Thesis Title Enhancement of myrosinase production from *Aspergillus* sp. NR463 by Mutagenesis

Author Mr. Bordin Butr-Indr

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member
Dr. Lalida Shank	Member

ABSTRACT

Twenty seven fungal isolates, a *Rhizopus* sp., a *Mucor* sp. and 25 *Aspergillus* sp., and 11 gram negative rod bacteria were obtained from soil by growing in sinigrin agar plates. All microbial strains were assessed for glucosinolate degradative potential in liquid culture by using sinigrin as a model substrate. Sinigrin degrading activity was shown by three fungal genus. Among three fungal genus, only the 21 isolates in the genus *Aspergillus* exhibited potential for degrading sinigrin. Preliminary studies of 21 *Aspergillus* isolates were found to be different in colony morphologies and intracellular protein patterns. The most effective myrosinase producer was *Aspergillus* sp. NR463. The NR463 strain also exhibited a high potential to degrade glucosinolate which were contained in brown mustard seeds (*Brassica juncea*).

For production of myrosinase by *Aspergillus* sp. NR463, cultivation was performed by one step liquid culture. Optimum conditions for enzyme production were achieved in mustard extract medium with glucosinolate concentration of 10 mM,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

operating at pH 6.5 and temperature of 30°C for 48 hr, under reciprocal shaking at 150 rpm. Cell free extracts obtained after fungal cell disruption of 1.369 units per ml of the culture medium.

UV, ethylmethane sulfonate (EMS) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) were used to mutate *Aspergillus* sp. NR463 in order to increase myrosinase production. The results presented 7 strains (NR463U2, NR463U3, NR463U4, NR463E2, NR463E3, NR463MG1 and NR463MG3) that have myrosinase overproduction (1.85, 1.7, 2.35, 1.68, 1.81, 1.88 and 1.64 units per ml respectively) and prolonged stability greater than the wild-type. The selected mutant strains were examined by RAPD to genetically distinguish the 7 isolates by using 10 primers. The result was clearly illustrated different DNA patterns among wild-type and mutant strains. All of the mutant strains had the same optimal growth conditions of the wild-type in 10 mM of glucosinolate medium, pH 6.5 and temperature of 30°C for 48 hr, under reciprocal shaking at 150 rpm. The most effective mutant strain was *Aspergillus* sp. NR463U4 produce 2.35 units per ml of the culture medium. This is the highest myrosinase production ever reported by a microorganism.

Optimal condition of crude myrosinase from *Aspergillus* sp. NR463U4 was pH 8.0 and 29-30^{0}C. Enzyme kinetics of crude myrosinase was shown as K_m and V_{max} with sinigrin. When spectrophotometric method was used to monitor substrate decrease, the values were calculated to be 0.25 mM and 28.86 μmol min^{-1} mg-1 protein. While couple enzyme method used to follow product increase gave the K_m

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and V_{max} values of 0.82 mM and 95 μmol $min^{-1}mg^{-1}$ protein respectively. Glucosinolate hydrolysis by crude myrosinase at pH 7.5, yielded allylisothiocyanate as a main product. Whereas, no liberation of allylcyanide, a possible toxic product, was observed in the reaction mixtures.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเพิ่มการผลิตไมโรซิเนสจาก *Aspergillus* sp. NR463 โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์
ชื่อผู้เขียน	นาย บดินทร์ บุตรอินทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม ประธานกรรมการ
	ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์ กรรมการ
	ดร. ลลิดา แชงค์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเชื้อรา 27 สายพันธุ์ คือ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., และ *Aspergillus* sp. 25 สายพันธุ์ และ แบคทีเรียแกรมลบ 11 สายพันธุ์ ที่แยกจากดิน โดยเลี้ยงในอาหารวุ้นซินิกริน เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในอาหารเหลวที่มีซินิกรินเป็นสับสเตรท พบว่ามีเพียงเชื้อราเท่านั้นที่สามารถย่อยซินิกรินได้ ถึงแม้ว่าเชื้อราทั้ง 3 กลุ่ม สามารถย่อยซินิกรินได้ แต่มีเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* 21 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถย่อยซินิกรินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Aspergillus* 21 สายพันธุ์นี้มีลักษณะของโคโลนี และรูปแบบของโปรตีนภายในเซลล์แตกต่างกัน โดย *Aspergillus* sp. NR463 สามารถผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนส (myrosinase) ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดและไมโรซิเนสที่ผลิตได้ยังมีแอคติวิตีสูง ยิ่งไปกว่านั้น NR463 สามารถย่อยกลูโคสิโนเลต (glucosinolate) ที่อยู่ในเมล็ดมัสตาร์ดสีน้ำตาล (*Brassica juncea*) ได้ ซึ่งการผลิตไมโรซิเนสโดย *Aspergillus* sp. NR463 ทำโดยเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนเดียว สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ ใช้สารสกัดมัสตาร์ดที่มีกลูโคสิโนเลทเข้มข้น 10 mM เป็นอาหาร นำไปเลี้ยงที่ pH 6.5,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 30^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่า 150 รอบต่อนาที เมื่อทดสอบสารสกัดเซลล์หลังทำให้เซลล์แตกพบว่า มีแอคติวิตีของไมโรซิเนส 1.369 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพื่อเพิ่มการผลิตไมโรซิเนส จึงได้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus* sp. NR463 โดยวิธีกายภาพและเคมี โดยใช้ UV, ethylmethane sulfonate (EMS) และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ในเวลาที่เหมาะสมในการเกิดการกลาย พบว่ามีเชื้อรากลาย 7 สายพันธุ์คือ NR463U2, NR463U3, NR463U4, NR463E2, NR463E3, NR463MG1 และ NR463MG3 ผลิตไมโรซิเนส 1.85, 1.7, 2.35, 1.68, 1.81, 1.88 และ 1.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่ผลิตมีความเสถียรมากกว่าเชื้อ wild-type เมื่อนำเชื้อกลาย (mutant strains) เหล่านี้ (7 สายพันธุ์) ไปตรวจสอบด้วย RAPD โดยใช้ 10 primers เพื่อพิสูจน์ความแตกต่างทางพันธุกรรม ผลที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความแตกต่างของดีเอ็นเอในเชื้อ wild-type และเชื้อกลายทั้ง 7 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์กลายทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหาร ในสภาวะเดียวกับเชื้อ wild-type (กลูโคสิโนเลทเข้มข้น 10 mM, pH 6.5, อุณหภูมิ 30^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่า 150 รอบต่อนาที) เชื้อกลาย *Aspergillus* sp. NR463U4 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไมโรซิเนส โดยผลิตไมโรซิเนส 2.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการผลิตไมโรซิเนสปริมาณสูงที่สุดเท่าที่ได้เคยมีการรายงานมาในจุลินทรีย์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude myrosinase ของเชื้อกลาย *Aspergillus* sp. NR463U4 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที pH 8.0 และอุณหภูมิ 29-30^{0}C. เมื่อการศึกษาจลน์ศาสตร์ของ crude myrosinase โดยคำนวณการลดลงของสับสเตรทซินิกรินด้วยวิธีสเปคโตรโฟโทเมตรีพบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 0.25 mM และ V_{max} เท่ากับ 28.86 μmol min^{-1}mg^{-1} protein และเมื่อคำนวณการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี couple enzyme พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 0.82 mM และ V_{max} เท่ากับ 95 μmol min^{-1}mg^{-1} protein ตามลำดับ ในการย่อยกลูโคสิโนเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดย crude myrosinase ที่ pH 7.5 ให้อัลลิลไอโซไธโอไซยาเนท (allylisothiocyanate) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยไม่พบอัลลิลไซยาไนด์ (allylcyanide) ซึ่งเป็นสารพิษที่อาจเกิดได้ในปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved