

การแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดิน
Isolation and Screening of Microorganisms Capable of Producing Protease
Enzymes from Soil

นงลักษณ์ สายเทพ

Nonglak Saithep

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง

Biology Program, Faculty of Science at Lampang Rajabhat University

E-Mail : nonglak_pim_saithep@yahoo.com

Received: January 25, 2020

Revised: March 10, 2020

Accepted: April 20, 2020

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินมีหลายชนิด และมีบทบาทสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก และคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์จำนวน 29 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 3 บริเวณ ได้แก่ บ้านแม่ฮวก บ้านเข้าซ้อง และอุทยานแห่งชาติน้ำตกแจ้ซ้อน จังหวัดลำปางโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 29 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 21 ไอโซเลท แกรมลบ 8 ไอโซเลท รูปร่างพบได้ 3 แบบได้แก่ รูปแท่ง แท่งสั้น และกลม จำนวน 22 4 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์บนอาหาร Skim Milk Agar พบว่าทั้ง 29 ไอโซเลท เกิดบริเวณใสรอบรอยการเจริญของเชื้อ โดยไอโซเลท MH2-4 Pro ให้บริเวณใสกว้างที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ 90.02 มิลลิเมตร

คำสำคัญ : โปรติเอส, จุลินทรีย์, เอนไซม์

ABSTRACT

This research investigated the selection and screening of microorganisms that produce protease. Twenty-nine isolates of protease-producing microorganisms were isolated from three soil samples collected at Ban Mea Huag, Ban Khao Son and Chae

Son National Park. The isolated microorganisms were grown on tryptic soy agar (TSA) at 37°C for 24-48 hours. Morphological tests of the isolates show that twenty-one were gram-positive and eight were gram-negative bacteria. Twenty-two of these were rod-shaped, four were short rod-shaped and three cocci-shaped. Protease production on skimmed milk agar showed that all isolates had positive results with a clear zone around the cultures. At 90.02 mm, the isolate MH2-4 pro had the widest statistically significant clear zone ($p \leq 0.05$).

Key Words : Protease, Microorganisms, Enzyme

บทนำ

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบได้ทั้งในพืชสัตว์และจุลินทรีย์ (นิธิยา รัตนพนนท์, 2556) เอนไซม์โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ของอาหารจำพวกโปรตีนจึงมักถูกเรียกว่าเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือเรียกว่า โปรติเนส เอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสนี้มีหลายชนิดตามความสามารถในการจับกับพันธะเปปไทด์แบบต่าง ๆ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2556) เอนไซม์โปรติเอสแบ่งย่อยได้เป็น 4 พวกคือ Acid Protease, Serine Protease, Sulfhydryl Protease และ Metal Containing Protease แหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่สำคัญมีหลายแหล่ง เช่น จากสัตว์ พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ พวกจุลินทรีย์ เช่น ราและแบคทีเรีย ซึ่งจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ได้ดีกว่าพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีวงจรชีวิตสั้นกว่า ในปัจจุบันพบว่า การนำเอาเอนไซม์โปรติเอสที่เสถียรต่อความร้อน (Thermo stable protease) มาประยุกต์ใช้งานในทางอุตสาหกรรมจะให้ผลดีกว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ไม่เสถียรต่อความร้อน เพราะการเพิ่มอุณหภูมิในกระบวนการใช้งานจะมีผลทำให้อัตราเร็วของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์สูงขึ้นและใช้เวลาในการเกิดผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นจึงสามารถที่จะลดต้นทุนการผลิตได้ด้วย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาจุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากดิน ในพื้นที่หมู่บ้านแม่ฮวก หมู่บ้านเข้าซ้อน อำเภอกะลา และบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง เพื่อนำตัวอย่างดินมาทำการคัดแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ในดินที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส

1. วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.1 เพื่อคัดแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส
- 1.2 เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างจากดินจำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ บริเวณหมู่บ้านแม่ฮวก บ้านเข้าซ้อน ตำบลไหลหิน อำเภอกะเคา จังหวัดลำปาง และบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกแจ้ซ้อน ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง โดยได้เก็บดินไว้ในตู้เย็นเพื่อรักษาสภาพของจุลินทรีย์ ในกรณีที่ยังไม่ได้แยกเชื้อภายในเวลา 6 ชั่วโมง

