



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิต การทำบริสุทธิ์ และลักษณะสมบัติของ β -galactosidase สำหรับ
การย่อยสลายแลคโตสและการเกิดพรีไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์
โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

Production, purification and characterization of β -galactosidase for lactose
hydrolysis and formation of prebiotic galacto-oligosaccharide by the
thermophilic organism

โดย นางสาวพิมพ์ชนก นาคราช และคณะ

เดือน กันยายน พ.ศ.2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิต การทำบริสุทธิ์ และลักษณะสมบัติของ β -galactosidase สำหรับ
การย่อยสลายแลคโตสและการเกิดพรีไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์
โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

Production, purification and characterization of β -galactosidase for lactose
hydrolysis and formation of prebiotic galacto-oligosaccharide by the
thermophilic organism

คณะผู้วิจัย

นางสาวพิมพ์ชนก นาคราช
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

นางจิรกานต์ เมืองนาโพธิ์
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เอนไซม์ β -galactosidase (lactase; EC 3.2.1.23) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมและอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีความสามารถในการสลายพันธะไกลโคสิติกของแลคโตสได้เป็นกลูโคสและกาแลคโตส จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากนั้นทำบริสุทธิ์ และ ศึกษาลักษณะสมบัติของ β -galactosidase จากเอนไซม์ที่ผลิตได้ จากการศึกษาเอนไซม์ β -galactosidase ที่ได้จากบ่อน้ำพุร้อนท่าปายสายพันธุ์ B1.1 พบว่าแลคโตสและ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ β -Galactosidase ตามลำดับ pH เริ่มต้น 8.5 และ อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะดังกล่าวได้กิจกรรมและกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.478 unit/ml และ 0.338 unit/mg ตามลำดับ หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 13 ชั่วโมงโดยมี 2.5% lactose, 2.0% peptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 และ 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วย ion-exchange และ affinity chromatography พบว่า มีความบริสุทธิ์ 2.58 เท่า ค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ oNPG เป็นสารตั้งต้นเท่ากับ 7.94 mM และ $2.00 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ตามลำดับ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 6.5 และ 65 °C ตามลำดับ

Abstract

The enzyme β -galactosidase (lactase; EC 3.2.1.23) is a commercially important enzyme due to its various applications in dairy and food industries, which hydrolysis of β -D-galactopyranosidic linkage to glucose and galactose. The objectives of the work were to determine the optimum condition on the production of β -galactosidase then purify and characterize. β -galactosidase form B1.1 screened from Tha Pai hot spring was produced with lactose and peptone as carbon and nitrogen sources, respectively. Optimal enzyme production occurred at an initial pH of 8.5 and at 45 °C. Under these optimum culture conditions, a maximum activity and specific activity of β -galactosidase were calculated to be 0.478 unit/ml and 0.338 unit/mg, respectively, after 13 h of fermentation in a medium containing 2.5% lactose, 2.0% peptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. The β -galactosidase was purified by ion-exchange and affinity chromatography and with a fold purification of 2.58. The K_m and V_{max} values for oNPG as a substrate were determined as 7.947 mM and $2.00 \times 10^{-3} \text{ mmolL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively. The pH and temperature optima for the purified enzyme are 6.5 and 65 °C, respectively.

Keywords: β -galactosidase, thermophilic, production, purification

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เอนไซม์ β -galactosidase เป็นเอนไซม์ที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย (Dziezak, 1991) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหารและนม เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหรือผลิตภัณฑ์จากนมที่มีแลคโตสต่ำหรือไม่มีแลคโตส ช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีอาการแพ้นม (Clamp et al., 1961; Harper, 1992; Holsinger and Kligerman, 1991; Zadow, 1992) นอกจากนี้ในระหว่างการย่อยสลายแลคโตส จะเกิดการสังเคราะห์ 프리ไบโอติก (Prebiotic); กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (Galactooligosaccharide, GOS) (Mahoney, 1998; Pivarinik et al., 1995) ซึ่งเป็นอาหารฟังก์ชัน (Functional food) โดยอาหารฟังก์ชันนี้จะไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนจะผ่านมายังลำไส้ใหญ่และส่งผลดีต่อสุขภาพ (Fran, 2000; Roberfroid, 1999) มีคุณสมบัติช่วยปรับส่วนของอาหารที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร มีผลกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มโพรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้ใหญ่ ให้สามารถควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโทษและปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในให้เหมาะสมเพื่อลดการติดเชื้อ ส่งผลให้สุขภาพแข็งแรง อีกทั้งช่วยให้ระบบการย่อยและดูดซึมอาหารดีขึ้น เพิ่มเมแทบอลิซึมของไขมัน เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลดความดันโลหิต และลดการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง (Nakayama and Amachi, 1999; Sako et al., 1999; Urgell and Orleans, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีศักยภาพในการเลี้ยงสัตว์เพื่อการส่งออก เช่น ไก่ สุกร เป็นต้น แต่ปัญหาที่พบคือการตกค้างของสารปฏิชีวนะ ที่ใช้ในการควบคุมโรค ทำให้เกิดการกีดกันทางการค้าของสหภาพยุโรป ที่เข้มงวดในเรื่องของมาตรฐานสุขภาพ ซึ่งมีการห้ามใช้สารปฏิชีวนะ จึงจำเป็นต้องหาสิ่งอื่นมาทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (ชุมพร และคณะ, 2534; ถวัลย์, 2536; วันดี, 2536) อีกทั้งกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในหลายจังหวัดประสบปัญหาน้ำนมดิบล้นตลาด ต้องนำน้ำนมดิบมาเททิ้ง ดังนั้น 프리ไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์จึงเป็นทางเลือกใหม่สำหรับใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะสำหรับควบคุมโรคในสัตว์ ทำให้ลดปัญหาการตกค้างของยา และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำนมดิบได้อีกทางหนึ่งด้วย

การศึกษาวิจัยในเรื่องดังกล่าวในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิต่ำที่ผ่านการคัดเลือก จากโครงการวิจัยเรื่องการคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิต่ำที่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากนั้นทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เราสามารถควบคุมการทำงานของเอนไซม์ให้เป็นไปตามต้องการ เพื่อเพิ่มผลผลิตของ GOS นวัตกรรมอาหารที่สร้างขึ้นได้นี้จะก่อให้เกิดการพัฒนาทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพของทั้งคนและสัตว์ของประเทศได้ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมของประเทศ โดยลดการทำเข้าของอาหารเสริมสุขภาพและสารปฏิชีวนะหรือสารเคมีสังเคราะห์สำหรับควบคุมโรคในสัตว์ เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลให้เกิดการพึ่งพาตนเองของประเทศได้

เอกสารอ้างอิง

- ชุมพร แสงขวา, เนติ จันทร์สนธิศรี, สุชาติ วัฒนชัย และ สุพจน์ เมธิยะพันธ์. 2534. การใช้สารเสริมชีวนะในการรักษาโรคท้องเสีย ลดอัตราการตาย และการเพิ่มน้ำหนักในสุกรก่อนหย่านม. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 13 หน้า
- ถวัลย์ วรรณกุล. 2536. โรคลูกสุกร. วารสารสุกรสาส์น. 20: 37-45.
- วันดี เจียเจริญ. 2536. การใช้สารโปรไบโอติกในอาหารลูกสุกรหย่านม. วารสารเกษตร. 9: 144-151.
- Clamp, J. R., Hough, L., Hickson, J. L. and Whistler, R. L. (1961) Lactose. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 16: 159-206.
- Dziezak, J. D. (1991) Enzyme: catalysts for food processes. *Food Technology*. January:78-85.
- Fran, W.E.R., *Prebiotics and Probiotics*. In: Wildman REC. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. New York, CRC Press. 2000:407-422.
- Holsinger, V. H. and Kligerman, A. E. (1991) Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose. *Food Technology*. 45: 92-95.
- Mahoney, R., R. (1998) Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food chemistry*. 63: 147-154
- Nakayama, T., and Amachi, T. (1999) β -Galactosidase, enzymology. In: Flickinger MC, Drew SW (eds) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, Wiley, New York, Vol. 3, pp. 1291–1305.
- Pivarinik, L. F., Senecal, A. G., and Rand, A. G. (1995) Hydrolysis and transgalactosylation activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. In: *Advances in food and nutrition research.*, Kinsella, J.E. Taylor S.L., editors, Academic Press, New York: 38: pp.1-102.
- Roberfroid M. B. (1999) Concept on functional foods : the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*. 127(suppl): S1398-1401.
- Sako, T., Matsuloto, K., and Ryuichiro, T. (1999) Recent progress on research and application of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9: 69-80.
- Urgell, M. R. and Orleans A. S. (2001) Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human development*. 65 Suppl.: S45-S52.
- Zadow, J. G. (1992) Lactose hydrolysis. In: *Whey and lactose processing.*, Elsevier, New York, pp.361-408.

2. วัตถุประสงค์

2.1 ผลิต β -galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตสและการเกิดฟรีไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

2.2 ทำบริสุทธิ์ และ ศึกษาลักษณะสมบัติของ β -galactosidase จากเอนไซม์ที่ผลิตได้

3. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยการดำเนินงานตามลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 การผลิต β -galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตส และ การเกิดฟรีไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

เป้าหมาย

เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิต β -galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตส และ การเกิดฟรีไบโอติก

กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

วิธีการ

นำเชื้อจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase สูงที่สุด จากโครงการวิจัยเรื่องการคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและผลิตเอนไซม์ β -galactosidase หลังจากสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่ศึกษา ได้แก่

1. แหล่งคาร์บอน
2. ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน
3. แหล่งไนโตรเจน
4. ความเข้มข้นของไนโตรเจน

วิธีวิเคราะห์

1. วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase

เก็บตัวอย่างของทุกการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ ไปวัดค่าการการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อ

2. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase โดยการทำปฏิกิริยากับ oNPG (ortho-nitroPhenol-beta-galactopyranoside) บ่มที่ 40°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.4 M Na₂CO₃ 750 μ l วิเคราะห์ปริมาณ oNP ที่เกิดขึ้น ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit, U) ของเอนไซม์ β -galactosidase มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μ mole ของ oNP จาก oNPG ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการวิเคราะห์

3.2 ทำบริสุทธิ์ และ ศึกษาลักษณะสมบัติของ β -galactosidase จากเอนไซม์ที่ผลิตได้

เป้าหมาย

เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และทราบลักษณะสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ให้เป็นไปตามต้องการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GOS

วิธีการ

นำเอนไซม์ β -galactosidase ที่ผลิตได้จากข้อ 8.1 มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟี จากนั้นศึกษาลักษณะสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ ได้แก่

1. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ β -galactosidase

หาอุณหภูมิสูงสุดที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase และความคงทนของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

2. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase

หาพีเอชที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase สูงสุด และความคงทนของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

3. ผลของโลหะไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase

เปรียบเทียบผลของโลหะไอออนชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase

4. ศึกษาค่าคงที่ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ β -galactosidase

หาค่าคงที่ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ β -galactosidase ได้แก่ K_m และ V_{max}

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

แผนการดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 13-18	เดือนที่ 19-24
1. กำหนดแผนปฏิบัติการและการทำงานขั้นตอนต่าง ๆ	↔			
2. การเตรียมวัตถุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	↔			
3. การผลิต β -galactosidase โดยจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง	↔	↔		
4. การวิเคราะห์ผลและการสรุปผลครั้งที่ 1		↔		
5. การจัดทำรายงานการวิจัยครั้งที่ 1		↔		
6. การจัดทำต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการครั้งที่ 1		↔		
7. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -galactosidase			↔	
8. การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ β -galactosidase			↔	↔
9. การวิเคราะห์ผลและการสรุปผลครั้งที่ 2				↔
10. การจัดทำรายงานการวิจัยครั้งที่ 2				↔
11. การจัดทำต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการครั้งที่ 2				↔
12. การจัดทำรายงานสรุปการวิจัยทั้งหมด				↔

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ “Production of β -galactosidase by the thermophilic organism”

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Fermentation and Bioengineering (impact factor 0.802)

ปีที่ 2 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ “Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase”

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Journal of Biotechnology (impact factor 2.687)

6. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน	120,000	120,000	240,000
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	
2. หมวดค่าวัสดุ	78,000	78,000	156,000
- ค่าสารเคมี	50,000	50,000	
- Glassware and other disposable item: bottles, beakers, flasks, pipette tips, Petri dishes, gloves, etc.	11,000	11,000	
- ค่ากระดาษอัดสำเนา	2,000	2,000	
- ค่าแผ่น Diskette/CD-Rom	2,000	2,000	
- ค่าหมึกพิมพ์คอมพิวเตอร์	3,000	3,000	
- ค่าเครื่องเขียนและอุปกรณ์สำนักงาน	3,000	3,000	
- ค่าถ่ายเอกสารบทความและเอกสารภาพสี	3,000	3,000	
- ค่าฟิล์มถ่ายภาพและค่าล้างอัดภาพ	2,000	2,000	
- ค่าวัสดุอื่นๆ	2,000	2,000	
3. หมวดค่าใช้สอย	32,000	32,000	64,000
- ค่าใช้จ่ายในการสืบค้นข้อมูล	1,000	1,000	
- ค่าเช่าเหมารถในการขนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์	2,000	2,000	
- ค่าบริการการใช้เครื่องมือวิเคราะห์	9,000	9,000	
- ค่าธรรมเนียมการนำเสนอผลงานวิชาการ	10,000	10,000	
- ค่าธรรมเนียมการตีพิมพ์ในวารสาร	10,000	10,000	
4. หมวดค่าจ้าง	10,000	10,000	20,000
- ค่าจ้างพิมพ์รายงานวิจัยด้วยคอมพิวเตอร์	3,000	3,000	
- ค่าจ้างเหมาจัดทำเล่มรายงานวิจัย	3,000	3,000	
- ค่าจ้างเหมาจ่ายอื่น ๆ	4,000	4,000	
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

เนื้อหางานวิจัย

3.1 การผลิต β -galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตสและการเกิดพรีไบโอติก กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง

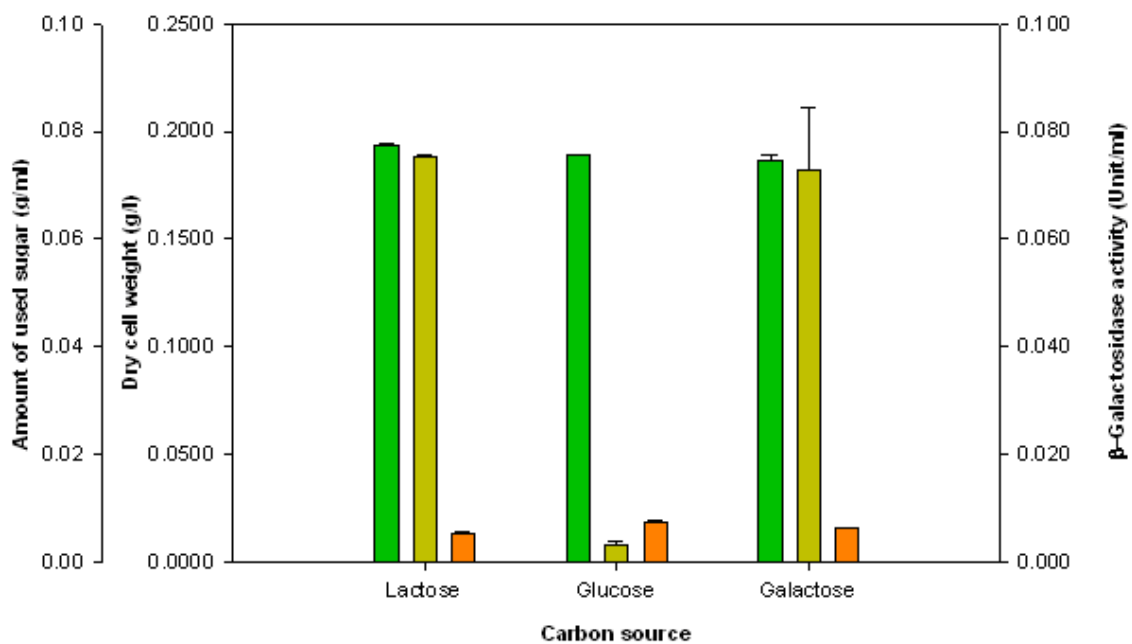
3.1.1 การศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ แลคโตส กลูโคส และกาแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีการเติมแร่ธาตุ (mineral salt) เลี้ยงเชื้อ B1.1 เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่าเชื้อ B1.1 เจริญได้ดีและมีการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ได้มากที่สุด เมื่อใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.1937 กรัมต่อลิตร กิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) 0.0751 unit/ml และกิจกรรมเฉพาะ (specific activity) เท่ากับ 0.3877 unit/mg ซึ่งได้ผลเหมือนกับการทดลองของ Hsu (2005) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต β -galactosidase จาก Bifidobacteria พบว่าน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อสามารถผลิต β -galactosidase ได้สูงสุด

นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ Ulrich (1972) เกี่ยวกับกลูโคสมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ซึ่งในที่นี้จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสสามารถทำให้เชื้อเจริญได้ดีใกล้เคียงกับการใช้แลคโตสและกาแลคโตส แต่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่ามาก

ส่วนกาแลคโตสมีรายงานว่ามีการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase (Ulrich, 1972) จากรูปที่ 3.1 พบว่าเชื้อ B1.1 สามารถใช้กาแลคโตสในการเจริญได้ดีและมีการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าการใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จากการเปรียบเทียบกิจกรรมเฉพาะคือจากน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.1867 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.0728 unit/ml ได้กิจกรรมเฉพาะ เท่ากับ 0.3899 unit/mg ซึ่งมีค่ามากกว่าเมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จากข้อมูลราคาของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ได้แก่ D-(+)-Glucose anhydrous 1 กิโลกรัม ราคา 1,250 บาท D-(+)-Galactose 25 กรัม ราคา 1,400 บาท และ D-(+)-Lactose monohydrous 1 กิโลกรัม ราคา 2,900 บาท (ข้อมูลจาก บริษัทเสริมกิจ จำกัด) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบราคาพบว่า D-(+)-Galactose มีราคาแพงกว่า D-(+)-Lactose monohydrous มากถึง 19 เท่า ด้วยเหตุนี้กาแลคโตสจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาลแต่ละชนิด พบว่าเชื้อ B1.1 ใช้น้ำตาลแลคโตสในปริมาณน้อย เพียง 0.005 กรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากถึง 0.075 unit/ml ขณะที่เชื้อ B1.1 ใช้กลูโคสในปริมาณที่มากกว่าแลคโตส แต่เชื้อกลับผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า และในกรณีที่ใช้กาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มากกว่าการใช้แลคโตส แต่เชื้อต้องใช้น้ำตาลกาแลคโตสในปริมาณที่มากกว่า

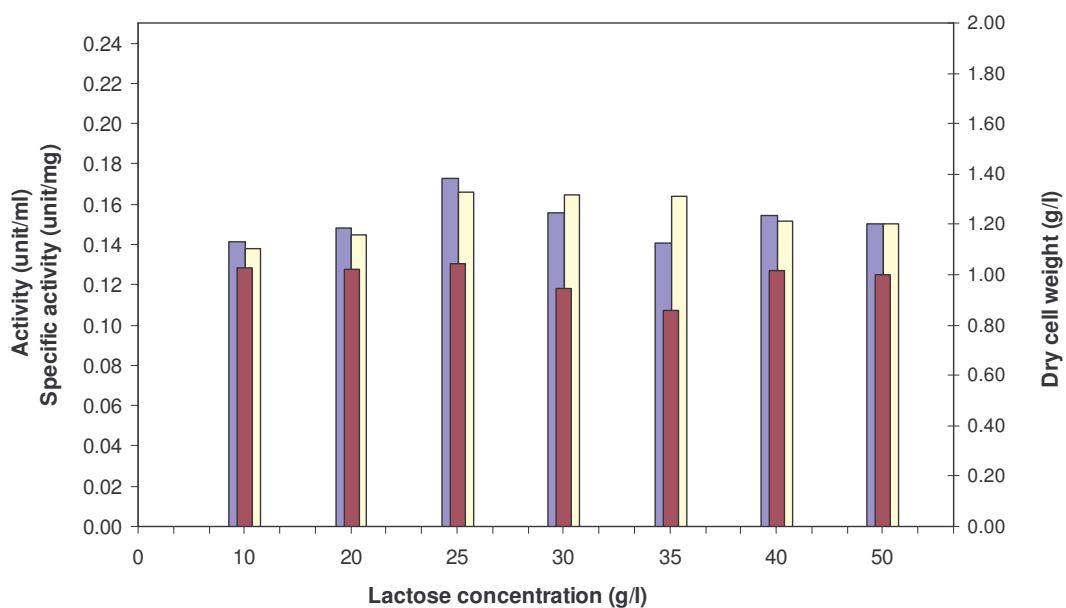
ดังนั้นน้ำตาลแลคโตสจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับใช้เลี้ยง B1.1 เพื่อผลิตเอนไซม์ β -galactosidase



รูปที่ 3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ B1.1 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเสริมแร่ธาตุที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ความเข้มข้นของแลคโตส เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 13 ชั่วโมง ($n = 3$) โดย ■■■ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง, ■■■ คือ กิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase และ ■■■ คือ ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป

3.1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลแลคโตส

จากการทดลองหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยแหล่งของคาร์บอนที่เลือกใช้ก็คือ น้ำตาลแลคโตส และความเข้มข้นที่เลือกมาวิเคราะห์คือ 10, 20, 25, 30, 35, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยที่แต่ละความเข้มข้นนั้นได้นำมาวิเคราะห์ทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ ผลการทดลองปรากฏ ดังรูปที่ 3.2



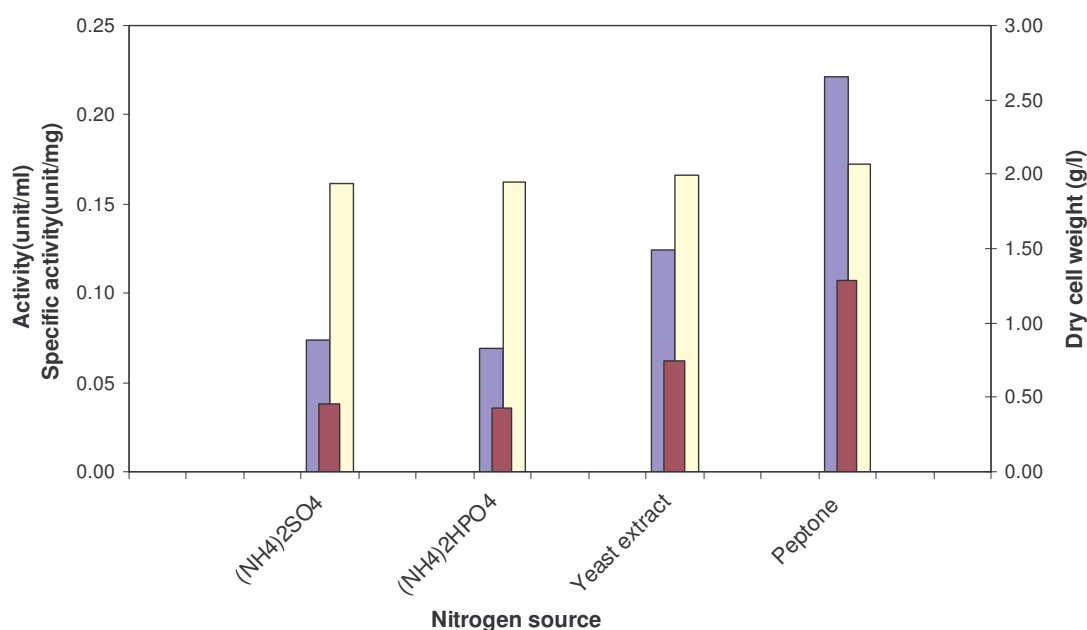
รูปที่ 3.2 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ B1.1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส ต่างๆกัน ในช่วง 10-50 กรัมต่อลิตร และประกอบด้วย 1.0%peptone, 1.0%yeast extract, 0.5%(NH₄)₂SO₄, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄ และ 0.05% MgSO₄·7H₂O pH เท่ากับ 7.0 เมื่อ เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยที่ ■ แทนกิจกรรมของ เอนไซม์ (unit/ml) ■ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) และ ■ แทน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (unit/mg)

จากรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแลคโตสมากขึ้นส่งผลให้มีการเจริญของ เชื้อ B1.1 สูงขึ้น เห็นได้จาก น้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ที่เพิ่มมากขึ้น และจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นของแลคโตสเพิ่มมากกว่า 25 กรัมต่อลิตร จนกระทั่งเมื่อความ เข้มข้นของแลคโตสเพิ่มสูงขึ้นถึง 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งและกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มมา กขึ้นอีกครั้ง แต่จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพิ่มขึ้นของ น้ำหนักเซลล์แห้ง จึงทำให้กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ลดน้อยลง ซึ่งถือว่าไม่ใช่ความเข้มข้นของแลค โตสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของเชื้อ B1.1 เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมเฉพาะ ของเอนไซม์จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของแลคโตส 25 กรัมต่อลิตร มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์สูง ที่สุด (0.166 unit/mg) โดยที่มีการเจริญของเชื้อ B1.1 ที่ดีที่สุด น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.042 กรัมต่อ ลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ก็สูงที่สุดเช่นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 0.173 unit/ml จึงถือว่าความเข้มข้น ของแลคโตสที่ 25 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ B1.1 ในปี ค.ศ. 2000 Chakraborti และคณะ พบว่าความเข้มข้นของแลคโตสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Bacillus sp* MTCC 3088 เท่ากับ 6.34 mM คิดเป็น 2.17 กรัมต่อลิตร Domingues และคณะ (2004) ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยทดลองเพาะเลี้ยง

เชื้อที่ความเข้มข้นของแลคโตสในช่วง 5-150 กรัมต่อลิตร โดยได้กล่าวแต่เพียงว่า กิจกรรมของเอนไซม์ จะมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแลคโตส และในปี 2005 Hsu และคณะ ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 โดยได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อใน อาหารเหลวที่มีแร่ธาตุและมีความเข้มข้นของแลคโตสอยู่ในช่วง 1.0–10.0% พบว่าความเข้มข้นของแลค โตสที่เหมาะสมที่สุดคือ 4% หรือคิดเป็น 40 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่า ปริมาณแลคโตสที่เหมาะสมต่อการ ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase นั้นแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการของเชื้อแต่ละชนิด

3.1.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน

ในการศึกษาผลของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของเชื้อ B1.1 โดยแหล่งไนโตรเจนที่ทำการศึกษาได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ yeast extract และ peptone และใช้ แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยได้วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ β -galactosidase จากการทดลองผลปรากฏ ดังรูป ที่ 3.3

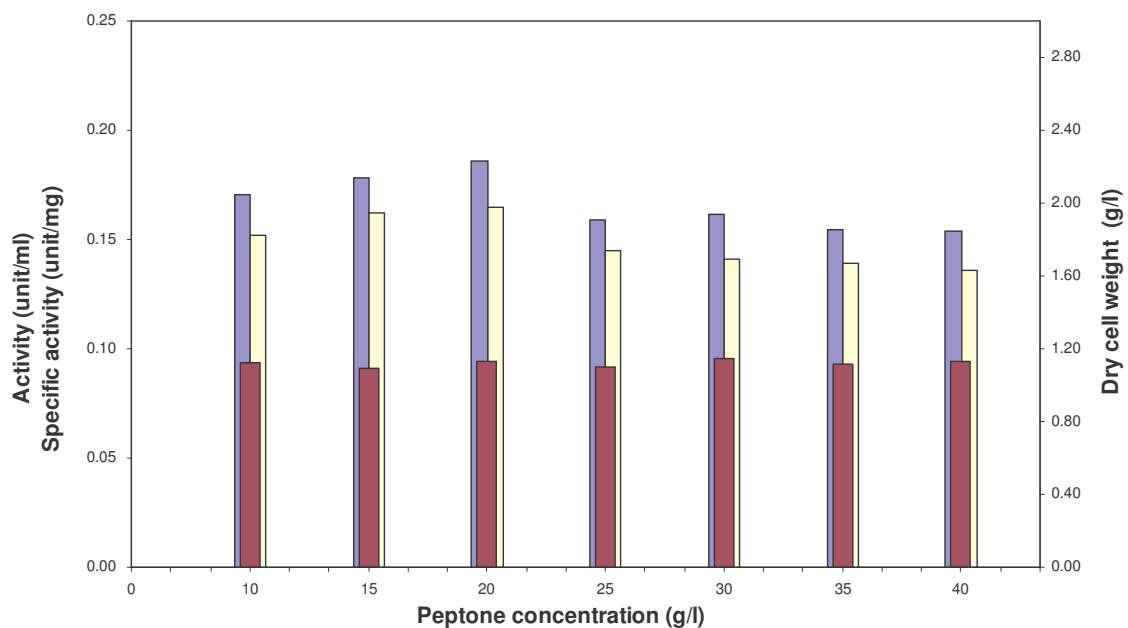


รูปที่ 3.3 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ B1.1 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, yeast extract และ peptone ที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร และ ประกอบด้วย 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 และ 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH เท่ากับ 7.0 เมื่อเพาะเลี้ยง เชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยที่ ■ แทนกิจกรรมของเอนไซม์ (unit/ml) ■ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) และ ■ แทน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (unit/mg)

จากรูปที่ 3.3 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักรเซลล์แห้งมากที่สุดคือ peptone โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase เท่ากับ 0.221 unit/ml น้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.288 กรัมต่อลิตร และกิจกรรมเฉพาะเท่ากับ 0.172 unit/mg เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของทานอื่นพบว่า ในปี ค.ศ. 1977 Rao และ Dutta ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus* โดยเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ proteose peptone, casein digest, casein, tryptone และ peptone ผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase คือ proteose peptone Domingues (2004) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของ *Aspergillus niger* พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในขณะที่ Hsu และคณะ (2005) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน ได้แก่ peptone, tryptone, gelatin, beef extract, yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ในปีเดียวกัน Konsoula และ Kyriakides (2005) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ tryptone

3.1.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ Peptone

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของ peptone ต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของเชื้อ B1.1 โดยใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร และใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เราตั้งสมมุติฐานว่าอัตราความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม จะเป็นอัตราส่วน 1:1 กับความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส (Aiyer, 2004) ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่เหมาะสมคือ 25 กรัมต่อลิตร เราจึงกำหนดช่วงของการแปรผันความเข้มข้น peptone คือ 10-40 กรัมต่อลิตร โดยได้วิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ β -galactosidase จากการทดลองผลปรากฏ ดังรูปที่ 3.4



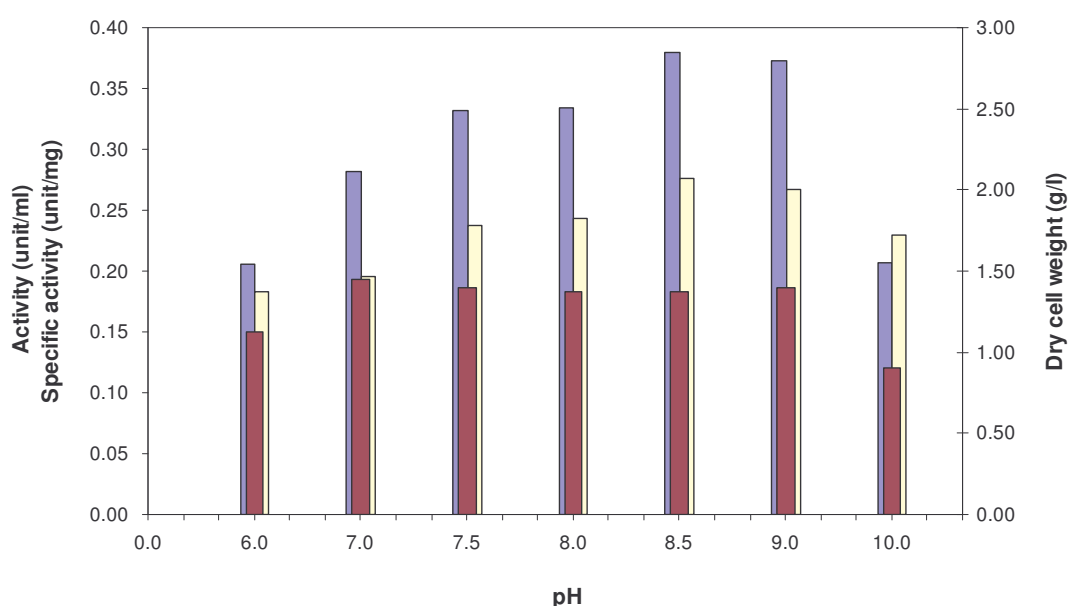
รูปที่ 3.4 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ B1.1 ในอาหารที่มีความเข้มข้น peptone ต่างๆ ได้แก่ 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 กรัมต่อลิตร และประกอบด้วย 2.5%lactose, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 และ 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pH เท่ากับ 7.0 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยที่ ■ แทนกิจกรรมของเอนไซม์ (unit/ml) ■ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) และ ■ แทน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (unit/mg)

จากรูปที่ 3.4 เมื่อพิจารณากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ β -galactosidase ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเท่ากัน คือ 25 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าความเข้มข้น peptone ในช่วง 10-20 กรัมต่อลิตรนั้น กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มีค่าเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของ peptone เพิ่มมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป คือที่ 25-40 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ โดยจากผลการทดลองค่ากิจกรรมและกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มีความสอดคล้องเป็นแนวทางเดียวกัน ซึ่งกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของ peptone ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.186 unit/ml กิจกรรมเฉพาะเท่ากับ 0.164 unit/mg และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.313 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rao และ Dutta (1997) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง โดยใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นของ peptone ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase คือ 2.0%w/v คิดเป็น 20 กรัมต่อลิตร Barreto และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Kluyveromyces lactis* โดยใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นของ peptone ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด คือ 2%w/v คิดเป็น 20 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน ส่วนงานวิจัยของ Morales และคณะ (2005) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus reuteri* NRRL 14171 ในนม โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ

กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มีค่าสูงสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของ peptone เท่ากับ 1%w/v คิดเป็น 10 กรัมต่อลิตร

3.1.5 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นในอาหาร

ในการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของเชื้อ B1.1 โดยใช้แลคโตสความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยศึกษาผลของ pH ในช่วง 6.0-10.0 แล้ววิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์และ กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ผลของเพาะการเลี้ยงเชื้อ B1.1 ในอาหารที่ pH เริ่มต้นต่างกัน ในช่วง 6-10 โดยประกอบด้วย 2.5%lactose, 2%peptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 และ 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยที่ ■ แทนกิจกรรมของเอนไซม์ (unit/ml) ■ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) และ ■ แทน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (unit/mg)

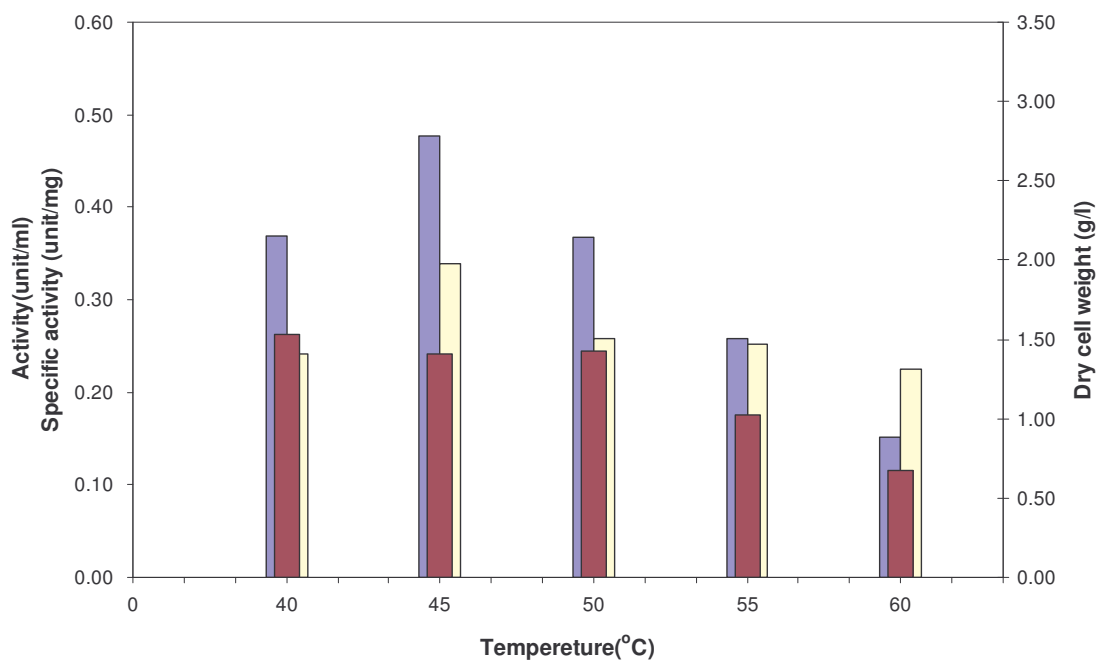
จากรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่าช่วงที่ pH เพิ่มขึ้น ในช่วง 6.0-8.5 กิจกรรมและกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ β -galactosidase ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ pH เท่ากับ 8.5 และจะเริ่มลดลงเรื่อย ๆ เมื่อ pH มากกว่า 8.5 จึงกล่าวได้ว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ คือ 8.5 โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.380 unit/ml กิจกรรมเฉพาะเท่ากับ 0.276 unit/mg และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.375 กรัมต่อลิตร

เมื่อปี ค.ศ. 1977 Rao และ Dutta ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* โดยได้แปรผัน pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองพบว่า ที่ pH เท่ากับ 7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด Griffiths และ Muir (1978) ได้ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ thermophilic *Bacillus* พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 6.0 ซึ่งอยู่ในช่วงของกรด Linko และ Bailey (1990) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* VTT-D-88353 ในถังหมัก ปรากฏว่า pH ในช่วง 5-7 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase Vasiljevic และ Jelen (2001) ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตกรดแลคติกได้ โดยเพาะเลี้ยง เชื้อดังกล่าวในนม จากผลทดลอง pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5.6 ในปี ค.ศ. 2005 Hsu และคณะ ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 6.5 และในปี 2007 Hsu และคณะ ได้ศึกษาและทดลองผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 อีกครั้งโดย ปรับ pH เริ่มต้นอยู่ในช่วงปานกลางที่ 4.5-7.5 และเพาะเลี้ยงเชื้อใน jar fermenter ผลปรากฏว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ยังคงเท่ากับ 6.5

3.1.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ของเชื้อ B1.1 โดยใช้แลคโตสความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อ ลิตร เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.5 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ ผลการทดลองปรากฏดังรูปที่ 3.6

จากรูปที่ 3.6 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ β -galactosidase คือ 45 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเซลล์สามารถเจริญได้ดี แต่กิจกรรมของเอนไซม์นั้นน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงว่าเป็นสภาวะที่เซลล์สามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ดี แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์มีค่าลดลงเล็กน้อย กล่าวได้ว่า เชื้อนี้มีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้ แต่มีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.478 unit/ml กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.338 unit/mg และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.411 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 3.6 ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อ B.1.1 ในอาหารที่ประกอบด้วย 2.5% lactose, 2% peptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 และ 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pH เท่ากับ 8.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยที่ ■ แทนกิจกรรมของเอนไซม์ (unit/ml) ■ แทนน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) และ ■ แทน กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (unit/mg)

เมื่อปี 1977 Rao และ Dutta ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ในหางนม โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* คือ 40 องศาเซลเซียส Griffiths และ Muir (1978) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จาก thermophilic *Bacillus* คือ 60 องศาเซลเซียส Linko และ Bailey (1990) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* VTT-D-88353 ในถังหมัก ปรากฏว่าอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ Linko และ คณะ (1998) ยังได้ทดลองผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จาก *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* 11F โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ batch และ fed-batch พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของการเลี้ยงแบบ batch คือ 42 องศาเซลเซียส และแบบ fed-batch อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส Shaikh และคณะ (1997) ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จาก thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 38-55 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส Vasiljevic และ Jelen (2001) ได้ทดลองแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 43 องศาเซลเซียส ส่วน Konsoula และ Kyriakides (2005)

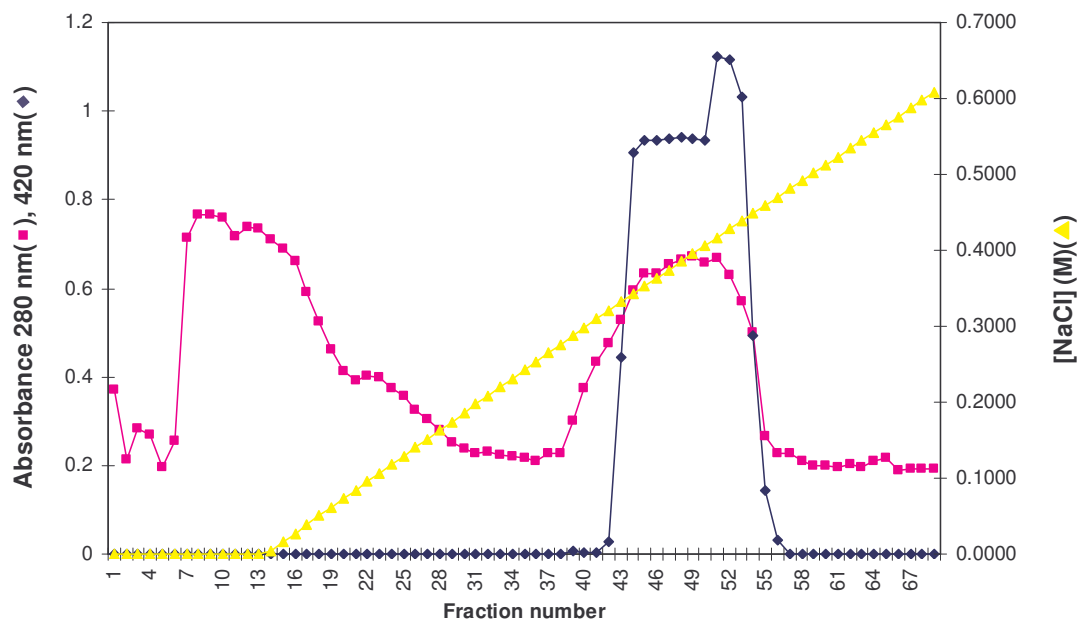
ได้ทดลองผลิตเอนไซม์ β -galactosidase จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส

3.2 ทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของ β -galactosidase จากเอนไซม์ที่ผลิตได้

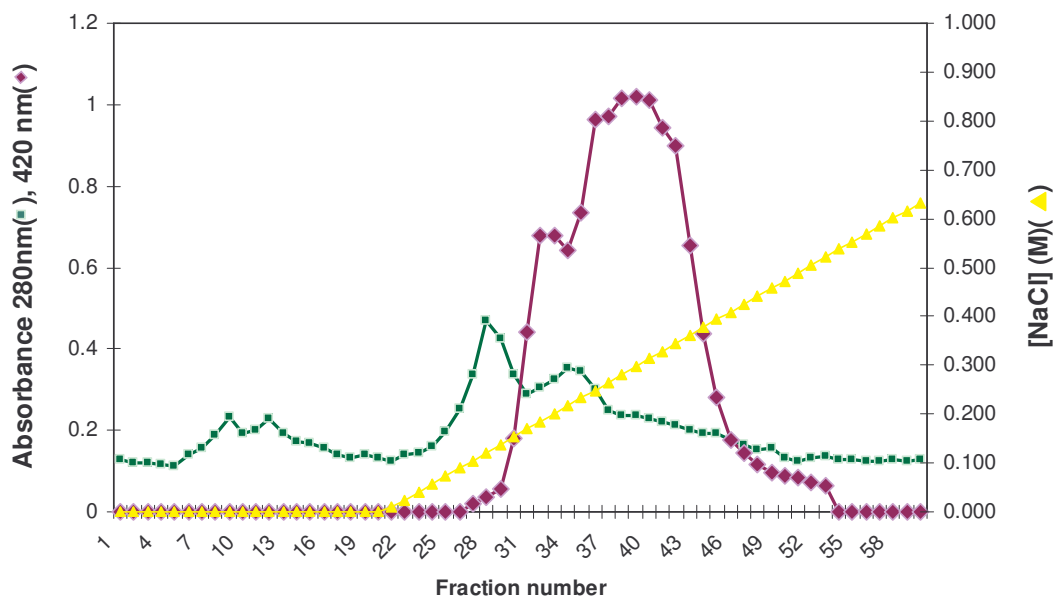
3.2.1 การทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของ β -galactosidase จากเอนไซม์ที่ผลิตได้

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ B1.1 มี 2 ขั้นตอนคือ การนำเอนไซม์ไปผ่าน DEAE sepharose column และ Affinity column โดยขั้นตอนทั้งสองได้ผ่านการทำ ultrafiltration ร่วมด้วย แล้วนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 420 nm วัดค่าโปรตีนที่ 280 nm และนำไปสร้างกราฟกับ fraction ต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.7 และ 3.8 โดยมีค่าความเข้มข้นของ NaCl ณ จุดที่เอนไซม์ถูกชะออกมาที่ 0.310 M และ 0.105 M สำหรับ DEAE sepharose column และ Affinity column ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 สรุปการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -galactosidase Yield ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ทั้ง 2 ขั้นตอนคือ 80.3% และ 58.0% ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.856 unit/mg เพิ่มขึ้นเป็น 1.179 และ 2.205 unit/mg ตามลำดับ รวมทั้งมีการเพิ่มระดับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (fold) เป็น 1.38 และ 2.58 เท่า ซึ่งจัดได้ว่าเป็นระดับความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับรายงานการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -galactosidase จากแบคทีเรียทนร้อน *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* ที่มีระดับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เมื่อผ่าน DEAE cellulose chromatography และ Affinity column เพิ่มขึ้นเป็น 3.95 และ 11.99 เท่า ตามลำดับ (Gul-Guven และคณะ, 2006)



รูปที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 420 nm และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์กับ fraction number หลังจากผ่าน DEAE sepharose column โดย (■) absorbance 280 nm; (◆) 420 nm; (▲) ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์



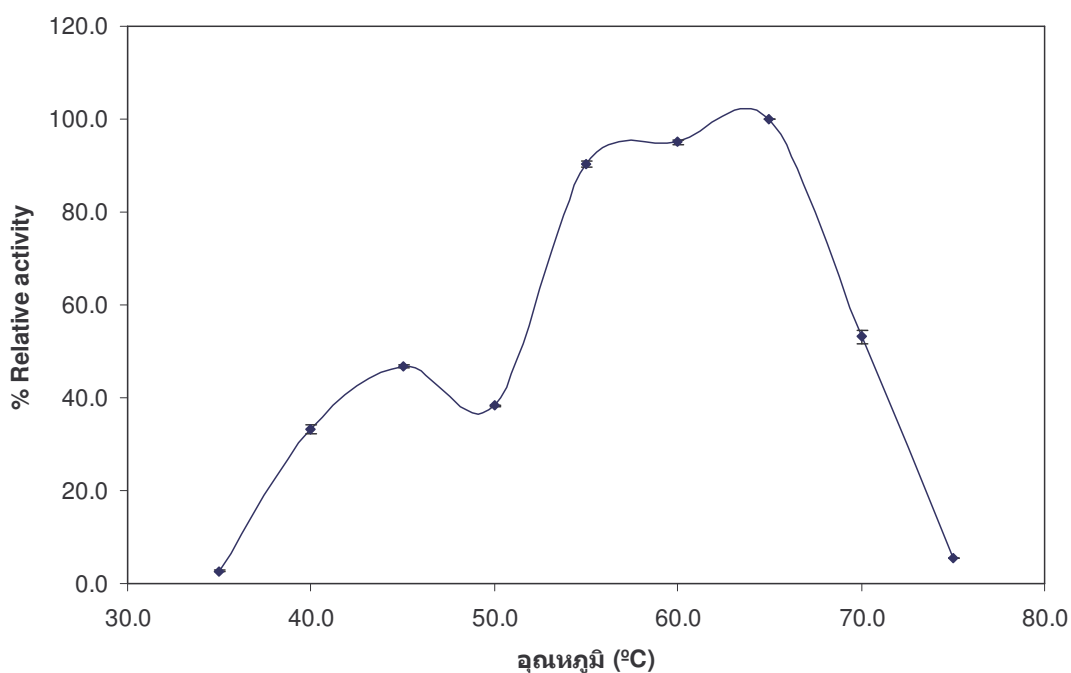
รูปที่ 3.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 420 nm และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์กับ fraction number หลังจากผ่าน Affinity column โดย (■) absorbance 280 nm; (◆) 420 nm; (▲) ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์

ตาราง 3.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -galactosidase จากเชื้อ B1.1

Purification steps	Volum e (ml)	Activit y (unit)	Protein (mg)	Specific Activity (unit/mg)	Purificatio n (fold)	Yield (%)
Crude extract	25	178.06	207.96	0.856	0.00	100.0
DEAE + Ultrafiltration	30	142.99	121.29	1.179	1.38	80.3
Affinity + Ultrafiltration	26.6	103.31	46.84	2.205	2.58	58.0

3.2.2 การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์

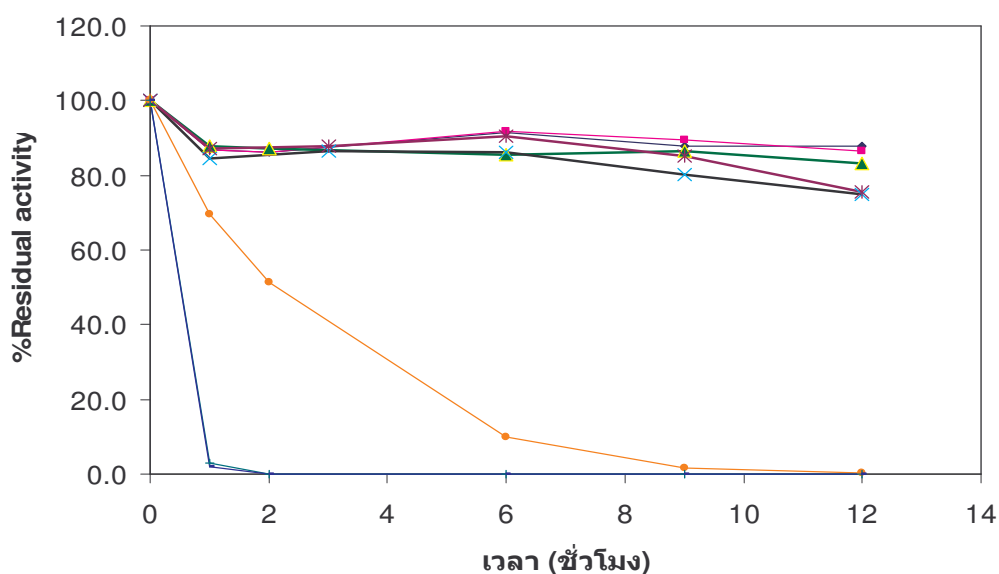
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 70 และ 75 องศาเซลเซียส โดยใช้ oNPG ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM pH 6.5 เป็นสับสเตรท พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ B1.1 นั้น ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.9) โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 0.346 unit/ml ซึ่งค่าอุณหภูมิที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีค่าใกล้เคียงกับคุณลักษณะของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ ที่ได้จากการทดลองของ Greenberg และคณะ (1982) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตและคุณลักษณะของเอนไซม์ β -galactosidase จาก *Streptococcus thermophilus* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วชัดเจน



รูปที่ 3.9 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ B1.1

3.2.3 การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 42, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรดี (รูปที่ 3.10) กิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ และยังมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 75 แต่สำหรับอุณหภูมิ 65, 70 และ 75 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วินาทีที่ 1 ของการบ่มเอนไซม์ ณ อุณหภูมิดังกล่าว ในขณะที่การศึกษาเอนไซม์ β -galactosidase จาก *Thermus sp.* 4-1A (Cowan และ คณะ, 1984) มีความเสถียรที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 วัน และที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ β -galactosidase ทั้งสามชนิดจาก *Bacillus circulans* พบว่า เอนไซม์ β -galactosidase ชนิดที่ I และ III จะมีความไวต่ออุณหภูมิมาก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase จะลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์ β -galactosidase ชนิดที่ II จะเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 25-50 องศาเซลเซียส นั่นคือเอนไซม์ β -galactosidase ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ ชนิดกันไปก็มีความเสถียรต่างๆ กันไป

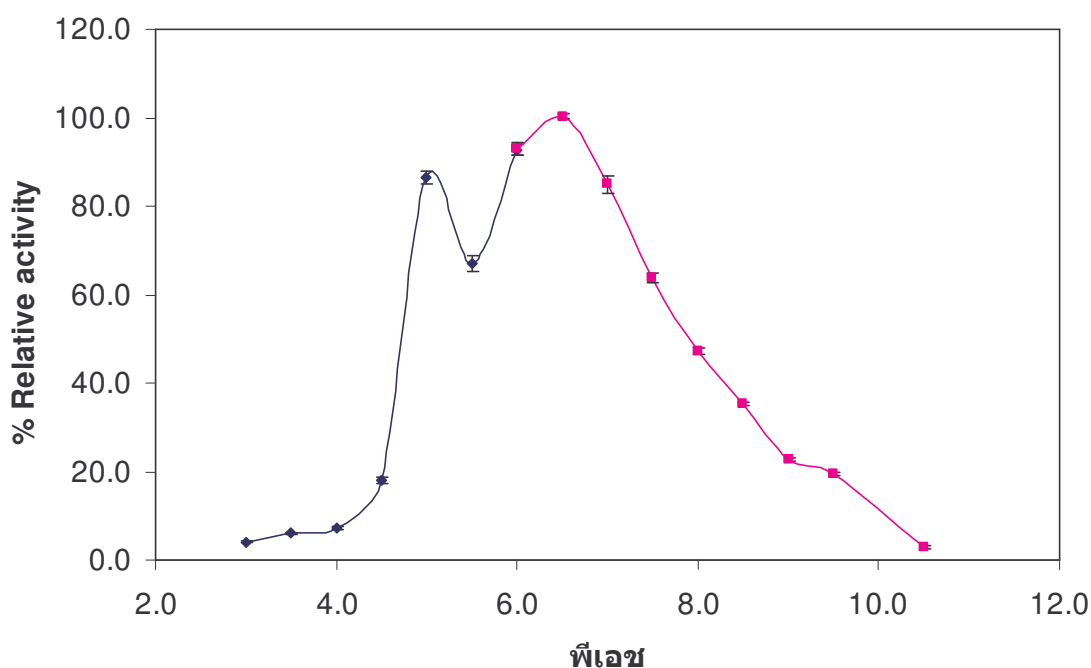


รูปที่ 3.10 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ β -galactosidase โดย (◆) 37 ; (■) 42 ; (▲) 50 ; (×) 55 ; (✱) 60 ; (●) 65 ; (+) 70 ; (-) 75 องศาเซลเซียส

3.2.4 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ที่ pH ต่างๆ คือ สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 3.0-6.0 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-10.5 พบว่า pH ที่ต่างกันมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ดังรูป 3.11 โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุดคือ 0.205 unit/ml พบที่ pH เท่ากับ 6.5 โดย pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 6.0-7.0 ค่าดังกล่าวนี้ใกล้เคียงกับ pH ที่

เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase จาก *Thermus thermophilus* (Wierzbicki และคณะ, 1974; Khare และ Gupta, 1988; Wang และคณะ, 1996; MaciunÅ ska และคณะ, 1998)



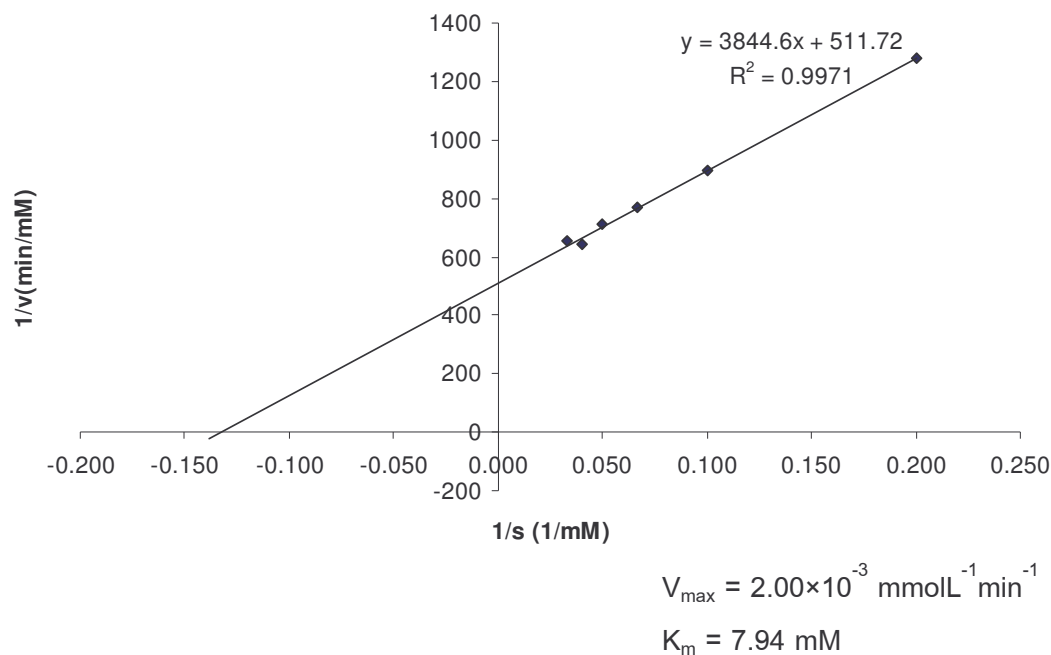
รูปที่ 3.11 อิทธิพลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ได้จากเชื้อ B1.1 โดยที่ (●) สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์; (■) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.2.5 การศึกษา pH ที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์

จากการศึกษาหา pH ที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ พบว่าที่ pH 3.0-5.5 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อบ่มเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5-10.5 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมง ยกเว้นที่ pH 7.0 และ 7.5 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าร้อยละ 80 เล็กน้อย คือ อยู่ที่ร้อยละ 67.1 และ 74.0 ตามลำดับ

3.2.6 การหาค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์

จากการศึกษาหาค่าพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยการหาปริมาณ oNP ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH 6.5 โดยใช้ oNPG เป็นสับสเตรท จากการทดลองพบว่ามีค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 7.94 mM ดังรูปที่ 3.13 ส่วนอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) ในการศึกษาครั้งนี้คือ $2.00 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ โดย Biswas และคณะ (2002) ที่ศึกษาเอนไซม์ β -galactosidase ทนร้อนจาก kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14 พบว่าเอนไซม์ให้ค่า K_m เท่ากับ 0.63 mM ส่วน Gul-Guven และคณะ (2007) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ β -galactosidase จาก thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* ที่แยกได้จาก Antarctica พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 8.9 mM



รูปที่ 3.13 Lineweaver Burk plot ของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์จากไอโซเลท B1.1

3.2.7 การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของไอออนโลหะทั้งหมด 5 ชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางที่ 3.2) พบว่า ไอออน Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ Fe^{3+} มีผลเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase บริสุทธิ์ ที่ศึกษาให้เพิ่มขึ้น สำหรับไอออน Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 และ 10 mM) มีผลเป็นตัวส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ที่แต่ที่ความเข้มข้นสูง (100 mM) จะเป็นตัวขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ Fe^{3+} นั้นจะส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 1 mM เท่านั้น ส่วน Ag^+ มีผลเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างชัดเจน และเป็นที่ทราบกันว่าเอนไซม์ β -galactosidase ที่ต่างๆ กัน ไป มักจะมีพวก mono และ divalent เป็นตัวส่งเสริมหรือยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แต่ก็ยังไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจนนัก เกี่ยวกับกลไกของการกระตุ้นของมันทั้งนี้จากการศึกษาล่าสุดพบว่าโครงสร้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ Na^+ และ Mg^{2+} มีลักษณะใกล้เคียงกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ *lacZ* ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดความเสถียรของเอนไซม์ (Nguyen และคณะ, 2006)

ตารางที่ 3.2 ผลของไอออนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ปริสุทธิ

ประเภทของ โลหะ	% Relative activity			
	0 mM	1 mM	10 mM	100 mM
Cu ²⁺	100.0	139.97	131.92	0.00
Ag ⁺	100.0	71.99	46.67	0.00
Zn ²⁺	100.0	130.92	149.62	5.83
Mg ²⁺	100.0	170.13	180.59	43.44
Fe ³⁺	100.0	159.07	64.96	2.21

บรรณานุกรม

- Aiyer, D. P. V.(2004). Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. African Journal of Biotechnology. Vol. 3 (10): p. 519-522.
- Barreto E. S., Silva D., Flavia O., Passos M. L. (2000). A practical method for screening for β -galactosidase secreting microbial colonies. Brazilian Journal of Microbiology 31: p.37-38.
- Biswas, S., Kayastha, A. M. and Seckler, R., (2003) Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. Journal of Plant Physiology. 160: 327- 337.
- Chakraborti S., Sani R. K., Banerjee U. C. and Sobti R. C. (2000). Purification and characterization of a novel β - galactosidase from *Bacillus sp* MTCC 3088. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 24: 58-63.
- Cowan. D. A., Daniel. R. M., Martin. A. M. and Morgan H. W. (2004), Some properties of a β -galactosidase from an extremely thermophilic bacterium. Biotechnology and Bioengineering; 10: 1141–1145.
- Domingues L., Oliveira C., Castro I., Lima N. and Teixeira A. J. (2004). Production of β -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 79 : p.809-815.
- Greenberg, N. A. and Mahoney, R.R. (1982) Production and characterization of β –galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Science. 47: 92-95.
- Griffiths M. W., Muir D. D. (1978). Properties of a thermostable β -galactosidase from a thermophilic *Bacillus*: Comparison of the enzyme activity of whole cells, purified enzyme and immobilised whole cells. Journal of the Science of Food and Agriculture. p. 753 – 761.
- Gul-Guven R. G., Guven. K., Poli. A. and Nicolaus. B. (2007), Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp.*rittmannii* isolated from Antarctica. Enzyme Microbiol Technol; 40: 1570–1577.
- Hsu C.A., Yu R.C. and Chou C.C. (2005). Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. International Journal of Food Microbiology. 104: p.197-206.
- Hsu C.A., Yu R.C., Lee S.L. and Chou C.C., (2007) Cultural condition affecting the growth and production of β - galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter, Graduate Institute of Food Science and Technology. International Journal of Food Microbiology.116:p.186–189.

- Khare, S.K. and Gupta, M. N. (1998) Immobilization of *Escherichia coli* β -galactosidase and its Derivatives by polyacrylamide gel. *Biotechnology and Bioengineering*. 31: 829-832
- Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides M. (2005). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*. 98: p.150–157.
- Linko M. and Bailey M. J. (1990). Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation . *Journal of Biotechnology*. Volume 16, Issues 1-2: p.57-66.
- Linko S., Enwald S., Zhu Y. H., and Mayra-Makinen. (1998). Production of β –galactosidase By *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* 11F. *Journal of Industrial Micrology and Biotechnology*. 20: p.215-219.
- Maciuńska. J., Czyz. B. and Synowieck. J. (1998), Isolation and some properties of β – galactosidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Food Chemistry*; 63: 441-445.
- Morales H., Olvera M.R., García V., Hugo S. (2005). *Lactobacillus reuteri* β -galactosidase activity and low milk acidification ability. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: p. 261-267.
- Nguyen TH., Splechna B., Steinböck M., Kneifel W., Lettner HP., Kulbe KD and Haltrich D. (2006). Purification and characterization of two novel beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:49 p. 89-98.
- Rao R.M.V. and Dutta S.M. (1977). Production of Beta-Galactosidase from *Streptococcus thermophilus* Grown in Whey. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 34, No. 2 : p. 185-188.
- Shaikh S.A. , Khire J.M. and Khan M.I. (1997). Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor sp.* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19: p.239–245.
- Ulrich, J. T., Mcfeters, G. A. And Temple, K. L. (1972) Induction and Characterization of β -galactosidase in and Extreme Thermophile. *Bacteriology*. 110: 691-698.
- Vasiljevic T. and Jelen P. (2001). Production of β - galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technology*. 2: p.75-85.
- Wang, D., Sakakibara, M., Kondo, N. and Suzuki, K. (1996) Ultrasound-enhanced lactose hydrolysis in milk fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 65: 86-92.
- Wierzbicki, L. E., Edwards, V. H. and Kosikowski, F. V. (1974) Hydrolysis of lactose in acid whey using β -glucosidase immobilized on porous glass particles; preparation and characterization of low-lactose dairy products. *Biotechnology and Bioengineering*. 16: 307-312.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Phimchanok Jaturapiree, Suganya Phuengjayaeam, Porntip Seangsawang, Witsanu

Srila and Chirakarn Meangnapho. Isolation and production of novel β -galactosidase from a newly isolated, moderate thermophile, *Bacillus* sp. strain B1.1.

This manuscript has been submitted for publication in World Journal of Microbiology and Biotechnology

ภาคผนวก

This manuscript has been submitted for publication in World Journal of Microbiology and Biotechnology

Isolation and production of novel β -galactosidase from a newly isolated, moderate thermophile, *Bacillus* sp. strain B1.1

Phimchanok Jaturapiree¹, Suganya Phuengjayaeam¹, Porntip Seangsawang¹, Witsanu Srila¹ and Chirakarn Meangnapho²

¹Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

²Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, 10300, Thailand

Corresponding author: P. Jaturapiree (phimchanok@hotmail.com)

Abstract

The enzyme β -galactosidase (lactase; EC 3.2.1.23) is a commercially important enzyme due to its various applications in dairy and food industries, which are based on the β -galactosidase-catalysed hydrolysis of lactose into glucose and galactose. The objectives of this work were to identify novel and attractive sources of this industrially relevant enzyme, and to study the effect of selected growth parameters (carbon source, lactose concentration, nitrogen source, peptone concentration, initial pH and temperature) on the formation of β -galactosidase. Based on a screening of isolates from Tha Pai hot spring, Mae Hong Son Province, Thailand, strain B1.1 was selected for further studies. Strain B1.1 is a Gram-positive, rod-shaped, catalase-positive bacterium that forms endospores. Based on the sequence of the 16S rDNA determined, this isolate is most closely related to *Bacillus* sp. YMY1010, and hence the strain is designated as *Bacillus* sp. B1.1. β -Galactosidase was produced by this strain with lactose and peptone as carbon and nitrogen sources, respectively. Optimal enzyme production occurred at an initial culture pH of 8.5 and at 45 °C. Under these optimum culture conditions, maximal volumetric and specific β -galactosidase activity of 0.478 U/ml and 0.338 U/mg, respectively, were obtained after 13 h of cultivation in a medium contain 2.5% lactose, 2.0% peptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Keywords: β -Galactosidase, Isolation, Production, Thermophile, *Bacillus* sp.

Introduction

β -Galactosidase or β -D-galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.23), commonly known as lactase, catalyzes the hydrolysis of the disaccharide lactose or structurally related galactosides, with the former cleaved to its monosaccharide constituents glucose and galactose. It is a commercially important enzyme due to its various applications in food and pharmaceutical industries. The production of lactose-reduced or lactose-free dairy products is one example of an important commercial application, since these products can be used by lactose-intolerant consumers who are unable to digest the milk sugar lactose. β -Galactosidase also offers a solution for the problem of whey surplus and disposal by increasing the value and possibilities of use of whey. In addition, galacto-oligosaccharides (GOS), prebiotic lactose derivatives, are commercially produced from lactose using the transferase activity of β -galactosidases.

Over the last decades, numerous biological systems, plants, animals, microorganisms including yeast, molds, bacteria and actinomyces, have been reported to produce β -galactosidase, and a variety of culture conditions can affect the production of β -galactosidase. More recently, enzymes from thermophilic micro-organisms, which show a higher degree of thermostability, are preferred because of several advantages that are encountered when performing the reactions at elevated temperatures, namely eliminated undesired microbial contamination during their application, increased substrate (lactose) solubility, higher product concentrations, and increased reaction rates. This results in improvement of the economy of the lactose hydrolysis process (Zeikus *et al.* 1998). Although numerous studies on β -galactosidase have been performed, suitable enzyme activities and culture condition for the production of β -galactosidase are still major factors limiting the application of this enzyme. Consequently, both the screening for new strains of thermophilic β -galactosidase producer

and the effect of culture conditions on the production of β -galactosidase activity are the primary objectives in this study.

Our experiments were aimed at screening for a suitable novel thermophilic β -galactosidase producer with beneficial properties and the identification of this strain. Culture conditions that affect enzyme production by the selected strain were further studied.

Materials and Methods

Microorganisms

Environmental samples were collected at Ta Pai hot spring (75 °C), Mae Hong Son Province, Thailand and Nong Ya Plong hot spring (45 °C), Petchaburi Province, Thailand.

Screening of microorganisms

Lactose medium (0.5% lactose, 0.5% peptone, 0.3% beef extract, and 1.5% agar) was used in a plate-based screening of microorganisms aiming at the identification of strains producing thermophilic β -galactosidase activity. The ability of the different isolates to produce β -galactosidase was examined on lactose medium plates containing 50 μ g/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) as a chromogenic substrate and 1 mM of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as an additional inducer for the synthesis of β -galactosidase.

Characterization of selected bacterial isolates

The morphological and physiological properties of the selected isolate B1.1 were investigated according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan & Gibbens 1984)

For the determination of the 16S rDNA sequence, strain B1.1 was cultivated in lactose medium for 24 h at 50 °C . Cells were subsequently lysed after their separation from the medium by centrifugation, and DNA was extracted using the phenol/chloroform/isoamyl alcohol method (Santos et al., 2001). The 16S rDNA gene was then amplified using the universal primers sFD (5'GAC GGG TGA GTA ACA CGT G 3') and sRD (5' GCT TTC TGG TTA GGT ACC GT 3'). The PCR conditions were initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C (30 sec), 50°C (30 sec), 72 °C (1 min), and final extension at 72 °C for 7 min. The amplification products were purified using the Hi Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (Real Biotech Corp., Taipei, Taiwan). The sequencing of the purified products was performed by a commercial provider (Bioservice Unit, Bangkok, Thailand). Sequence data were complied with the BLAST program and compared with those available from the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information. The phylogenetic relationship of isolate B1.1 was determined by using Vector NTI.

Culture condition

Inoculum was prepared in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of cultivation medium, which consisted of 0.5% lactose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, and 0.05% MgSO₄·7H₂O. The selected strain was incubated at 50°C for 24 h. Cells were harvested by centrifugation (4,000 rpm for 10 min at 4°C), washed twice with saline solution, diluted to a dry cell weight of ~0.1 g/l and used as the inoculum. The production of β-galactosidase was performed by transferring an aliquot (1.0 ml) of the inoculum to a 250-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the same culture medium. After 13-h incubation at 50°C, cell growth and β-galactosidase activity were examined. To determine the effect of various carbon sources on β-galactosidase production,

lactose, galactose or glucose were used as the main carbon source in the medium. The nitrogen sources studied included $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptone and yeast extract. To investigate the effect of pH, the initial pH of the medium was adjusted to various values (6.0–10.0) with sterile 1.0-N NaOH or 1.0-N HCl solutions. Various culture temperatures (40–60°C) were also tested with respect to growth and β -galactosidase yields.

Determination of β -galactosidase activity

Cells were first harvested from the culture broth by centrifugation (4,000 rpm for 10 min at 4 °C). After washing twice with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), cells were suspended in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 to obtain a cell suspension, and were then broken by three passages through a French Press (Aminco, USA) at 1200 bar and 4°C. The cell extract was separated from cell debris by centrifugation at 4,000 rpm and 4 °C for 30 min. This crude supernatant served as the enzyme source.

β -Galactosidase activity was quantitatively assayed at 40 °C by incubating 20 μl of suitably diluted enzyme solution with 480 μl of 22 mM *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (oNPG) in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) as the substrate for 15 min. The reaction was stopped by adding 750 μl of 0.4 M Na_2CO_3 and the amount of *o*-nitrophenol (oNP) released was determined by reading the absorbance at 420 nm.

One unit of β -galactosidase activity (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of oNP from oNPG per minute under the experimental conditions described above.

Determination of cell dry weight

Cell dry weight (CDW) was estimated by centrifuging 3 ml of the culture samples at 4500 rpm for 15 min, washing the pellet twice with distilled water, and drying the sample in an oven at 70 °C to constant weight.

Results and discussion

Screening and identification of a selected isolate

In a screening of moderately thermophilic microorganisms from hot spring water samples, aiming at identifying suitable thermophilic producers of β -galactosidase activity, an approach based on lactose agar plates with an incorporated chromogenic substrate was used. By using this approach, more than 30 phenotypically different colonies were isolated after incubation of the agar plates at 50 °C, and 5 colonies were identified as potential β -galactosidase producers since they showed blue colonies on lactose agar containing X-gal. Strain B1.1 (from Ta Pai hot spring) was found to exhibit the highest of β -galactosidase activity (data not shown). This strain has the ability to produce an intracellular β -galactosidase, and extracellular β -galactosidase activity was not detected during the cultivation. Isolate B1.1 is a Gram-positive, rod-shaped bacterium that is catalase-positive. In addition, it also forms endospores under appropriate conditions. Its colonies were found to be circular, milk white, smooth and humid.

In order to identify this isolate, the 16S rDNA of strain B1.1 was sequenced directly following PCR amplification. The 16S rDNA sequence of strain B1.1 was determined to be 406 bp long. An alignment of the 16S rDNA gene sequence of isolate B1.1 (GenBank, accession number AY198416.1) with sequences available in the GenBank databases at NCBI demonstrated that the highest degrees of identity is with the type strain *Bacillus* sp. YMY1010, sharing 97% 16S rDNA similarity. Figure 1 shows the phylogenetic tree of isolate B1.1. Based on the 16S rDNA sequence and the biochemical and physiological characteristics, we determined B1.1 to be a *Bacillus* species and designated it *Bacillus* sp. B1.1.

Factors affecting β -galactosidase production

In general, β -galactosidase production is affected by numerous factors, such as the components of the culture medium and the cultivation conditions (Nagy *et al.* 2001; Hsu *et al.* 2005; Hsu *et al.* 2007). The effects of some of the key factors, like carbon source, nitrogen source, amount of carbon, amount of nitrogen, initial pH and temperature, on the formation of β -galactosidase activity by *Bacillus* sp. B1.1 were determined.

Effect of carbon source on the production of β -galactosidase

To investigate the effect of different carbon sources on the production of β -galactosidase by the selected organism *Bacillus* sp. B1.1, lactose, galactose and glucose were used as the main carbon sources and compared with respect to the yields of β -galactosidase attained. β -Galactosidase activity was determined after growth of the organism for 13 h. As shown in Figure 2, *Bacillus* sp. B1.1 can utilize a variety of different carbon for the synthesis of β -galactosidase. The highest β -galactosidase activity was detected after growth on lactose followed by galactose and glucose. Several researchers have described that various carbon sources control the production of β -galactosidase in different microorganisms. Nagy *et al.* (2001) reported that lactose is the only sugar used by *Penicillium chrysogenum*, whereas glucose is not used. Shaikh *et al.* (1997) reported on the influence of some carbon sources on the production of β -galactosidase by *Rhizomucor* sp. They indicated that lactose was the best carbon source while glucose was the poorest carbon source.

Different lactose levels (10–35 g/l) were added to the medium and the activities of β -galactosidase as well as growth of B1.1 were estimated after 13 h of incubation. The results presented in Figure 3 indicate that the concentration of lactose in the medium affected both enzyme activity and growth of the organism. The β -galactosidase activity increased as the lactose concentration in the medium was raised up to 25 g/l. Under these growth conditions, a

maximum β -galactosidase activity of 0.166 U per mg dry cell weight was observed. A further increase in the initial lactose concentrations led to a decrease in β -galactosidase activity and cell growth. Increased lactose concentrations in the culture medium may repress the biosynthesis of β -galactosidase (Inchaurredo *et al.* 1998; Fiedurek & Szczodrak 1994).

Effect of nitrogen source on the production of β -galactosidase

A variety of different nitrogen sources were added to the medium containing 25 g/l lactose and the activity of β -galactosidase was determined after 15 h of fermentation at 50°C (Figure 4). Peptone was the best nitrogen source for the production of β -galactosidase by strain B1.1. Our results agreed with those observed for *Streptococcus thermophilus* and *Kluyveromyces lactis* by Rao & Dutta (1977) and Barreto *et al.* (2000), respectively, who demonstrated that peptone can be a good nitrogen source which that a maximum synthesis of β -galactosidase. On the other hand, these results were different from the report of Domingues (2004) and Hsu *et al.* (2005), which indicated that the highest activity of this enzyme was obtained by *Aspergillus niger* and *Bifidobacterium longum* CCRC 15708, respectively, when using yeast extract. A further increase in β -galactosidase activity was observed with an increase in the peptone concentration in the medium, and a maximum activity was obtained in the presence of 20 g/l peptone. A further increase in the concentration of peptone did not enhance the enzyme activity any further (Figure 5).

Effect of initial pH and temperature on enzyme production

The effect of the initial pH value of the medium on enzyme production was studied over a pH range of 6.0 to 10.0. The maximum enzyme production was observed between pH 8.5 and 9.0 (Figure 6), while higher initial pH values resulted in a sharp decrease in β -

galactosidase activity. There have been few reports on β -galactosidase production at this high range of pH.

As presented in Figure 7, various culture temperatures (40–60°C) were tested in order to investigate their effect on β -galactosidase production. At temperatures between 40°C and 50°C, the strain grew well, and highest levels of β -galactosidase activity were obtained. The maximum enzyme activity value was found when the cultivation was performed at 45°C.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund and The Higher Education Commission (MRG5080342) and the Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University. We also thank Asst. Prof. Dr. Busaraporn Ngampanya for the provision of the identification of the bacterium.

References

- Barreto, E.S., Silva, D., Flavia, O. & Passos, M.L. 2000 A practical method for screening for β -galactosidase secreting microbial colonies. *Brazilian Journal of Microbiology* 31, 37-38.
- Buchanan, R.E. & Gibbens, N.E. 1984 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed. Science Press, Beijing.
- Chakraborti, S., Sani, R.K., Banerjee, U.C. & Solti R.C. 2000 Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus sp* MTCC 3088. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24, 58-63.
- Domingues, L., Oliveira, C., Castro, I., Lima N. & Teixeira A.J. 2004) Production of β -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. *Journal of Chemical. Technology & Biotechnology* 79, 809-815.

- Fiedurek, J. & Szcodrak, J. 1994 Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragillis*. *Acta Microbiologica Polonica* 43, 57-65.
- Hsu, C.A., Yu, R.C. & Chou C.C. 2005 Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 104, 197-206.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Lee, S.L. & Chou C.C. 2007 Cultural condition affecting the growth and production of β -galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter, Graduate Institute of Food Science and Technology. *International Journal of Food Microbiology* 116, 186–189.
- Inchaurredo, V.A. & Flores Voget, C.E. 1998) Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 291-298.
- Linko, M. & Bailey M. J. 1990 Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *Journal of Biotechnolog* 16, 57-66.
- Linko, S., Enwald, S., Zhu, Y.H. & Mayra-Makinen 1998 Production of β -galactosidase by *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* 11F. *Journal of Industrial Micrology and Biotechnology* 20, 215-219.
- Nagy, Z., Keresztessy, Z., Szentirmai, A. & Biró, S. 2001 Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology* 41, 351 – 362.
- Rao, R.M.V. & Dutta, S.M. 1977 Production of Beta-Galactosidase from *Streptococcus thermophilus* Grown in Whey. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 185-188.
- Shaikh, S.A., Khire, J.M. & Khan M.I. 1997 Production of β -galactosidase from

thermophilic fungus *Rhizomucor sp.*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 239–245.

Zeikus, J.G., Vieille, C & Savchenko, A. 1998 Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* 2, 179–183.

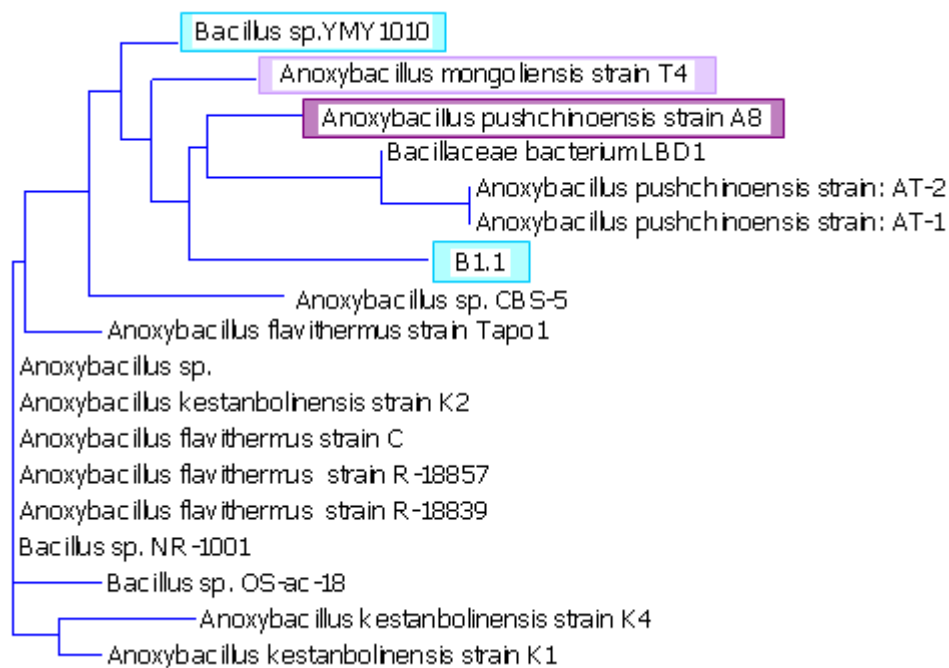


Figure 1. The phylogenetic tree showing the position of isolate B1.1 to a selected number of members of Bacillus Gram-positive rod bacteria.

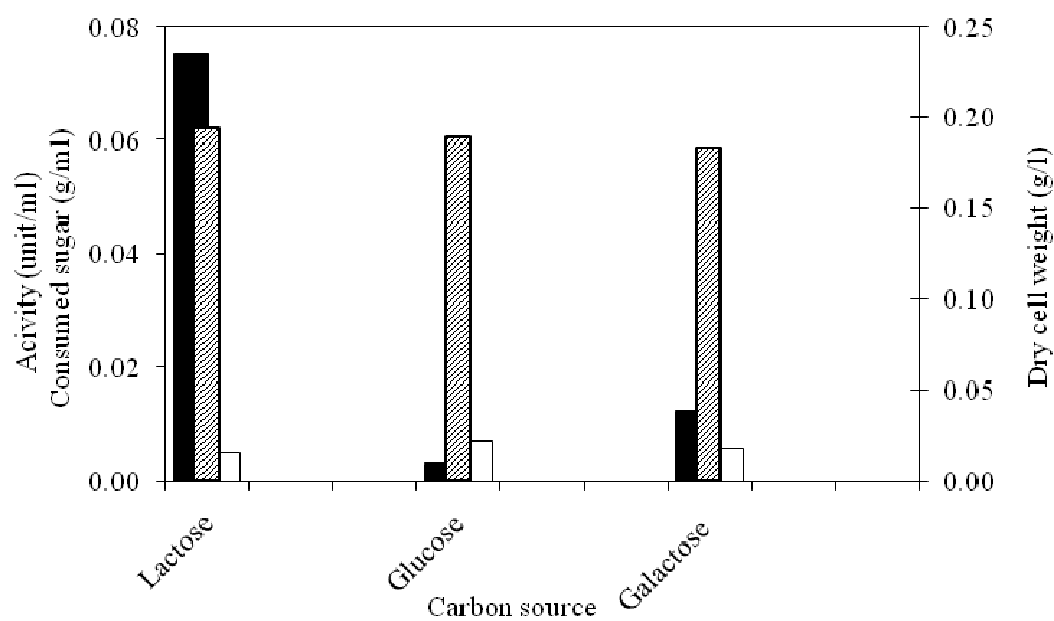


Figure 2. Effect of carbon source on the production of β -galactosidase by strain B1.1

Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:  dry cell weight;  β -galactosidase activity;  consumed sugar.

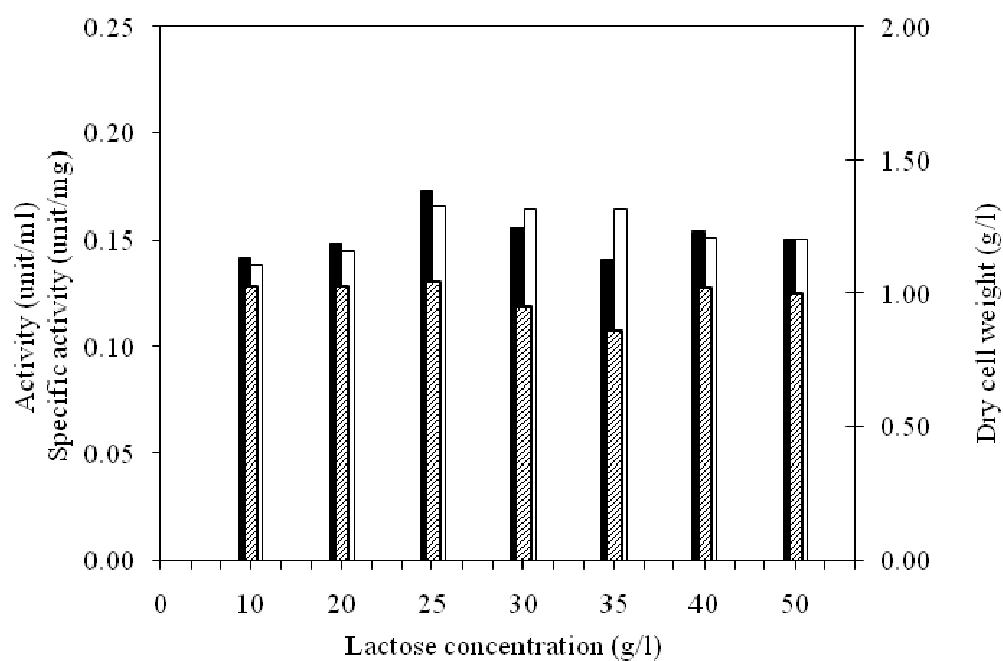


Figure 3. Effect of lactose concentration on the production of β -galactosidase by strain B1.1

Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:

▨ dry cell weight; ■ β -galactosidase activity; □ specific activity.

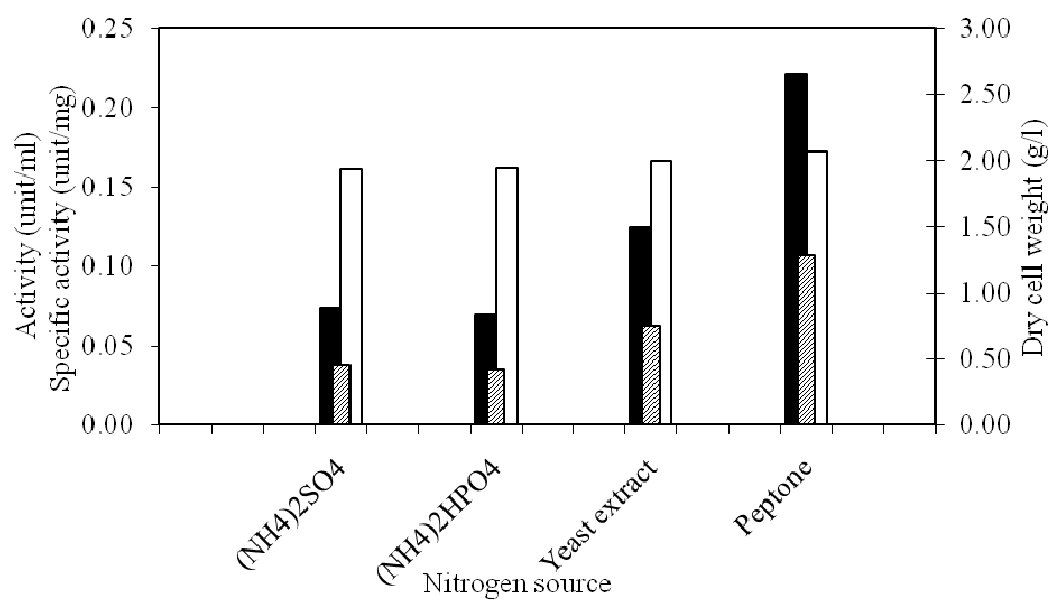


Figure 4. Effect of nitrogen source on the production of β -galactosidase by strain B1.1

Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:  dry cell weight;  β -galactosidase activity;  specific activity.

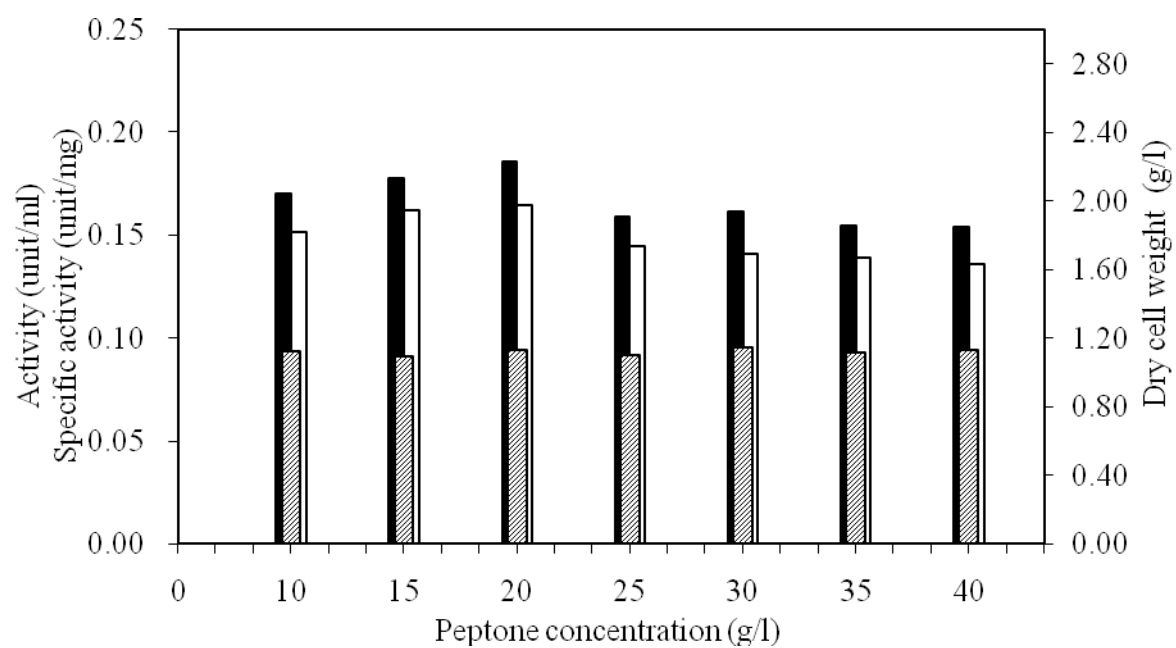


Figure 5. Effect of peptone concentration on the growth and β -galactosidase production by strain B1.1 Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:  dry cell weight;  β -galactosidase activity;  specific activity.

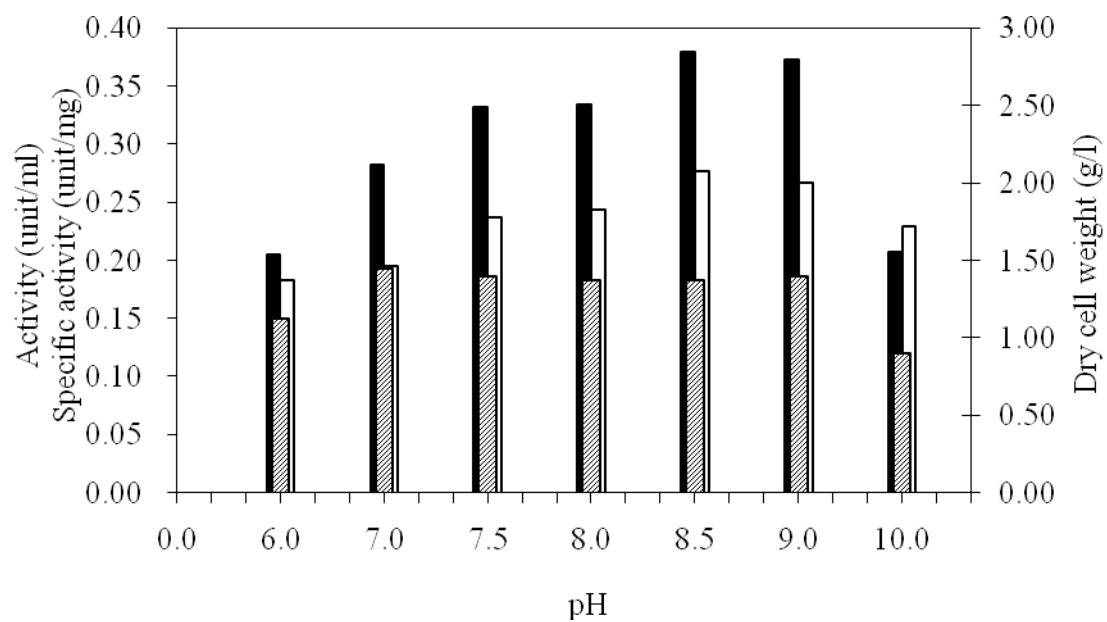


Figure 6. Effect of initial pH on the production of β -galactosidase by strain B1.1

Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:  dry cell weight;  β -galactosidase activity;  specific activity.

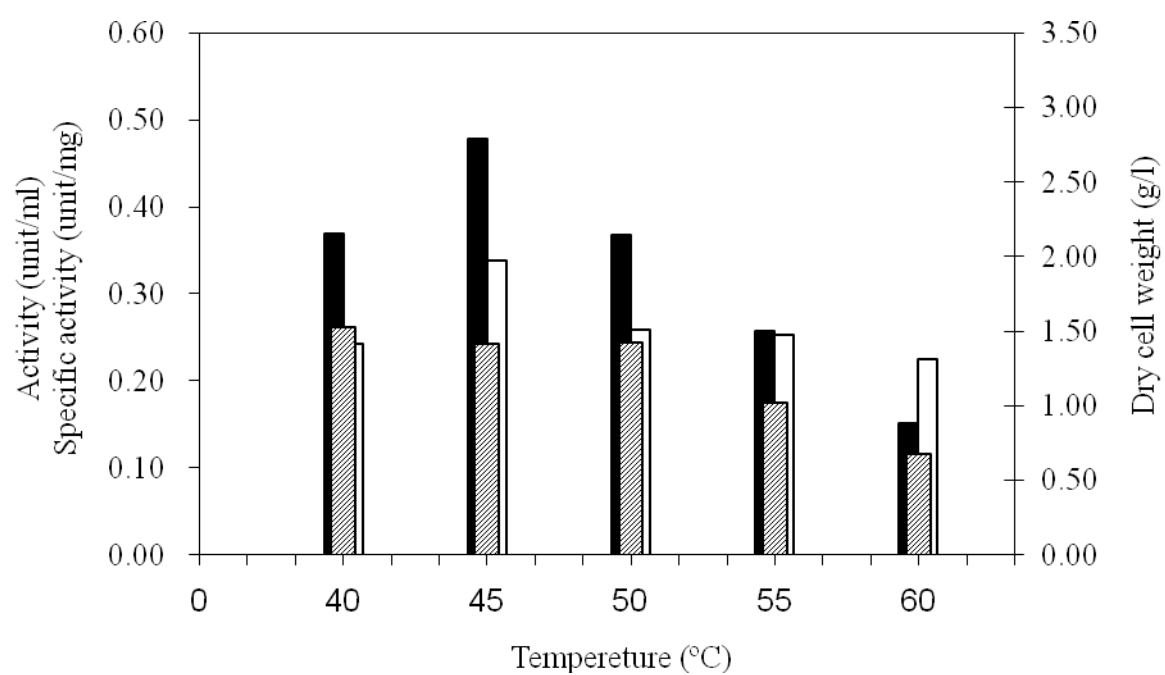


Figure 7. Effect of temperature on the production of β -galactosidase by strain B1.1

Determinations were made after 13-h cultivation at 50 °C. Symbols:  dry cell weight;  β -galactosidase activity;  specific activity.