production of chitinase in enzyme production medium (EPM) for 5 days. Twenty isolates that gave high enzyme activity in EPM were tested for production of chitinase by solid-substrate fermentation of prawn and shrimp shells for 2 weeks. Isolate CK_{44} later identified as *Basipetospora* sp. from shrimp shells, was selected for further studies. This isolate showed high chitinase activity of 81.5 milliunit/ml (mU/ml) giving the specific activity of 3.86×10^{-3} mU/mg. The isolated CK_{44} grew more rapidly on malt extract yeast extract glucose agar (MYG) medium pH8 at 30°C.

The optimum conditions for chitinase production by isolate CK_{44} in solid-substrate fermentation of prawn and shrimp shells were at room temperature (28±2°C), 67 % moisture content and pH 5 with 1%colloidal chitin as carbon source and 2%$NaNO_3$ as nitrogen source.

After 16 days cultivation , the fungus gave the highest enzyme activity of 34.5 mU/ml and the specific activity of $14.5x10^{-4}$ mU/mg. The enzyme was extracted for one hour in an ice bath with 0.2 M phosphate buffer pH 7. Spore suspensions prepared directly from 7 days old slant were the most appropiate and effective inoculum for enzyme activity study. Chitinase was optimally active after 30 minutes incubation time at a pH of 5 and 40°C .

The culture filtrate of *Basipetospora* sp CK_{44} was partial purified by precipitation with ammonium sulfate , the enzyme was purified about 214.73 fold higher than the culture filtrate.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University