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บโดยวิธีการเจือจางลำดับส่วน (Serial ten-Fold dilution)

ในขั้นตอนนี้มีวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่างดินปริมาณ 10 กรัม โดยเตรียมน้ำเกลือที่จะใช้เจือจางลำดับส่วนโดยมีสารละลาย 0.85% NaCl โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายใส่หลอดทดลองทั้งหมด 5 หลอด ในแต่ละหลอดดูดใส่ 1 มิลลิลิตร ให้เจือจางที่เหมาะสมมา 3 ระดับ กระจาย (Spread plate) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Loopแตะโคโลนีที่แตกต่างกันโดยดูจากความแตกต่างของโคโลนีที่ปรากฏ Streak บนจานอาหารเพาะเชื้อ Tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการ re-streak จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ และบันทึกลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏและชนิดของจุลินทรีย์ลงในตารางบันทึกผล จากนั้นเก็บโคโลนีที่บริสุทธิ์ ลงในหลอด Eppendorf ที่บรรจุอาหาร Glycerol medium ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เก็บเชื้อละ 2 หลอด ให้ Label ข้างหลอดโดยระบุ รหัสเชื้อ และวัน/เดือน/ปีที่เก็บแช่หลอดไว้ในตู้ Deep freeze เพื่อใช้เป็น Stock culture

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Point inoculation

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้บริสุทธิ์ขึ้นต้นมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Point inoculation technique ด้วยเข็มเชื้อปลายแหลม ลงบนอาหารแข็ง Skim milk agar ทดสอบแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส บันทึกผล

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

ทำการศึกษาจากเชื้อบริสุทธิ์ โดยดูจากขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ ใช้ Loop แตะเชื้อแล้วนำไปวางบนสไลด์ทำการย้อมแกรมตามขั้นตอน แล้วนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้ SPSS เวอร์ชัน 14 (SPSS Inc.) โดยการทดลองทั้งหมดจะทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ทางสถิติจะทำการประเมิน Completely Randomized Design (CRD) การวิเคราะห์ความแปรผัน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ค่า $p < 0.05$

ผลการวิจัย

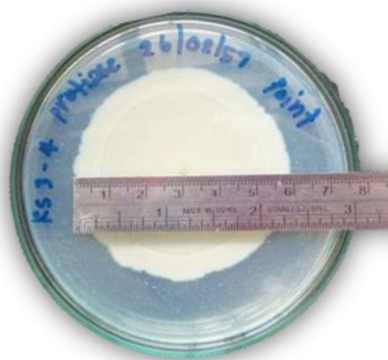
1. ผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส

จากการคัดแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดิน บริเวณบ้านแม่ฮวก บ้านเข้าซ้อน และอุทยานแห่งชาติน้ำตกแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณัฐวรรณ พัทธกิจศิริพรรณ (2548) นำตัวอย่างดินบริเวณที่มีขยะมูลฝอย ปุ๋ยอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ จากท้องที่ต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ มาแยกและคัดเลือกเชื้อ โดยการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส โลเปส และเซลลูเลส บนอาหารวุ้น Starch, Skim milk, Tributyrin และ Carboxy methyl cellulose ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 3 4 5 6 และ 7 พบเชื้อที่สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีน ไขมัน และเซลลูโลส จำนวน 82 50 125 และ 13 ไอโซเลท ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของสุทธิดา แสงยนต์ (2548) ได้แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนจากตัวอย่างดิน 30 ตัวอย่าง แต่ใช้อาหาร Basal medium agar ที่เติม skim milk 1 เปอร์เซ็นต์ (BMSM) ได้จำนวน 160 ไอโซเลท จากงานวิจัยของ Josephine *et al.* (2012) ได้เก็บตัวอย่างดินใน มหาวิทยาลัยมหารานีวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ บังกลอร์ พบว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ 24 ชั่วโมง เชื้อที่ได้คือ *Bacillus* sp. และจากงานวิจัยของ Chonlachat (2011) ได้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินตัวอย่างใน 4 พื้นที่ของประเทศไทยโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของ ผงเปลือกปู 2 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ วุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ จากการคัดเลือกครั้งแรกพบว่ามีจุลินทรีย์ 45 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ และมีจุลินทรีย์ 29 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างวงใสได้ในอาหารนี้

2. ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Point inoculation บนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เกิดบริเวณวงใสรอบรอยการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2 โดยมีความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 5.45-90.02 มิลลิเมตร ไอโซเลทที่มีความกว้างของวงใสสูงสุดเป็นอันดับแรก คือ MH2-4Pro ที่ 90.02 มิลลิเมตร รองลงมาเป็น JS5P4 ที่ 85.04 มิลลิเมตร และ JS3P Pro5.2 ที่ 80.07 มิลลิเมตร ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังภาพที่ 3 กราฟแสดงค่าความกว้างวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 29 ไอโซเลท

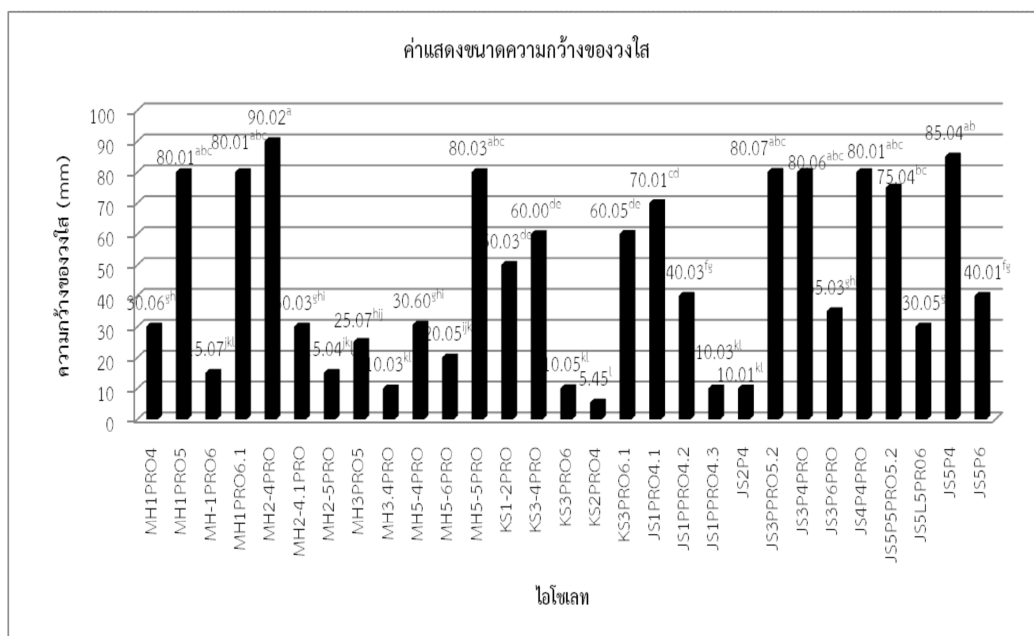
เปรียบกับงานวิจัยของจตุรงค์ จงจิ้น และ สุพรรณณี แก่นสาร อะโอกิ (2553) เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส บนอาหารจำเพาะสูตร Skim milk agar ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์จากวงใสที่ปรากฏ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสได้ 11.0-18.0 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร Skim milk agar ก็เกิดวงใสเช่นเดียวกับงานวิจัยของกรรณิการ์ เสนทอง (2551) ซึ่งพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Baccillus* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อมีชื่อว่าสร้างวงใสรอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท BA26 และ BA27 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 12.278 และ 12.058 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และจากงานวิจัยของณัฐวรรณ พัทธ์ศิริพรรณ (2548) พบเชื้อที่สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีน ไขมัน และเซลลูโลส จำนวน 82 50 125 และ 13 ไอโซเลท จากการนำเชื้อที่ให่วงใสได้ดีภายใต้เงื่อนไขดังกล่าว ไปทดสอบดูกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส และเซลลูโลส และจัดจำแนกชนิด พบว่าไอโซเลทที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีคือ *Bacillus subtilis* nst 12, nsk 12, ntri 9 และ ncmc 1 โดยให้ค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.9095 ($\times 10^{-3}$ U/ml), 0.5998 U/ml, 254.0540 U/ml และ 0.0847 U/ml ตามลำดับ



ภาพประกอบ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Point inoculation



ภาพประกอบ 2 แสดงวงใสที่เกิดจากการย่อย Skim milk agar ของไอโซเลท MH 2-4 Pro



ภาพประกอบ 3 กราฟแสดงค่าความกว้างของวงใสของจุลินทรีย์ทั้ง 29 ไอโซเลท

3. ผลการจัดจำแนกแบคทีเรีย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยนำไอโซเลท ทั้ง 29 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมแกรม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 100 เท่า ดูรูปร่างเซลล์พบว่า มีเซลล์รูปร่างแท่ง (Rod) จำนวน 22 ไอโซเลท รูปร่างกลม (Cocci) จำนวน 3 ไอโซเลท รูปร่างท่อนสั้น (Short rod) จำนวน 4 ไอโซเลท จากงานวิจัยของวีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และปริยานุช บวรเรืองโรจน์ (2546) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลมสีแดง เซลล์เป็นรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาและทำการทดลองการแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินบริเวณบ้านแม่ฮวก บ้านเข้าซ้อน และอุทยานแห่งชาติน้ำตก แจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส จากการทดลองพบว่า การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินนำมาแยกและคัดกรองเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar ได้เชื้อทั้งหมด 29 ไอโซเลท

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Point inoculation ใช้เข็มหย�เชื้อปลายแหลมลงบนอาหาร Skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24

ชั่วโมง โดยเชื่อมีความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 5.45-90.02 มิลลิเมตร โดยไฮโซเลทที่มีความกว้างของวงใสสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือ MH2-4Pro ที่ 90.02 มิลลิเมตร รองลงมาเป็น JS5P4 ที่ 85.04 มิลลิเมตร และ JS3P Pro 5.2 ที่ 80.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า จากจำนวน 29 ไฮโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 21 ไฮโซเลท แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 8 ไฮโซเลท ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียรูปแท่ง (Rod) จำนวน 22 ไฮโซเลท รูปท่อนสั้น (Short rod) จำนวน 4 ไฮโซเลท และ รูปกลม (Cocci) จำนวน 3 ไฮโซเลท การศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงการแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ เสนทอง. (2551). การคัดเลือกและวิเคราะห์แยกชนิด *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ทรานและ *Lactobacillus* จากนํ้ามันดิบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย. *บทความวิทยาศาสตร์*, 43-47. นครศรีธรรมราช: สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.
- จาตุรงค์ จงจัน และ สุพรรณณี แก่นสาร อะโอะกิ. (2553). การคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอสและโคนิเดสจากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 41, 317-320.
- ณัฐวรรณ พัทธศิริพรรณ. (2548). การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อย สลายขยะมูลฝอยทางชีวภาพ. (วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่).
- นิธิยา รัตนพนนท์. (2558). โปรติเอส. สืบค้นเมื่อ 8 พฤศจิกายน 2556. จาก <http://www.foodnetworksolution.com>.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2556). เอนไซม์. สืบค้นเมื่อ 8 พฤศจิกายน 2556. จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0680/enzyme%E0%B980%E0%B8%AD%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%8B%E0%B8%A1%E0%B9%8C>.
- วีรสิทธิ์ กัลยาณฤต และ ปรียานุช บวรเรืองโรจน์. (2546). การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิต เอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา. (วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).
- สุดธิดา แสงยนต์. (2548). สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่แยกได้จากดิน. (วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).
- Jaihao, C. (2011). *Screening and optimization of Protease production by proteolytic Bacteria for Deproteinization of Crab shell for Green chitin production*. (Master of science, Biotechnolog, Chiang Mai University).

Josephine, F. S., Ramya, V. S., Devi, N., Ganapa, S. B., Siddalingeshwara, K. G., Venugopal, N., and Vishwanatha, T. (2012). Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. Isolated from soil sample. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 163-168.