เอกสิทธิ์ แก่นกลาง : การผลิตและศึกษาคุณลักษณะอะไมเลสจากแบคทีเรียผลิตกรดดี-แล็กติก *Lactobacillus* sp. SUTWR 73 (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE FROM D-LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIUM *Lactobacillus* sp. SUTWR 73) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 191 หน้า.

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิตกรดอินทรีย์ในกลุ่มมอนอเมอร์เพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพจากแป้งด้วยจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. SUTWR 73 เป็นแบคทีเรียสร้างอะไมเลสที่สามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้โดยตรงจากแป้ง การใช้แป้งความเข้มข้นสูงเพื่อให้ได้กรดปริมาณมาก มีปัญหาความหนืดในระยะเริ่มต้นของการผลิตกรดที่ต้องอาศัยอะไมเลสทางการค้าช่วยลดความหนืด การศึกษานี้จึงมุ่งหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสจาก *Lactobacillus* sp. SUTWR 73 และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เพื่อการใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะการทดแทนหรือลดการใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งพบว่า SUTWR 73 สามารถผลิตอะไมเลสได้ทั้งแบบหลั่งออกนอกเซลล์ (4.23±1.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (0.0854±0.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร) พร้อมทั้งได้ปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียให้แข็งแรงและเสถียรขึ้นโดยกระตุ้นด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต (ยูวี) ซ้ำ 8 ครั้ง คัดเลือกได้สายพันธุ์ SUTWR 73-1 ที่เสถียร ผลิตอะไมเลสได้ 8.79±1.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร (4.20±0.061หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในอาหารแป้งมันสำปะหลังสูตรเริ่มต้น จากนั้นได้พัฒนาสูตรอาหารเพื่อผลิตอะไมเลสจาก SUTWR 73-1 โดยทดลองแบบแฟกทอเรียลและใช้วิธีการทดสอบแบบพื้นผิวตอบสนอง (อาร์เอสเอ็ม) เพื่อหาปัจจัยสำคัญและระบุสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอะไมเลส พบว่า ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตอะไมเลส ได้แก่ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นของทริปโตน และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร สูตรอาหารที่เหมาะสมเป็นสูตรอาหารมาตรฐานเอ็มอาร์เอสที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนคือแป้งมันสำปะหลังและทริปโตนเข้มข้นร้อยละ 10 และ 4.5 ตามลำดับ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 9.0 นำค่าที่ได้นี้ไปใช้สร้างแบบจำลอง พบว่าแบบจำลองที่ได้สามารถทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสที่ความเข้มข้นของแป้งและทริปโตนร้อยละ 11.70 และ 4.68 ตามลำดับ มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.87 เมื่อยืนยันโดยทดลองที่ระดับการผลิตเอนไซม์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ขนาดบรรจุ 125 มิลลิลิตร ได้อะไมเลสสูงถึง 33.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพิ่มระดับการผลิตเอนไซม์ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 5 ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 5 ลิตร ได้กิจกรรมของอะไมเลสสูงสุด 17.00±0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ใกล้เคียง

กับที่ใช้แบบจำลองทำนาย กิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสสูงสุดได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 70 เท่ากับ 17.34 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน อะไมเลสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 46.04 กิโลดาลตัน ที่ค่าคงที่ของมิเชลิส-เมนเทนและอัตราความเร็วสูงสุดของอะไมเลสต่อแป้งสับสเตรทเท่ากับ 0.167 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.67×10^{4} ไมโครโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ อะไมเลสที่ได้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.8 และยังคงทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาเสถียรภาพของอะไมเลสที่ได้ พบว่าการบ่มเอนไซม์ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 เป็นเวลา 30 นาที ให้กิจกรรมสูงกว่าสภาวะเริ่มต้นถึง 1.38 และ 1.33 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้อะไมเลสยังทำงานได้ดีที่สุดภายหลังบ่มก่อนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 50 นาที ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงขึ้นจากสภาวะเริ่มต้นถึง 2.09 เท่า อะไมเลสที่ได้สามารถกระตุ้นด้วยการเติมแบเรียม แมกนีเซียม แมงกานีส และเฟอรัสไอออน และยับยั้งได้โดยเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (อีดีทีเอ) และแคลเซียมไอออน จากผลข้างต้น อะไมเลสที่ผลิตได้จัดเป็นอะไมเลสที่มีเสถียรภาพในสภาวะด่างและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำโดยสามารถกระตุ้นได้โดยไอออนของโลหะ ด้วยสมบัติการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำและสภาวะด่างทำให้สามารถลดการใช้พลังงานในกระบวนการผลิตที่กำลังการผลิตสูง เช่น การผลิตกรดแล็กติก และยังสามารถต่อยอดไปสู่อุตสาหกรรมอื่นได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาปรีคลินิก
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา ศุภลักษณ์ แก่นกลาง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

EKKASIT KANKLANG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE FROM D-LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIUM *Lactobacillus* sp. SUTWR 73. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 191 PP.

AMYLASE PRODUCTION/AMYLASE PURIFICATION/*LACTOBACILLUS*/ /AMYLASE/OPTIMIZATION/LACTIC ACID BACTERIUM

Amylase is an important enzyme for the microbial production of organic acids from starch, especially the acids used as monomers for bioplastics production. The bacterium *Lactobacillus* sp. SUTWR 73 can produce amylase, and directly convert starch to D-lactic acid. The utilization of high starch concentration to obtain high acid yield faces the high viscosity problem at initial stage of the acid production. Commercial amylases are then required. This study aimed to determine optimum conditions for amylase production from *Lactobacillus* sp. SUTWR 73, and to characterize the enzyme for further applications, especially the purpose for replacing or reducing the commercial enzymes. It is found that SUTWR 73 could produce both extracellular (4.23±1.17 U/ml) and cell-associated amylase (0.0854±0.06 U/ml). The strain was also improved by repeating UV exposure for 8 times to obtain a strong and stable mutant. The mutant strain SUTWR 73-1 was selected as its capability to produce amylase exhibiting the highest activity of 8.79±1.33 U/ml (0.420±0.061 mg/ml) among other mutants when cultivated in the original cassava starch medium. The amylase production medium for SUTWR 73-1 was then developed to support the maximum enzyme yield using a factorial experiment and response surface method (RSM) for identifying the enzyme production key factors, which were found to be cassava

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

starch and tryptone concentrations, and initial pH of the medium. The optimized medium contained cassava starch and tryptone as C-and N-sources at 10 and 4.5%(w/v), respectively, with the initial pH of 8.0. These values were used to construct the model, that could predict the optimum condition for amylase production as follows: the suitable medium contained 11.70 and 4.68%(w/v) of cassava starch and tryptone, respectively, at the initial pH of 8.87. When confirmed the conditions by performing two experimental scales, the highest amylase yields of 33.54 U/ml and 17.00±0.44 U/ml were detected at 18 h with 5% starch in 50-ml and 3-l medium in 125-ml flask and 5-l bioreactor, respectively. The results were as predicted by the model. The partially purified enzyme, 46.04-kD molecular weight, was obtained at 70% ammonium sulphate saturation with the highest specific activity of 17.34 U/mg. The kinetic values K_m and V_{max} toward the soluble starch were 0.167 mg/ml and 1.67×10^4 μM/min, respectively. The enzyme effectively performed at a wide pH range (pH 6.0 to 9.0) with the optimum pH of 6.8, and the optimal temperature at 35°C. When incubated the amylase from SUTWR 73-1 at pH 8.0 and 9.0 for 30 min, its activity was higher than the initial activity around 1.38 and 1.33 times, respectively. The highest activity was still obtained with incubating at 25°C for 50 min, which was found to be 2.09 times higher than the initial activity. The amylase was activated by Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Fe^{2+}. But it was inhibited by EDTA and Ca^{2+}. The application of this metalloenzyme stable and active in alkali and at low temperature, could decrease energy consumption in large scale operations such as lactic acid production, and could expand to other industry.

School of Preclinic

Academic Year 2018

Student's Signature EKKASIT KANKLANG

Advisor's Signature Sureelak Rodtong

Co-Advisor's Signature