Thesis Title Screening of Fungi and Optimization of Conditions for Tannase Production

Author Miss Phichayaphorn Aryuman

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Dr. Prasert Hanmoungjai

ABSTRACT

One hundred soil samples from different areas in Chiang Mai province were collected and screened. Samples were then cultivated in Czapek Dox's minimal agar medium containing tannic acid as the sole carbon source and incubated at 30 degree celsius for three days. The experiment found forty isolates which produced visible halo around the colony. These isolates were tested for capability of enzyme production by being cultivated in submerged and solid substrate cultivation. It was found that each fungal isolate could grow and produce maximum tannase activity in different culture condition. This was for example isolate 7PR1 which could grow and produce the highest tannase activity (1.677 units/mL) when cultivated in submerged cultivation, whereas isolate 56MS1 yielded the highest tannase activity (1.83 units/mL) when cultivated in solid substrate cultivation. Additionally, it was observed that the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

tannase activities produced by cultivating on solid–state cultivation were higher than those produced by submerged cultivation. As tannic acid used for tannase production is costly, this study employed agricultural wastes, i.e. mangosteen, longan and coffee husks, as potential substitutes. Chemical analysis showed that mangosteen, longan and coffee husks, contain 8.99, 7.20 and 6.93% w/w tannin (dry basis) respectively. Each of the Czapek Dox's minimual agar on which forty fungal isolates were cultivated contained extract from either mangosteen, longan or coffee husk as the sole carbon source. The experiment found that some isolates could grow and produce visible halo on agar medium containing the tannin extracted from all the three types of husks. These fungal isolates were also cultivated in each proper ground substrate mixed with liquid medium. The results showed that isolate 50MS1 (*Aspergillus ustus*) yielded the highest enzyme at 1.60 units / g dry solid substrate when cultivated on ground coffee husk. To obtain the best result, an initial inoculum had to be adjusted to 5×10^8 spores/mL. The appropriate media composition for the enzyme production was 2 g of ground coffee husk containing 4 mL of Czapek Dox's minimal medium with 0.05% w/v of starch soluble as carbon source and 1% w/v of ammonium chloride as nitrogen source. Optimal condition for tannase production was four-day incubation at 30 degree Celsius, pH 5.0, which yielded 17.74 units of tannase per grams of dry solid substrate.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อราและการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเอนไซม์แทนเนส

ผู้เขียน นางสาวพิชญาพร อายุมั่น

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ประเสริฐ หาญเมืองใจ

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างดินจำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่างๆในจังหวัดเชียงใหม่ มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox's minimal agar medium ที่มีกรดแทนนิคเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่เจริญและเกิดวงใสที่มองเห็นได้รอบ ๆ โคโลนีให้อยู่ในรูปของเชื้อที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวและอาหารแข็ง พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ดังเช่น เชื้อรา ไอโซเลท 7PR1 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์แทนเนสได้สูงสุด (1.677 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท 56MS1 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์แทนเนสได้สูงสุด (1.830 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว แต่อย่างไรก็ตาม กรดแทนนิคหรือแทนนินซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำสำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์แทนเนสนั้นมีราคาแพง ในการทดลองนี้จึงศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้แทนกรดแทนนิคในการผลิตเอนไซม์แทนเนสได้ ได้แก่ เปลือกมังคุด เปลือกลำไย และเปลือกกาแฟ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในของเหลือใช้ทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่ามีแทนนิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณร้อยละ 8.99, 7.20 และ 6.93 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 40 ไอโซเลทบนอาหารแข็ง Czapek Dox's minimal agar medium ที่มีน้ำสกัดจากเปลือกมังคุด เปลือกลำไย หรือเปลือกกาแฟเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่ามีเชื้อราที่สามารถเจริญและผลิตวงใสที่มองเห็นได้รอบ ๆ โคโลนีบนอาหารแข็งที่มีน้ำสกัดจากวัสดุเหลือใช้ทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำเอาเชื้อราที่คัดแยกได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีเปลือกมังคุด เปลือกลำไย และ เปลือกกาแฟที่ผ่านการบดแล้วเพื่อผลิตเอนไซม์ ผลปรากฏว่าเชื้อราไอโซเลท 50MS1 (*Aspergillus ustus*) สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงที่สุด คือ 1.60 ยูนิตต่อกรัมสารตั้งต้นภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเปลือกกาแฟ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์จากเปลือกกาแฟทำได้โดยการปรับปริมาณเชื้อตั้งต้น $5x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร อาหารที่เหมาะสมคือ อาหารแข็งที่ประกอบด้วยเปลือกกาแฟ 2 กรัมต่ออาหารเหลว Czapek Dox's minimal medium 4 มิลลิลิตร มีแป้งร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5.0 เป็นเวลา 4 วัน โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ สูงสุด 17.74 ยูนิตต่อกรัมสารตั้งต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved