หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาลักษณะจำเพาะของยีนเซลลูเลสและไซลาเนสจากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของวัว	
ผู้เขียน	นางสาวรัชรา กาละวงค์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท โดยไอโซเลท B4 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงที่สุด เมื่อบ่งบอกสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ โดยวิธี 16s rDNA sequencing พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด (>99%) จึงตั้งชื่อเชื้อนี้ว่า *B. subtilis* B4 หลังจากนั้นทำการโคลนยีนเซลลูเลส (*BglC*) และยีนไซเลนเนส (*XynA*) ของ*B. subtilis* B4 เข้าสู่เวคเตอร์ (pETDuet-1) แล้วส่งถ่ายเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 (DE3) แบคทีเรียที่ได้รับเวคเตอร์ลูกผสม pETbglC และ pETxynA มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเซลลูเลสและไซลาเนส 19.46 และ 110.38 U/mg protein และสูงกว่าเอนไซม์จาก *B. subtilis* B4 ถึง 3 และ 2 เท่าตามลำดับ เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตจาก pETbglC และ pETxynA ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate แล้วผ่านคอลัมน์ DEAD Toyopearl 650M และ Butyl-Toyopearl 650M ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมีน้ำหนักโมเลกุลบน SDS-PAGE ประมาณ 50 และ 23 kDa ตามลำดับ เอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20- 80 องศาเซลเซียส พีเอช 5- 10 ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20- 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4-9 และพบว่า Fe^{3+} มีผลกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซลาเนส แต่ Mn^{2+} และ Cu^{2+} มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง นอกจากนั้นพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซลาเนสที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถย่อยสารตั้งต้นลิกโนเซลลูโลส (ต้นข้าวโพด, ฟางข้าว, หญ้าขน, และหญ้าเนเปียร์) ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพได้ ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองจึงมีความสามารถที่จะนำไปใช้ในการย่อยสารชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในกระบวนหมักเป็นเอทานอลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Characterization of Cellulase and Xylanase Genes from Cow's Rumen Bacteria	
Author	Ms. Ratchara Kalawong	
Degree	Master of Science (Biology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Chalobol Wongsawad	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Co-advisor

ABSTRACT

In this research, cellulase and xylanase producing bacteria were isolated from cow's rumen fluid. Among twenty isolates, strain B4 showed the highest cellulolytic and hemicellulolytic activity. Analysis of a 16S rDNA sequence showed the highest homology with *Bacillus subtilis* (>99%). The isolate, strain B4 was designated as *B. subtilis* B4. Then both of the cellulase (*BglC*) and xylanase (*XynA*) genes of *B. subtilis* B4 were cloned into expression vector (pETDuet-1) and transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3). The transformants named pETbglC and pETxynA showed cellulase and xylanase specific activity of 19.46 and 110.38 U/mg protein, respectively and about 3-fold of cellulase and 2-fold of xylanase grater than enzymes of the wild type. The cellulase and xylanse which produced by pETbglC and pETxynA were purified by ammonium sulfate precipitation, DEAD Toyopearl 650M and Butyl-Toyopearl 650M column. The molecular mass of purified cellulase and xylanase were estimated to be approximately 50 and 23 kDa on SDS-PAGE, respectively. The cellulase exhibited its optimum activity at 60 °C and pH 8.0. It was stable over a broad range at 20-80 °C and pH 5-10. Optimal temperature and pH of xylanase activity were 50 °C and pH 7.0. The enzyme showed stability at 20-50 °C and pH 4-9. Moreover, enzyme activity of both enzymes was stimulated by Fe^{3+} and was strongly inhibited by Mn^{2+} and Cu^{2+}. Furthermore, cellulase and xylanase in this study have potential to be used for degradation of non-treated and pretreated lignocellulosic substates (corn stover, rice straw, paragrass and napier grass). Therefore, these enzymes could be useful in hydrolysis of lignocellulosic biomass into reducing sugar, which is finally able to ferment to ethanol.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved