

รัฐพร สุมาลัย : การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของอะไมเลสจากแบคทีเรียผลิตกรดแอล-แล็คติก *Lactococcus* sp. SUT 513 (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE FROM L-LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIUM *Lactococcus* sp. SUT 513) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง, 133 หน้า.

เอนไซม์อะไมเลสทางการค้ามีประโภชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็คติกที่ต้องบอยเบংเพื่อแก้ปัญหาความหนืดสูงจากวัตถุคิบเบংความเข้มข้นสูง การศึกษาการผลิตอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Lactococcus* sp. SUT 513 ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดแอล-แล็คติกเพียง ไอโซเมอร์เดียวได้โดยตรงจากเบং อาจสามารถลดการใช้เอนไซม์อะไมเลสทางการค้า การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อผลิตอะไมเลส ตามส่วนประกอบมาตรฐานที่มีเบংมันสำปะหลัง ทริปโติน สารสกัดจากเยลต์ ได-โพแทสเซียมฟอสเฟต ไตร-แอมโนเนียมซิเตรฟ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และฟอรัสซัลเฟต ปริมาณ 10.0 5.0 3.0 6.0 1.0 0.57 0.12 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มนต้นเท่ากับ 7.0 เมื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการพื้นผืนตอบสนอง โดยใช้แผนแบบเห็นทรัคคอมโพสิต และนำมารีวิวแบบจำลองทางสถิติด้วย 3 ตัวแปรหลัก คือ ความเข้มข้นของเบংมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของรำข้าวสกัดน้ำมัน และความเป็นกรด-ด่างเริ่มนต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พนว่าสูตรอาหารที่เหมาะสม ประกอบด้วย เบংมันสำปะหลัง และรำข้าวสกัดน้ำมัน ความเข้มข้น 45.0 และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มนต้น 8.5 และจำเป็นต้องเติม ได-โพแทสเซียมฟอสเฟต เข้มข้น 6.0 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้การเจริญดีที่สุด เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ตรวจพบกิจกรรมของอะไมเลสเท่ากับ 9.508 ± 0.022 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีโปรตีน 305 ± 53 กรัมต่อลิตร และสามารถต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อลงจากเริ่มนต้นร้อยละ 79.0 ผลการศึกษาแสดงถึงศักยภาพสูงในการผลิตอะไมเลสโดย *Lactococcus* sp. SUT 513 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ด้วยปริมาตรอาหาร 3 ลิตร พนกิจกรรมของอะไมเลสสูง 9.459 ± 0.219 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ 16 ถึง 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ขึ้นต้นด้วยวิธีการตกลงเอนโนมโนเนียมซัลเฟตอั่มตัวร้อยละ 90.0 เมื่อกรองและแยกโปรตีน พนว่าอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 16 ถึง 52 กิโลดัลตัน เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิช่วง 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง ช่วง 6.0 ถึง 7.0 สามารถทนอุณหภูมิในช่วง 70 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งพนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ตั้งแต่ร้อยละ 88 ถึง 95 และพนว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงาน

ได้โดยไม่มีแคลเซียม อีกทั้งแคลเซียมยังมีแนวโน้มขึ้นยังการทำงานของเอนไซม์ลงประมาณ 2.5 เท่า สำหรับแมกนีเซียมและเฟอรัสไออกอนนั้นสามารถถูกต้านทานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 2.0 เท่า สำหรับค่าความคงตัวในกรด-ด่าง พนวจว่าจะไม่เลสันนักตักษณ์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.0 ถึง 5.0 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 10 ถึง 20 ซึ่งมีความคงตัวสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 และในตักษณ์ส่วนนี้มีเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิช่วง 15 ถึง 35 องศาเซลเซียส จากการศึกษาบ่งพบร่วมจากการแข็งและน้ำลาย กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 5 ถึง 15 ต่อครั้งของการหลาด และเมื่อติดตามผลเป็นเวลา 26 วัน โดยเก็บเอนไซม์สดหายาที่อุณหภูมิ 2 ถึง 4 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมลดลงร้อยละ 1.5 ต่อวัน ผลจาก การศึกษานี้สามารถใช้ต่อยอดในการผลิตและใช้ประโยชน์เอนไซม์จะไม่เสียที่ผลิตจากแบคทีเรีย พลิตกรดแอล-แล็กติก อย่างไรก็ตามบังคับต้องศึกษาเพิ่มในขั้นตอนการทำริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ต่อไป



สาขาวิชาปรัชลินิก
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา ธนูธร สุมาลัย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พัฒนา แสวง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดี คงยิ่ง

RATTAPORN SUMALU : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION
OF AMYLASE FROM L-LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIUM

Lactococcus sp. SUT 513. THESIS ADVISOR :

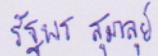
ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 133 PP.

AMYLASE PRODUCTION/ENZYME CHARACTERIZATION/L-LACTIC ACID
BACTERIA

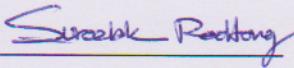
Commercial amylase enzymes provide benefit to starchy industry for solving viscosity problem that causes by high starch concentration. The potential production study of amylase from *Lactococcus* sp. SUT 513 that directly produces optical pure L-lactic acid at high concentration of cassava starch could reduce the application of commercial enzymes. This study commenced from the development of the optimal amylase production medium using the standard medium composed of cassava starch, tryptone, yeast extract, di-potassium hydrogen phosphate, tri-ammonium citrate, magnesium sulfate, manganese sulfate, and ferrous sulfate at concentrations of 10.0, 5.0, 3.0, 6.0, 1.0, 0.57, 0.12, and 0.03 g/l, respectively, with the initial pH of 7.0. Then, the 3 factors (cassava starch concentration, defatted rice bran concentration, and initial pH) were optimized, and used to build the model using central composite design (CCD) with response surface methodology (RSM). The optimal amylase production medium formula composing of cassava starch, defatted rice bran, and di-potassium hydrogen phosphate at concentrations of 45.0, 6.0, and 6.0 g/l, respectively. When cultivated *Lactococcus* sp. SUT 513 for 24 h in the optimal medium with an initial pH of 8.5, the amylase activity of 9.508 ± 0.022 U/ml with protein concentration 305 ± 0.053 g/l was

obtained. The cost of optimized medium was 79.0% cheaper than the original medium. These results showed the high potential production of amylase by *Lactococcus* sp. SUT 513. The amylase enzyme could be produced by *Lactococcus* sp. SUT 513 within a short cultivation period (16 to 18 h of cultivation) when cultivated in a 3-liter working volume in a 7.5-liter bioreactor. The bacterium produced enzyme exhibiting 9.459 ± 0.219 U/ml of amylase activity. For the characterization of partially purified amylase by 90% ammonium sulfate precipitation with ultrafiltration, the molecular weight of amylase was in the range of 16-52 kDa. The amylase had its optimal pH at 6.0 to 7.0, and optimal temperature ranging from 50 to 60°C. The partially purified amylase was stable at 70 to 100°C for 30 min with 88 to 95% relative activity. This amylase was active without adding calcium ion. The calcium ion could slightly inhibit (2.5-fold reduction of activity). The magnesium and ferrous ions acted as activators that could increase its activity to 2.0 fold. The amylase partially purified by pH 3.0 precipitation showed high stability at pH 6.0 to 6.8, low stability at pH 3.0 to 5.0 with 10 to 20% relative activity, this fraction of enzyme showed activity at the optimal temperature ranging from 15 to 35°C. Freezing and thawing of the crude enzyme resulted in amylase reducing activity around 5-15% each time. The activity of crude enzyme reduced 1.5% per day, during storage at 4°C for 26 days. Results from this study provide advantages for future application and production of the enzyme from agricultural waste. Also, further purification and characterization of the enzyme will be necessary to be investigated.

School of Preclinic

Student's Signature 

Academic Year 2018

Advisor's Signature Co-advisor's Signature 