

<b>Thesis Title</b>	Production and Properties of Thermostable Phytase from <i>Thermoascus aurantiacus</i> SL16W
<b>Author</b>	Miss Chatchaya onumpai
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Thesis Advisor</b>	Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch

### ABSTRACT

Phytase (myo-inositol hexakis dihydrogenphosphate phosphohydrolase; EC3.1.3.6 and 3.1.3.28) hydrolyzes phytic acid to mono-, di-, tri-, tetra- and pentadihydrogenphosphate and orthophosphate. *Thermoascus aurantiacus* SL16W is a thermophilic fungus isolated from soil sample collected in Chiang Mai area. This strain could produce phytase. The screening of agricultural materials for using as the source of carbon and phytic acid was performed. It was found that, the highest phytase activity was obtained from cultivation on rice bran as 41.1 U/g rice bran at the third day of fermentation. The optimization culture conditions in both solid and liquid medium by using rice bran as carbon and phytic acid source was investigated. In the case of solid-state fermentation, the proper amount of rice bran and initial moisture content was 8.14 g and 61% (w/w). Addition of 0.5% Tween 80, 2.64 mg% (w/w) phosphate (in the form of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 8.89% (w/w) glucose and 0.06% (w/w)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  increased the phytase production. The optimum temperature was 55°C. Cultivation of *T. aurantiacus* SL16W in optimized medium at 55°C for 72 h gave the maximum phytase activity as 80.08 U/g rice bran. In liquid medium, the optimum rice bran quantity was 10% (w/v) and initial pH value of medium was 6.0. Addition of

0.25% (w/v) Tween 80, 7.01 mg% (w/v) phosphate (in the form of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1.86% (w/v) glucose and 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  increased the phytase yield. In optimized liquid medium at  $50^\circ\text{C}$  for 72 h, *T. aurantiacus* SL16W produced the maximum phytase activity as 761.8 U/g rice bran. The phytase was partial purified to 161 folds with specific activity 6.64 U/mg protein and 3.63% recovery by ethanol precipitation, DEAE sephadex A-50 and Sephadex G150, respectively. The molecular weight estimated by gel filtration was 80.8 kDa approximately. The partial purified phytase exhibited an optimum temperature at  $50^\circ\text{C}$  and stable at  $40^\circ\text{C}$  for 24 h. The half-life of the enzyme after heat inactivation at  $60^\circ\text{C}$  was 60 min. Optimum pH for phytase activity was 5.0 and stable at 5.0-8.0.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไฟเตสทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อ

*Thermoascus aurantiacus* SL16W

ผู้เขียน

นางสาว ฉัตรชยา อ่อนอำไพ

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร. ชชาติชาย โจนงนุช

### บทคัดย่อ

เอนไซม์ไฟเตส (myo-inositol hexakis dihydrogenphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 และ EC 3.1.3.26) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสกรดไฟติกและให้ผลิตภัณฑ์เป็น mono-, di-, tri-, tetra-, pentadihydrogenphosphate และ orthophosphate พบว่า *Thermoascus aurantiacus* SL16W ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงใหม่ เป็นราที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ จากการคัดเลือกวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและกรดไฟติก พบว่าการหมักบนรำข้าวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 41.1 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ส่วนการหมักบนงาขาว งาคำ กากงา และกากถั่วเหลืองให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่ต่ำกว่า คือ 31.9, 26.1, 16.0 และ 16.6 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ จากนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ซึ่งเลือกใช้รำข้าวเป็นแหล่งของคาร์บอนและกรดไฟติกได้ถูกศึกษาทั้งการหมักบนอาหารแห้งและอาหารเหลว ในการหมักบนอาหารแห้งพบว่าปริมาณรำข้าวและความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 8.14 กรัม และ 61% (w/w) นอกจากนี้การเติม Tween 80 0.5% (w/w) ฟอสเฟต (ในรูปของ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.64 mg% กลูโคส 8.89% (w/w)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.06% (w/w) ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไฟเตสและอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซลเซียส จากการหมักบนอาหารที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์ไฟเตส 80.1 หน่วยต่อกรัมรำข้าว ส่วนการหมักในอาหารเหลว พบว่าปริมาณรำข้าวที่เหมาะสมคือ 10% (w/v) และค่าความ-

เป็นกรดค้างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมคือ 6.0 นอกจากนี้การเติม Tween 80 0.25% (w/v) ฟอสเฟต (ในรูปของ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 7.01 mg% (w/v) กลูโคส 1.86% (w/v) และ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.4% (w/v) ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสจากการเลี้ยงในอาหารที่ผ่านการทำให้เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คือ 761.8 ยูนิต์ต่อกรัม รำข้าว สามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอล การแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE sephadex A-50 และเจลฟิวเตรชัน Sephadex G-150 ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 161 เท่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 6.64 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และค่าผลผลิตกลับคืน 3.63% การประมาณมวลโมเลกุลโดยเจลฟิวเตรชัน พบว่ามีขนาดประมาณ 80.8 kDa อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และเสถียรที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าครึ่งชีวิตของการเสถียรภาพการทำงานนาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดค้างเท่ากับ 5.0 และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดค้าง 5.0-8.0.