งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ไม่ใช้ออกซิเจนและชอบอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างชานอ้อยจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทนร้อนที่ผลิตได้ พบว่า สามารถคัดแยก *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 และ EPPO5 ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน และมีการสร้างสปอร์ โดย *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 สามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ในขณะที่สายพันธุ์ EPPO5 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 70 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีพีเอชในช่วง 6.0-8.0 โดยมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 7.0 เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ EPPO2 และ EPPO5 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 พบว่า สามารถผลิตเซลลูเลสซึ่งทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 40-90 องศาเซลเซียส โดยเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยังแสดงค่ากิจกรรมของเซลลูเลสมากกว่าร้อยละ 90 และ 75 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 และ EPPO5 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Clostridium thermocellum* สายพันธุ์ ATCC27405 พบว่า เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังคงเหลือกิจกรรมร้อยละ 74 และ 63 ตามลำดับ เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา

12 ชั่วโมง ในขณะที่เซลลูเลสที่ผลิตจาก *C. thermocellum* สายพันธุ์ ATCC27405 สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์อย่างรวดเร็ว (น้อยกว่าร้อยละ 30)

เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ใน crude enzyme ที่ผลิตจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 และ EPPO5 พบว่า ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก คือ เอ็นโดเซลลูเลส (คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสและเซลลูโลสพาวเดอร์) เซลโลไบโอไฮโดรเลส และเบต้ากลูโคซิเดส เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกคือ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส อะซิติล-เอสเทอเรส นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของแมนนาเนส เพ็กติเนส อะไมเลส และไคติเนสด้วย เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีนของ crude enzyme ที่ผลิตจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 ด้วยเทคนิค native-polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) พบโปรตีนอย่างน้อย 5 แถบ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 28 ชนิด เมื่อตรวจสอบด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่า โปรตีนอย่างน้อย 10 ชนิด แสดงกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส (เซลลูโลสที่ละลายน้ำ) และอย่างน้อย 11 ชนิด แสดงกิจกรรมของไซลาเนส ส่วน crude enzyme ที่ผลิตจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO5 พบโปรตีนอย่างน้อย 5 แถบใน native-PAGE เช่นกัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 25 ชนิด (SDS-PAGE) และเมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่า โปรตีนอย่างน้อย 7 ชนิดแสดงกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส และอย่างน้อย 10 ชนิดแสดงกิจกรรมของไซลาเนส

เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีนของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 ที่ผ่านการยึดเกาะกับอะไวเซล (เซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ) หลังจากการชะด้วย 1% TEA โดยเทคนิค native-PAGE พบว่า ประกอบด้วยโปรตีน 2 กลุ่ม ที่แสดงทั้งกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลสและไซลาเนส ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 16 ชนิด (SDS-PAGE) เมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่า โปรตีนที่มีขนาด 76, 94, 123 และ 195 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิล-เซลลูเลส และขนาด 69, 84, 117, 172 และ 203 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมของไซลาเนส ส่วน *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO5 พบโปรตีน 2 กลุ่ม ที่แสดงกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิล-เซลลูเลสและไซลาเนสเช่นกัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 13 ชนิด (SDS-PAGE) เมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่า โปรตีนที่มีขนาด 76, 94, 123 และ 171 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมของคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส และขนาด 42, 69, 117, 172 และ 198 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมของไซลาเนส

เมื่อนำ crude enzyme ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ไปย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพบว่าสามารถย่อยชานอ้อยได้ดีกว่าเปลือกข้าวโพด ฟางข้าว รำข้าว และซังข้าวโพด ตามลำดับ นอกจากนี้

240759

ยังสามารถย่อยกากถั่ว เช่น กากถั่วเหลือง และกากถั่วเขียวได้ด้วยเช่นกัน และเมื่อทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO2 ด้วยวิธี gas chromatography พบว่า ประกอบด้วยกรดอะซิติก (25.02 มิลลิโมลาร์) เอทานอล (3.17 มิลลิโมลาร์) กรดโพรพิโอนิก (0.40 มิลลิโมลาร์) และกรดบิวทิริก (0.25 มิลลิโมลาร์) ในขณะที่น้ำหมักจาก *Ca. saccharolyticus* สายพันธุ์ EPPO5 ตรวจพบเฉพาะกรดอะซิติก (38.52 มิลลิโมลาร์) และเอทานอล (4.68 มิลลิโมลาร์) เท่านั้น

240759

The aim of this research is to isolate thermophilic anaerobic bacteria from sugarcane bagasse pile in paper industry and characterize their plant cell wall degrading thermostable enzymes. The results showed that *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* EPPO2 and EPPO5 were isolated. Both strains, EPPO2 and EPPO5 were Gram-positive, rod-shaped and endospore-forming. The temperature for growth of the strain EPPO2 was 60-80°C, with an optimum temperature around 70°C. For the strain EPPO5, it grew at 65-75°C, with an optimum temperature at 65°C. The pH range for growth of both bacteria was 6.0-8.0, with an optimum pH at 7.0. Both strains, EPPO2 and EPPO5 produced thermostable cellulases when cultivated in basal medium containing cellulose powder as a carbon source under 70°C and pH 7.0. Optimum conditions for cellulase activity were 80°C and pH 7.0. The thermal stability was in the range of 40-90°C and showed highly thermostable as evidenced by retaining more than 90 and 75% activity for the strain EPPO2 and the strain EPPO5, respectively after 1 h incubation at 90°C. Furthermore, the residual cellulase activity (74 and 63%, respectively) of both strains, EPPO2 and EPPO5 showed more than *Clostridium thermocellum* ATCC27405 (less than 30% residual activity) after incubation at 80°C for 12 h.

The crude enzymes from both strains, EPPO2 and EPPO5 composed of cellulolytic enzymes such as endocellulase (carboxymethyl cellulose and cellulose

powder), cellobiohydrolase and β-glucosidase, xylanolytic enzymes such as xylanase, β-xylosidase, arabinofuranosidase and acetyl esterase and mannanase, pectinase, amylase and chitinase. Native-polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) of crude enzyme from the strain EPPO2 showed 5 protein bands, whereas sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) exhibited at least 28 protein bands. Zymograms analysis revealed 10 protein bands showed carboxymethyl cellulase activity (soluble cellulose) and 11 protein bands showed xylanase activity. For the strain EPPO5, crude enzyme showed 5 protein bands, whereas SDS-PAGE exhibited at least 25 protein bands. Zymograms analysis revealed 7 protein bands showed carboxymethyl cellulase activity and 10 protein bands showed xylanase activity.

Avicel (insoluble cellulose) binding enzymes were isolated through adsorption-desorption techniques using elution with 1% (w/v) triethylamine (TEA). For the strain EPPO2, native-PAGE analysis indicated that the Avicel-binding enzyme contained only 2 bands of protein, having carboxymethyl cellulase and xylanase activities. It comprised at least 16 bands of protein on SDS-PAGE and 4 active bands of carboxymethyl cellulase with molecular weights of 76, 94, 123 and 195 kDa and 5 active bands of xylanase with molecular weights of 69, 84, 117, 172 and 203 kDa on zymograms. For the strain EPPO5, native-PAGE analysis indicated that the Avicel-binding enzyme contained only 2 bands of protein, having carboxymethyl cellulase and xylanase activities. It comprised at least 13 protein bands on SDS-PAGE and 4 active bands of carboxymethyl cellulase with molecular weights of 76, 94, 123 and 171 kDa and 5 active bands of xylanase with molecular weights of 42, 69, 117, 172 and 198 kDa on zymograms.

Crude enzymes from both strains, EPPO2 and EPPO5, could hydrolyze sugarcane bagasse better than corn hull, rice straw, rice bran and corn cob, respectively. Moreover, bean meals such as soybean meal and mung bean meal were hydrolyzed by the strain EPPO2. Gas chromatography revealed that main fermentation products from the strain EPPO2 were acetic acid (25.02 mM), ethanol (3.17 mM), propionic acid (0.40 mM) and butyric acid (0.25 mM). On the other hand, for the strain EPPO5, the fermentation products were only 38.52 mM acetic acid and 4.68 mM ethanol.