งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงแบบ submerged ของการผลิตไคทิเนส โดยเชื้อโคลน Chi60 และ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับขวดเขย่า (shaking-flask) และระดับถังหมัก (fermenter) การเลี้ยงในขวดเขย่าของเชื้อโคลน Chi60 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp. TU09 สามารถเจริญและผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 40% และความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที และการเลี้ยงในถังหมักไคทิเนส Chi60 มีแอคติวิตีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่ DO 2.5 % และเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนส Chi60 ด้วย HPLC พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ ไดเมอร์ โดยได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินกุ้ง ไคทินแกนหมึก และเปลือกกุ้ง ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในขวดเขย่าของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินที่จังหวัดนครปฐมสามารถเจริญและผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MM ที่ใช้ไคทินกุ้งและเปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ใช้ 2.0% ไคทินกุ้งปั่นละเอียด และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 50% และใช้ 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียด และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 10% โดยไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุดในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่ 0.25 % yeast extract นอกจากนี้ผลของแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca, Cu มีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนสน้อยมาก ยกเว้น 0.01% Cu ไคทิเนสมีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่ใช้เปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีแอคติวิตีสูงสุดที่ DO 20% ลักษณะสมบัติของไคทิเนสต่างๆ พบว่า ไคทิเนสที่ผลิตจาก *A.caviae* D6 ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ pH 5 -10 โดยทำงานได้ดีที่สุดใน Tris-HCl buffer pH 7 อุณหภูมิ 50 °C และสามารถย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ คอลลอยดอลไคทิน และเบทาไคทิน เมื่อแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตี พบว่า ไคทิเนสจาก *A.caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตี 1 แถบ ขนาดประมาณ 60 kDa และพบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยเปลือกกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตีอย่างน้อย 3 แถบ ขนาดประมาณ 60, 70 และ 90 kDa ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก *A.caviae* D6 ด้วย HPLC พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ มอนอเมอร์ และได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก

The effects of submerged cultivation parameters on the production of chitinase Chi60 by *E.coli* and *Aeromonas caviae* D6 in shaking-flask and fermenter level were investigated. Chi60, cloned from *Serratia* sp. TU09, was expressed in *E.coli*. In the shaking-flask level, *E.coli* cells expressing Chi60 can grow and produce the optimal Chi60 activity when they are cultured in LB medium at 40% volume of medium per flask volume ratio, at 250 rpm. A 15 L fermentation level scale-up cultivation of *E.coli* expressing Chi60 was conducted. The highest chitinase activity was obtained when the dissolved oxygen concentration (DO) was set at 2.5%, at 37 ° C, while the pH was not controlled. *N, N'*-diacetyl chitobiose was the major product of Chi60. We discovered that colloidal chitin gave the highest yield followed by shrimp chitin, squid pen chitin and shrimp shell, respectively. *Aeromonas caviae* D6 isolated from soil in Nakhonpathom Province, Thailand, produce the highest chitinolytic activity when it was induced by flake shrimp chitin and flake shrimp shell. In the shaking-flask level, when flake shrimp chitin was used as carbon source the optimum cultivation condition was in minimum medium, MM, (0.25 % yeast extract, 0.1 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.03 % $MgSO_4.7H_2O$, 0.6 % KH_2PO_4, 1.0 % K_2HPO_4) containing 2 % flake shrimp chitin, 50 % volume of medium per flask volume ratio. When flake shrimp shell was used as carbon source, optimal activity was obtained when MM contains 1.5 % flake shrimp shell and 10 % volume of medium per flask volume ratio was used. Addition of Fe, Mn, Zn, Ca, or Cu did not have any further addition effect on the production chitinolytic enzymes. Scale-up cultivation with a 5 L fermenter was conducted. Highest chitinase activity was obtained when the DO was set at 20%, 37 °C, while the pH was not controlled. The optimum pH and temperature of the chitinolytic enzymes produced by *A. caviae* D6 was 5 -10 and 50°C, respectively. Substrate specificity of the enzyme was highest on PNAC (partially-*N*-acetylated chitin) followed by colloidal chitin and β-chitin, respectively. SDS-PAGE analysis shows a single chitinolytic activity band when *A. caviae* D6 was induced by flake shrimp chitin. However, at least three chitinolytic activity bands were found when *A. caviae* D6 was induced by flake shrimp shell. *N*-acetyl-D-glucosamine was the major product, identified by HPLC.