

**PRODUCTION OF RECOMBINANT PHYTASE IN
PSEUDOMONAS PUTIDA CARRYING
ESCHERICHIA COLI APPA**

JETNAPA TECHAWIPARAT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATED STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-4223-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การผลิตเอนไซม์ไฟเทสจาก *Pseudomonas putida* ที่มียีน *appA* จาก *Escherichia coli*
(PRODUCTION OF RECOMBINANT PHYTASE IN *Pseudomonas putida*
CARRYING *Escherichia coli appA*)

เจษฎ์นภา เดชวิภารัตน์ 4436699 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เสาวนีย์ ธรรมสถิต, Ph.D., สัทธีวัฒน์ เลิศศิริ, Ph.D.,
สุชาติ อุดมโสภกิจ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Pseudomonas putida ที่มียีน *appA* จาก *Escherichia coli* [P(EappA)] ผลิตเอนไซม์ไฟเทสแบบ extracellular นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB เพื่อศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ไฟเทสของ P(EappA) มีความคงทนต่อความเป็นกรดและด่างที่อุณหภูมิ 4°C ที่ pH 4 และ 8 และเปลี่ยนระดับความคงทนมาที่ pH 4 และ 10 ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความคงทนสูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C เอนไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดที่ pH 4.5 และอุณหภูมิ 55°C ไฟเทสลดความคงทนในสภาวะที่มี trypsin, taurocholic acid, deoxycholic acid และ propionic acid แต่คงทนในสภาวะที่มี lactic acid ไฟเทสมีความคงทนในสภาวะที่มี Na^+ , K^+ , Mn^{2+} และ Co^+ แต่เสียความคงทนเมื่อมี Ca^{2+} , NH_4^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+} ส่วน Mg^{2+} เพิ่มความสามารถการทำงานของเอนไซม์และ EDTA ไม่มีผลกระทบต่อไฟเทส เมื่อพัฒนาสูตรอาหารพบว่าอาหารชนิด SMYC ประกอบด้วย ส่วนประกอบของ PSM (Kerovuoto *et al.*, 1998) ที่ไม่เติม phytate และเติม 10% กากถั่วเหลือง, 0.1% yeast extract และ 0.1% citric acid และเติมน้ำตาลกลูโคสก่อนฆ่าเชื้อให้ความสามารถการทำงานของไฟเทสสูงสุด นำ SMYC 500 มิลลิลิตรมาเลี้ยง P(EappA) พบว่าใน 12 ชั่วโมงอัตราการเจริญเข้าสู่ log phase และสูงสุดสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.1 OD₆₀₀/hr และความสามารถทำงานที่ 6.32 U/ml เมื่อครบ 48 ชั่วโมงความสามารถทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 177.62 U/ml ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งลดลงอย่างช้าใน 30 ชั่วโมงแรกและลดอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ stationary phase ส่วนค่า pH ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ใน P(EappA) พบเอนไซม์ชนิดอื่นเช่น amylase, cellulase, xylanase และ endoglucanase ทำไฟเทสให้เข้มข้นและเก็บในรูปแบบของสารละลาย, ตะกอนแห้ง และตะกอนเปียกพบว่าทั้งสามชนิดมีความสามารถทำงานคงเหลือมากกว่า 80% หลังจากเก็บ 28 วัน และเอนไซม์ชนิดตะกอนแห้งมีความคงทนสูงสุดเมื่อผสมกับอาหารสัตว์ ประสิทธิภาพการย่อยโดยไฟเทสเพิ่มปริมาณฟอสเฟตและโปรตีนในอาหารเลี้ยงไก่, ไร่ข้าวสาลี และกากถั่วเหลืองแต่ไม่พบในไร่ข้าวเจ้า ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การย่อน้ำนมถั่วเหลืองของการศึกษานี้ไม่ประสบผลสำเร็จ

103 หน้า ISBN 974-04-4223-4

PRODUCTION OF RECOMBINANT PHYTASE IN *PSEUDOMONAS PUTIDA*
CARRYING THE *ESCHERICHIA COLI* GENE (*APPA*)

JETNAPA TECHAWIPARAT 4436699 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SAOVANEE DHARMSTHITI, Ph.D., SITTIWAT LERTSIRI,
Ph.D., SUCHAT UDOMSOPHAKIT, Ph.D.

Abstract

Phytase is important for animal feed supplementation. Previous work showed that *Escherichia coli* K12 produced phytase but could not secrete it. Later, the gene coding for phytase was cloned and transformed into *Pseudomonas putida* which could secrete the enzyme and utilize simple materials as a nutrient source. Thus, it was necessary to find out the general properties of phytase and its digestion efficiency as well as the best developing medium.

Pseudomonas putida carrying *Escherichia coli* gene (*appA*) [P(EappA)] was studied for extracellular phytase production. General properties of P(EappA) phytase were determined by using culture supernatant produced in Luria Bertani medium. Crude phytase was found to be most stable at pH 4 and 8 when stored for two hours at 4°C, and at pH 4 and 10 when stored at 37°C. It was most stable at 45°C. The optimal condition for its activity was obtained at pH 4, 55 °C. P(EappA) phytase was sensitive to trypsin, taurocholic acid, deoxycholic acid and propionic acid. Nonetheless, its activity was enhanced when stored with lactic acid. As to the effect of ions, P(EappA) phytase was stable when stored in Na⁺, K⁺, Mn²⁺ and Co⁺ but was not stable when stored in Ca²⁺, NH₄⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ and Zn²⁺. In addition, the enzyme activity was enhanced when stored in Mg²⁺, although it was insensitive to EDTA. In developing the medium, P(EappA) phytase was found to be best produced in medium composed of Phytase Screening Medium with phytate omitted and supplemented with 10% soybean meal, 0.1% yeast extract and 0.1% citric acid. In preparation of this medium, glucose was added prior to sterilization. Cultivation of P(EappA) in 500-ml of this medium showed that P(EappA) growth entered log phase at 12 hours and reached maximum growth at the 18 hours with a growth rate at 0.1 OD₆₀₀/hr. Phytase production was concomitant with growth with a rate at 6.32 U/hr. After 48 hours, the phytase activity obtained was 177.62 U/ml. The level of reducing sugar decreased slowly during the first 30 hours and then dropped rapidly when growth reached the stationary phase. The level of pH did not show vigorous change throughout the cultivation. P(EappA) also contained other enzyme activities: amylase, cellulase, xylanase and endoglucanase. P(EappA) phytase was concentrated and stored in three forms: solution, air-dried and wet precipitates, which retained ≥80% of activity after a 28-day storage. When each form of enzyme was mixed in chicken feed, the air-dried form was the most stable. As to digestion efficiency, the enzyme helped to increase the phosphate and protein contents in chicken feed, wheat bran and soybean meal but not in rice bran, while the level of reducing sugar contents in all materials tested did not significantly increase. Soymilk digestion under the condition used in this study was unsuccessful.

KEY WORDS: *PSEUDOMONAS PUTIDA*/ PHYTASE/ *ESCHERICHIA COLI* *APPA*
103 P. ISBN 974-04-4223-4