รัฐพร สุมาลุย์ : การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของอะไมเลสจากแบคทีเรียผลิตกรดแอล-แล็กติก *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.

เอนไซม์อะไมเลสทางการค้ามีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็กติกที่ต้องย่อยแป้งเพื่อแก้ปัญหาความหนืดสูงจากวัตถุดิบแป้งความเข้มข้นสูง การศึกษาการผลิตอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Lactococcus* sp. SUT 513 ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดแอล-แล็กติกเพียงไอโซเมอร์เดียวได้โดยตรงจากแป้ง อาจสามารถลดการใช้เอนไซม์อะไมเลสทางการค้า การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อผลิตอะไมเลส ตามส่วนประกอบมาตรฐานที่มีแป้งมันสำปะหลัง ทริปโตน สารสกัดจากยีสต์ ไค-โพแทสเซียมฟอสเฟต ไตร-แอมโมเนียมซิเตรท แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และเฟอรัสซัลเฟต ปริมาณ 10.0 5.0 3.0 6.0 1.0 0.57 0.12 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เมื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้แผนแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต และนำมาสร้างแบบจำลองทางสถิติด้วย 3 ตัวแปรหลัก คือ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของรำข้าวสกัดน้ำมัน และความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง และรำข้าวสกัดน้ำมัน ความเข้มข้น 45.0 และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 8.5 และจำเป็นต้องเติมไค-โพแทสเซียมฟอสเฟต เข้มข้น 6.0 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้การเจริญดีที่สุด เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ตรวจพบกิจกรรมของอะไมเลสเท่ากับ 9.508±0.022 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีโปรตีน 305±53 กรัมต่อลิตร และสามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อลงจากเริ่มต้นร้อยละ 79.0 ผลการศึกษาแสดงถึงศักยภาพสูงในการผลิตอะไมเลสโดย *Lactococcus* sp. SUT 513 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ด้วยปริมาตรอาหาร 3 ลิตร พบกิจกรรมของอะไมเลสสูงสุด 9.459±0.219 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ 16 ถึง 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ขั้นต้นด้วยวิธีการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 90.0 เมื่อกรองและแยกโปรตีน พบว่าอะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 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 ซึ่งพบค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ตั้งแต่ร้อยละ 88 ถึง 95 และพบว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงาน

ได้โดยไม่มีแคลเซียม อีกทั้งแคลเซียมยังมีแนวโน้มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลงประมาณ 2.5 เท่า สำหรับแมกนีเซียมและเฟอรัสไอออนนั้นสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 2.0 เท่า สำหรับค่าความคงตัวในกรด-ด่าง พบว่าอะไมเลสนั้นตกตะกอนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.0 ถึง 5.0 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 10 ถึง 20 ซึ่งมีความคงตัวสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 และในตะกอนส่วนนี้มีเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิช่วง 15 ถึง 35 องศาเซลเซียส จากการศึกษายังพบว่าจากการแช่แข็งและนำมาละลาย กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 5 ถึง 15 ต่อครั้งของการละลาย และเมื่อติดตามผลเป็นเวลา 26 วัน โดยเก็บเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 2 ถึง 4 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมลดลงร้อยละ 1.5 ต่อวัน ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้ต่อยอดในการผลิตและใช้ประโยชน์เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียผลิตกรดแอล-แล็กติก อย่างไรก็ตามยังคงต้องศึกษาเพิ่มในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาปรีคลินิก
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา รัฐพร สุมาลุย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

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 produced by *Lactococcus* sp. SUT 513 within shorted cultivation period (16 to 18 h of cultivation) when cultivated in a 3-liter working volume in 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

Academic Year 2018

Student's Signature รัฐพร สุมาลุย์

Advisor's Signature Suwalak Rachtong

Co-advisor's Signature