Thesis Title	Screening of Cellulase Producing Microorganisms for Application in Alcoholic Fermentation
Author	Ms. Naruemon Saikhamfu
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson Dr. Chartchai Khanongnuch Member

Abstract

Bamboo naturally grows in tropical countries. Cellulose content in bamboo is similar to wood. Hence, bamboo pulp, pretreated bamboo, was used as carbon source in screening and optimization processes, in this study. Thirteen isolates out of 686 isolates could produce cellulase on plate agar assay. Three groups of cellulase: endoglucanase (CMCase), exoglucanase (avicelase) and ß-glucosidase (cellobiase) were measured in liquid medium. The results showed that the highest CMCase producer was isolate F2-2 (0.25±0.04 U/ml), the avicelase producer was F6-2 (0.17±0.03 U/ml), and the cellobiase producer was F6-3 (0.04±0.01 U/ml). Isolate F6-2 which produced all enzymes and showed the highest avicelase activity was selected for application in alcoholic fermentation.

Morphological and biochemical characteristic revealed that this isolate is of genus *Streptomyces*. From molecular technique study using 16S rDNA sequence, the data analysis showed that isolate F6-2 was closely related to *Streptomyces kunmingensis* with similarity value of 99 %. The phylogenetic tree construction using neighbour-joining analysis showed that isolate F6-2 and *S. kunmingensis* (DQ442513 and AB184597) produced 100 % value of bootstrap. Following the data collected led to the identification of isolate F6-2, it should be *S. kunmingensis*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Optimum conditions for cellulase production were examined. *S. kunmingensis* F6-2 produced the highest cellulase at on initial pH of 5.0, inoculum size 6 % (v/v), incubated at 30˚C for 9 days using modified M1 medium containing pretreated 1 % (w/v) bamboo leaves as a sole carbon source. Effective medium composition factors were determined using Placket-Burman design (PBD) for screening effective factors. The results showed that ammonium sulfate, proteose peptone, yeast extract, di-potassium hydrogen phosphate and cobalt (II) chloride were effective factors and optimum level after calculation following equation by Design-expert 6.0.10 software using response surface methodology were 0.52, 2.90, 0.79, 4.37 and 0.01 g/l, respectively. The CMCase activity was obtained at 0.85 U/ml (specific activity 14.84 U/mg proteins) after being cultured in condition above. It was about 1.5-fold increase from original medium.

Enzymatic saccharification of pretreated lignocellulosic materials using *S. kunmingensis* F6-2 crude enzyme was performed. The highest reducing sugar obtained from pretreated corn cobs and pretreated bamboo leaves were 131.1 and 105.2 mg glucose/g dry substrate, respectively. Alcoholic fermentation using hydrolysated solution from enzymatic saccharification process was performed. The highest alcohol content of 3.5 (v/v) was obtained from fermentation by co-cultures (*Z. mobilis* TISTR 551 and *K. marxianus* TISTR 51161) and single culture of *Z. mobilis* TISTR 551.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสเพื่อการประยุกต์ในการหมักแอลกอฮอล์

ผู้เขียน นางสาวนฤมล ใสคำฟู

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ลำยอง ประธานกรรมกร
ดร.ชาติชาย โขนงนุช กรรมการ

บทคัดย่อ

ไผ่ พบทั่วไปในธรรมชาติ ในประเทศเขตร้อน ปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในไผ่มีสัดส่วนคล้ายกับไม้ ดังนั้นเยื่อไผ่ที่ทำจากไผ่ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมแล้วจึงถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการคัดกรองและการหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษานี้ พบว่า 13 ไอโซเลท จากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 686 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เมื่อทำการทดสอบบนอาหารแข็ง จากการตรวจสอบเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม คือ เอนโดกลูแคนเนส (CMCase) เอกโซกลูแคนเนส (avicelase) และ เบต้า-กลูโคซิเดส (cellobiase) ในอาหารเหลว พบว่า เอนไซม์ที่ผลิต CMCase สูงสุด คือ ไอโซเลท F2-2 (0.25±0.038 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนเอนไซม์ avicelase คือ ไอโซเลท F6-2 (0.17±0.03 ยูนิต/มิลลิลิตร) และเอนไซม์ cellobiase คือ ไอโซเลท F6-3 (0.04±0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) ไอโซเลท F6-2 ซึ่งผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 กลุ่มและผลิตเอนไซม์ avicelase ได้สูงสุดถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาในการประยุกต์ในการหมักแอลกอฮอล์

จากการทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่า ไอโซเลท F6-2 จัดอยู่ในจีนัส Streptomyces เมื่อนำลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA มาทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทางด้านอนูชีววิทยา พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces kunmingensis* (DQ442513 และ AB184597) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (similarity value) เท่ากับ 99 % เมื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้วิธี neighbour-joining analysis พบว่า ให้ค่า bootstrap เท่ากับ 100 % จากข้อมูลทั้งหมดสามารถบ่งชี้ได้ว่าไอโซเลท F6-2 ควรจะเป็น *S. kunmingensis*

เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า *S. kunmingensis* F6-2 สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุดที่สภาวะ สภาพความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 5.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 % (ปริมาตร/ปริมาตร) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มนาน 9 วัน โดยใช้อาหารดัดแปลง M1 ที่มีใบไผ่ที่ทำการย่อยด้วยด่างแล้ว 1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลส โดยใช้ Placket-Burman design พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต โปรติโอสเปปโตน ยีสต์เอกแทรก ได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ โคบอลต์คลอไรด์ เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการตรวจสอบด้วย Placket-Burman design การหาปริมาณที่เหมาะสม ด้วยโปรแกรม Design-expert 6.0.10 ด้วยวิธี response surface methodology พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต (0.52 กรัมต่อลิตร) โปรติโอสเปปโตน (2.90 กรัมต่อลิตร) ยีสต์เอกแทรก (0.79 กรัมต่อลิตร) ได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (4.37 กรัมต่อลิตร) และ โคบอลต์คลอไรด์ (0.01 กรัมต่อลิตร) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะข้างต้น แล้วตรวจสอบ CMCase activity พบ 0.85 ยูนิต/มิลลิลิตร (specific activity 14.84 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) ปริมาณ enzyme activity เพิ่มขึ้นจากสูตรอาหารเดิมเท่ากับ 1.5 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การย่อยชีวมวลที่ทำการย่อยก่อนด้วยด่าง แล้วทำการย่อยด้วยครูดเอนไซม์จาก *S. kunmingensis* F6-2 เมื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิ้วส์ พบว่ามีปริมาณสูงสุด เมื่อใช้ซังข้าวโพดบดและใบไผ่บด เป็นสับสเตรท มีปริมาณเท่ากับ 131.1 และ 105.2 มิลลิกรัม กลูโคสต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายดังกล่าวเป็นสับสเตรทในการหมักแอลกอฮอล์ แล้วทำการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ พบว่าได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดเมื่อทำการหมักโดยใช้เชื้อตั้งต้นผสม (*Zymomonas mobilis* TISTR 551 และ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 51161) และ *Z. mobilis* TISTR 551 เชื้อเดี่ยวเท่ากับ 3.5 % (ปริมาตร/ปริมาตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved