50401205 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คำสำคัญ : เบต้า-กาแลคโตซิเดส/การทำบริสุทธิ์/จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง

สมยศ โอศิริพันธุ์ : การทำบริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดส จากเชื้อ B 1.2 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ , ผศ.ดร.พิทยา หลิวเสรี และ ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา. 127 หน้า.

เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ B1.2 ที่คัดแยกได้จากโป่งน้ำร้อนท่าปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย การศึกษาและระบุชนิดสายพันธุ์เชื้อประกอบด้วย การย้อมสีแกรม การย้อมสีเอนโดสปอร์ การทดสอบ Catalase พบว่าจุลินทรีย์ B1.2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีเอนโดสปอร์ และ การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธี 16s rDNA sequencing (Partial length) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus kestanbolinensis* และ *Anoxybacillus flavithermus* มากที่สุด เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ DEAE ion-exchange และ Affinity chromatography ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น โดยวิธี Ultrafiltration พบว่าคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ มี Specific activity เท่ากับ 1.1 U/mg protein มีความบริสุทธิ์ประมาณ 3.79 เท่า และ Recovery 86.4% น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หาโดยวิธี Native-PAGE และ SDS-PAGE คือ 215 และ 75 kDa ตามลำดับ สอดคล้องกับวิธี Gel chromatography คือ 215 kDa เอนไซม์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 60 $^{0}$C เสถียรที่อุณหภูมิ 40-60 $^{0}$C และที่พีเอช 6.0-10.0 ค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ที่หาได้คือ 13.32 mM และ 4.93 $\times 10^{-3}$ $mmolL^{-1}min^{-1}$ ตามลำดับ เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสซึ่งผลิตภายในเซลล์จุลินทรีย์ถูกยับยั้งโดยไอออนของ $Zn^{2+}$, $Cu^{2+}$ สาร EDTA และการผลิต Glucose และ Galactose โดยเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นสามารถนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและนมได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

---

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ..... 2. ..... 3. .....

50401205 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : β-GALACTOSIDASE/PURIFICATION/THERMOPHILIC

SOMYOS OSIRIPHUN : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BETA - GALACTOSIDASE FROM STAIN B1.2. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Dr.nat.techn., ASST. PROF. PITTAYA LIEWSAREE, Ph.D., AND ASST. PROF BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D. 127 pp.

An intracellular β-galactosidase was extracted from a thermophile B1.2 strain isolated from Ta Pai hot spring, Maehongson, Thailand. Different identification methods were used to investigate its species including gram staining, endospore staining, catalase test, the direct amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction and the partial sequencing of the 16S rDNA gene. The B1.2 strain was found to be a gram positive bacteria which its endospores located at the terminal end of the vegetative cell. PCR analysis indicated that this isolated strain had a high similarity with *Anoxybacillus kestanbolinensis* and *Anoxybacillus flavithermus*. The enzyme β-galactosidase was purifiled by ion-exchange and affinity chromatography and concentrated by an ultrafiltration technique. The purified enzyme had a specific activity of 1.1 U/mg proteins, with a purification fold of 3.79 and a recovery of 86.4%. The molecular mass of the purified enzyme as estimated by native PAGE SDS-PAGE and gel filtration was approximately 215, 75 and 215 kDa,respectively. The optimum pH and temperature purified β-galactosidase were 6.5 and 60 $^{o}$C, respectively. This enzyme was thermally stable in the range of 40-60 $^{o}$C with the pH stability of 6.0 - 10.0. The $K_m$ and $V_{max}$ values for oNPG were calculated to be 28.85 mM and 8.38 $\times 10^{-3}$ mmolL$^{-1}$min$^{-1}$ respectively. The intracellular β-galactosidase from B1.2 was strongly inhibited by EDTA and various mono- and divalent cations, such as $Zn^{2+}$ and $Mg^{2+}$. This enzyme was also moderately inhibited by its hydrolysis products; glucose and galactose. This purified β-galactosidase could be further used in food and milk industry.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

---

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010
Student's signature .....
Thesis Advisors' signature 1. ..... 2. ..... 3. .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง อาจารย์ ด.ร.สุวัฒนา พฤกษะศรี ประธานกรรมการ อาจารย์ ด.ร.ประกิต สุขใย กรรมการภายนอก ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำต่างๆ และช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ อาจารย์.ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม ที่ให้คำปรึกษา และ ช่วยเหลือในทุกๆปัญหาตลอดมาทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่มอบวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณพี่ๆ และ นักวิทยาศาสตร์ในสำนักงานภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ตลอดในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ให้เงินการสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบเงินทุนอุดหนุนงานวิจัยระดับปริญญามหาบัณฑิตให้งานวิจัยดำเนินสำเร็จลุล่วงด้วยดี

และสุดท้ายนี้สำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว รวมทั้งเพื่อนๆ น้องๆ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่างๆจนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์