Thesis Title Optimal Conditions for Production and Characterization of Phytase from Bacteria Isolated from Hot Spring

Author Mr. Apinun Kanpiengjai

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch

ABSTRACT

Phytase is one enzyme widely used in feed industry. Feed enzymes are expected to have high thermostability to withstand the high temperature during feed processing. The main purpose of this research is to isolate the thermotolerant bacteria for using as phytase producer that may be have the appropriate properties for industrial utilizing in the future and to optimize the medium compositions and condition for phytase production. Screening of phytase producing thermotolerant bacteria from hot spring was studied. It was found that bacteria MHW14 was able to produce the highest clear zone as 0.40 centimeter on phytase screening medium (PSM) plate. Phytase activity as 0.10 unit per milliliter was produced in culture broth containing rice bran as phytate source at 12 hours. The suitable source of phytate, carbon and nitrogen for phytase production was rice bran, glucose and ammonium sulfate, respectively. Plackett and Burman design was used for analysis the factors affected on phytase production. The results showed that rice bran and ammonium sulfate were two positively significant effective factors (P<0.05). Central Composite Design (CCD) was used to predict the maximum phytase activity as

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.2007 unit per milliliter by adding 10.35%(w/v) rice bran and 2.64% (w/v) ammonium sulfate in optimized medium. However, the maximum phytase activity as 0.1962 unit per milliliter was obtained after growing the bacteria at 45°C for 12 hours which was calculated to be 96% validation. Effect of temperature and pH on phytase production was determined. The condition was carried out at 37, 45, 50, 55, 60 and 65°C and pH was adjusted to 5, 6, 7, 8, 9 and 10. The temperature at 45°C and pH 7.0 was found to be the best condition for phytase production. The phytase was partially purified to 32 purification folds with specific activity of 0.833 unit/mg protein by heat treatment, DEAE-Sephadex A-50, Sephacryl S-100 column chromatography, and 3% recovery was obtained. The molecular weight was estimated to be 12.1 and 11.3 kDa by gel filtration and SDS-PAGE respectively. The partial purified phytase was characterized and found that the optimum temperature for the enzyme was 60°C and it was stable up to 60^{o}C for 1 hour incubation. The enzyme was stable at pH 6.0-8.0 and had a broad range of optimal pH from 2.0-10.0. The enzyme had 4.57 mM and 0.048 µmole/minute of K_m and V_{max}, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตและการหาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไฟเตสจากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำพุร้อน

ผู้เขียน นาย อภินันท์ กันเปียงใจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช

บทคัดย่อ

ไฟเตสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์อย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เอนไซม์ต้องสามารถทนอุณหภูมิสูงจากขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์ได้ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการแยกจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ไฟเตสที่มีคุณสมบัติเหมาะสม และนำไปใช้งานได้จริงในการผลิตระดับอุตสาหกรรม จากการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนจากตัวอย่างน้ำพุร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ พบว่า แบคทีเรีย MHW14 สามารถสร้างวงใสกว้างที่สุดบนอาหารที่ใช้คัดเลือก (Phytase Screening Medium, PSM) เท่ากับ 0.4 เซนติเมตร และแบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้สูงสุด เท่ากับ 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในอาหารเหลวที่ใช้รำข้าวเป็นแหล่งไฟเตทเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส พบว่า รำข้าว กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไฟเตท แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ตามลำดับ จากนั้นจึงใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส พบว่า รำข้าว และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นปัจจัยเชิงบวกที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ทำนายปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่แบคทีเรีย MHW14 สามารถผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.201 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้รำข้าวและแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 10.35 และ 2.64 โดยมวลต่อปริมาตร ในสูตรอาหารที่ใช้ศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่สามารถผลิตได้ เท่ากับ 0.193 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารนี้ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง คิดเป็น 96.5 %validation เมื่อทำการแปรผันอุณหภูมิ 37, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียสและความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 6 7 8 9 และ 10 พบว่า ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส สำหรับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการใช้ความร้อน โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE-Sephadex A-50 และเจลฟิลเทรชั่น Sephacryl S-100 ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 32 เท่า โดยเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.833 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ค่าผลผลิตกลับคืนเท่ากับร้อยละ 3 การประมาณขนาดโมเลกุลของเอนไซม์โดยเจลฟิวเทรชั่นและ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีขนาดประมาณ 12.1 และ 11.3 กิโลดาลตัน ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถทำงานได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง คือ ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0-10.0 และมีเสถียรภาพที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0-8.0 ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เท่ากับ 4.57 มิลลิโมลาร์ และ 0.048 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved