ISOLATION OF CELLULOSE-DEGRADING BACTERIA FROM TERMITES *Microcerotermes sp.*

Kitipong Taechapoempol

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University, and Institut Français du Pétrole
2009

Thesis Title:	Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria from Termites *Microcerotermes sp.*
By:	Kitipong Taechapoempol
Program:	Petroleum Technology
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit
	Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej
	Asst. Prof. Thammanoon Sreethawong
	Assoc. Prof. Sirirat Rengpipat

Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

..... (Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit)

..... (Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

..... (Asst. Prof. Thammanoon Sreethawong)

..... (Assoc. Prof. Sirirat Rengpipat)

..... (Assoc. Prof. Suntud Sirianuntapiboon)

..... (Asst. Prof. Siriporn Jongpatiwut)

ABSTRACT

5073003063: Petroleum Technology Program
Kitipong Taechapoempol: Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria from Termites *Microcerotermes sp.*
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit, Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, Asst. Prof. Thammanoon Sreethawong, and Assoc. Prof. Sirirat Rengpipat 101 pp.
Keywords: Cellulose/ *Microcerotermes sp.*/ Cellulase-Producing Bacteria/ *Bacillus subtilis*/ 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride

The main problem of using cellulose as a feedstock for direct bio-hydrogen production by a fermentative microorganism is the inefficiency of the process, because the hydrogenase enzyme cannot access the internal surface of the cellulose and convert it to hydrogen. To solve this problem, the accessibility of the hydrogenase enzyme was increased by converting cellulose to glucose by using a cellulase enzyme, which is generated from bacteria, before the fermentation process. In this research, cellulase-producing bacteria were isolated from higher termites, *Microcerotermes sp.* Three effective strains of *Bacillus subtilis* (A 002, F 018, and M 015) were identified and studied for the specific cellulase activities—endoglucanase, exoglucanase, and β-glucosidase—at 37°C and pH 7.2. The results showed that strain F 018 had the highest specific exoglucanase activity and β-glucosidase activity; and strain M 015 had the highest specific endoglucanase activity. In addition, all three strains were also tested for their tolerance to the presence of the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, or [BMIM]Cl, which was used to enhance the accessibility of the cellulase enzyme in the pretreatment step. All strains were able to tolerate the [BMIM]Cl in the range of 0.1 to 1.0 vol%.

บทคัดย่อ

กิติพงษ์ เตชะเพิ่มผล: การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากปลวก สายพันธุ์ *Microcerotermes sp.* (Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria from Termites *Microcerotermes sp.*) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร.ปราโมช รังสรรค์วิจิตร, รศ. ดร.สุเมธ ชวเดช, ผศ. ดร. ธรรมนูญ ศรีทะวงศ์ และ รศ. ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ 101 หน้า

ปัญหาสำคัญที่เกิดจากการใช้เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยตรงด้วยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์คือประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ต่ำ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่สามารถเข้าถึงพื้นผิวภายในของเซลลูโลสและเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นทำได้โดยการเพิ่มความสามารถในการเข้าถึงของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในขั้นตอนการหมักด้วยการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนโดยอาศัยเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย งานวิจัยนี้ศึกษาการคัดแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากปลวกชั้นสูงสายพันธุ์ *Microcerotermes sp.* โดยแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis* ที่มีประสิทธิภาพดี 3 สายพันธุ์ คือ A 002 F 018 และ M 015 ได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาค่าแอคทิวีตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ย่อย 3 ชนิดด้วยกันคือ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์เบตากลูโคสิเดส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.2 จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ F 018 มีค่าแอคทิวีตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเอนไซม์เบตากลูโคสิเดสสูงที่สุด แบคทีเรียสายพันธุ์ M 015 มีค่าแอคทิวีตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงที่สุด นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความทนทานของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ต่อสารกลุ่ม ionic liquid คือ 1-butyl-3-methylimidazolium chloride หรือ [BMIM]Cl ที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมเบื้องต้น เพื่อช่วยให้เอนไซม์เซลลูเลสเข้าถึงพื้นผิวภายในของเซลลูโลสได้มากขึ้น จากการทดสอบพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถทนต่อสาร [BMIM]Cl ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank many people, who have contributed to my education over the past two years and specifically to this research work.

Firstly, I would like to express my grateful appreciation to Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit, Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, and Asst. Prof. Thammanoon Sreethawong, who initiated this research thesis topic, for their support, guidance through this research work and served as the thesis advisors. It has been privilege to work with such a dedicated and resourceful people.

I would like to express my grateful appreciation to Assoc. Prof. Sirirat Rengpipat, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for her guidance, support, and also laboratory room and equipments.

I would like to express my sincere thanks to Dr. Duangkhae Sitthicharoenchai, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for her help and guidance in termite identification.

Furthermore, I would like to thank all members and staffs of Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for their kind helps, advice, encouragement, and assistance throughout my work.

Many thanks are given to all members of the laboratory room 408 and room 407: Mr. Kamol Rodyou, Ms. Titarat Lertchaowayuth, Ms. Kanchaniga Rungreangsuk, Mr. Pattarapong Sapcharoen, Ms. Piyanuch Suppalerksakoon, Ms. Natchaya Werachaiwat, and Ms. Kankiya Chanitnun at Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for advices and friendships throughout my research.

This thesis work is supported by the Petroleum and Petrochemical College, and the Center of Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Thailand.

I feel fortunate to have spent 2 years with collection of graduate students, who not only made the experience bearable, but also quite pleasant. Therefore, I simply say thanks to friends, who made the two years such a memorable experience.

Finally, I would like to thank my family for their love, spirit, and understanding during my studies and research work.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER **PAGE**

CHAPTER **PAGE**

CHAPTER **PAGE**

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**