Thesis Title Safety Evaluation of Xylanase Produced from *Thermoascus aurantiacus* SL16W

Author Mr. Watee Kongbuntad

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Dr. Chartchai Khanongnuch Member
Asst. Prof. Dr. Kanokporn Saenphet Member
Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham Member

ABSTRACT

Xylanase derived from *Thermoascus aurantiacus* SL16W has suitable characteristics such as high activity and heat tolerance that are prerequisites for development of an industrial feed enzyme. The objectives of this study were to evaluate the toxicity effect of the enzyme by determining acute, subchronic and chronic responses in albino rats and cytotoxicity in cell lines. A study of the efficacy of diet-supplemented xylanase on chicken growth performance was included. The oral LD_{50} of crude xylanase (CX) attained was more than 8,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$. In the acute toxicity test, the male rats were divided into 3 groups, the first group received a single dose of CX8,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$, the second and third received 1 $mlKg^{-1}$ of 20 mM citrate buffer (CB) and distilled water (DW), respectively. Body weight, feed intake, internal organ weight, hematological and blood biochemistry levels were investigated. It was found that CX did not affect the body and internal organ weight, hemoglobin (Hb), packed red cell percent (% PCV), white blood cell (WBC) count and differential WBC. But blood urea nitrogen (BUN) level in the CX group was decreased compared with the control group. In the subchronic toxicity test, male rats were divided into four groups, three groups were treated orally with CX400, CX2,000 and CX4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$, respectively. The control group was treated with DW, for 60 days, CX did not affect the body and internal organ weight, while the Hb level in CX4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

group was lower than the CX2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ treated group. However, the % PCV in CX2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ was lower than the control group and the WBC count of the CX2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ group was significantly decreased to control group ($P \leq 0.05$). Eosinophil, neutrophil, basophil and lymphocyte were not significantly different from the control, except in the 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ group which was lower than all groups while BUN and creatinine decreased as serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT; AST), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT; ALT) and alkaline phosphatase (ALP) were not significantly different from control. In the chronic toxicity test, CX at doses of 750, 1,500 and 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ were orally administered to rats for 120 days. Body weight, internal organ weight, hematological and blood biochemistry levels were investigated in two periods (exposure and recovery). CX had no effect on the rat's body weight. SGOT levels of treated rats significantly decreased compared to those of the control group ($P \leq 0.05$), while SGPT levels were similar in all groups. BUN levels in treated groups were higher than those of controls in the exposure period, but slightly lower in the recovery period. However, Crea levels in treated groups were not different from control group.

Three cytotoxicity assays, the sulphorhodamine B (SRB), the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT), and the neutral red (NR) were used to determine of CX, inactivated crude xylanase (ICX) and purified xylanase (PX) on % cell viability in five cancer cell lines and one normal cell line. The results showed that CX and ICX did not show any cytotoxic effects on normal and cancer cell lines, IC_{50} was more than 100 μgml^{-1} at 24, 48 and 72 h of exposure times, while PX IC_{50} was 30 μgml^{-1} at 72 h exposure.

The development of xylanase for use as an animal feed enzyme was determined. The efficacy of xylanase supplementation in the diet on chicken was evaluated. The chickens were divided into three groups. The first group was administered a control diet (without enzyme). The second and third groups were fed with xylanase-supplemented diet at two different levels, 10 and 30 gkg^{-1}, respectively. Weight gain, feed intake, survivability and primary toxicity effect on internal organs weight and plasma biochemistries were recorded and evaluated. The xylanase supplemented diet increased weight gain and decreased feed conversion efficiency (FCE) and had no effect on survivability of chickens. Xylanase supplementation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

decreased BUN level in the 30 gkg^{-1} diet, but slightly increased the serum SGPT level. In addition, xylanase supplementation had no effect on changes in the weight of internal organs.

From these studies, it can be concluded that xylanase produced from *T. aurantiacus* SL16W has no toxic effects in albino rats, cell lines and this indicates a potential for use of xylanase in the feed for monogastric animals.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การประเมินความปลอดภัยของไซแลนเนสผลิตจากเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* SL16W	
ผู้เขียน	นายวาที คงบรรทัด	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
	อ. ดร. ชาติชาย โขนงนุช	กรรมการ
	ผศ. ดร. กนกพร แสนเพชร	กรรมการ
	ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ	กรรมการ

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* SL16W มีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ เช่น มีค่าของกิจกรรมที่สูง และทนสภาวะอุณหภูมิสูง ทั้งหมดเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นเอ็นไซม์อุตสาหกรรมอาหาร การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความเป็นพิษของเอ็นไซม์โดยการตรวจวัดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรัง ในหนูขาว และความเป็นพิษต่อเซลล์เชื้อสาย รวมถึงการศึกษาความเป็นไปได้ของไซแลนเนสที่ผสมในอาหารต่อประสิทธิภาพการเติบโตของไก่ ขนาดของไซแลนเนสที่ให้โดยการป้อนแล้วทำให้หนูทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 8,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ ในการศึกษาพิษแบบเฉียบพลันได้แบ่งหนูขาวเพศผู้ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่1ได้รับไซแลนเนสที่ระดับ 8,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ ครั้งเดียว ส่วนกลุ่มที่ 2 และ3ได้รับซิเตรดบัฟเฟอร์ และน้ำกลั่นขนาด 1 $mlkg^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักตัว ปริมาณการกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะภายใน ค่าโลหิตวิทยา และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับชีวเคมีของเลือด พบว่าไซแลนเนสไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะภายใน ค่าฮีโมโกลบิน (Hb), เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% PCV), จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) และ ชนิดของเม็ดเลือดขาว แต่ไซแลนเนสทำให้ระดับของ blood urea nitrogen (BUN) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควมคุม ในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง แบ่งหนูตัวผู้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 3 กลุ่มแรกได้รับการป้อนไซแลนเนสปริมาณต่างกันคือ 400, 2,000 และ 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ ตามลำดับ กลุ่มควบคุมได้รับการป้อนน้ำกลั่น ระยะเวลาการป้อน 60 วัน ไซเลนเนสไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว และอวัยวะภายใน ในขณะที่ค่า Hb ในกลุ่ม 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม 2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ แต่ค่า % PCV ในกลุ่ม 2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และจำนวน WBC ของกลุ่ม 2,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$). Eosinophil, neutrophil, basophil และ lymphocyteไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับปริมาณ 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ มีค่า Monocyte ต่ำกว่าทุกกลุ่ม ในขณะที่ ระดับของ BUN และCreatinine ลดลง เช่นเดียวกับระดับของ glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) และ alkaline phosphatase (ALP) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง หนูทดลองได้รับไซแลนเนสในปริมาณต่างกันคือ 750, 1,500 และ 4,000 $Uml^{-1}Kg^{-1}$ เป็นระยะเวลา 120 วัน ได้พิจารณาผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะภายใน ค่าโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีของเลือด เป็นสองช่วง (ช่วงการให้และช่วงหยุดการให้) พบว่า ไซแลนเนสไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว อวัยวะภายใน ระดับ SGOT ในหนูกลุ่มที่ได้รับไซแลนเนส มีระดับลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ ระดับของ SGPT มีค่าใกล้เคียงกันทุกกลุ่มการทดลอง ระดับของ BUN ในกลุ่มที่ได้รับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซแลนเนส มีค่าสูงขึ้นในช่วงการให้ แต่จะค่อยๆ ลดลงในช่วงหลังหยุดการให้ อย่างไรก็ตามระดับของ Creatinine ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

ทำการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์สามวิธี คือ Sulphorhodamine B(SRB), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT และ Neutral red (NR) นำมาใช้เพื่อการวัดผลของ CX, inactivated crude xylanase (ICX) และ purified xylanase (PX) ต่อเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์เชื้อสายที่เป็นเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด และเซลล์ปกติ 1 ชนิด พบว่า CX และICX ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็ง มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μgml^{-1} ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของการได้รับ ในขณะที่ PX มีค่า IC_{50} มากกว่า 30 μgml^{-1}ในเวลา 72 ชั่วโมงของการได้รับ

การพัฒนาไซแลนเนสเพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์ในอาหารสัตว์โดยการวัดความเป็นไปได้ของการเสริมไซแลนเนสที่ผสมในสูตรอาหาร ต่อประสิทธิภาพการเติบโตของไก่ ได้แบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่1 ให้อาหารสูตรปกติ ส่วนกลุ่มที่ 2 และ3 ให้อาหารสูตรที่มีไซแลนเนสผสมอยู่ในปริมาณที่ต่างกัน คือ 10 และ30 gKg^{-1} ตามลำดับ น้ำหนักตัว ปริมาณการกินอาหาร อัตราการรอด และความเป็นพิษเบื้องต้นต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน และค่าชีวเคมีในเลือด ถูกบันทึก และนำมาประเมินผล พบว่า การเสริมไซแลนเนสในสูตรอาหารทำให้น้ำหนักตัวไก่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น และไม่พบการตายของไก่ตลอดการทดลอง แต่การเสริมไซแลนเนสในสูตรอาหารที่ปริมาณ 30 gKg^{-1} ทำให้ระดับของ BUN ลดลง แต่ทำให้ระดับของ SGPT เพิ่มขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าการเสริมไซแลนเนสไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักอวัยวะภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าไซแลนเนสที่ผลิตจากเชื้อ *T. aurantiacus* SL16W ไม่มีความเป็นพิษในหนูทดลอง เซลล์เชื้อสาย ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้ไซแลนเนสเพื่อผสมในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved