Thesis Title β-Galactosidase from Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant and Feasibility in Oligosaccharide Synthesis Application

Author Mr. Wattana Sriphannam

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Chartchai Khanongnuch	Advisor
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal	Co-advisor

ABSTRACT

Lactic acid bacteria from healthy breast-fed infants for β-galactosidase production were screened in MRS broth. Among 49 isolates exhibited the yellow clear zone on MRS agar supplemented with bromocresol purple, the isolate no.CM33 was selected as the highest β-galactosidase producer and was identified as *Lactobacillus fermentum* according to the morphological characteristics and 16S rRNA sequence analysis. *L. fermentum* CM33 exhibited a good survival rate under the simulated stomach passage model comparable with known probiotic strains, *L. gallinaraum* JMC2011 and *L. agilis* JMC1187. It demonstrated the antagonistic effect against pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteriditis* while being investigated by well diffusion method. In addition, the selected lactobacilli exhibited a high growth rate when cultivated in modified MRS containing commercial galactooligosaccharide (GOS) similar to glucose as a sole carbon source. Plackette and Burman statistical design and Central composite design (CCD) were applied to optimize the β-galactosidase production and the optimal medium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Composition (w/v) contained 3.0% lactose, 3.3% tryptone, 0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.2% beef extract, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% K_2HPO_4, 0.005% $MgSO_4.7H_2O$, 0.003% L-cysteine and 0.5% Tween80 with initial pH 6.5. By this condition, a maximum of 19.96 Units was achieved at 16 hours of cultivation at 37^{o}C, which was about 47.5-folds over the initial values obtained with the non-optimized medium.

β-Galactosidase from *L. fermentum* CM33 was purified to apparent homogeneity by ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction. The purified enzyme is a heterodimer consisting of two subunits with molecular weight of 35 and 73 kDa. The optimum temperature and pH of β-galactosidase activity was 40°C and pH ranging from 6.5-8.0, respectively using *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. The enzyme showed high specific requirements for Mn^{2+} ions, to enhance enzyme activity. Heterodimeric β-galactosidase were encoded by two overlapping genes, *lac-L* (1887 bp) and *lac-S* (960 bp). The coding regions of the *lac-LS* genes were cloned and successfully over expressed in *E. coli* using an expression system based on the T5 RNA polymerase promoter. Recombinant β-galactosidase was purified to apparent homogeneity. The purified recombinant enzyme had the same properties as that from native one. In addition, the obtained recombinant β-galactosidase also showed the capability of transgalactosidase activity and it was possible for using in oligosaccharides synthesis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เอนไซม์บีต้ากาแลกโตซิเดสจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจาก อุจจาระ ทารกและ ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

ผู้เขียน นายวัฒนา ศรีพันนาม

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร. ชาติชาย โขนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

คัดกรองแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอุจจาระของเด็กที่เลี้ยงด้วยนมแม่ เพื่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากาแลกโตซิเดสในอาหารเหลว MRS จากจุลินทรีย์ 49 ไอโซเลตที่สร้างวงใสในอาหาร แข็ง MRS ที่เติม bromocresol purple พบว่าไอโซเลตหมายเลข CM33 สามารถผลิตเอนไซม์ บีต้ากาแลก-โตซิเดสได้สูงที่สุด จากการพิสูจน์สายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้คือ *Lactobacillus fermentum* ผลการทดสอบสมบัติการเป็นโพรไบโอติคพบว่า L. fermentum CM33 มีอัตรารอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้ดีเทียบได้กับแบคทีเรียแลคติก *L. gallinaraum* JCM2011 และ *L. agilis* JCM1187 ซึ่งเป็นโพรไบโอติค ผลการทดสอบ การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี well diffusion พบว่า *L. fermentum* CM33 สามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Listeria monocytogenes, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella typhi* และ *Salmonella enteriditis* นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (GOS) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว *L. fermentum* CM33 มีอัตราการเจริญสูงเช่นเดียวกับที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ บีต้ากาแลคโตซิเดสโดยใช้แผนการทดลองทางสถิติแบบ Plackette and Burman design และ Central composite design (CCD) พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย (น้ำหนักต่อปริมาตร) แลคโตส 3.0% ทริปโตน 3.3% เนื้อสกัด 0.2% ยีสต์สกัด 0.2% เปปโตน 0.2% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.02% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.005% แอล-ซีสเทอีน 0.003% และ Tween80 0.5% พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 จากสูตรอาหารที่ได้เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง *L. fermentum* CM33 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 19.96 ยูนิต ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนการศึกษาถึง 47.5 เท่า เอนไซม์บีต้ากาแลคโตซิเดสจาก *L. fermentum* CM33 ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุและโครมาโทกราฟีแบบไฮโดรโฟบิก เอนไซม์ที่ได้เป็นเฮเทอร์โรไดเมริคที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาดประมาณ 35 และ 72 กิโลดาลตัน อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียสและที่ พีเอช 6.5-8.0 ตามลำดับ เมื่อใช้ *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) เป็นซับสเตรต แมงกานีส ไอออนมีความจำเป็นอย่างมากต่อ เอนไซม์ซึ่งจะช่วยในการเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ บีต้ากาแลคโตซิเดสทั้งสอง หน่วยย่อย ถูกถอดรหัสพันธุกรรมมาจากยีนที่มีการซ้อนทับกัน 2 ยีน คือ *lac-L* (1887bp) และ *lac-S* (960bp) ยีน *lac-LS* ได้ถูกโคลนแล ะแสดงออกใน *E. coli* โดยใช้ T5 RNA polymerase promoter รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์และพบว่าเอนไซม์มีสมบัติไม่แตกต่างจากเอนไซม์จาก สายพันธุ์เดิม นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้ยังคงแสดงกิจกรรมของทรานกาแลคโตซิ - เดสและมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved