บทคัดย่อภาษาไทย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ๒ ชนิด เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นม ๒ แนวทางหลัก คือ ๑) ในการผลิต แกแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ กอซ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก และ ๒) สำหรับการผลิตนมที่มีปริมาณแลคโตสต่ำ เพื่อช่วยให้ผู้บริโภคที่ขาดเอนไซม์นี้ซึ่งมีอยู่ ๑ ใน ๓ ของประชากรโลก และมีน้อยกว่าร้อยละ ๑๐ ในประเทศไทย สามารถดื่มนมได้โดยไม่มีผลข้างเคียง เอนไซม์ทั้ง ๒ ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

เอนไซม์แรก เป็นเอนไซม์จากเชื้อ แลคโตบาซิลัส เพนโตซัส เคยูบี-เอสที ๑๐-๑ พัฒนาขึ้นด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ตามด้วย วิธีการคัดแยกด้วยวิธีการโครมาโตกราฟฟีที่คัดแยกโดยปฏิกิริยาแบบไม่ชอบน้ำ และโดยความสามารถในการจับจำเพาะ ผลจากการวิเคราะเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงว่า เอนไซม์มีโครงสร้างเป็นคู่แบบแตกต่าง ที่มีขนาด ๑๐๕ กิโลดาลตัน มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 97 U_{oNPG}/mg มีค่าจลศาสตร์ในการทำปฏิกริยา Km, kcat และ kcat/Km สำหรับ แลคโตส และ *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) เท่ากับ 38 mM, 20 s^{-1}, 530 M^{-1} s^{-1} และ 1.67 mM, 540 s^{-1}, 325 000 M^{-1} s^{-1}, ตามลำดับ มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาอยู่ในช่วง 60–65°C สำหรับการวิเคราะห์ในช่วงเวลา ๑๐ นาที ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ แลคโตบาซิลัสอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมา รวมทั้งยังพบว่า แมกนีเซียม สามารถเพิ่มทั้งความสามารถในการทำงาน และความเสถียรของเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนำเอนไซม์นี้ไปใช้ผลิต พรีไบโอติก กอซ จากแลคโตส พบว่าได้ผลผลิตสูงสุดที่ ร้อยละ ๓๑ ของ น้ำตาลรวม ซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนแลคโตส ที่ร้อยละ ๗๘ เอนไซม์มีความสามารถสูงในการสร้างพันธะ β-(1⟶3) และ β-(1⟶6) โดยมีผลผลิตหลักเป็น กอซ ที่มีความยาว ๒ โมเลกุล ชนิดต่างๆ ได้แก่ β-D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Gal, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-DGal และ กอซ ที่มีความยาว ๓ โมเลกุล ๒ แบบ ได้แก่ β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Lac, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Lac คุณสมบัติข้างต้น มีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ กอซ ต่อไป

เอนไซม์ตัวที่สองที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ คือเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ บาซิลัส ไลเคนนิฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๑๓ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นโมเลกุลคู่แบบเสมือน พัฒนาขึ้นมาโดยการโคลนยีน *lacA* แล้วนำไปแสดงออกในปริมาณสูงในเชื้อ *เอสเชอริเชีย โคไล* ได้เป็นเอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรม แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ทั้ง แลคโตส และ *o*NPG เป็นสารตั้งต้น จะมีค่าอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมในการทำงานที่ ๕๐ °ซ และ ๖.๕ ตามลำดับ เอนไซม์นี้มีความเสถียรในช่วงค่า pH 5-9 ที่ ๓๗ °ซ และในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ ๔ – ๔๒ °ซ ที่ pH 6.5 ถึง ๑ เดือน ค่า K_m สำหรับ แลคโตส และ oNPG เท่ากับ 169 and 13.7 mM, ตามลำดับ เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ดีด้วยผลผลิต ได้แก่ กลูโคส และ กาแลค

โตส และสามารถถูกกระตุ้นได้บ้างด้วย อิออนเดี่ยว Na^{+} และ K^{+} ที่ความเข้มข้นในช่วง 1-100 mM และ อิออนคู่ Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ย่อยแลคโตสในนมที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่ไม่เหมาะกับการนำมาสังเคราะห์ กอซ เพราะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเอนไซม์แรกมาก คือใช้สังเคราะห์ได้ กอซ ในปริมาณสูงสุดเพียง ร้อยละ ๑๒ ของปริมาณน้ำตาลรวม เมื่อใช้แลคโตสตั้งต้นในความเข้มข้น ๒๐๐ กรัมต่อลิตร ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ นมแลคโตสต่ำ ต่อไป

ทั้งนี้ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ทั้ง ๒ นี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ที่มีการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ และมีค่าดัชนีผลกระทบ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

We succeed in the development of two β-galactosidases for the production of two value-added products, i.e., 1) production of galacto-oligosaccharides (GOS), which has prebiotic acitivity and 2) production of low-lactose milk, which will allow lactase deficient consumers, which comprise one-third of world population and less than 10% in Thailand, to be able to drink milk with no side effects. The two enzymes that have been developed in this research project can be further applied for industrial applications in the future

The first enzyme is a novel heterodimeric β-galactosidase with a molecular mass of 105 kDa, which was purified from crude cell extracts of the soil isolate *Lactobacillus pentosus* KUB-ST10-1 using ammonium sulphate fractionation followed by hydrophobic interaction and affinity chromatography. The electrophoretically homogenous enzyme has a specific activity of 97 U*o*NPG/mg protein. The Km, kcat and kcat/Km values for lactose and *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) were 38 mM, 20 s–1, 530 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$ and 1.67 mM, 540 s^{-1}, 325 000 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$, respectively. The temperature optimum of β-galactosidase activity was 60–65°C for a 10-min assay, which is considerably higher than the values reported for other lactobacillal β-galactosidases. Mg2+ ions enhanced both activity and stability significantly. *L. pentosus* β-galactosidase was used for the production of prebiotic galactooligosaccharides (GOS) from lactose. A maximum yield of 31% GOS of total sugars was obtained at 78% lactose conversion. The enzyme showed a strong preference for the formation of β-(1⟶3) and β -(1⟶6) linkages, and the main transgalactosylation products identified were the disaccharides β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Gal, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-DGal, and the trisaccharides β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Lac, β-D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Lac. This enzyme is suitable for the production of GOS in industrial scale in the future.

For the second enzyme, the gene encoding homodimeric β-galactosidase (lacA) from Bacillus licheniformis DSM 13 was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, and the resulting recombinant enzyme was characterized in detail. The optimum temperature and pH of the enzyme, for both o-nitrophenyl-β-D-galactoside (oNPG) and lactose hydrolysis, were 50°C and 6.5, respectively. The recombinant enzyme is stable in the range of pH 5 to 9 at 37°C and over a wide range of temperatures (4–42°C) at pH 6.5 for up to 1 month. The Km

values of LacA for lactose and oNPG are 169 and 13.7 mM, respectively, and it is strongly inhibited by the hydrolysis products, i.e., glucose and galactose. The monovalent ions Na^+ and K^+ in the concentration range of 1–100 mM as well as the divalent metal cations Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Ca^{2+} at a concentration of 1 mM slightly activate enzyme activity. This enzyme can be beneficial for application in lactose hydrolysis especially at elevated temperatures due to its pronounced temperature stability; however, the transgalactosylation potential of this enzyme for the production of galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose was low, with only 12% GOS (w/w) of total sugars obtained when the initial lactose concentration was 200 g/L. This enzyme is suitable for the production of low-lactose milk and milk products in industrial scale in the future.

The information about these two enzymes has already been published in international publications with peer-review and impacfactors.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี