Thesis Title β-Galactosidase from Lactic Acid Bacteria Isolated from Healthy Infant

Author Miss Kamrai Woranoot

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch

ABSTRACT

The purposes of this study are isolation and studying of β-galactosidase from lactic acid bacteria isolated from healthy infant. From the isolation on MRS agar, 49 isolates showing yellow clear zone were obtained and characterized as Gram-positive bacteria. Those were screened for the production of β-galactosidase in MRS broth and found that isolate No.29, No.33 and No.37 were shown the highest β-galactosidase activity as 0.1, 0.14 and 0.12 U/ml, respectively. Those were investigated for the best β-galactosidase producer in a production medium supplemented with lactose as a carbon source, the isolate No.33 were produced the highest β-galactosidase activity up to 0.23 U/ml and selected for further study. Investigation of the optimal carbon source, using lactose, glucose and galactose found that lactose was the best carbon source for β-galactosidase production .

Plackette and Burman statistical design was applied to find out for other nutritional factors affected on β-galactosidase production. All 11 nutritional ingredients were studied including lactose, yeast extract, peptone, beef extract, tryptone, $(NH_4)_2SO_4.7H_2O$, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, K_2HPO_4, L-cysteine and Tween80. The results indicated that lactose, tryptone, KH_2PO_4 and Tween80 were found to be the significantly affected on β-galactosidase production at the level above 95%. Central composite design (CCD) was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

used to determine the optimal concentrations and interaction effect of those components. Only lactose and tryptone were highly affected on the enzyme production. The optimal medium composition for β-galactosidase production was comprised of 5.5% (w/v) lactose, 6.0% (w/v) tryptone, 0.2% (w/v) beef extract, 0.05% (w/v) $(NH_4)_2SO_4.7H_2O$ and 0.01% (w/v) KH_2PO_4. By this condition, the highest β-galactosidase as 1.33 U/ml was predicted to obtain at 24 hours cultivation at 37°C. The maximal β-galactosidase activity of 2.0 U/ml was obtained from practical and validation of β-galactosidase production was 150.38%. However, the highest value of the enzyme activity of 2.83 U/ml was found at 16 hours of cultivation.

In addition, further study on the effect of the initial pH and Tween80 on the enzyme production was found that β-galactosidase was produced 4.09 U/ml with 0.5% (w/v) Tween80 at the initial pH 6.5 at 16 hours of cultivation period. From optimized medium containing 5.5% (w/v) lactose, 6.0% (w/v) tryptone, 0.2% (w/v) beef extract, 0.05% (w/v) $(NH_4)_2SO_4.7H_2O$ and 0.01% (w/v) KH_2PO_4, 0.5% (w/v) Tween80 and initial pH 6.5 for the production of β-galactosidase by lactic acid bacteria isolate No.33, we achieved a maximum of 4.15 U/ml at 16 hours of cultivation, which was about 29.6-folds over the initial values obtained with the non-optimized medium.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ บีตา-กาแลกโตซิเดสจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกจากทารกสุขภาพดี

ผู้เขียน นางสาวกำไร วรนุช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร.ชาติชาย โขนงนุช

บทคัดย่อ

ในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากแลคติกแบคทีเรียจากอุจจาระของทารกสุขภาพดี จากการคัดแยกโดยใช้ MRS agar พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ที่สร้างวงใสและย้อมติดสีแกรมบวกได้ทั้งหมด 49 โคโลนี จากการคัดเลือกไอโซเลทที่ สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสในอาหารเหลว MRS พบว่า 3 ไอโซเลท คือ No.29, No.33 และ No.37 ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณ 0.10, 0.14 และ 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นศึกษาหาไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสสูงที่สุดจาก 3 ไอโซเลทในอาหารที่เติมน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลท No.33 ผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสสูงที่สุดคือ 0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส แลคโตส และกาแลคโตส พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือน้ำตาลแลคโตส การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบ Plackette and Burman design โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 11 ปัจจัยประกอบด้วย น้ำตาลแลคโตส ยีสต์สกัด (yeast extract) เปบโตน (peptone) เนื้อสกัด (beef extract) ทริปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต L-ซิสเทอีน และ ทวีน80 (Tween80) ผลการทดลองพบว่า แลคโตส ทริปโตน โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และทวีน80 เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นสูงกว่า 95% การวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับปัจจัยที่มีเหล่านี้ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แลคโตส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทริปโตน 6.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื้อสกัด 0.2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ไอโซเลท No.33 ผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมาได้สูงที่สุด 1.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบการเลี้ยงจริงโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทำนาย CCD พบว่าไอโซเลท No.33 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสได้ 2.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีค่า validation เท่ากับ 150.38% แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ที่สูงที่สุดคือ 2.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 16 ชั่วโมง

จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นและปริมาณ Tween80 ต่อการผลิตเอนไซม์พบว่าในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่มีการเติม Tween80 ในปริมาณ 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ทำให้ไอโซเลท No.33 สามารถผลิตเบต้า-กาแลคโตซิเดสได้สูงที่สุด 4.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่ประกอบด้วย แลคโตส 5.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทริปโตน 6.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื้อสกัด 0.2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทวีน80 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่าทำให้ไอโซเลท No.33 ผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมาได้สูงที่สุด 4.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมากกว่าเดิม 29.6 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved