Thesis Title Medium Optimization for Production and Characterization of Purified Xylanase from Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* SL16W

Author Mr. Yuth Kasinubol

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch **Chairperson**

Assoc. Prof.Dr. Saisamorn Lumyong **Member**

ABSTRACT

Medium optimization for xylanase production by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* SL16W was studied both in solid and liquid culture in 250 ml Erlenmeyer flask. Statistical experimental methods were used to find the factors affected on enzyme production. In solid medium, the results of first–order factorial design experiments with 0.934 of R^2 value showed that corncob and soybean meal were significant factors, while ammonium phosphate and moisture content were insignificant, however ammonium phosphate exhibited an interaction with corncob. Based on the results of the first–order factorial design experiment, the optimum composition was investigated by using a central composite design (CCD). It was found that corncob and soybean meal quantities were affected on enzyme production significantly. Xylanase activity produced by the fungus under the optimized condition, 1.27 g corncob, 1.32 g soy bean meal, 0.04 g ammonium phosphate/g corncob and 50% (w/w) of moisture content, was found to be 7513 U/g substrate at 11 days where its value predicted by the response surface methodology was 6377 U/g substrate. In liquid medium, initial screening using a Plackett-Burman design identified ten components demonstrated soybean meal, $CaCl_2$, KH_2PO_4 and $ZnSO_4$ were significantly affected on xylanase production. Based on the results of Plackett-Burman design, the optimum composition was then investigated by using a central composite design (CCD). Soybean meal and $CaCl_2$ were found to be the significant variables. Response surface methodology was applied to determine the interaction between these two components and optimal levels for xylanase production. The maximum xylanase activity of 953 U/ml could be estimated at 11.37g/l of soybean meal and 0.38g/l of $CaCl_2$. Under optimized medium, the maximum xylanase activity was 1144 U/ml after cultivation for 11 days.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The extracellular xylanase from *T. aurantiacus* SL16W, obtained from cultivated in optimized medium at 45°C, was purified to homogeneity by ammonium sulphate precipitative, DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography and Sephacryl S-100 HR gel filtration. The enzyme was purified 6.20 folds with the specific activity of 1427 U/mg protein. This xylanase was monomeric protein with molecular weight (MW) of 33 kDa by SDS-PAGE and 31 kDa by gel filtration. The optimum pH and temperature for the action of enzyme activity were 5.0 and 75°C, respectively. The purified xylanase was fully stable at pH 6.0 and temperature range 50-70°C for at least 1 h incubation. The K_m and V_{max} value were 1.1% (w/v) and 0.793 μmole/min, respectively. At 1 mM concentration of $HgSO_4$ and $KMnO_4$ strongly inhibited xylanase activity, while $CaCl_2$, KCl and NaCl were tended to increase the enzyme activity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตและศึกษาสมบัติเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์จากเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูง *Thermoascus aurantiacus* SL16W
ผู้เขียน	นายยุทธ กสิณอุบล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ชาติชาย โขนงนุช **ประธานกรรมการ** รศ.ดร. สายสมร ลำยอง **กรรมการ**

บทคัดย่อ

ทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราทนร้อนสายพันธุ์ *Thermoascus aurantiacus* SL16W โดยทำการเลี้ยงในอาหารแข็งและเหลวที่บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร มีการใช้วิธีทางสถิติในการออกแบบการทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ผลการศึกษาในอาหารแข็งพบว่าปริมาณแกนข้าวโพดและกากถั่วเหลืองบดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณแอมโมเนียมฟอสเฟต และความชื้นในอาหาร ไม่มีผลต่อค่าการผลิตเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแกนข้าวโพดและแอมโมเนียมฟอสเฟตมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ จากการออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) พบว่าปริมาณแกนข้าวโพดและกากถั่วเหลืองบดมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมโดยมีส่วนประกอบของอาหารคือ แกนข้าวโพดบด 1.27 กรัม, กากถั่วเหลืองบด 1.32 กรัม, แอมโมเนียมฟอสเฟต 0.04 กรัม และความชื้น 50%(น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าในวันที่ 11 ของการเลี้ยงได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 7513 ยูนิตต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่การวิเคราะห์ด้วยการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response surface methodology) สามารถทำนายสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 6377 ยูนิตต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกรณีของการศึกษาในอาหารเหลว ทำการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารสิบชนิด พบว่ากากถั่วเหลืองบด แคลเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟสและสังกะสีซัลเฟตมีผลต่อการผลิตไซลาเนสอย่างมีนัยสำคัญและถูกคัดเลือกเพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป จากผลการทดลองที่ได้นำมาใช้ในการออกแบบการทดลองแบบ CCD เพื่อหาองค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตมากที่สุด พบว่ากากถั่วเหลืองบดและแคลเซียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบของอาหารมีผลต่อการผลิตไซลาเนสอย่างมีนัยสำคัญ การนำวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองและหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสพบว่า ค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการทำนายมีค่า 953 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของกากถั่วเหลืองบด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11.38 กรัมต่อลิตรและมีแคลเซียมคลอไรด์ 0.39 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่เหมาะสมพบว่า ได้ค่ากิจกรรมของไซลาเนสสูงสุด 1144 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อนาน 11 วัน

เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. aurantiacus* SL16W สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ(DEAE-Sephadex A-50) และเจลฟิวเตรชั่น (Sephacryl S-100HR) หลังจากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.20 เท่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ1427 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และจัดเป็นโมโนเมอร์ริกเอนไซม์ (monomeric enzyme) โดยมีค่ามวลโมเลกุลประมาณ 33 และ 31 กิโลดาลตัน จากการประมาณโดย SDS-PAGE และ เจลฟิวเตรชั่นตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 5.0 และ 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 จากการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิช่วง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส จากการบ่มนาน 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.1%(w/v) และ 0.793 ไมโครโมลต่อนาทีตามลำดับ ปรอทซัลเฟต ($HgSO_4$) และโปแทสเซียมเปอร์มังกาเนต ($KMnO_4$) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล่าร์สามารถยับยั้งการทำงานของไซลาเนสได้อย่างรุนแรง ในขณะที่แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีแนวโน้มที่จะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved