ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46272

SCREENING AND OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION BY PROTEOLYTIC BACTERIA FOR DEPROTEINIZATION OF CRAB SHELL FOR GREEN CHITIN PRODUCTION

CHONLACHAT JAIHAO

MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

b00256107

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46272

SCREENING AND OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION BY PROTEOLYTIC BACTERIA FOR DEPROTEINIZATION OF CRAB SHELL FOR GREEN CHITIN PRODUCTION

CHONLACHAT JAIHAO

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

SCREENING AND OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION BY PROTEOLYTIC BACTERIA FOR DEPROTEINIZATION OF CRAB SHELL FOR GREEN CHITIN PRODUCTION

CHONLACHAT JAIHAO

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

Pairote Wongputtisin
..... CHAIRPERSON
Dr. Pairote Wongputtisin

Phisit Seesuriyachan
..... MEMBER
Dr. Phisit Seesuriyachan

P. Hanmoungjai
..... MEMBER
Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai

THESIS ADVISOR

P. Hanmoungjai
.....
Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai

7 October 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGMENT

I am grateful to my advisor Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai for all valuable suggestions, constant help and encouragement throughout my thesis.

I am also deeply grateful to Dr. Pairote Wongputtisin, Maejo University and Dr. Phisit Seesuriyachan for their valuable comments and suggestions.

I am also thankful to all lecturers and staff members in Division of Biotechnology for suggestions and their helps.

Lastly, I am full of gratitude to my family for their understanding and supporting in everything.

Chonlachat Jaihao

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

E46272

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)

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยแบคทีเรียย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้ในการกำจัดโปรตีนในเปลือกปูสำหรับการผลิตไคตินเพื่อสิ่งแวดล้อม

ผู้เขียน นางสาวชลฉัตร ใจห้าว

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ประเสริฐ หาญเมืองใจ

บทคัดย่อ

E46272

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

E46272

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)

TABLE OF CONTENTS

	Page
Acknowledgments	iii
Abstract (in English)	iv
Abstract (in Thai)	v
Table of contents	vii
List of tables	x
List of figures	xi
Abbreviations and symbols	xiii
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Literature Reviews	3
2.1 Crab shell	3
2.2 Chitin	8
2.2.1 Chitin in solid state	10
2.2.2 Soluble chitin and characterization	11
2.2.3 Chitin derivative	12
2.2.4 Application of chitin	16
2.3 Chitin production	17
2.3.1 Conventional processes	17
2.3.2 Bioprocesses	20
2.3.3 Proteolytic enzyme for deproteinisation	20

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

	Page
2.4 Proteases	21
Chapter 3 Materials and Methods	29
3.1 Material	29
3.1.1 Chitin powder	29
3.1.2 Soil samples	29
3.1.3 Media	29
3.2 Method	29
3.2.1 Isolation and screening of protease-producing microorganisms	29
3.2.2 Microscopic Morphology	30
3.2.3 16s rDNA sequence analysis	30
3.2.4 Measurement of protease activity	31
3.2.5 Protein determination	32
3.2.6 Measurement of total protein in crab shell	32
3.2.7 Inoculum preparation	33
3.2.8 Protease production in liquid phase fermentation	33
3.3 Effect of culture conditions on enzyme production	33
3.3.1 Effect of crab shell powder concentration	33
3.3.2 Effect of carbon source supplement	33
3.3.3 Effect of nitrogen source supplement	34
3.3.4 Effect of pH and temperature on enzyme production	34
3.4 Effect of pH and temperature on enzyme activity	34
3.5 Protein removal of crab shell wastes	35
3.6 Statistical analysis	35

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

	Page
Chapter 4 Results and Discussions	36
4.1 Isolation and screening of microorganisms	36
4.2 Morphological characteristic	38
4.3 16s rDNA sequence analysis	40
4.4 Effect of culture conditions on enzyme production	42
4.4.1 Effect of cultivation time	42
4.4.2 Effect of crab shell powder concentration on protease production	42
4.4.3 Effect of carbon source on protease production	43
4.4.4 Effect of nitrogen source on enzyme production	45
4.4.5 Effect of pH and temperature on enzyme production	46
4.5 Effect of pH and temperature on enzyme activity	47
4.6 Protein removal of crab shell wastes	49
4.7 Protein removal of crab shell in liquid phase fermentation	50
Chapter 5 Conclusions	53
References	54
Appendix	62
Curriculum Vitae	72

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Monthly crab products import of USA (In June 2011)	8
2.2	Utilization of marine crustacean waste as substrate and optimal condition	6
2.3	Sources of chitin and chitosan	10
2.4	Chitin derivatives and their proposed uses	14
2.5	Protease producing microorganism using marine crustacean waste as substrate	23
2.6	Commercial bacterial alkaline proteases, sources, applications and their industrial suppliers.	27
4.1	Forty-five isolates from different areas obtained from first screening	37
6.1	Volume of tyrosine standard (ml) on μmoles of tyrosine	67

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Chitin powder Structure of chitin, chitosan and cellulose	5
2.2	Structure of chitin, chitosan and cellulose Protease activity of 13 isolates obtained from different area	9
2.3	Overall process for the preparation of chitin from salted shrimp shells	18
3.1	Diagram of material preparation and measurement of protease activity	32
4.1	The morphology characteristic of 4 isolates which can produce higher protease enzyme	39
4.2	The morphology characteristic of strains ECM04	39
4.3	PCR product of the isolate ECM04	40
4.4	Phylogenetic tree of bacteria isolate ECM04	41
4.5	Effect of cultivation time on protease production and cell growth	42
4.6	Effect of crab shell concentration on enzyme activity	43
4.7	Enzyme activity in each carbon source supplement (0.5%)	44
4.8	Enzyme activity in each carboxymethyl cellulose concentration	44
4.9	Enzyme activity in each nitrogen source supplement (1.0%)	45
4.10	Effect of cultivation condition on protease production in various initial pH	46
4.11	Effect of cultivation temperature on protease production in different temperature	47
4.12	Effect of pH on enzyme activity	48
4.13	Effect of temperature on enzyme activity	49
4.14	Deproteinization of crab shell powder in liquid phase fermentation with isolate ECM04, soaked in water, soaked in 2 N NaOH, and incubated with crude enzyme	50
4.15	Deproteinization and protease activity of isolate ECM04	51

LIST OF FIGURES

Figure		Page
4.16	Residue protein after treated in each condition for 3 days compared with total protein in crab shell	52
6.1	Standard curve of μmoles tyrosine and absorbance of sample	68
6.2	Standard curve of bovine serum albumin (mg/ml) and absorbance of sample	70

ABBREVIATION AND SYMBOLS

°C	degree Celsius
%	percent
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
µl	microliter
µmole	micromole
rpm	Revolutions per minute
h	hour