

Thesis Title	Laccase Production and Characterization by <i>Coriolus versicolor</i> RC3 Cultivated on Rice Bran	
Author	Miss Pattana Kakumyan	
Degree	Master of Science (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	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, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.09%(w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1%(w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03%(w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09%(w/v) KH_2PO_4 , 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 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_m and V_{max} value of the enzyme were 0.809 mM and 2.659 $\mu\text{mole}/\text{min}$, 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 $\mu\text{mole}/\text{min}$, respectively. The purified enzyme was completely inhibited by 1 mM FeSO_4 .

ที่เหมาะสมคือข้าวเหนียวสันป่าตอง 5 กรัม ความชื้นเริ่มต้นของอาหาร 75%(w/w) แอมโมเนียมคาร์เตรต 0.49%(w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต 0.652 มิลลิโมลาร์ Tween80 0.91%(v/v) และค่า pH เริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 5.17 เอนไซม์แลคเตสทนร้อนจากเชื้อรา *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% แลคเตสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เป็นโมโนเมอร์เอนไซม์ 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 ไมโครโมลต่อนาที ในขณะที่เมื่อทำปฏิกิริยากับ DMP เท่ากับ 0.856 mM และ 2.117 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์