



5 AUG 2002

**PRODUCTION AND PURIFICATION OF THERMO-ACIDO-
TOLERANT PHYTASE FROM BACILLUS SP. PH01**

SUTTILUK POPANIT

N

สมัครแพทยศาสตรบัณฑิต

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2002

ISBN 974-04-1763-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S967p
2002
C.2

Copyright by Mahidol University

4236953 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

KEY WORDS : *BACILLUS SUBTILIS* / PHYTASE / PURIFICATION

SUTTILUK POPANIT : PRODUCTION AND PURIFICATION OF THERMO-ACIDO-TOLERANT PHYTASE FROM *BACILLUS* SP. PH01. THESIS ADVISOR : SAOVANEE DHARMSTHITI, Ph.D., PAIROJ LUANGPITUKSA, Ph.D., PRAMVADEE Y. WONGSAENGCHANTRA, Ph.D. 134 p. ISBN 974-04-1763-9

A bacterial strain capable of producing a thermo-acido-tolerant phytase was isolated from soil around haystack. It was identified as *Bacillus subtilis* strain PH01 according to its colony morphology, gram stain, biochemical activities and ability to form spore as determined from its survival after 30 min at 90 °C. Maximum phytase activity was obtained from the 48-hour culture at 37 °C. PH01 required at least 200 rpm for optimum growth. The crude phytase was purified to a homogeneous state by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography by Q-Sepharose and gel filtration chromatography by Sephadex G-100. The molecular weight of PH01 phytase was 30 kDa. A complex medium, PheB, suitable for PH01 phytase production, has been developed. For scaled-up production of PH01 phytase in PheB medium, optimum growth and phytase activity was faster when the cultivation was started with 1% glucose and then fed with another 1% at 12th hr. General properties of PH01 phytase produced from PheB medium were determined. The crude enzyme was stable under pH range of 2.0-9.0 at 37 °C and under temperature range 37 °C - 80 °C when stored for 1 hour. The optimum activity was found at 45 °C, pH 6 (0.05M acetate buffer). PH01 phytase stored in animal feed was stable at room temperature and 4 °C for nine weeks. In the case of formulation, liquid form of enzyme by ethanol precipitation was found to be highly stable. The activity was retained for at least three weeks. A 42-day experiment was conducted with day-old male and female broilers (n=192) to evaluate the effectiveness of phytase supplement on growth performance and on reduction of the P excretion to the environment. The basal animal feed contained 0.26% nonphytate P. Three levels of crude PH01 phytase; i.e. 0, 300 and 600 U/kg feed, were added. However, the treatment did not significantly improve the body weight gain and feed intake at all phytase levels. Phytase supplementation at 600 U/kg fed could reduce the feces weight of both sexes by 15 to 18 %, when compared to the chickens in the control group.

4236953 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ : วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สุทธิลักษณ์ โพธิ์พาดิชย์ : การผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไฟเทสที่มีคุณสมบัติทนร้อนและทนสภาพกรดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PH01 (PRODUCTION AND PURIFICATION OF THERMO-ACIDO-TOLERANT PHYTASE FROM *BACILLUS* SP. PH01) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ, Ph.D., ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์ Ph.D., เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์ Ph.D. 134 หน้า ISBN 974-04-1763-9

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเทสที่มีคุณสมบัติทนร้อนและทนสภาพความเป็นกรดได้สูง ถูกแยกจากตัวอย่างดินบริเวณกองหญ้าแห้ง ผลการทดสอบลักษณะของโคโลนี, การย้อมสีดูลักษณะของเชื้อ, การทดสอบทางชีวเคมีและความสามารถในการสร้างสปอร์ ซึ่งพิจารณาจากการอยู่รอดของเชื้อที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที จากการจำแนกเชื้อพบว่าเป็น *Bacillus subtilis* PH01 สภาวะในการสร้างเอนไซม์ไฟเทสได้ดีที่สุดคือเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ 37°C และการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเพื่อการเจริญเติบโตที่ดี เอนไซม์ไฟเทสสามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต และผ่านกระบวนการ ion exchange ด้วย Q-Sepharose และ gel filtration ด้วย Sephadex G-100 เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์มีขนาดประมาณ 30 kDa PheB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการผลิตเอนไซม์ไฟเทสในปริมาณสูง การเพิ่มขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ PheB พบว่าการเจริญเติบโตที่เหมาะสมควบคู่กับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฟเทสได้ดีและรวดเร็ว เมื่อเริ่มเลี้ยงด้วยปริมาณกลูโคส 1% และเพิ่มอีก 1% ในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติของ PH01 ในการผลิตเอนไซม์ไฟเทสใน PheB คือ เอนไซม์สามารถคงทนได้ในช่วงสภาวะ pH 2.0-9.0 ที่ 37°C และในช่วงอุณหภูมิ 37 °C - 80 °C และเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดที่ pH 6.0 และที่อุณหภูมิ 45°C เมื่อนำเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อ *B. subtilis* PH01 มาผสมกับอาหารสัตว์พบว่าสามารถคงทนในสภาวะอุณหภูมิห้องและที่ 4°C และเมื่อนำเอนไซม์มาทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นในรูปแบบผงและเป็นของเหลว พบว่า เอนไซม์ไฟเทสชนิดของเหลวซึ่งทำให้เข้มข้นด้วยเอธานอล มีความคงทนสูงที่อุณหภูมิ 4°C การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไฟเทสต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการลดปริมาณฟอสฟอรัสในมูลไก่เพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อม ทดลองกับไก่ เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 192 ตัว เป็นระยะเวลา 42 วัน โดยอาหารไก่ที่ใช้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่ไก่สามารถนำไปใช้ได้อยู่ที่ 0.26% กลุ่มทดลองแบ่งจากปริมาณเอนไซม์ไฟเทสที่ใช้ผสมในอาหารไก่ คือ 0 U/kg, 300 U/kg และ 600 U/kg เอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อ *B. subtilis* PH01 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่แต่สามารถลดปริมาณมูลไก่ลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นการช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม