รหัสโครงการ SUT3-304-52-36-31

รายงานการวิจัย

การพัฒนาและประยุกต์ใช้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นม

Development and Application of Beta-galactosidase for Value-added Dairy Food Products

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-52-36-31

รายงานการวิจัย

การพัฒนาและประยุกต์ใช้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นม

Development and Application of Beta-galactosidase for Value-added Dairy Food Products

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรลัดา เจือจันทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๒ - ๒๕๕๔

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม ๒๕๕๖

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ถึง ๒๕๕๔ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ดิฏฐมา หาลทิช จาก BOKU University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna ประเทศออสเตรีย ที่ได้ช่วยให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ด้วยดีตลอดมา รวมทั้งให้โอกาส ผศ. ดร. อรลัดา เจือจันทร์ ได้ไปทำงานวิจัยนี้ที่ห้องปฏิบัติการของท่าน เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ อีกทั้งขอขอบคุณนักวิจัยท่านอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ ที่ได้ร่วมกันทำงานวิจัยจนมีผลงานวิจัยคุณภาพร่วมกัน รวมทั้งขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ และคุณน.ส. สุภมาส บัณฑิตสาธิสรรค์ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี

บทคัดย่อภาษาไทย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ๒ ชนิด เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นม ๒ แนวทางหลัก คือ ๑) ในการผลิต แกแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ กอซ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก และ ๒) สำหรับการผลิตนมที่มีปริมาณแลคโตสต่ำ เพื่อช่วยให้ผู้บริโภคที่ขาดเอนไซม์นี้ซึ่งมีอยู่ ๑ ใน ๓ ของประชากรโลก และมีน้อยกว่าร้อยละ ๑๐ ในประเทศไทย สามารถดื่มนมได้โดยไม่มีผลข้างเคียง เอนไซม์ทั้ง ๒ ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

เอนไซม์แรก เป็นเอนไซม์จากเชื้อ แลคโตบาซิลัส เพนโตซัส เคยูบี-เอสที ๑๐-๑ พัฒนาขึ้นด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ตามด้วย วิธีการคัดแยกด้วยวิธีการโครมาโตกราฟฟีที่คัดแยกโดยปฏิกิริยาแบบไม่ชอบน้ำ และโดยความสามารถในการจับจำเพาะ ผลจากการวิเคราะเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงว่า เอนไซม์มีโครงสร้างเป็นคู่แบบแตกต่าง ที่มีขนาด ๑๐๕ กิโลดาลตัน มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 97 U_{oNPG}/mg มีค่าจลศาสตร์ในการทำปฏิกริยา Km, kcat และ kcat/Km สำหรับ แลคโตส และ *o*-nitrophenyl-**β**-D-galactopyranoside (*o*NPG) เท่ากับ 38 mM, 20 s^{-1}, 530 M^{-1} s^{-1} และ 1.67 mM, 540 s^{-1}, 325 000 M^{-1} s^{-1}, ตามลำดับ มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาอยู่ในช่วง 60–65°C สำหรับการวิเคราะห์ในช่วงเวลา ๑๐ นาที ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ แลคโตบาซิลัสอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมา รวมทั้งยังพบว่า แมกนีเซียม สามารถเพิ่มทั้งความสามารถในการทำงาน และความเสถียรของเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนำเอนไซม์นี้ไปใช้ผลิต พรีไบโอติก กอซ จากแลคโตส พบว่าได้ผลผลิตสูงสุดที่ ร้อยละ ๓๑ ของ น้ำตาลรวม ซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนแลคโตส ที่ร้อยละ ๗๘ เอนไซม์มีความสามารถสูงในการสร้างพันธะ β-(1⟶3) และ β-(1⟶6) โดยมีผลผลิตหลักเป็น กอซ ที่มีความยาว ๒ โมเลกุล ชนิดต่างๆ ได้แก่ β-D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Gal, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-DGal และ กอซ ที่มีความยาว ๓ โมเลกุล ๒ แบบ ได้แก่ β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Lac, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Lac คุณสมบัติข้างต้น มีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ กอซ ต่อไป

เอนไซม์ตัวที่สองที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ คือเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ บาซิลัส ไลเคนนิฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๑๓ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นโมเลกุลคู่แบบเสมือน พัฒนาขึ้นมาโดยการโคลนยีน *lacA* แล้วนำไปแสดงออกในปริมาณสูงในเชื้อ *เอสเชอริเชีย โคไล* ได้เป็นเอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรม แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ทั้ง แลคโตส และ *o*NPG เป็นสารตั้งต้น จะมีค่าอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมในการทำงานที่ ๕๐ °ซ และ ๖.๕ ตามลำดับ เอนไซม์นี้มีความเสถียรในช่วงค่า pH 5-9 ที่ ๓๗ °ซ และในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ ๔ – ๔๒ °ซ ที่ pH 6.5 ถึง ๑ เดือน ค่า K_m สำหรับ แลคโตส และ oNPG เท่ากับ 169 and 13.7 mM, ตามลำดับ เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ดีด้วยผลผลิต ได้แก่ กลูโคส และ กาแลค

โตส และสามารถถูกกระตุ้นได้บ้างด้วย อิออนเดี่ยว Na^{+} และ K^{+} ที่ความเข้มข้นในช่วง 1-100 mM และ อิออนคู่ Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ย่อยแลคโตสในนมที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่ไม่เหมาะกับการนำมาสังเคราะห์ กอซ เพราะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเอนไซม์แรกมาก คือใช้สังเคราะห์ได้ กอซ ในปริมาณสูงสุดเพียง ร้อยละ ๑๒ ของปริมาณน้ำตาลรวม เมื่อใช้แลคโตสตั้งต้นในความเข้มข้น ๒๐๐ กรัมต่อลิตร ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ นมแลคโตสต่ำ ต่อไป

ทั้งนี้ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ทั้ง ๒ นี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ที่มีการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ และมีค่าดัชนีผลกระทบ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

We succeed in the development of two β-galactosidases for the production of two value-added products, i.e., 1) production of galacto-oligosaccharides (GOS), which has prebiotic acitivity and 2) production of low-lactose milk, which will allow lactase deficient consumers, which comprise one-third of world population and less than 10% in Thailand, to be able to drink milk with no side effects. The two enzymes that have been developed in this research project can be further applied for industrial applications in the future

The first enzyme is a novel heterodimeric β-galactosidase with a molecular mass of 105 kDa, which was purified from crude cell extracts of the soil isolate *Lactobacillus pentosus* KUB-ST10-1 using ammonium sulphate fractionation followed by hydrophobic interaction and affinity chromatography. The electrophoretically homogenous enzyme has a specific activity of 97 U*o*NPG/mg protein. The Km, kcat and kcat/Km values for lactose and *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) were 38 mM, 20 s–1, 530 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$ and 1.67 mM, 540 s^{-1}, 325 000 $M^{-1}{\cdot}s^{-1}$, respectively. The temperature optimum of β-galactosidase activity was 60–65°C for a 10-min assay, which is considerably higher than the values reported for other lactobacillal β-galactosidases. Mg2+ ions enhanced both activity and stability significantly. *L. pentosus* β-galactosidase was used for the production of prebiotic galactooligosaccharides (GOS) from lactose. A maximum yield of 31% GOS of total sugars was obtained at 78% lactose conversion. The enzyme showed a strong preference for the formation of β-(1⟶3) and β -(1⟶6) linkages, and the main transgalactosylation products identified were the disaccharides β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Glc, β -D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Gal, β -D-Gal*p*-(1⟶3)-DGal, and the trisaccharides β -D-Gal*p*-(1⟶3)-D-Lac, β-D-Gal*p*-(1⟶6)-D-Lac. This enzyme is suitable for the production of GOS in industrial scale in the future.

For the second enzyme, the gene encoding homodimeric β-galactosidase (lacA) from Bacillus licheniformis DSM 13 was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, and the resulting recombinant enzyme was characterized in detail. The optimum temperature and pH of the enzyme, for both o-nitrophenyl-β-D-galactoside (oNPG) and lactose hydrolysis, were 50°C and 6.5, respectively. The recombinant enzyme is stable in the range of pH 5 to 9 at 37°C and over a wide range of temperatures (4–42°C) at pH 6.5 for up to 1 month. The Km

values of LacA for lactose and oNPG are 169 and 13.7 mM, respectively, and it is strongly inhibited by the hydrolysis products, i.e., glucose and galactose. The monovalent ions Na^+ and K^+ in the concentration range of 1–100 mM as well as the divalent metal cations Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Ca^{2+} at a concentration of 1 mM slightly activate enzyme activity. This enzyme can be beneficial for application in lactose hydrolysis especially at elevated temperatures due to its pronounced temperature stability; however, the transgalactosylation potential of this enzyme for the production of galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose was low, with only 12% GOS (w/w) of total sugars obtained when the initial lactose concentration was 200 g/L. This enzyme is suitable for the production of low-lactose milk and milk products in industrial scale in the future.

The information about these two enzymes has already been published in international publications with peer-review and impacfactors.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ **3**

บทคัดย่อภาษาไทย **4**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **6**

สารบัญ **8**

บทที่ ๑ : บทนำ **10**

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 10

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 12

ขอบเขตของการวิจัย 13

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 13

บรรณานุกรม 14

บทที่ ๒: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง **15**

นมและผลิตภัณฑ์จากนม กับภาวะการทนรับน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ (Lactose Intolerance) 15

พรีไบโอติก (Prebiotics) 16

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics) 18

ลักษณะของเชื้อ *Lactobacilli* 19

ลักษณะของเชื้อ *Bifidobacteria* 19

สรุปกลไกการทำหลักของ โพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายคือ [13, 14] 19

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS) 20

เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส 20

บรรณานุกรม 22

บทที่ ๓ : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย **24**

ผลงานเรื่องที่ ๑ 24

ผลงานเรื่องที่ ๒ 35

บทที่ 4 : บทสรุป **46**

สรุปผลการวิจัย 46

ข้อวิจารณ์ และเสนอแนะ 47

ภาคผนวก **48**

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน 48

๑. ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ 48

๒. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 48

๓. ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ 48

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร 49

ประวัติผู้วิจัย **50**

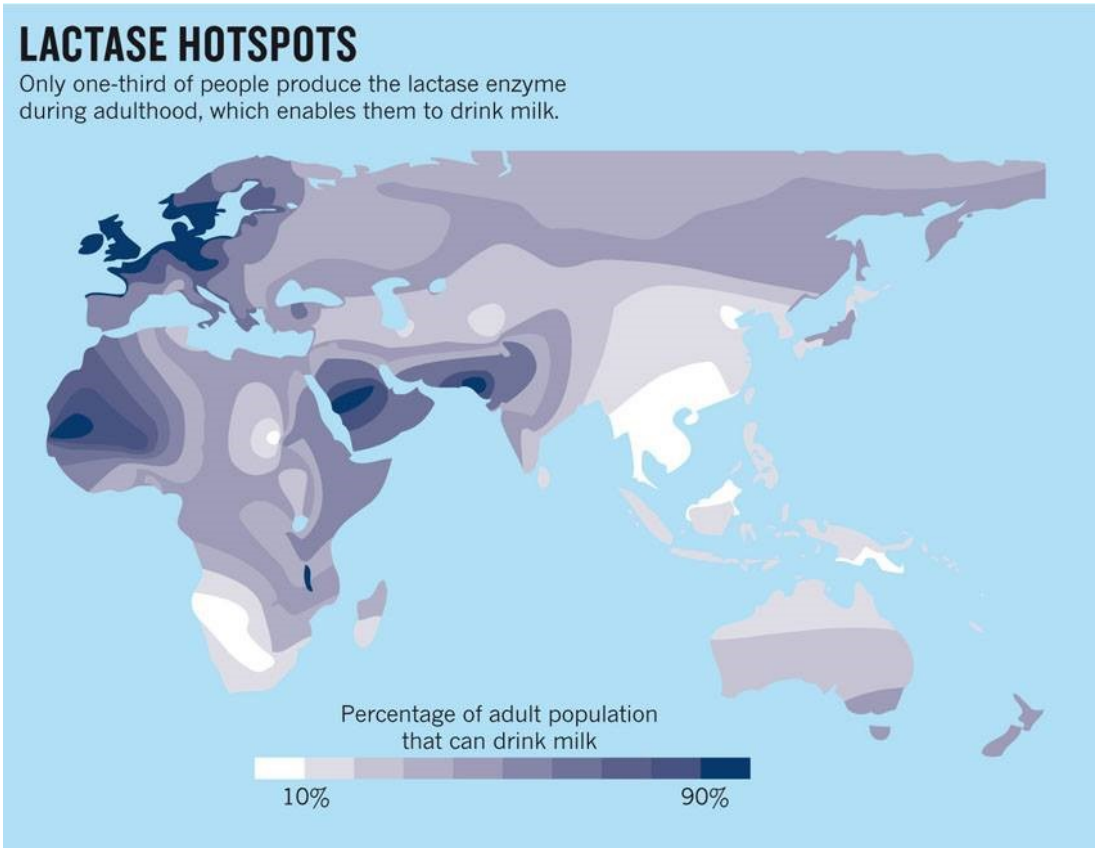
บทที่ ๑ : บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะที่ได้จากโคนม มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค และสภาวะเศรษฐกิจของประเทศ เพราะโคนมถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจของชาติ ดังนั้นจึงได้มีการกำหนดให้การส่งเสริมการเลี้ยงโคนมและการบริโภคนม รวมทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมให้เป็นวาระที่สำคัญอันหนึ่งของชาติ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชีย มีปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งเกี่ยวกับการบริโภคผลิตภัณฑ์จากนม คือภาวะที่ร่างกายไม่สามารถทนรับน้ำตาลแลคโตสในนมได้ (Lactose intolerance) [1, 2] ซึ่งสภาวะนี้เกิดขึ้นจากการที่ร่างกายขาดเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-galactosidase) หรือ แลคเตส (lactase) จึงไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมได้ โดยข้อมูลล่าสุดพบว่ามีประชากรในโลกเพียง ๑ ใน ๓ ที่มีเอนไซม์ แลคเตส สำหรับย่อยนม และในประเทศไทยมีประชากรที่ดื่มนมได้จริงน้อยกว่าร้อยละ ๑๐ ดังแสดงในแผนภาพด้านล่าง [3] เป็นผลให้จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ในการสร้างกรดและแก๊ส มีการดึงน้ำเข้ามาในลำไส้รวมทั้งมีการเคลื่อนตัวของลำไส้เร็วขึ้น จึงเกิดอาการท้องเดิน ส่วนแก๊สที่เกิดขึ้นทำให้มีอาการแน่นท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ ปวดท้อง เสียดท้อง และมีลมในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งยังทำให้ไม่สามารถนำสารอาหารต่างๆ ไปใช้ประโยชน์ได้ จากการศึกษาพบว่าประชากรในกลุ่มประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เกือบ 100 % [2] อยู่ในสภาวะที่ทนรับน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ ส่วนประชากรไทยนั้นมีการประเมินว่ามีถึง 98 % [4] ที่อยู่ในสภาวะนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่ามีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาผลิตภัณฑ์นมให้มีน้ำตาลแลคโตสลดลงโดยใช้เทคโนโลยีนี้พัฒนาขึ้นในประเทศ เพื่อให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่ของประเทศดื่มและใช้ประโยชน์จากสารอาหารในนมได้

นอกจากปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพของผู้บริโภคแล้ว ความสำคัญอีกประการหนึ่งของโครงการวิจัยนี้ คือการพยายามส่งเสริมอุตสาหกรรมโคนมในประเทศ จากสถิติการผลิตโคนมในปีพ.ศ. 2547 ประเทศไทยมีโคนมถึง 444,510 ตัว สามารถให้น้ำนมได้ถึง 842,611 ตัน ทั้งยังมีผลิตภัณฑ์นมประเภทต่างๆ ที่ส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศทั่วโลก เป็นรายได้หลายพันล้านบาทเข้าสู่ประเทศ ข้อมูลของกรมศุลกากรในปี 2546 ได้รายงานว่าการส่งผลิตภัณฑ์นมออกจำหน่ายยังต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่าถึง 3,591,698,367 บาท [www.oae.go.th] จึงนับได้ว่านมเป็นผลผลิตที่สำคัญของชาติ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประเทศไทยได้เซ็นสัญญาเปิดเขตการค้าเสรี (free trade) กับหลายประเทศรวมทั้งประเทศ ออสเตรเรีย [http://e-fpo.fpo.go.th/e-inter/australia.asp] ซึ่งจะเป็นคู่แข่งทางการค้าที่สำคัญทั้งตลาดผลิตภัณฑ์นมภายในและต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเร่งพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับนมที่ผลิตขึ้นได้ในประเทศ เพื่อการพึ่งตนเองและความมีเสถียรภาพของอุตสาหกรรมนมไทยต่อไป โดยในโครงการวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางการแปรรูปแลคโตสในนม เพื่อสร้างเป็นอาหารเสริมประเภทพรีไบโอติก ชนิดกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide, GOS) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าสูง แต่ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการผลิตที่มีประสิทธิภาพดี อีกทั้งผู้ที่ทำการศึกษาวิจัยในด้านนี้ยังมีอยู่น้อยมากโดยเฉพาะในประเทศไทย

จากการที่ผู้วิจัยได้เห็นประโยชน์ของการดื่มนมต่อสุขภาพ เพราะนมเป็นแหล่งของโปรตีนและแคลเซียม ซึ่งมีความสำคัญในการเจริญเติบโต รวมทั้งยังช่วยป้องกันโรคกระดูกผุโดยเฉพาะในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน รวมทั้งยังได้เล็งเห็นความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น เพื่อช่วยส่งเสริมกิจการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย โครงการวิจัยนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อพยายามประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านเอนไซม์ (enzyme biotechnology) ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยมีความชำนาญและประสบการณ์อยู่แล้ว เพื่อช่วยแก้ปัญหาทั้งสองดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-galactosidase) หรือแลคเตส (lactase) นั้น มีความสามารถในการทำปฏิกริยาได้ 2 ประเภท คือ ทั้งการย่อยสลาย (hydrolysis) น้ำตาลแลคโตสให้เป็นน้ำตาลเดี่ยว 2 โมเลกุล คือ กลูโคสกับกาแลคโตส และปฏิกิริยาการส่งผ่าน (transglycosylation) เพื่อสร้างเป็น GOS ซึ่งเป็นสายใยของน้ำตาลโมเลกุลสั้น และมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก [5, 6] ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการพัฒนาและประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้กับนมและผลิตภัณฑ์นม เพื่อลดปริมาณน้ำตาลแลคโตสลง รวมถึงการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์ไปใช้ในการผลิต GOS ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าความรู้และเทคโนโลยีที่จะเกิดขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะยังให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคส่วนใหญ่ของประเทศแล้ว ยังอาจช่วยส่งเสริมการพัฒนากิจการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย ด้วยเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นในประเทศ ส่งเสริมการพัฒนาประเทศให้ยั่งยืนตามหลักเศรษฐกิจพอเพียงได้ต่อไป



ภาพแสดงการกระจายตัวของประชากรที่สามารถดื่มนมได้ ในภาพจะเห็นว่าในประเทศไทยมีประชากรน้อยกว่า ร้อยละ ๑๐ (ที่มา Curry, A. Archaeology: The milk revolution. Nature 500, 20-22, doi:10.1038/500020a, 2013).

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการนำเอนไซม์ beta-galactosidase จากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillus หรือจุลินทรีย์อื่นที่เหมาะสม มาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์ คือ การผลิตเป็นนมที่มีแลคโตสต่ำ และการสังเคราะห์เป็นพรีไบโอติก Galacto-oligosaccharide (GOS) โดยใช้น้ำตาลแลคโตสที่อยู่ในนมเป็นสารตั้งต้น เพื่อส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค และสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ โดยแบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

๑. เพื่อทำการคัดหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม แล้วทำการสกัดแยกยีน (clone) ที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ beta-galactosidase เพื่อนำไปศึกษาลำดับเบสและแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
๒. เพื่อพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ beta-galactosidase ในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม
๓. เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ beta-galactosidase ที่ได้พัฒนาขึ้นมา เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมนมทั้ง 2 ด้าน คือ ด้านการย่อยสลาย (hydrolysis) น้ำตาลแลคโตส และด้านการสร้างเป็น GOS ด้วยปฏิกิริยาการส่งผ่าน (transglycosylation)

ขอบเขตของการวิจัย

เริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ beta-galactosidase ได้ดี เพื่อทำการสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ จากนั้นนำไปโคลนไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสมเพื่อทำการผลิตให้ได้เป็นจำนวนมากในแบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตให้ได้เป็นจำนวนมาก จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นแล้วไปประเมินความเหมาะสมในการใช้ในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในนม และการสร้างเป็น GOS องค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากนมที่มีมูลค่าเพิ่มในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เทคโนโลยีเอนไซม์ เป็นเทคโนโลยีสะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม [7] จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปสู่การพัฒนาที่ยั่งยืนทั้งด้านเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ ดังนั้นจึงควรนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลักที่สำคัญต่างๆของประเทศให้มากที่สุด เอนไซม์ beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) มีศักยภาพสูงอย่างยิ่งในการที่จะนำมาพัฒนา เพื่อประยุกต์ใช้ในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลิตภัณฑ์นมเพราะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ ๒ ประการ คือ ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในนม ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ lactose intolerance และยังสามารถเกิดปฏิกริยา transglycosylation [5, 6] ทำให้สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสจากนมเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ galacto-oligosaccharide (GOS) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก [8] ได้ คุณสมบัติทั้ง ๒ ประการนี้จะช่วยสร้างผลิตภัณฑ์นมชนิดใหม่ที่มีคุณค่า และมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นมากอย่างน้อย ๒ ชนิด ผลิตภัณฑ์แรก คือ นมไร้แลคโตส หรือนมแลคโตสต่ำ ที่คนส่วนใหญ่ทุกเพศทุกวัยสามารถดื่มได้โดยไม่เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ แต่จะได้สารอาหารอย่างครบถ้วน โดยเฉพาะโปรตีน แคลเซียม และวิตามินอีกหลายชนิด ผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่มีมูลค่าสูงมากเช่นกัน คือ GOS ซึ่งประโยชน์ของ GOS ในการเป็นอาหารเสริมประเภทพรีไบโอติกนั้น กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในประเทศต่างๆ ทั่วโลก [9] โดยเฉพาะในกลุ่มที่พัฒนาแล้ว ว่ามีคุณสมบัติในการเสริมสร้างสุขภาพของผู้บริโภคได้อย่างแท้จริง เพราะสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งเป็นมิตรและมีคุณประโยชน์ต่อร่างกายได้ นอกจากนั้นแล้วยังอาจนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการทำมาก่อน คือ ผลิตภัณฑ์นมที่มีแลคโตสต่ำ แต่มี GOS สูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์สองต่อกับผู้บริโภคในประเทศไทยและแถบเอเชีย เพราะนอกจากจะไม่เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากนมแล้ว ยังได้ประโยชน์ในการกระตุ้นโพรไบโอติกจาก GOS ด้วย การพยายามสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่จากวัตถุดิบในประเทศด้วยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ดังที่ได้เสนอมาในโครงการวิจัยนี้ จึงน่าจะนำไปสู่ความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของคนในชาติและเพื่อการพึ่งตนเองได้ทางเทคโนโลยีและเศรษฐกิจ โดยเฉพาะในส่วนของการพัฒนากิจการโคนมและอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากนมของประเทศ ตามปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียงต่อไป

บรรณานุกรม

1. Campbell, A., Waud, J., and Matthews, S. (2005). The molecular basis of lactose intolerance. Sci Prog *88*, 157-202.
2. Heyman, M.B. (2006). Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. Pediatrics *118*, 1279-1286.
3. Curry, A. (2013). Archaeology: The milk revolution. Nature *500*, 20-22.
4. Densupsoontorn, N., Jirapinyo, P., Thamonsiri, N., Chantaratin, S., and Wongarn, R. (2004). Lactose intolerance in Thai adults. J Med Assoc Thai *87*, 1501-1505.
5. Nakayama, T., and Amachi, T. (1999). β-galactosidase, enzymology. In Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation; Flickinger, M.C., Drew, S.W., Eds;, Volume 3. (New York: John Wiley and Sons), pp. 1291-1305.
6. Pivarnik, L.F., Senegal, A.G., and Rand, A.G. (1995). Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β-galactosidase (lactase) in food processing. In Advances in Food and Nutrition Research (Kinsella, J. E. and Taylor, S. L.). (Academic Press), pp. 1-101.

บทที่ ๒: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

นมและผลิตภัณฑ์จากนม กับภาวะการทนรับน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ (Lactose Intolerance)

น้ำนมวัวเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ หลายชนิดที่จำเป็นต่อร่างกาย สารอาหารที่สำคัญในนม คือ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ แร่ธาตุในน้ำนมที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียมและฟอสฟอรัส ซึ่งมีมากในนมและมีความจำเป็นในการเสริมสร้างกระดูกและฟัน ส่วนวิตามินประกอบด้วย วิตามินเอ บี1 บี2 ซี และดี โดยธรรมชาตินำ้นมวัวหนึ่งถ้วยตวง (ประมาณ 250 กรัม) จะมีโปรตีน 8 กรัม ไขมัน 8 กรัม แลคโตส 10 กรัม แคลเซียม 280 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 245 มิลลิกรัม วิตามินเอ 336 I.U. (international unit) วิตามินบี1 84 มิลลิกรัม วิตามินบี2 360 มิลลิกรัม และไนอาซีน 240 มิลลิกรัม [www.tistr.or.th] เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการที่ครบถ้วน จึงนับได้ว่านำ้นมเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญสำหรับร่างกาย ดังนั้นจึงได้มีการส่งเสริมให้ประชากรโดยเฉพาะในวัยเด็กดื่มนม เพื่อการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ ส่วนในผู้ใหญ่โดยเฉพาะในหญิงที่ตั้งครรภ์และให้นมบุตร รวมทั้งในวัยหมดระดูก็มีการส่งเสริมให้ดื่มนม เพราะนมเป็นแหล่งที่สำคัญของแคลเซียม จึงสามารถช่วยป้องกันโรคกระดูกผุได้ อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญของประชากรไทยในการบริโภคนม คือประชากรส่วนใหญ่มักจะแพ้นำ้ตาลแลคโตสที่อยู่ในนม ทำให้ไม่สามารถดื่ม และใช้ประโยชน์จากนมได้เต็มที่ การแพ้นำ้ตาลแลคโตส หรือ ภาวะที่ร่างกายทนรับนำ้ตาลแลคโตสไม่ได้ (Lactose Intolerance) เป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยนำ้ตาลแลคโตสในนมได้ จึงทำให้จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารนำนำ้ตาลแลคโตสไปใช้ในการสร้างกรดและแก๊ส มีการดึงนำ้เข้ามาในลำไส้และมีการเคลื่อนตัวของลำไส้เร็วขึ้น จึงเกิดอาการท้องเดิน ส่วนแก๊สที่เกิดขึ้นทำให้มีอาการแน่นท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ ปวดท้อง เสียดท้อง และมีลมในระบบทางเดินอาหาร [11] จึงทำให้ผู้ที่มีอาการเหล่านี้ต้องหลีกเลี่ยงการดื่มนม นำ้ตาลแลคโตสเป็นนำ้ตาลที่มีเฉพาะในนมสัตว์เท่านั้น อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่านำ้ตาลนม (milk sugar) นำ้ตาลแลคโตสถูกย่อยด้วยเอนไซม์แลคเตส (lactase) หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-galactosidase) ในลำไส้เล็กได้เป็นนำ้ตาลเดี่ยว 2 โมเลกุล คือ กลูโคสกับกาแลคโตส เอนไซม์นี้มีมากในทารกและค่อยๆ ลดลงเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ คนเอเชียรวมทั้งคนไทยและคนอัฟริกาโดยกรรมพันธุ์จะขาดเอนไซม์ชนิดนี้ในเด็กโตและผู้ใหญ่ ทำให้มีปัญหาเกิดอาการแพ้นำ้ตาลแลคโตสได้ [1] สาเหตุของการแพ้เกิดจากร่างกายไม่มีเอนไซม์มาย่อยนำ้ตาลโตสได้ ไม่ใช่แพ้โปรตีน การแพ้นำ้ตาลแลคโตสจึงไม่ใช่เป็นปฏิกิริยาภูมิแพ้ จะไม่พบอาการทางผิวหนัง หอบ หรือรุนแรงถึงกับหมดสติ โดยพบว่าสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้ จะต่ำที่สุดในกลุ่มประเทศสแกนดิเนเวียและยุโรปทางด้านตะวันตกเฉียงเหนือ ซึ่งพบเพียง 3-8 % ส่วนในยุโรปทางตอนใต้และทางตะวันออกมีอัตราการเพิ่มขึ้นมากถึง 70% ส่วนในประเทศในแถบอัฟริกาและเอเชียโดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อัตราการแพ้นำ้ตาลแลคโตสจะสูงมากถึงเกือบ 100 % ในอเมริกาพบในคนผิวขาว 15 % คนอเมริกันเม็กซิกัน 53 % และในคนผิวดำพบถึง 80 % ส่วนในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์พบ 6 และ 9 % ตามลำดับ [2, 11] ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าประชากรผู้ใหญ่ทั่วโลกจะมีปัญหาภาวะ

ที่ไม่ทนต่อแลคโตส ส่วนในประเทศไทยมีรายงานว่ามีประชากรไทยถึง 98 % ที่อยู่ในภาวะนี้ [www.medassocthai.org]

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยน้ำตาลแลคโตสในคนไทยในอดีต 30 ปีที่ผ่านมา พบว่า เอนไซม์แลคเตสไม่สามารถสร้างเพิ่มขึ้นได้แม้จะให้ดื่มนมต่อเนื่อง การย่อยน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ในคนไทยในขณะนั้นพบว่ามีมากกว่าร้อยละ 96 [www.bangkokhealth.com] ทั้งนี้การศึกษาเรื่องนี้ในอดีตจะให้อาสาสมัครดื่มสารละลายน้ำตาลแลคโตส 2 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม และไม่เกิน 50 กรัม ส่วนใหญ่ในผู้ใหญ่จะให้กินแลคโตส 50 กรัมเท่ากับปริมาณแลคโตสที่มีในนม 1 ลิตร ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่คนเราจะดื่มนมครั้งละ 1 ลิตร ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวัดภาวะการย่อยน้ำตาลแลคโตส โดยการวัดแก๊สไฮโดรเจนในลมหายใจ โดยให้ดื่มนม 1 แก้วซึ่งมีแลคโตสประมาณ 12 กรัมเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนั้นพบว่า เมื่อให้เด็กวัยรุ่นและผู้ใหญ่ไทยดื่มนม 1 แก้ว มีผู้ที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ในอัตราต่างๆ กันตั้งแต่ 40 - 88% และมีผู้ที่มีอาการไม่สบายท้องหรือที่เรียกว่า แพ้น้ำตาลแลคโตสในระดับต่างๆ กันตั้งแต่ 30 – 66 % ส่วนเด็กเล็กไม่พบอาการดังกล่าว [9] ซึ่งถ้าความสามารถในการย่อยน้ำตาลแลคโตสของร่างกายสูญเสียไป เพราะร่างกายไม่สามารถสร้างเอนไซม์beta-galactosidaseได้แล้ว ร่างกายก็จะไม่สามารถนำสารอาหารต่างๆ ที่มีประโยชน์จากน้ำนมไปใช้ได้ และนอกจากนี้ยังส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียมในร่างกายลดลงอีกด้วย การนำเอนไซม์ beta-galactosidase ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมนม จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้ผู้ที่แพ้น้ำนม (แพ้น้ำตาลนม) หรือมีภาวะที่ทนรับแลคโตสไม่ได้ (lactose intolerance) สามารถดื่มนมได้ และจะส่งผลให้ร่างกายได้รับสารอาหารต่างๆ ที่มีประโยชน์จากน้ำนมเพิ่มขึ้นด้วยโดยเฉพาะโปรตีนและแคลซียม จากปัจจุบันสถิติการดื่มนมของประชากรไทยอยู่ที่ 12 ลิตร/คน/ปี ซึ่งถือว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณการดื่มนมในต่างประเทศ เช่น สหรัฐ 120 ลิตร/คน/ปี สหภาพยุโรป 70 ลิตร/คน/ปี มาเลเซีย 50 ลิตร/คน/ปี [www.dmh.go.th] ทั้งที่การผลิตน้ำนมวัวในประเทศไทยมีแนวโน้มในการผลิตเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้ประชากรภายในประเทศสามารถบริโภค และใช้ประโยชน์จากน้ำนมวัวเพิ่มมากขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงได้เห็นแนวทางในการแก้ปัญหา การบริโภคน้ำนมวัวไม่ได้ของประชากรผู้ใหญ่ในประเทศ โดยศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ beta-galactosidase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายแลคโตสในนม เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นมที่ปราศจากแลคโตส หรือนมแลคโตสต่ำ ที่คนส่วนใหญ่ทุกเพศทุกวัยสามารถดื่มได้โดยไม่เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ แต่จะได้สารอาหารอย่างครบถ้วน โดยเฉพาะ โปรตีน แคลเซียม และวิตามินอีกหลายชนิด

พรีไบโอติก (Prebiotics)

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วว่า นอกจากความต้องการแก้ปัญหาภาวะทนรับแลคโตสในนมไม่ได้ของประชากรส่วนใหญ่แล้ว ผู้วิจัยยังได้เล็งเห็นความจำเป็นที่จะต้องเร่งพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับนมที่ผลิตขึ้นได้ในประเทศเพื่อการพึ่งตนเองและความมีเสถียรภาพของอุตสาหกรรมนมไทย จึงได้เสนอแนวทางการแปรรูปแลคโตสในนมให้เป็นสาร galacto-oligosaccharide, GOS โดยอาศัยความสามารถในการทำ

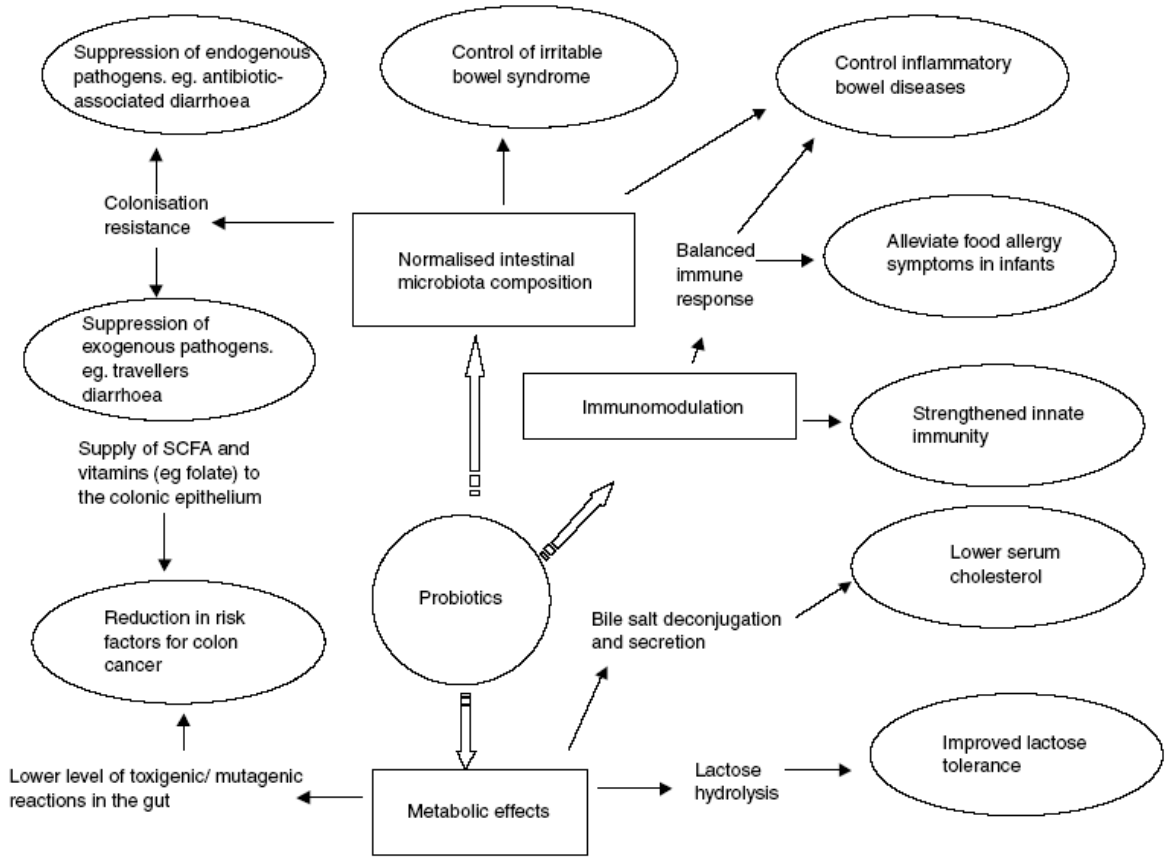
ปฏิกิริยา transglycosylation ของเอนไซม์ beta-galactosidase สาร GOS นั้นมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งมีคุณประโยชน์และช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคกล่าวคือ

พรีไบโอติก (Prebiotics) หมายถึง สารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรียที่เป็นมิตรและมีคุณประโยชน์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ [8] หรือจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics, จะได้อธิบายโดยละเอียดในหัวข้อต่อไป) โดยสามารถไปช่วยกระตุ้นการเจริญและช่วยในกิจกรรมต่างๆ ซึ่งอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ หรือสายใยน้ำตาล ตัวอย่างของสารที่มีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides, FOS) อินูลิน (inulin) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides, GOS) แลคทูโลส (lactulose) แลคทูซูโครส (lactosucrose) และซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (soybean oligosaccharides) เป็นต้น

สรุปกลไกหลักของการทำงานของโอลิโกแซคคาไรด์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และส่งเสริมสุขภาพของคนและสัตว์ คือ [8]

1. เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ ให้กับเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นมิตรต่อร่างกาย (จุลินทรีย์ probiotics) โดยเฉพาะในกลุ่ม Bifidobacteria ส่วนแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแก่ร่างกายไม่สามารถนำสายใยน้ำตาลไปใช้ได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้โอลิโกแซคคาไรด์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งมีอยู่แล้วภายในคนและสัตว์ จึงสามารถทดแทนการใส่แบคทีเรียจากภายนอกลงไปได้ จากการศึกษา พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิด มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่มีความสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลชีพจำพวก Bifidobacteria (bactidogenic factor) นอกจากนั้นแล้วยังมีการรายงานว่า โอลิโกแซคคาไรด์ FOS สามารถช่วยเพิ่มจำนวนประชากร Bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ของคนได้ด้วย
2. โอลิโกแซคคาไรด์บางประเภท สามารถกระตุ้นแบคทีเรียเป็นมิตรหลายชนิดในร่างกายให้ผลิตเอ็นไซม์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ช่วยย่อยอาหารต่างๆ ในร่างกายสัตว์ให้ได้เป็นสารอาหารที่สามารถดูดซึมเข้าไปใช้ในร่างกายได้
3. โอลิโกแซคคาไรด์หลายประเภท สามารถจับกับ receptor บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถเข้าไปทำร้ายร่างกายได้ โดยได้มีกรณีตัวอย่างการใช้ manno oligosaccharides, MOS ในการลดการติดเชื้อ Salmonella ในลูกไก่มาแล้ว
4. นอกจากโอลิโกแซคคาไรด์จะสามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแล้ว ยังมีข้อสันนิษฐานว่าโอลิโกแซคคาไรด์บางประเภท จะสามารถจับกับผนังเยื่อบุเซลล์ในลำไส้ของคนและสัตว์ได้ ซึ่งในบางกรณีการจับกับเยื่อบุเซลล์ในส่วนที่มีหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกัน จะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีออกมาเพื่อช่วยสร้างภูมิต้านทานให้กับคนและสัตว์ได้ โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการรายงานว่าเมื่อนำสายใยน้ำตาล Lactulose ไปป้อนให้กับแม่สุกร พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกสุกรได้ โดยคาดว่าเป็นเพราะ Lactulose ไปช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่แม่สุกร ซึ่งสามารถส่งต่อไปยังลูกได้

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าคุณประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อสุขภาพมีมากมาย และส่วนใหญ่จะคล้ายกับของโพรไบโอติกคือ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรค เช่น โรคท้องร่วง อาหารเป็นพิษ ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมภายในลำไส้ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโพรไบโอติก กลไกการช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคด้านต่างๆ ของพรีไบโอติกสรุปได้ดังรูปที่ 1 [12] ดังนั้นจึงสามารถนำโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ มาใช้เป็นอาหารเสริมให้กับทั้งมนุษย์และสัตว์ได้ และเนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้เป็นสารจากธรรมชาติ จึงไม่ทำให้เกิดอาการแพ้หรือสะสม และเป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนั้นแล้วโอลิโกแซคคาไรด์ยังทนต่อความร้อนและภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี ทำให้สะดวกต่อการจัดเก็บและขนส่ง ซึ่งวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตเป็นโอลิโกแซคคาไรด์นั้นควรหาได้ง่ายและราคาถูก โดยในโครงการวิจัยนี้วัตถุดิบที่จะใช้คือ น้ำตาลแลคโตสจากนม โดยจะอาศัยปฏิกริยา transglycosylation ของเอนไซม์ beta-galactosidase เพื่อสร้างเป็น galacto-oligosachharide, GOS ดังที่จะได้อธิบายต่อไป



รูปที่ 1 สรุปกลไกต่างๆ ในการเป็นสารช่วยเสริมสุขภาพของพรีไบโอติก [12]

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics)

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics) เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของคนและสัตว์ พบเป็นจำนวนมากในลำไส้ใหญ่ และพบได้บ้างในลำไส้เล็กและกระเพาะอาหาร แบ่งแบคทีเรียนี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม Lactobacilli และกลุ่ม Bifidobacteria [13, 14]

ลักษณะของเชื้อ Lactobacilli

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ พบอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ เจริญได้ในสภาวะกรด Lactobacilli เจริญได้ที่ pH 4.0-4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส

ลักษณะของเชื้อ Bifidobacteria

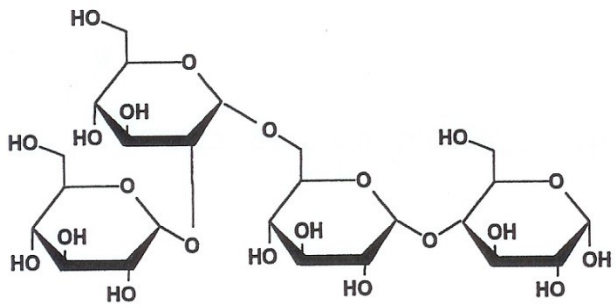
Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนคล้ายตัว Y ไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง และไม่ผลิตก๊าซ เชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติก โดยผ่าน phosphoketolase pathway Bifidobacteria พบได้ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ สามารถผลิตวิตามินบีได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37-41 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5-7.0 เนื่องจากสามารถผลิตกรดอะซิติกและกรดแลคติกได้ จึงทำให้เพิ่มความเป็นกรดในลำไส้

สรุปกลไกการทำหลักของ โพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายคือ [13, 14]

1. ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเพราะ Bifidobacteria จะผลิตสารปฏิชีวนะและกรดออกมาช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและควบคุมจำนวนของจุลินทรีย์ธรรมชาติ (normal flora) อื่นๆ กรดที่พบส่วนใหญ่เป็นกรดอะซิติกและกรดแลคติก ซึ่งกรดเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Clostridium perfringens, Salmonella spp. และ E. coli ในลำไส้
2. ช่วยลดอาการท้องผูก กรดที่ผลิตโดย Bifidobacteria จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก
3. ช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด โดย Lactobacillus acidophilus ซึ่งเป็น normal flora อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคลอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคลอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้
4. ช่วยลดความดันโลหิต โดยพบว่า ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง เมื่อบริโภค fructooligosaccharide เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 mmHg และยังพบว่า ความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ Bifidobacteria ในลำไส้อีกด้วย
5. ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด พบว่า Bifidobacteria สามารถผลิตวิตามิน B1, B2, B6, B12, nicotinic acid และ folic acid นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในระบบย่อยอาหารอีกด้วย
6. ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ในระบบทางเดินอาหารบางชนิด ที่สามารถสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ เป็นผลให้ปริมาณสารพิษที่เข้าสู่ตับลดลงด้วย

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS)

เอนไซม์ beta-galactosidase สามารถนำไปใช้ในการสร้างกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลจากนม โครงสร้างทางเคมีของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังแสดงในรูปที่ 2



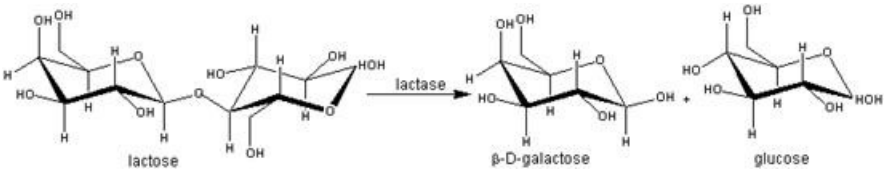
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

