

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์                   สภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน

ชื่อผู้เขียน                                 นางสาวนฤมล นระธรรมโม

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต             สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มรกต สุกโชติรัตน์	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูชาติ พิรพรพิศาล	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิญา ผลิโกมล	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

ได้เลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่มีผู้แยกได้จากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด จำนวน 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ T1-5 นำมาบ่งบอกชนิด พบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และไอโซเลท T1-5 คือ *Bacillus coagulans* ทดสอบอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงใน cellulose broth ที่มี 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี 0.2% carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2% tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัด enzyme activity ได้ 0.281 unit/ml และ specific activity 1.778 unit/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงใน cellulose broth ที่มี 0.4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี 0.2% cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัด enzyme activity ได้ 0.168 unit/ml และ specific activity 1.108 unit/mg protein

เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.0-8.0 ปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที ส่วนเซลลูเลสที่ผลิตจาก

*Bacillus coagulans* T1-5 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 ความเสถียรไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.8-6.0 และปฏิกิริยาเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจะลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 จะทำปฏิกิริยากับชั้นเสถียรชนิดต่างๆ ได้แก่ carboxymethyl cellulose, locuse bean gum, xylose และ arabic gum แต่เอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5 ไม่ทำปฏิกิริยากับ arabic gum และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์กับ carboxymethyl cellulose เมื่อทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลท มี glucose และ cellobiose เป็นองค์ประกอบ

**Thesis Title** Optimum Conditions for the Production of Cellulase by Thermotolerant Bacteria

**Author** Miss Naruemon Nathammo

**M.S.** Biology

**Examining Committee**

Assistant Prof. Morakot Sukchotiratana	Chairperson
Assistant Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal	Member
Assistant Prof. Abhinya Plikomol	Member

**Abstract**

Two isolates among thermotolerant bacteria isolated from soil with highest cellulase activity were selected i.e CMU4-4 and T1-5. They were identified to be *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* respectively. Suitable inoculating medium for their growth was tested. *B. subtilis* CMU4-4 was found to grow well in tryptone yeast extract broth. Optimum conditions for cellulase production were to grow in cellulose broth containing 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at 45°C, pH of medium was 5.5 with 0.2% carboxymethyl cellulose as carbon source, 0.2% tryptone as nitrogen source and incubated for 18 hours. The enzyme activity was 0.281 unit/ml and specific activity 1.778 unit/mg protein. *B. coagulans* T1-5 also grew well in tryptone yeast extract broth. Optimum conditions for cellulase production were to grow in cellulose broth containing 0.4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at 37°C, pH of medium was 5.5 with 0.2% cellulose acetate as carbon source, 0.2% peptone as nitrogen source and incubated for 18 hours. The enzyme activity was 0.168 unit/ml and specific activity 1.108 unit/mg protein.

Some properties of cellulase were studied. Optimum conditions for cellulase activity of *B. subtilis* CMU4-4 were at 60 °C and pH 5.0. The enzyme was stable up to 60 °C at pH 4.0-8.0. The

peak activity was at 5 minutes then gradually decreased and became stable at 60 minutes. Optimum conditions for cellulase activity of *B. coagulans* T1-5 were at 60 °C and pH 5.0. The enzyme was stable up to 60 °C at pH 4.8-6.0. The peak activity was at 15 minutes then gradually decreased and became stable at 60 minutes. Cellulase from *B. subtilis* CMU4-4 reacted with various substrates including carboxymethyl cellulose, locuse bean gum, xylose and arabic gum but cellulase from *B. coagulans* T1-5 also reacted with carboxymethyl cellulose, locuse bean gum and xylose but did not react with arabic gum. Thin layer chromatography of the products from the reaction of the enzyme from both bacteria with carboxymethyl cellulose indicated that they contained glucose and cellobiose.