

17 MAY 2002



**PHYTASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIUM**

**PORNTIP POOLSWAT**

**With compliments  
of**

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล**

**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**

TH  
P936p  
3002  
C.9

Copyright by Mahidol University

3936437 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc.(MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : *BACILLUS* / THERMOPHILIC BACTERIA / PHYTASE C / PHYTIC ACID / CLONING

PORNTIP POOLSWAT : PHYTASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIUM. THESIS ADVISORS : VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D, SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D, SAOVANEE DHARMSTHITI, Ph.D., p151. ISBN 974-04-1287-4

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 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 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา : วท.ม. (จุลชีววิทยา)

พรทิพย์ พูลสวัสดิ์ : เอนไซม์ไฟเตสจากแบคทีเรียที่ชอบร้อน (PHYTASE FROM A THERMOPHILIC BACTERIUM). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., สุเทพ ไวยครุฑธา, Ph.D., เสาวนีย์ ธรรมสถิต, Ph.D. 151 หน้า. ISBN 974-04-1287-4

การศึกษาเอนไซม์ phytase ที่ทนร้อนที่ได้มาจากแบคทีเรียเป็นที่น่าสนใจโดยเฉพาะการนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารสัตว์ เอนไซม์ phytase นี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เพิ่มการใช้ phytin-phosphate ซึ่งปรากฏอยู่ทั่วไปในเมล็ดพืชทำให้ลด phosphate ที่ระบายออกมากับมูลสัตว์ลงสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย ความทนร้อนของเอนไซม์เป็นปัจจัยที่สำคัญมากในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ที่มีการใช้ความร้อนสูงโดยเฉพาะขั้นตอนการอัดอาหารสัตว์เป็นเม็ด ในการศึกษาแบคทีเรียที่ชอบร้อน *Bacillus stearothermophilus* T2 ได้ถูกแยกขึ้นและพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ phytase ได้ เชื้อนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 60°C และที่อุณหภูมิ 37°C สามารถเจริญเติบโตได้เล็กน้อย เอนไซม์ของมันมีประสิทธิภาพสูงที่อุณหภูมิ 65°C การคัดแยกและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้ Ammonium sulfate fractionation และ Ion exchange chromatography นั้นไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งพบว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาน้อยมากในน้ำเลี้ยงเชื้อและคาดว่าเอนไซม์มีคุณสมบัติที่ชอบน้ำมากเหมือนเอนไซม์ phytase ทั่วไป การทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยการทำ lyophilization ไม่ได้ผลเพราะจะจับเป็นก้อนกลายเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถละลายกลับมาได้อีก การมีปริมาณเอนไซม์น้อยมากอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การตกตะกอนด้วย Ammonium sulfate และการแยกด้วย Ion exchange chromatography ไม่ได้ผล วิธีหนึ่งที่น่าไปสู่การศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้คือการโคลนนิ่งเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* และศึกษาการแสดงออกของยีนของ chromosomal DNA ที่มียีน phytase อยู่ โดยการใช้ primer ที่ออกแบบมาจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นยีน conserved ของเอนไซม์ phytase ที่บันทึกใน GenBank และไม่เหมือนกับเอนไซม์ phosphatase เมื่อทำ PCR จะได้ชิ้นส่วนของยีน 571 คู่เบส ต่อมายีนส่วน 571 คู่เบสได้ถูกนำมาทำ PCR เพื่อตัดฉลากและใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการคัดเลือก genomic library โดยมีขนาดของชิ้นส่วนตัดฉลากเท่ากับ 546 คู่เบส จากการคัดเลือก clone จำนวน 1,000 clones พบว่ามี 2 clones ที่เหมือนกันจึงได้เลือก clone ชื่อ K2 ที่มี DNA ขนาด 6.5 กิโลเบสที่ให้ผลบวกชัดเจนเมื่อตรวจสอบด้วย colony hybridization และ Southern blot และจากการวิเคราะห์โดยการหาลำดับ DNA ของชิ้นส่วนที่ประกอบด้วยส่วนที่เหมือนกันของ DNA ที่ตัดฉลากและส่วนใกล้เคียง พบว่าจากลำดับ DNA ทั้งหมด 2,450 คู่เบสจะมี ORF ที่มีขนาด 1,575 คู่เบสซึ่งได้ถูกจำแนกว่าเป็นเอนไซม์ phytase ซึ่งมี deduced amino acid 525 ตัวและมีมวลโมเลกุล 58,030 Daltons