

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION
OF
PHYTASE FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS MEC1**

KATHAWUT SOPALUN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

ISBN 974-04-5060-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS MEC1

KATHAWUT SOPALUN 4536524 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: JEERAPUN WORAPONG, Ph.D., JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., SAOVANEE DHAMSTHITI, Ph.D., SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D.

Abstract

Phytase (myo-inositol-hexakisphosphate 3-phosphohydrolase) is an acid phosphatase enzyme, which efficiently cleaves phosphomonoester bonds of phytate, creating lower forms of myo-inositol phosphates and inorganic phosphate. Phytic acid, or phytate, is a major storage form of phosphorus in soy bean meals and other plant materials as protein sources in animal feed but it acts as an antinutrient by chelating divalent cations and preventing the uptake of minerals. However, phytate phosphorus is biologically unavailable to non-ruminant animals including humans and pigs, as they lack the digestive enzyme capable of hydrolyzing this substrate. Therefore, phytase becomes the industrially important enzyme for solving those problems. Production and characterization of phytase from endophytic fungi were studied and general properties of phytase enzyme produced, as new candidates for applications in industry and agriculture, were determined. Three hundred and five endophytic fungi were isolated from thirty plant species collected from Nakhonnayok, Prachoapkeereekhan and Nakhonprathom provinces, Thailand. The strain MEC1, isolated from *Minosops elengi*, can produce the highest phytase on a phytic selective medium (PSM) at pH 6.0 and 25°C. The MEC1 gives the highest activity of phytase (3.3 U/ml) when it was cultured in 8% corn starch medium (CSM80) for 9 days. Crude MEC1 exhibited the optimum pH and temperature for phytase activity at pH 5.0 and 60°C, respectively. Crude phytase enzyme showed a high stability under high temperatures, even at 60°C and in pH range 2.0-6.0. It was stable in the presence of 10 mM of Na⁺, Ca²⁺, K⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Moreover, the enzyme activity was increased to 103.9% and 109.7% in the presence of 10 mM K⁺ and NH₄⁺ ions, respectively. Apart from the phytase enzyme, MEC1 produced high amounts of amylase, xylanase, endoglucanase and acid phosphatase in CSM80 medium. Low amounts of protease, lipase and alkaline phosphatase were found in crude MEC1. For the digestion efficiency, crude MEC1 helped increase phosphate, reducing sugar and protein content in digestion of chicken feed, rice bran, wheat bran and soybean meals. The endophytic strain MEC1 produces *Acremonium*-liked conidia. However, based on its ITS1-5.8S-ITS2 sequence, MEC1 should be classified as *Mycosphaerella* sp. with 99% similarity of uncultured *Mycosphaerella* clone LDG1 (AF207670).

KEY WORDS: PRODUCTION/ CHARACTERIZATION/ PHYTASE/
ENDOPHYTE/ *Mycosphaerella* sp.

116 pp. ISBN 974-04-5060-1

การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ MEC1
(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE FROM AN
ENDOPHYTIC FUNGUS MEC1)

คณาจารย์ โสภากุล 4536524 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จีรพันธ์ วรพงษ์, Ph.D., จริญญา ณรงค์ชวนะ, D.Agr.Sc.,
เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ, Ph.D., สุเทพ ไวยครุฑรา, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไฟเทสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไฟเตคฟอสฟอรัสให้เกิดอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่พืชและสัตว์สามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่าย ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์ที่มีกระเพาะเดียวรวมทั้งมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายไฟเตคฟอสฟอรัสที่มีสะสมอยู่มากในในส่วนต่าง ๆ ของพืชเนื่องจากขาดเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดนี้ ดังนั้นเอนไซม์ไฟเทสจึงเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้แก้ปัญหาดังกล่าว การจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อราเอนโดไฟท์จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาผู้ผลิตเอนไซม์ไฟเทสชนิดใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรม ผลจากการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืชสามสิบชนิดจากจังหวัดนครนายก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดนครปฐม สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 305 สายพันธุ์ และเมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านี้มาทดสอบเพื่อหาการผลิตเอนไซม์ไฟเทส ปรากฏว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ MEC1 ซึ่งแยกได้จากดินพิกุล (*Minosops elengi*) สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเทสได้มากที่สุดบนอาหาร PSM ที่มีค่าพีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเทสได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร CSM80 เป็นเวลา 9 วัน ผลจากการศึกษาคุณสมบัติทั่วไปของครูดเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร CSM80 พบว่าเอนไซม์ไฟเทสมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความคงทนในช่วงสภาวะพีเอช 2.0-6.0 และในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ครูดเอนไซม์ไฟเทสยังมีความคงทนต่อ Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} และ EDTA ยิ่งไปกว่านั้น K^+ และ NH_4^+ ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไฟเทส นอกจากนี้เอนไซม์ไฟเทสแล้วเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ MEC1 ยังสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์เซลลูลาเนส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเทส ในปริมาณมาก และยังพบเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหาร CSM80 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยอาหารไก่ ไร่ข้าวสาลี ไร่ข้าวเจ้า และกากถั่วเหลือง พบว่าครูดเอนไซม์ไฟเทสสามารถเพิ่มปริมาณฟอสเฟต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง และปริมาณโปรตีนในสารตั้งต้นดังกล่าว เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ MEC1 สร้างสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายสปอร์ของเชื้อรา *Acremonium* sp. อย่างไรก็ตามเมื่อจำแนกด้วยการตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ MEC1 คือ *Mycosphaerella* sp. ด้วยระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1-5.8S-ITS2 ที่ 99% กับ uncultured *Mycosphaerella* clone LDG1 (AF207670)