หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองและการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไคติเนส โดย *Streptomyces* sp. CMU-NKS-5	
ผู้เขียน	นางสาว นภัสนันท์ โกษาวัง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	อาจารย์ ดร. มธุรส ชัยหาญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในการทดลองทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที้งหมด 104 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ทำการทดสอบโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี 4% (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ค่าอัตราส่วน H/C จะทำการคำนวณระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (H) และ โคโลนี (C) ผลการทดลอง พบว่า 25 ไอโซเลท ให้ค่าอัตราส่วนของ H/C มากกว่า 1 และ ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) colloidal chitin บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลอง พบว่า 10 ไอโซเลท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง เมื่อวัดด้วยวิธี dinitrosalicylic method โดยพบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 มีค่าอัตราส่วนของ H/C สูงสุดเท่ากับ 2.33 และ มีค่า chitinase activity เท่ากับ 1,949 mU/ml เชื้อนี้แยกมาจากดินรอบรังปลวก และ นำมาระบุสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทางชีวเคมี และ การวิเคราะห์ข้อมูลของยีน 16S rRNA ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และ ชีวเคมี พบว่า จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* นอกจากนี้ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ ด้วยลำดับเบสบน 16S rRNA พบว่าไอโซเลทนี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ NBRC 15711 ที่ 98%

จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้การทดลองแบบปัจจัยเดียว พบว่า chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ casein และ KNO_3 จากนั้นคัดเลือกส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้การทดลองแบบ Plackett and Burman design ผลการทดลอง พบว่า chitin powder, casein และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

K_2HPO_4 นั้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นทำการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ chitin powder และ casein ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณของ chitin powder และ casein ที่เหมาะสม คือ 15 และ 0.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมที่มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ในอาหารที่เหมาะสม ประกอบด้วย chitin powder (15 g/L) เป็นแหล่งคาร์บอน casein (0.88 g/L) เป็นแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ KNO_3 (1 g/L) เป็นแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ K_2HPO_4 (0.7 g/L), KH_2PO_4 (0.03 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0.03 g/L) และ trace element (10 ml/L) โดยมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ ใช้เชื้อตั้งต้นปริมาณ 2.0% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 130 rpm เป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าของ chitinase activity เท่ากับ 145 mU/ml และ ค่าของ specific activity เท่ากับ 40.374 mU/mg protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Screening and Optimizations of Chitinase Production by *Streptomyces* sp. CMU-NKS-5	
Author	Miss Napatnun Kosawang	
Degree	Master of Science (Applied Microbiology)	
Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Lect. Dr. Mathurot Chaiharn	Co-advisor

ABTRACT

One-hundred and four actinomycete isolates were screened for chitinase production on agar containing 4% (w/v) colloidal chitin as carbon source incubated at 30°C for 10-14 days. The H/C ratio was computed as the clear zone diameter (H) dividual by colony diameter (C). Twenty-five isolates had a H/C ratio greater than 1. The chitinase production was tested in enzyme production medium (EPM), containing 1% (w/v) colloidal chitin and incubated at room temperature for 7 days. Ten isolates gave a high chitinase activity as measured with the dinitrosalicylic method. Isolate CMU-NKS-5 showed the highest H/C ratio on agar cultured as 2.33 and chitinase activity on liquid culture as 1,949 mU/ml. This strain was isolated from termite nest soil and identified by morphological, biochemical and 16S rRNA gene analyses. The morphology and biochemical character of isolate CMU-NKS-5 placed it in the genus *Streptomyces*. In addition, phylogenetic analysis of 16S rRNA gene suggested that this isolate is related to *S. bungoensis* NBRC 15711 with 98% nucleotide similarity.

In single factor design, carbon source was found to be chitin powder and proper nitrogen sources were casein and KNO_3. The medium components were optimized for chitinase production by *Streptomyces* sp. CMU-NKS-5. The factors that affected chitinase production were evaluated by Plackett and Burman design. Chitin powder, casein and K_2HPO_4 had significant effect on chitinase production. Central Composite Design was used to estimate the optimal concentration of chitin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

powder and casein for chitinase production. The optimal concentration of chitin powder and casein was 15 and 0.88 g/L, respectively.

The optimum conditions for maximum chitinase production by *Streptomyces* sp. CMU-NKS-5 were succeeded using optimized medium containing chitin powder (15 g/L) as carbon source, casein (0.88 g/L) as organic nitrogen source, KNO_3 (1 g/L) as inorganic nitrogen source, K_2HPO_4 (0.7 g/L), KH_2PO_4 (0.03 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0.03 g/L) and trace element (10 ml/L) and initial pH 5.0, using 2.0% (v/v) seed inoculum. Cultures were incubated at room temperature with shaking at 130 rpm for 7 days. Under these conditions, the highest chitinase activity was 145 mU/ml and specific activity was 40.374 mU/mg protein.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved