

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและศึกษาสมบัติของบีตา-กาแล็กโทซิเดสบริสุทธิ์จาก ยีสต์ทนร้อน <i>Kluyveromyces</i> sp. CK8
ผู้เขียน	นางสาว สิริندا อ่ำเอี่ยม
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาติชาย โชนงนุช

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิต การทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บีตา-กาแล็กโทซิเดสจากยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces* sp. CK8 ที่คัดแยกได้จากผลไม้ในเขตภาคเหนือของประเทศไทยและสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี รวมทั้งการจัดจำแนกระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA พบว่า *Kluyveromyces* sp. CK8 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Kluyveromyces marxianus* การศึกษาการผลิตบีตา-กาแล็กโทซิเดสด้วยอาหารเหลว Yeast-Malt extract medium ที่มีน้ำตาลแล็กโทสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 5.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การหาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 ชนิด โดยใช้แผนการทดลองแบบ 2-Level fractional factorial design พบว่าสารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต และ โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% การศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดย Central composite design และ Response surface plot พบว่า สารสกัดยีสต์ 0.23 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 9.64 กรัมต่อลิตร โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 7 กรัมต่อลิตร น้ำตาลแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร ทำนายค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 8.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบค่าที่ได้จากการทำนายโดยการผลิตเอนไซม์ในส่วนประกอบอาหารดังกล่าว ตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ 8.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 98.66% ผลการทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์โดย คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 157 เท่า มีค่าผลได้ของเอนไซม์บริสุทธิ์ และค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 19.7% และ 107.22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์

บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 280 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาดประมาณ 143 กิโลดาลตัน จำนวน 2 หน่วยย่อย อุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและค่าพีเอช 7.5 ตามลำดับ ไอออนของโลหะ Co^{2+} และ Mn^{2+} สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์บริสุทธิ์เป็น 2.5 เท่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า K_m และ V_{max} เป็น 4.1 มิลลิโมลาร์ และ 0.1 มิลลิโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ เมื่อใช้ *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside เป็นซับสเตรต การศึกษาเบื้องต้นในการสังเคราะห์กาแล็กโทอลิโกแซ็กคาไรด์พบว่าการใช้เอนไซม์ในรูปแบบ cell permeabilized-form สามารถสังเคราะห์กาแล็กโทอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่าเอนไซม์หยาบ

Thesis Title	Production and Characterization of Purified β -Galactosidase from Thermotolerant Yeast <i>Kluyveromyces</i> sp. CK8
Author	Miss Sirinda Am-aiam
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Advisor	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch

ABSTRACT

□ This research aimed to study the production, purification and characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces* sp. CK8, a thermotolerant yeast isolated from rotten fruit in northern Thailand with capability of growth at 45°C. The yeast isolate was identified to be *Kluyveromyces marxianus* based on the morphological and biochemical characteristics and comparative sequence analysis of 26S rRNA gene at D1/D2 domain (99% similarity). *Kluyveromyces marxianus* CK8 produced β -galactosidase 5.33 U/ml culture when cultivated in Yeast-Malt extract (YM) medium containing 1% (w/v) lactose as a sole carbon source at 37°C for 18 hours. The optimization of medium composition of 5 medium components for enzyme production by *K. marxianus* CK8 was conducted using 2-Level Factorial experimental design to determine the most relevant variables of the culture medium composition. Among 5 parameters, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 were significant effectors at $p < 0.05$. The Central Composite Design (CCD) and Response Surface Plot predicted to the highest β -galactosidase activity of 8.94 U/ml culture in the medium containing yeast extract 0.23 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9.64 g/l, KH_2PO_4 7 g/l, lactose 20 g/l and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l. Time course of validation in the optimal medium was investigated and found that the actual value of enzyme activity was 8.82 U/ml culture at 18 hours cultivation which calculated to be 98.66% validation. The β -galactosidase was purified to homogeneity by column

chromatographies and achieved the purified enzyme with 19.7% yield, 107.22 units/mg protein of specific activity and 157 purification folds. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 280 kDa composed 2 subunits of 143 kDa. The optimal temperature and pH of the purified β -galactosidase were 30°C and 7.5, respectively. Co^{2+} and Mn^{2+} enhanced the activity of the purified enzyme 2.5 fold comparing to control. *K_m* and *V_{max}* values of the purified β -galactosidase for *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside were 4.1 mM and 0.1 mM/min. Preliminary study on GOS synthesis found that the enzyme in form of permeabilized yeast cell was capable of GOS synthesis better than using the crude enzyme.