Thesis Title	Study of Thermostable Phytase from Actinomycetes for Application in Animal Feed
Author	Mr. Tewa Upathanpreecha
Master of Science	Biotechnology

Examining Committee	Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Member
	Dr. Piyanuch Niamsup	Member

ABSTRACT

Screening of phytase production from 213 actinomycetes isolates was performed, 79 isolates from the stock culture of the Applied Microbiology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University and 134 newly isolated actinomycetes from soil samples from sites around Chiang Mai. The isolate RC7n showed the highest phytase production as 50 mU/ml and residual activity was more than 90% after incubation at 55°C for 8 h. Based on morphological studies, chemical characteristics and results obtained from scanning electron microscopy, the isolate RC7n was identified to the genus *Thermomonospora*. Optimization of phytase production from *Thermomonospora* sp. RC7n was attained using central composite design methodology. Wheat bran and ammonium nitrate were found to be the significant variables. The response surface methodology was simulated by quadratic model for predict the best condition for phytase production. The maximum phytase activity of 233 mU/ml could be estimated at 12%(w/v) wheat bran and 0.89%(w/v) ammonium nitrate. When *Thermomonospora* sp. RC7n was cultivated in optimized medium, the maximum phytase activity was 205 mU/ml after cultivation at 50°C for 72

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

h. The phytase from *Thermomonospora* sp. RC7n was purified 50 fold to homogeneity with specific activity 23.83 U/mg protein and 6.67% recovery yield by heat treatment, DEAE-sephadex A-50 and Sephacryl S-100 HR column chromatography. Its molecular weight was estimated to be 11 kDa by SDS-PAGE and corresponding with that obtained by gel filtration. It can be concluded that RC7 phytase is a monomeric enzyme. The purified phytase exhibited an optimum temperature at 55^{o}C and showed thermostability up to 75^{o}C after 1 h incubation. The half-life of the enzyme after heat inactivation at 85^{o}C was 60 min. An optimum pH for phytase activity was 7.0 and it was stable at pH 5.5-7.0. The K_m and V_{max} value were 0.49 mM and 2.98 µmole/min, respectively. The purified enzyme was strongly inhibited by EDTA, indoacetic acid (IAA) at 5 mM and metal ions such as Pb^{2+} and Cu^{2+} at 5 mM.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์ไฟเตสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์
ชื่อผู้เขียน	นาย เทวา อุปธารปรีชา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ชาติชาย โขนงนุช ประธานกรรมการ รศ.ดร.สายสมร ลำยอง กรรมการ ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 213 ไอโซเลตซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 79 ไอโซเลต และ 134 ไอโซเลตที่ทำการคัดแยกจากตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าสายพันธุ์ RC7n สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสสูงสุด 50 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือมากกว่า 90% จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากการศึกษาลักษณะรูปร่าง สมบัติทางเคมี และผลจากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนสามารถจัดไอโซเลท Rc7n อยู่ในจีนัส *Thermomonospora* จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) พบว่ารำข้าวสาลี และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ และจากผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (response surface methodology) ที่ได้จากแบบจำลองควอดราติก (quadratic model) พบว่าแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้ สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้สูงสุดเท่ากับ 233 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลี 12%(w/v) และแอมโมเนียมไนเตรท 0.89%(w/v) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Thermomonospora* sp. RC7n ในสูตรอาหารที่ได้จากการหา สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ 205 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร จากการเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ 50 °Cที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สามารถทำเอนไซม์ไฟเตสให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้ความร้อน การแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE-sephadex A-50 และเจลฟิวเตรชั่น Sephacryl S-100 HR ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 50 เท่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 23.83 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และค่าผลผลิตกลับคืน 6.67% จากการทำ SDS-PAGE เอนไซม์ไฟเตสจาก *Thermomonospora* sp. RC7n มีค่ามวลโมเลกุลประมาณ 11 kDa และให้ผลสอดคล้องกับการประมาณมวลโมเลกุลโดยเจลฟิวเตรชั่น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อ Rc7n เป็นโมโนเมอร์ริกเอนไซม์ (monomeric enzyme) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55°C และเสถียรที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าครึ่งชีวิตของการเสียสภาพการทำงานนาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 85°C สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5-7.0 เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.49 มิลลิโมลาร์และ 2.98 ไมโครโมลต่อนาทีตามลำดับ และถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงจากการเติม EDTA, indoacetic acid (IAA) และอิออนบางชนิด Pb^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved