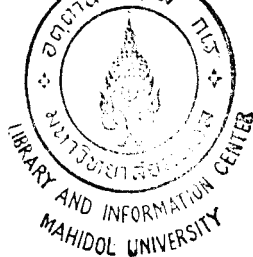


27 JUN 2003



**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL
PHYTASE PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION**

KWANJIRA CHANTASARTRASSMEE

With compliments
of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**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 974-04-2873-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
K 98 pm
2003
C. 2

Copyright by Mahidol University

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL PHYTASE PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION.

KWANJIRA CHANTASARTRASSMEE 4336350 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISOR: SAOVANEE DHARMSTHITI, Ph.D., PAIROJ LUANGPITAK, Ph.D., PRAMVADEE Y.WONGSAENGCHANTRA, Ph.D.

Abstract

A high phytase producing strain, *Aspergillus oryzae* 9252, used for soysauce fermentation was selected from a stock culture of fungal strains. The ultrafiltrated crude phytase was purified by ion exchange chromatography using Q-Sepharose and hydrophobic interaction using phenyl-sepharose CL-4B resins. The molecular weight of 9252 phytase was 100 kDa. A solid medium, suitable for 9252 phytase production, was composed of 0.3 g of rice flour and 0.65 ml of distilled water per 1 g of soybean meal. General properties of 9252 phytase produced by solid state fermentation were determined. The crude enzyme was stable at pH range 2.0-7.0 and under temperature range of 37-80 °C after 2-hr storage. The optimum activity was found at 75 °C, pH 5.0. Study on the effect of metal ions and EDTA showed that crude 9252 phytase was stable in the presence of Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, and Fe²⁺, while Zn²⁺ and EDTA inhibited the phytase activity. Formulation of crude 9252 phytase was done by addition with 0.1% (v/v) each of lactic acid and propionic acid and stored at 4°C. The activity was retained at 1-2 u/mg through to the seventh week. Additionally, crude amylase and protease in the koji were characterized. It was found that amylase worked best under pH 4.5 and at 55 °C. In the case of protease, there seemed to be 2 kinds of protease, one showed maximum activity at pH 5.5 and the other at pH 6.5. Optimum temperature of both proteases was at 55 °C. Koji was dried in order to test the effect of temperature on phytase, amylase and protease activities. It was found that phytase and amylase were stable when the koji was dried at 60-65 °C. For the protease activity, the remaining activity was lower than 50% after 2-hr storage at 60-65 °C. It was found that 9252 also gave other digestive enzyme activities such as xylanase, lipase, cellulase, and endoglucanase activities. A 42-day feeding experiment was conducted with 1-day-old male and female broilers (n=192) to evaluate the effectiveness of phytase supplement on growth performance and on reduction of the Pi excretion to the environment. The basal animal diet contained 0.26% nonphytate P. Three levels of crude 9252 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 300 and 600 U/kg fed could reduce the feces weight of male and female chickens by 11 to 14%, when compared to the chickens in the control group.

KEY WORDS :*Aspergillus oryzae*/ KOJI MOLD PHYTASE/ SOLID-STATE FERMENTATION

131 P. ISBN 974-04-2873-8

การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อราโดยการหมักในภาควัสดุเหลือ
(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL PHYTASE
PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION)

ขวัญจิรา ฉันทศาสตร์ศรี 4336350 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เสาวนีย์ ธรรมสถิต, Ph.D., ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, Ph.D.,
เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์ Ph.D.

บทคัดย่อ

Aspergillus oryzae สายพันธุ์ 9252 เป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไฟเทสได้ เอนไซม์ไฟเทสที่ผลิตได้นี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ได้โดยผ่านกระบวนการ ion exchange chromatography ด้วย Q-sepharose และ hydrophobic interaction ด้วย phenyl-sepharose CL-4B เมื่อนำไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีขนาดประมาณ 100 kDa เชื้อราสายพันธุ์ 9252 สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเทสได้ดีเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย แป้งข้าวเจ้า 0.3 กรัมและน้ำ 0.65 มิลลิลิตรต่อภาควัสดุเหลือ 1 กรัม จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการหมักในภาควัสดุเหลือพบว่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 75 °C และมีความคงทนในช่วงสภาวะ pH 2.0-7.0 และในช่วงอุณหภูมิ 37-80 °C เอนไซม์ไฟเทสนี้มีความคงทนต่อ Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , และ Fe^{2+} ในขณะที่ไม่สามารถทนทานได้ต่อ Zn^{2+} และ EDTA ไฟเทสที่เติมด้วยแกลดิกแอซิด และโพรพิโอนิกแอซิดสามารถทำงานได้จนถึงสัปดาห์ที่ 7 เมื่อเก็บที่ 4 °C นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส และ โปรตีเอส ที่ผลิตได้จาก สายพันธุ์ 9252 ด้วย พบว่าเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่ pH 4.5 และที่อุณหภูมิ 55 °C ในขณะที่เอนไซม์โปรตีเอสทำงานได้ดีที่ pH 5.5 และ 6.5 และที่อุณหภูมิ 55 °C จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเมื่อนำโคจิไปทำให้แห้งด้วยความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 60-80 °C พบว่าเอนไซม์ไฟเทสและอะไมเลสสามารถทนทานได้ที่อุณหภูมิ 60-65 °C ในขณะที่ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสลดลง 50% 9252 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส, ไลเปส, เซลลูเลส และเอนโคกลูแคนเนสได้ด้วย การทดลองเลี้ยงไก่เพศผู้ และเพศเมีย จำนวน 192 ตัว เป็นระยะเวลา 42 วันด้วยอาหารที่มีการเติมเอนไซม์ไฟเทสจากเชื้อราสายพันธุ์ 9252 ในปริมาณ 300 และ 600 U/kg พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่กระทงในแต่สามารถช่วยลดที่ปริมาณมูลของไก่ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม