PHYTASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIUM

PORNTIP POOLSWAT

With compliments of

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1287-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY
The study of bacterial thermostable phytase is of interest for its use in animal feed. The phytase enzyme is important to increase utilization of phytin-phosphate commonly present in plant seeds and to lower the release of phosphate along with animal manure into the environment. Thermostability of the enzyme is a critical factor in the feed processing with high heat during extrusion or pelletization. In this study a thermophilic bacterium, *Bacillus stearothermophilus* T2, was isolated and found to produce phytase. The organism grew well at 60°C but only slightly at 37°C but its enzyme was active at a temperature of 65°C. Isolation and purification of the enzyme using ammonium sulfate fractionation and ion exchange chromatography were met with no success. The enzyme was found in minute amount in the culture supernatant and was assumed to be very hydrophilic in nature like most of the reported phytases. Attempts to concentrate the enzyme in culture supernatant with the lyophilization method resulted in insoluble protein. Thus, it was assumed that the low protein content might be the cause of failure in using ammonium sulfate fractionation and ion exchange chromatography. An alternative approach was employed to study the enzyme. Cloning and expression of chromosomal DNA containing the phytase gene in *E. coli* was attempted with the aim to study both the phytase gene and finally the enzyme. By using primers designed from conserved sequences of the reported phytases and and with no homology to those of phosphatases, a PCR product of 571 bp was obtained. The PCR product was, then, used to produce a DIG labeling DNA probe of 546 bp for use in screening genomic library. Out of 1,000 colonies screened, two identical positive clones were detected. A positive clone named K2 clone was found to have a 6.5 kb DNA insert. DNA sequence of a 2,450 bp part of the insert DNA that contained sequence similar to that the 546 bp. DNA probe showed an ORF of 1,575 bp that was identified to be the phytase gene. The deduced enzyme was composed of 525 amino acids with a molecular weight of 58,030 daltons.
3936437 SCM/M : สาขาวิชา : ดุริยางค์ : ว.ท.ม. (ดุริยางค์)
ฟาร์มซ์ พูลสวัสดิ์ : เอนไซม์ฟิตสะจากแบคทีเรียที่ชอบร้อน (PHYTASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIUM). คณะวิทยาการควบคุมวิทยาธนพิษ : วิทยา มีเวทีตม., Ph.D., สุ
เทพ ไทยจักรชัย, Ph.D., เสาวนีน์ ธรมสินธุ, Ph.D. 151 หน้า. ISBN 974-04-1287-4

การศึกษาอนิษ์ phytauze ที่พบเรื่อยๆ มาจากแบคทีเรีย เป็นที่น่าสนใจโดยเฉพาะการม่า
ไลฟ์นิ่งในอาหารสัตว์ เอนไซม์ phytauze นี้เป็นอนิษ์ที่สำคัญซึ่งเป็นอนิษ์ที่เพิ่มภูมิคุ้ม
phytin-phosphate ซึ่งปรากฏอยู่ทั่วไปในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีลิปอิก ที่ระบายออกมาภูมิคุ้มของสัตว์
ตุ่มสัตว์และอยู่ในต้นของ ความต้องการของอนิษ์เป็นปัจจัยที่สำคัญอันในกระบวนการถ่ายเท
อนิษ์ที่มีการใช้ความร้อนสูงโดยเฉพาะเข้าจุดการถ่ายเทอนิษ์สัตว์เป็นที่น่าสนใจในแบบที่เร็วที่สุด
Bacillus stearothermophilus T2 ได้ถูกแยกเข้าและพบว่าสามารถถ่ายเทอนิษ์ phytauze
ได้เร็วและสามารถสรุปได้คิดที่ตุ่มอยู่ที่ 60°C และที่ตุ่มอยู่ที่ 37°C สามารถสรุปได้ถูกถ่ายเทได้ใน
น้อย เอนไซม์อนิษ์มีประสิทธิภาพสูงที่ตุ่มอยู่ที่ 65°C การถ่ายเทและอาการการทำอนิษ์บริสุทธิ์
โดยใช้ Ammonium sulfate fractionation และ Ion exchange chromatography นี้ไม่ไปผลกระทบ
สัตว์ ซึ่งพบว่าเข้าสู่ร่างแอนิษ์ออกมาจากอนิษ์ในน้ำเย็นจนกว่าจะไม่แอนิษ์ได้กุมมันที่
ปลอดภัยที่จะเป็นอันตรายเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถสัมผานกับน้ำได้ กรณีการเป็นอนิษ์บริสุทธิ์
อนิษ์อนิษ์นั้นมักจะถูกจับกุมอยู่ที่ตุ่มจนกว่าจะทำให้การถ่ายเทลงต่ำกว่า Ammonium sulfate และการแยก
ด้วย Ion exchange chromatography ไม่ได้ผล วิธีนี้ที่นำไปสู่การศึกษาอนิษ์อนิษ์ขั้นตอนการ
โดเมนนี้เข้าไปในแบบที่เร็ว E. coli และศึกษาการแสดงออกของอนิษ์ของ chromosomal DNA ที่มีใน
phytauze อวัยวะ วิธีการใช้ primer ข้อมูลจากการจากพันธุ์ของนั้นสามารถโพลิฟิลลาเป็นอนิษ์ conserved ของ
อนิษ์อนิษ์ phytauze ที่บันทึกไว้ใน GenBank และไม่เหมือนกับอนิษ์ phosphatase เมื่อทำ PCR จะได้
ชื่อนี้ตั้งขึ้นในตัวอย่าง 571 ตัวอย่าง ตัวอย่างต่อตัวอย่าง 571 ตัวอย่างได้รับอนิษ์ทำ PCR เพื่อดีคลิกและใช้เป็นตัว
ดีคลิกสำหรับการพัฒนา genomice library โดยมีขนาดของขั้นต่ำจากถูกทำบันทึก 546 ตัว
เอฟแซน จากการคัดเลือก clone จำนวน 1,000 clones พบว่ามี 2 clones ที่เป็นอนิษ์ ซึ่ง K2 ที่มี DNA ขนาด 6.5 กิโลเบ้าที่ให้ผลเป็นชัดเจนเมื่อตรวจสอบด้วย colonuhybridization และ
Southern blot และจากการวิเคราะห์โดยการอ่าน DNA ของชื่อนี้ส่วนที่ประกอบด้วยตัวอย่างที่
พบกับก่อนของ DNA ที่ติดคลิกและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ พืชจากตัวอย่าง DNA ที่มีขนาด 2,450 ตัวอย่างจะมี
ORF ที่มีขนาด 1,575 ตัวอย่างได้ถูกจัดเก็บความเป็นอนิษ์ phytauze ซึ่งมี deduced amino acid 525
ดีและมีมวลโมเลกุล 58,030 Daltons.