น้ำฝน ไทยวงษ์ : การผลิตนมและไอศกรีมแลคโตสต่ำโดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ (THE PRODUCTION OF LOW LACTOSE MILK AND ICE CREAM USING ENZYME TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวัฒ ไทยอุดม, 220 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อผลิตนมและไอศกรีมแลคโตสต่ำ โดยใช้เอนไซม์เบต้า -กาแลคโทสิเดสลูกผสมจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* TLG02 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตเอนไซม์เกรดอาหาร ในขั้นแรกของการผลิตเอนไซม์เกรดอาหารนี้เป็นการเปลี่ยนเวคเตอร์ pSIP409-*lacZ* และ pSIP409-*lacZ*-His ซึ่งมียีนต้านยาปฏิชีวนะอีริโทรมัยซินให้เป็นยีนอะลานีนราซิเมส ทำให้ได้เวคเตอร์ ใหม่คือ pSIP609-*lacZ* และ pSIP609-*lacZ*-His เวคเตอร์ดังกล่าวนี้เป็นเวคเตอร์ที่ไม่ต้องใช้ ยีนต้านยาปฏิชีวนะเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ต่อมาเวคเตอร์เหล่านี้ได้ถูกถ่ายโอนไปยังเชื้อ *L. plantarum* TLG02 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้เหมาะกับ การถ่ายโอนเวคเตอร์ที่มียีนอะลานีนราซิเมสเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก เอนไซม์เบต้า-กาแลคโทสิเดสลูกผสม บริสุทธิ์ที่ได้ในข้างต้นนี้ มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 165±5 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการทำงานของเอนไซม์นี้คือ ในช่วงอุณหภูมิ 55–60 องศาเซลเซียส เมื่อใช้แลคโตสเป็นสารตั้งต้น ค่าคงที่ไมคีลิส-เมนเทนที่ดีที่สุดของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโทสิเดสลูกผสม บริสุทธิ์นี้มีค่าประมาณ 5.6 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า ความเร็วสูงสุ ดของเอนไซม์ ที่อุณหภูมินี้มีค่าประมาณ 153 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม ทั้งนี้ยังได้มีการศึกษา เสถียรภาพ ของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นในบัฟเฟอร์ต่างชนิด (โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมไอออน 1 มิลลิโมลาร์, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมไอออน 10 มิลลิโมลาร์ และบัฟเฟอร์นม ซึ่งพบว่าโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมไอออน 1 มิลลิโมลาร์สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ได้ การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์สกัดหยาบที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (1, 5 และ 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ร่วมกับแลคโตสที่ความเข้มข้น 2 ระดับ (125 และ 165 มิลลิโมลาร์) ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (4 และ 65 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อปฏิกิริยาแลคโตสไฮโดรไลซิสในบัฟเฟอร์นม พบว่าการใช้เอนไซม์สกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 5-10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถไฮโดรไลซ์แลคโตสได้อย่างน้อยร้อยละ 50 ทั้งที่ 4 และ 65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การศึกษาปฏิกิริยาแลคโตสไฮโดรไลซิสในนมไขมันต่ำ ที่ได้จากเปรียบเทียบการใช้ เอนไซม์เบต้า -กาแลคโทสิเดสลูกผสม ต่างชนิด (เอนไซม์สกัดหยาบ และเอนไซม์บริสุทธิ์) และเอนไซม์เชิงการค้า (Lactozym 2600L) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง พบว่า เอนไซม์ทุกชนิด สามารถย่อยแลคโตสในนมไขมันต่ำได้มากกว่าร้อยละ 85 ภายใน 18 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งในปฏิกิริยาดังกล่าวนี้พบว่า กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์สามารถเกิดขึ้นได้มากที่สุด (3.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เวลา 3 ชั่วโมง โดยผล

ของปฏิกิริยาแลคโตสไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันในข้างต้นได้ถูกศึกษาในนมที่มีปริมาณไขมันที่ต่างกัน (ไขมันต่ำและไขมันปกติ : ร้อยละ 3.5) ซึ่งพบว่าปริมาณไขมันในนมไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาแลคโตสไฮโดรไลซิส จากการใช้ เอนไซม์ทุกชนิด ผลดังกล่าวนี้ ยืนยันได้ โดยการตรวจสอบด้ วยเทคนิ คโครมาโตกราฟี แผ่นบาง ส่วนผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าคะแนนเฉลี่ยความชอบรวมของนมไขมันต่ำหรือนมไขมันปกติที่มีการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดและนมตัวอย่างควบคุมมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่คะแนนเฉลี่ยความชอบรวมของไอศกรีมจากนมไขมันต่ำที่มีปริมาณแลคโตสต่ำจากการใช้เอนไซม์สกัดหยาบหรือเอนไซม์บริสุทธิ์และไอศกรีมตัวอย่างควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างในไอศกรีมจากนมไขมันปกติที่มีปริมาณแลคโตสต่ำจากการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดและไอศกรีมตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-กาแลคโทสิเดสลูกผสมทั้งชนิดเอนไซม์สกัดหยาบและเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถ นำมาประยุกต์ใช้ ได้ในการผลิตนมและไอศกรีมที่มีปริมาณแลคโตสต่ำ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่มีปัญหาในเรื่องการย่อยแลคโตสในนม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NUMPHON THAIWONG : THE PRODUCTION OF LOW LACTOSE MILK AND ICE CREAM USING ENZYME TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SIWATT THAIUDOM, Ph.D., 220 PP.

RECOMBINAT β-GALACTOSIDASE/*LACTOBACILLUSPLANTARUM*/ pSIP VECTOR/OVEREXPRESSION/LACTOSE HYDROLYSIS/MILK BUFFER

The objective of this study was to produce low lactose milk and ice cream using a recombinant β-galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, overexpressed in *L. plantarum*, a food-grade expression host. The food-grade expression vector (pSIP-based) was constructed by replacing the erythromycin resistance gene (erm^R) of the pSIP409-*lacZ* and pSIP409-*lacZ*-His with the alanine racemase (*alr*) gene, allowing an antibiotic-free selection condition. Subsequently, the food-grade expression vectors, designated as pSIP609-*lacZ* and pSIP609-*lacZ*-His, were transformed into the *L. plantarum* TLG02, which is a D-alanine auxotroph. Consequently, a recombinant β-galactosidase was produced from these bacteria. The purified recombinant β-galactosidase showed the specific activity was 165±5 U/mg and the optimal temperature was in the range of 55–60°C when lactose was used as a substrate. The best value of Michaelis-Menten constant (K_m) was approximately 5.6 mM at 30°C, of which the maximal velocity ($V_{max,Glc}$) at this temperature was approximately 153 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$. Then, the catalytic stability was determined in different buffers (Sodium phosphate buffer, Sodium phosphate buffer + 1 mM Mg^{2+}, Sodium phosphate buffer + 10 mM Mg^{2+}, and milk buffer). The result showed that 1 mM of Mg^{2+} in the sodium phosphate buffer could enhance the enzyme stability. The

effects of different crude enzyme concentrations (1, 5, and 10 U/mL), lactose concentrations (125 and 165 mM), and temperatures (4 and 65°C) in the milk buffer on lactose hydrolysis were also studied. The crude enzyme concentration from 5-10 U/mL could hydrolyze lactose by at least 50% in both studied temperatures. Moreover, low-fat milk as a lactose source was used for the comparison of different types of recombinant β-galactosidase (crude and purified forms) and commercial enzyme (Lactozym 2600L) on lactose hydrolysis. HPLC analysis indicated that all enzyme preparations could hydrolyze more than 85% of lactose within 18 hours at 4°C. The highest galacto-oligosaccharides formation (3.63 mg/mL) was found at 3 hours in this reaction condition. The effect of fat content (low-fat milk and regular milk: 3.5% milk fat) on the hydrolysis of these enzymes was also investigated. The results showed that the different fat content in milks (low-fat milk and regular milk) did not affect the lactose hydrolysis for all enzyme preparations, which were detected by TLC. For the sensory evaluation, the overall acceptance of low-fat lactose-hydrolyzed milks and regular-fat lactose-hydrolyzed milks were significantly different from that of the control ($p<0.05$). The overall acceptance of all ice cream from low-fat lactose-hydrolyzed milk using crude or purified enzymes and the control was significantly different ($p<0.05$) but no significant difference was found among those samples prepared by regular-fat milk ($p>0.05$). In conclusion, both crude and purified recombinant β-galactosidase could be applied for the preparation of low-lactose milk and ice cream for lactose-intolerant consumers.

School of Food Technology

Academic Year 2016

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor's Signature_____