

<b>Thesis Title</b>	Laccase Production and Characterization by <i>Coriolus versicolor</i> RC3 Cultivated on Rice Bran	
<b>Author</b>	Miss Pattana Kakumyan	
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Lect. Dr.Chartchai Khanongnuch Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson Member

## ABSTRACT

Thermostable laccase (TSL) production by thermotolerant white rot fungus, *Coriolus versicolor* RC3, on seven kinds of rice bran including Sanpatong, Neowsanpatong, RD6, RD10, RD15, Mali105 and Chainat rice was studied. It was found that rice bran from Neowsanpatong was an efficient substrate for enzyme production. Plackett and Burman design was used to study the effect of some variables including ammonium tartrate, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, yeast extract, Tween80 and initial pH for TSL production and Central Composite Design (CCD) was used for optimization. In liquid medium, the highest yield of TSL (90%TSL) was obtained when cultivated in medium containing 3.94%(w/v) Neowsanpatong rice bran, 0.19%(w/v) ammonium tartrate, 0.951 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.09%(w/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.1%(w/v) MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.03%(w/v) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.09%(w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.09%(w/v) yeast extract, 1%(v/v) Tween80 and initial pH 6.92. In case of solid state cultivation, the highest thermostable laccase production (90%TSL) was obtained with the medium containing 5 grams Neowsanpatong rice bran, 75%(w/w) initial moisture content,

0.49%(w/v) ammonium tartrate, 0.652 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.91%(v/v) Tween80 and initial pH 5.17. TSL from *C. versicolor* strain RC3 was purified by DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 and Sephadex G-150. The purification of TSL was 98.6 folds and 8.6% activity yield was obtained. The TSL activity was 98% remaining after 1 h of incubation at 60 °C. The enzyme was monomeric protein with 61-62 kDa of molecular weight, approximately. The TSL showed optimal pH at pH 5.0 with 2,6-dimethoxyphenol (DMP). The enzyme was stable at pH 6.0-8.0. The K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> value of the enzyme were 0.809 mM and 2.659 μmole/min, respectively, with 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate) (ABTS) as substrate, while those value with DMP were 0.856 mM and 2.117 μmole/min, respectively. The purified enzyme was completely inhibited by 1 mM FeSO<sub>4</sub>.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคลสโดย

*Coriolus versicolor* RC3 จากการเลี้ยงในรำข้าว

ผู้เขียน

นางสาว พัฒนา คำกำยาน

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.ชาติชาย โภนงนูช ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ถ่ายอง กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์แลคเคลสจากเชื้อรากของเชื้อราเบสิดิโอมัยซีททันร้อน *Coriolus versicolor* RC3 ในรำข้าว 7 ชนิด คือ รำข้าวเหนียวสันป่าตอง สันป่าตอง กบ6 กบ10 กบ15 มะลิ105 และ ขี้นนาท พบร่วมกับ รำข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นสับสเตรทที่มีแนวโน้มในการผลิตเอนไซม์แลคเคลสทันร้อนสูงสุด จึงนำมาทดสอบผลของปัจจัยต่างๆ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ แอมโมเนียมทาร์เทต คอปเปอร์ชัลเฟตแมกนีเซียมชัลเฟต แมงกานีสชัลเฟต เฟอร์สชัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไಡไฮドโรเจนฟอสเฟต สารสกัดจากเยลล์ Tween80 และค่า pH เริ่มต้นของอาหาร จากนั้นหาความสัมพันธ์ของปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคลสที่ทันร้อนสูงสุดโดยใช้แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD) พบว่าในอาหารเหลวที่ทำให้การผลิตเอนไซม์แลคเคลสที่ทันร้อนสูงสุด 90%(%TSL) ประกอบด้วยรำข้าวเหนียวสันป่าตอง 3.94%(w/v) แอมโมเนียมทาร์เทต 0.19%(w/v) คอปเปอร์ชัลเฟต 0.951 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมชัลเฟต 0.09%(w/v) แมงกานีสชัลเฟต 0.1%(w/v) เฟอร์สชัลเฟต 0.03%(w/v) โพแทสเซียมไಡไฮดโรเจนฟอสเฟต 0.09%(w/v) สารสกัดจากเยลล์ 0.09%(w/v) Tween80 1%(v/v) และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.92 ในขณะที่ส่วนประกอบของอาหารแข็ง

ที่เหมาะสมคือข้าวเหนียวสันป่าตอง 5 กรัม ความชื้นรีมตันของอาหาร 75%(w/w) และโมเนียมฟาร์เกรต 0.49%(w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต 0.652 มิลลิโมลาร์ Tween80 0.91%(v/v) และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.17 เอนไซม์แลคเตสทานร้อนจากเชื้อรา *C. versicolor* RC3 ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 และ Sephadex G-150 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 98.6 เท่า และค่า recovery yield เท่ากับ 8.6% เอนไซม์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือ 98% และเคลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นโมโนเมริกเอนไซม์ มีขนาดมวลโมเลกุลของประมาณ 61-62 kDa ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 5.0 เมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) เป็นสับสเตรท และมีความเสถียรที่ pH 6.0 ถึง 8.0 ค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  เมื่อทำปฏิกิริยากับ 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) เท่ากับ 0.809 mM และ 2.659 ในโครโนมลต่อนาที ในขณะที่เมื่อทำปฏิกิริยากับ DMP เท่ากับ 0.856 mM และ 2.117 ในโครโนมลต่อนาที ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย  $\text{FeSO}_4$  ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved