

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เอนไซม์ในระบบการย่อยสลายแป้งและการผลิต
กรดแลกติกโดย *Lactobacillus* sp. S21

ผู้เขียน

นายอภิรักษ์ กันเปิงใจ

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร. ชชาติชาย โชนงนุช

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. สายสมร ลำยอง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. วสุ ปฐมอารีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลกติกย่อยแป้ง (ALAB) *Lactobacillus* sp. S21 คัดแยกได้จากแป้งหมักจากกระบวนการผลิตขนมจีน และจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus plantarum* ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับของยีน 16S rRNA และยีน *recA* *L. plantarum* S21 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอมิเลสออกนอกเซลล์ประมาณ 4,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และผลิตกรดแลกติกได้โดยตรงจากแป้ง เก็บเกี่ยวเอนไซม์แอลฟา-แอมิเลสจากน้ำเลี้ยงของ *L. plantarum* S21 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสสูตรดัดแปลงที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนและทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์เป็นเอนไซม์มอนอเมริกที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 95 กิโลดาลตัน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่ขึ้นกับไอออนของแคลเซียม และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์คือความเสถียรภาพต่อพีเอชในช่วงกว้างระหว่าง 4.0-8.0 โดยมีความเสถียรที่ช่วงพีเอชดังกล่าว เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยสตาร์ช แอมิโลส แอมิโลเพกติน และไกลโคเจนคือ มอลโทส (ร้อยละ 60) และกลูโคส (ร้อยละ 38) ตรวจพบ open reading frame ของยีนเอนไซม์แอมิเลสขนาด 2,733 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดแอมิโนได้ 910 ตัว กรดแอมิโน 36 ตัวแรกเป็นลำดับของ signal peptide และอีก 874 กรดแอมิโนเป็นเอนไซม์แอมิเลส ลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดแอมิโนมีความเหมือนกับเอนไซม์แอลฟา-แอมิเลสจาก *L. plantarum* A6, *L. manihotivorans* LMG18010 และ *L. amylovorus* NRRL B4540 มากกว่าร้อยละ 96 แต่คุณสมบัติของเอนไซม์แตกต่างจากเอนไซม์จาก *L. plantarum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวและของ *Lactobacillus* spp. อื่นๆ อย่างชัดเจน ทำการโคลนยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส (*AmyW*) และ แอลฟาแอมิเลสที่ปราศจาก signal peptide (*AmyM*) และศึกษาการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้ pET21a

pET21d เป็นเวกเตอร์ ตามลำดับ ริกอมบีแนนท์ของ *E. coli* ที่มียีน *AmyW* สามารถผลิตเอนไซม์แอมิเลสภายในเซลล์ได้ถึง 22,000 ยูนิตต่อลิตร ภายหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการผลิตเอนไซม์แอมิเลสจาก *L. plantarum* S21 ประมาณ 5 เท่า ในขณะที่ริกอมบีแนนท์ของ *E. coli* ที่มียีน *AmyM* สามารถผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ได้มากถึง 81,000 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตจาก *L. plantarum* S21 สายพันธุ์เดิมถึง 20 เท่า เอนไซม์แอมิเลสจากริกอมบีแนนท์ทั้งสองมีคุณสมบัติเหมือนกับแอมมิเลสจาก *L. plantarum* S21 นอกจากนี้ผลการศึกษากายการแสดงออกของยีน *AmyW* และ *AmyM* ในเซลล์เจ้าบ้าน *L. plantarum* TGL02 โดยใช้ pSIP409-GusA เป็นเวกเตอร์พบว่า ริกอม-บีแนนท์ *L. plantarum* TGL02 ที่มี pSIP409-GusA-*AmyW* สามารถผลิตเอนไซม์แอมิเลสและหลั่งออกนอกเซลล์ในระดับเดียวกันกับ *L. plantarum* S21 หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย induction peptide ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างเอนไซม์แอมิเลสใน *L. plantarum* TGL02 ที่มี pSIP409-GusA-*AmyM* เอนไซม์แอมิเลสบริสุทธิ์จากริกอมบีแนนท์ *L. plantarum* TGL02 ที่มี pSIP40-GusA-*AmyW* มีคุณสมบัติเหมือนกับแอมมิเลสจาก *L. plantarum* S21 แสดงให้เห็นว่าการโคลนและการแสดงออกยีนแอมมิเลสประสบความสำเร็จทั้งใน *E. coli* และ *L. plantarum* *L. plantarum* S21 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.24 ต่อชั่วโมง ในอาหารเอ็มอาร์เอส สูตรดัดแปลงที่ประกอบด้วยสตาร์ชความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว แบคทีเรียนี้แสดงประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดแลกติกโดยให้ผลได้เท่ากับ 9.4 ± 0.36 , 24.5 ± 1.96 , 41.8 ± 1.64 , 74.3 ± 0.11 และ 94.0 ± 1.54 กรัมต่อลิตร จากสตาร์ชมันสำปะหลังความเข้มข้น 10, 25, 50, 75 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียกรดแลกติกย่อยแป้งชนิดอื่นที่มีรายงานมาก่อน ในการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียที่มีสตาร์ชเป็นองค์ประกอบและของเสียที่เป็นสตาร์ชสูง พบว่า *L. plantarum* S21 คงประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก แม้ความเข้มข้นของสตาร์ชเริ่มต้นสูง 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตรโดยให้ผลได้สูงสุดเท่ากับ 1.00 ± 0.06 , 0.89 ± 0.03 , 0.90 ± 0.07 กรัมต่อกรัม กำลังการผลิตเท่ากับ 0.79 ± 0.06 , 0.98 ± 0.00 , 1.23 ± 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับร้อยละ 94.6, 78.8 และ 74.3 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลได้ของการผลิตกรดแลกติกจากสตาร์ช ความเข้มข้นสูง และคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์แอมิเลส แบคทีเรียกรดแลกติก *L. plantarum* S21 จึงเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลกติกย่อยแป้ง แลคโทบาซิลัส แอมมิเลส กรดแลกติก

Thesis Title	Enzymes in Starch Degrading System and Lactic Acid Production by <i>Lactobacillus</i> sp. S21	
Author	Mr. Apinun Kanpiengjai	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch	Advisor
	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
	Dr. Wasu Pathom-aree	Co-advisor

ABSTRACT

Amylolytic lactic acid bacterium (ALAB), *Lactobacillus* sp. S21 was isolated from fermented starch during the process of Thai indigenous fermented rice noodle (Khanom Jeen) and identified to be *Lactobacillus plantarum*, based on 16S rDNA sequence and *recA* gene analysis. *L. plantarum* S21 is capable of producing extracellular amylase, approximately 4,200 U/L and directly producing lactic acid from starch. The α -amylase was harvested from *L. plantarum* S21 culture supernatant cultivated in the modified MRS medium containing starch as the sole carbon source and purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. The purified enzyme was found to be monomeric with a molecular mass of 95 kDa, its activity was Ca^{2+} -independent and the optima of amylase activity was found at pH 5.0 and 45°C. A unique property of the enzyme is its stability over the broad pH range of 4.0 to 8.0, where it was stable for at least 3 days at 37°C. The main hydrolysis products from starch, amylose, amylopectin as well as glycogen were maltose (60%) and glucose (38%). The open reading frame (ORF) of 2733 bp was confirmed to be amylase gene which deduced 910 amino acids consisting of 36 amino acids of signal peptide sequence and 874 amino acids as mature α -amylase. Both nucleotide sequence and deduced amino acid sequence shared higher than 96% identity to α -amylases from *L. plantarum* A6, *L. manihotivorans* LMG18010 and *L. amylovorus* NRRL B4540, but the enzyme properties were apparently different to amylases from the

the mentioned strains and other *Lactobacillus* spp. Gene encoding α -amylase (*AmyW*) was successfully cloned and α -amylase without signal peptide (*AmyM*) was expressed in *E. coli* BL21(DE3) using pET21a and pET21d as expression vectors, respectively. The recombinant *E. coli* harboring *AmyW* produced intracellular amylase 22,000 U/L after induction by 0.1 mM IPTG at 25°C for 18 h, where it was five times higher than that from *L. plantarum* S21. When *AmyM* inserted in pET21d was expressed in the same host and induced by the same condition, the recombinant *E. coli* successfully overproduced intracellular amylase up to 81,000 U/L which was 20 times higher than that from *L. plantarum* S21. Both amylases from recombinants had identical properties to *L. plantarum* S21 amylase. In addition, both *AmyW* and *AmyM* were expressed in a host, *L. plantarum* TGL02 using pSIP609-GusA as expression vector. Recombinant *L. plantarum* TGL02 harboring *AmyW* produced extracellular amylase at the same level as *L. plantarum* S21 after induction by 25 ng/mL induction peptide at 25°C for 18 h but *AmyM* was not expressed in this host. The amylase from recombinant *L. plantarum* TGL02 was purified and confirmed to have identical properties to *L. plantarum* S21 amylase. This indicated that the cloning and expression of amylase gene from *L. plantarum* S21 in both *E. coli* and *L. plantarum* TGL02 were successful. *L. plantarum* S21 exhibited a specific growth rate (μ) of 0.24 h⁻¹ in modified MRS broth containing 10 g/L starch as the sole carbon source. It demonstrated high efficacy in producing lactic acid to the tunes of 9.4±0.36, 24.5±1.96, 41.8±1.64, 74.3±0.11 and 94.0±1.54 from 10, 25, 50, 75, and 100 g/L of cassava starch, respectively which is higher than the ones previously reported from ALAB. In utilization of both starch containing wastewater and gelatinized starchy waste, *Lactobacillus plantarum* S21 demonstrated the high capability of lactic acid production directly from starchy effluent and maintained its potency even at high concentration of initial starchy substrate of 40, 60 and 80 g/L by maximum yielding 1.00±0.06, 0.89±0.03, 0.90±0.07 g/g substrate, productivity of 0.79±0.06, 0.98±0.00, 1.23±0.07 g/L·h and production efficiency of 94.6, 78.8, and 74.3%, respectively, at 48 h fermentation. Considering the high lactic acid yield achieved from the bioconversion of high starch concentration and the unique amylase properties, it is evident that *L. plantarum* S21 would be considered useful for industrial bioconversion of starch into lactic acid.

Keywords: Amylolytic lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, amylase, lactic acid