Galacto-oligosachharide (GOS) เป็นสายใยของน้ำตาลที่มีความยาวตั้งแต่ 2 – 5 หน่วย โดยมีน้ำตาลหน่วยย่อย 2 ชนิดหลักคือ galactose และ glucose เชื่อมต่อกันอยู่ด้วยพันธะ glycosidic ชนิดต่างๆ [4] GOS สามารถถูกสังเคราะห์ได้ด้วยการใช้ปฏิกริยาทางเคมี [15] แต่วิธีการนี้ไม่เหมาะสำหรับการผลิตเป็นจำนวนมากเพื่อการบริโภค พบว่าวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต GOS ในระดับอุตสาหกรรมคือการใช้เอนไซม์ beta-galactosidase [4, 5] ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการสังเคราะห์ GOS จาก lactose จาก รายงานต่างๆ เกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ beta-galactosidase จากแหล่งต่างๆ ทั้งยีสต์ ไวรัส และแบคทีเรีย ในการสังเคราะห์ GOS แสดงว่า โครงสร้างและอัตราส่วนของ GOS ที่ถูกผลิตขึ้นนั้นจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับเอนไซม์ที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกริยา [16] โดยในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะใช้เอนไซม์ beta-galactosidase จากเชื้อ Lactobacillus ในการเปลี่ยน lactose ที่ได้จากนมวัวให้เป็น GOS ซึ่งคาดว่าผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่กระบวนการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ GOS ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมพรีไบโอติกได้ต่อไป ดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าประโยชน์ของ GOS ที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในประเทศต่างๆ ทั่วโลก คือ การเป็นอาหารเสริมประเภทพรีไบโอติก [8] เนื่องจาก GOS มีคุณสมบัติเป็น bifidus grown factor เพราะมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ที่เป็นมิตรในทางเดินอาหาร การบริโภค GOS จึงนำไปสู่ประโยชน์อื่นๆ ที่ร่างกายจะได้รับ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

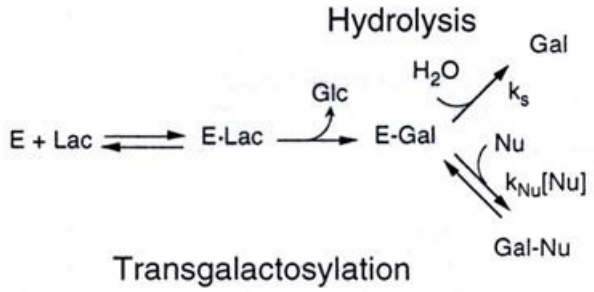
เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส

เอนไซม์ beta-galactosidase หรือ lactase มีชื่อเต็มว่า beta-D-galactoside-galactohydrolase (EC 3.2.1.23) เป็นเอนไซม์ที่สามารถ hydrolyze พันธะกาแลคโตซิล (galactosyl) ที่ตำแหน่ง □(1-3) และ □(1-4) (รูปที่ 3) ดังนั้นจึงสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุล คือ

น้ำตาลกาแลคโตสและน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถถูกนำไปใช้ต่อในวิถีเมตาบอลิซึมภายในร่างกายได้ [4] นอกจากสั้นแล้วยังพบอีกว่าเอนไซม์ beta-galactosidase สามารถทำปฏิกิริยา transgalactosylation (รูปที่ 4) เพื่อใช้ในการสร้างสายใยน้ำตาลสั้นๆ คือ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำตาลแลคโตสได้ [4, 5]



รูปที่ 3 ปฏิกริยาการย่อยสลายแลคโตสด้วยเอนไซม์ beta-galactosidase หรือ lactase



รูปที่ 4 ปฏิกริยาการ transglycosylation ด้วยเอนไซม์ beta-galactosidase หรือ lactase เพื่อสร้างเป็น GOS

เอนไซม์ beta-galactosidase นั้นสามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรีย ยีสต์ รา รวมทั้งพืชและสัตว์ การศึกษาเกี่ยวกับ คุณสมบัติ และความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์นี้ยังมีไม่มากนัก แต่ได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้มากในการเป็นตัวรายงาน (reporter) ในการศึกษาวิจัยทางด้านอณูชีววิทยาต่างๆ [17] นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานอีกจำนวนมากในการพยายามนำเอนไซม์นี้จากแหล่งต่างๆ รวมทั้งในบริเวณขั้วโลกที่เย็นจัด [18-21] เพื่อใช้ในการผลิตนมที่ปราศจากน้ำตาลแลคโตส [4, 22] ส่วนการรายงานการใช้เอนไซม์นี้ในปฏิกริยา transglycosylation เพื่อผลิตเป็น GOS นั้น ยังมีไม่มากนัก [5, 16]

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยต้องการที่จะศึกษาเอนไซม์ beta-galatosidase จากแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillus และ Bacillus เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้รับสถานะเป็น GRAS (Generally Recognized As Safe) คือ มีความปลอดภัยในการบริโภค นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมนม ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของเอนไซม์ beta-galactosidase จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาคุณสมบัติให้ครบถ้วนตั้งแต่ในระดับยีน จนถึงการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการสร้างมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์นมทั้ง 2 ประการดังกล่าวข้างต้น ซึ่งในขั้นตอนการ

พัฒนาคุณสมบัติของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้น จะได้ใช้เทคโนโลยีการเร่งวิวัฒนาการซึ่งจะได้กล่าวในลำดับต่อไปร่วมด้วย

บรรณานุกรม

1. Campbell, A.K., Waud, J.P., and Matthews, S.B. (2005). The molecular basis of lactose intolerance. Sci Prog. 88, 157-202.
2. Heyman, M.B. (2006). Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. Pediatrics. 118, 1279-1286.
3. Densupsoontorn, N., Jirapinyo, P., Thamonsiri, N., Chantaratin, S., and Wongarn, R. (2004). Lactose intolerance in Thai adults. J Med Assoc Thai. 87, 1501-1505.
4. Nakayama, T., and Amachi, T. (1999). Beta-Galactosidase: Enzymology. In Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, 3 Edition, M.C. Flickinger and S.W. Drew, eds. (New York: John Wiley and Sons), pp. 1291-1305.
5. Pivarnik, L.F., Senegal, A.G., and Rand, A.G. (1995). Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial beta-galactosidase in food processing. In Advances in Food and Nutrition Research, Volume 38, J.E. Kinsella and S.L. Taylor, eds. (Academic Press), pp. 1-102.
6. Aehle, W. ed. (2004). Enzymes in Industry, 2 Edition (Wiley-VCH).
7. Rastall, R.A., and Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Curr Opin Biotechnol. 13, 490-496.
8. Gibson, G.R., and Rastall, R.A. eds. (2006). Prebiotics: Development and Application (John Wiley & Sons, Ltd).
9. Soontornchai, S., Sirichakwal, P., Puwastien, P., Tontisirin, K., Kruger, D., and Grossklaus, R. (1999). Lactitol tolerance in healthy Thai adults. Eur J Nutr. 38, 218-226.
10. Thong-Ngam, D., Suwangool, P., Prempracha, J., Tangkijvanich, P., Vivatvekin, B., and Sriratanabun, A. (2001). Lactose intolerance and intestinal villi morphology in Thai people. J Med Assoc Thai. 84, 1090-1096.
11. Franz, K.B. (2000). Lactose intolerance: a new perspective. J Am Diet Assoc. 100, 1303.
12. Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., and Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol. 100, 1171-1185.
13. Tannock, G.W. ed. (2002). Probiotics and Prebiotics: Where are We Going (Horizon Scientific Press).

14. Trenev, N. (1998). Probiotics, (Avery).
15. Flowers, H.M. (1978). Chemical synthesis of oligosaccharides. Methods Enzymol. 50, 93-121.
16. Nakkharat, P., Kulbe, K.D., Yamabhai, M., and Haltrich, D. (2006). Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel beta-galactosidase from the moderately thermophilic fungus Talaromyces thermophilus. Biotechnol J. 1, 633-638.
17. Bommarius, A.S., and Riebel, B.R. (2004). Biocatalyst: Fundamentals and Applications, (Weinheim: Wiley-VCH).
18. Makowski, K., Bialkowska, A., Szczesna-Antczak, M., Kalinowska, H., Kur, J., Cieslinski, H., and Turkiewicz, M. (2007). Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic beta-galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. FEMS Microbiol Ecol. 59, 535-542. Epub 2006 Oct 2024.
19. Coker, J.A., and Brenchley, J.E. (2006). Protein engineering of a cold-active beta-galactosidase from Arthrobacter sp. SB to increase lactose hydrolysis reveals new sites affecting low temperature activity. Extremophiles. 10, 515-524. Epub 2006 May 2031.
20. Cieslinski, H., Kur, J., Bialkowska, A., Baran, I., Makowski, K., and Turkiewicz, M. (2005). Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium Pseudoalteromonas sp. 22b. Protein Expr Purif. 39, 27-34.
21. Fernandes, S., Geueke, B., Delgado, O., Coleman, J., and Hatti-Kaul, R. (2002). Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol. 58, 313-321. Epub 2002 Jan 2012.
22. Nguyen, T.H., Splechtna, B., Yamabhai, M., Haltrich, D., and Peterbauer, C. (2007). Cloning and expression of the beta-galactosidase genes from Lactobacillus reuteri in Escherichia coli. J Biotechnol. 129, 581-591. Epub 2007 Feb 2011.
23. Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesutcha, P., Jaruseranee, N., and B, B. (2007). Secretion of recombinant Bacillus hydrolytic enzymes using Escherichia coli expression systems. J Biotechnol. 133, 50-57.

บทที่ ๓ : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และรายงานผลการวิจัย แบ่งเป็นสองส่วน โดยทั้งสองส่วนนำเสนอในรูปแบบผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ ดังนี้

ผลงานเรื่องที่ ๑

เป็นรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ เบต้าแกแลคโตซิเดส จากเชื้อ แลคโตบาซิลัส เพนโตซัส เคยูบี-เอสที ๑๐-๑ ซึ่งผลจากการวิจัยพบว่ามีความเหมาะสมในการใช้สังเคราะห์ กอซ โดยใช้น้ำตาลแลคโตสจากน้ำนมเป็นสารตั้งต้น ผลงานนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ชื่อ Biotechnology Journal ซึ่งมีค่า impact factor 3.446 ชื่อเรื่อง

Maischberger, T. *et al.* Beta-galactosidase from Lactobacillus pentosus: purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnol J* **5**, 838-847, doi:10.1002/biot.201000126 [doi] (2010).
(๑๐ หน้า)

DOI 10.1002/biot.201000126 Biotechnol. J. 2010, 5, 838–847

Research Article

β-Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides

Thomas Maischberger[1,2], Elisabeth Leitner[1], Sunee Nitisinprasert[3], Onladda Juajun[1,4], Montarop Yamabhai[4], Thu-Ha Nguyen[1,2] and Dietmar Haltrich[1]

[1] Food Biotechnology Laboratory, BOKU University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria
[2] Research Centre Applied Biocatalysis, Graz, Austria
[3] Department of Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand
[4] School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

A novel heterodimeric β-galactosidase with a molecular mass of 105 kDa was purified from crude cell extracts of the soil isolate *Lactobacillus pentosus* KUB-ST10-1 using ammonium sulphate fractionation followed by hydrophobic interaction and affinity chromatography. The electrophoretically homogenous enzyme has a specific activity of 97 U_{oNPG}/mg protein. The K_m, k_{cat} and k_{cat}/K_m values for lactose and *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) were 38 mM, 20 s^{-1}, 530 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ and 1.67 mM, 540 s^{-1}, 325 000 $M^{-1}\cdot s^{-1}$, respectively. The temperature optimum of β-galactosidase activity was 60–65°C for a 10-min assay, which is considerably higher than the values reported for other lactobacillal β-galactosidases. Mg^{2+} ions enhanced both activity and stability significantly. *L. pentosus* β-galactosidase was used for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose. A maximum yield of 31% GOS of total sugars was obtained at 78% lactose conversion. The enzyme showed a strong preference for the formation of β-(1→3) and β-(1→6) linkages, and the main transgalactosylation products identified were the disaccharides β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Glc, β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Glc, β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Gal, β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Gal, and the trisaccharides β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Lac, β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Lac.

Received 27 April 2010
Revised 2 July 2010
Accepted 5 July 2010

Keywords: Biocatalysis · Food biotechnology · Lactase · Lactic acid bacteria · Transgalactosylation

1 Introduction

The lactic acid bacterium *Lactobacillus pentosus* is frequently used as starter culture for silage fermentations and various food fermentation processes, including sauerkraut and raw sausage production, or olive and tea leave fermentations, to name a few. Most of *L. pentosus* subspecies are plant isolates, generally recognised as safe (GRAS), and capable of metabolising different pentoses such as ribose, arabinose and xylose [1]. Yet, some subspecies of *L. pentosus* have been isolated, *e.g.* from human faeces [2] or from raw milk [3], that have been proposed as potentially probiotic strains. Fred *et al.* [4] previously described very effective growth of *L. pentosus* on lactose, which could imply high β-galactosidase activity, but this property has not been studied to date.

Lactic acid bacteria (LAB) and β-galactosidases have been studied extensively in the past, both from a fundamental and an applied point of view. β-Galactosidases, *e.g.* from *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis* [5], *Carnobacterium piscicola* [6], *L. acidophilus* [7], *L. bulgaricus* [8], *L. reuteri* [9], and *Leuconostoc lactis* [10], have been cloned and characterised in varying detail. Despite of the importance

Correspondence: Dr. Thu-Ha Nguyen, Lebensmittelbiotechnologie, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria
E-mail: thu-ha.nguyen@boku.ac.at
Fax: +43-1-47654 6251

Abbreviations: **β-Gal**, β-galactosidase; **GOS**, galacto-oligosaccharides; **LAB**, lactic acid bacteria; **MUG**, 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside; ***o*NPG**, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, ***o*NP**, *o*-nitrophenol

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

of LAB and in particular *Lactobacillus* spp. for food technology and dairy applications, and despite of numerous studies on the gene clusters involved in lactose utilisation, only few lactobacillal β-galactosidases have been characterised in detail pertaining to their biochemical properties or investigated for their ability to produce galacto-oligosaccharides (GOS) in biocatalytic processes [11–13]. These carbohydrate-based food ingredients are of interest as novel and possibly improved prebiotics, or for the development of synbiotic functional food that could introduce new dimensions of applications [14].

GOS belong to the prebiotics, which are defined as a "selectively fermented ingredient that allows specific changes, both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microbiota that confers benefits upon host well-being and health" [15]. In practice, the beneficial bacteria that serve as targets for prebiotics and GOS are almost exclusively bifidobacteria and lactobacilli. An advantage of the concept of prebiotics to modify gut function is that the target bacteria are already commensal to the large intestine, whereas with probiotics allochthonous micro-organisms are introduced and have to compete against established colonic communities [16]. GOS have been classified as one of the few proven prebiotics fulfilling the three criteria (i) resistance to gastric acidity, hydrolysis by mammalian enzymes and gastrointestinal absorption; (ii) fermentation by intestinal microflora; and (iii) selective stimulation of the growth and/or activity of intestinal bacteria associated with health and well-being [15]. GOS have been widely investigated for their prebiotic properties and physiological effects using *in vitro*, animal, human, and infant studies, and functional effects of GOS on human health are summarised in [16–18].

GOS are produced from lactose using β-galactosidases (EC 3.2.1.23), which in addition to their hydrolytic activity catalyse glycosyl transfer reactions. In this reaction galactosyl residues are transferred onto suitable acceptors such as another sugar (lactose, the primary reaction products glucose and galactose, or other oligosaccharides formed), thus building up complex series of higher oligosaccharides [19–21]. The spectrum of the oligosaccharides making up these mixtures strongly depends on the source of the β-galactosidase used for the biocatalytic reaction, and on the conversion conditions used in their production. Since these differences in GOS spectrum and yields are a result of structural and/or mechanistic differences between β-galactosidases from different sources, a detailed knowledge on novel, yet-unexplored β-galactosidases from various strains can be of significant interest [20]. Rabiu *et al.* [22] and Tzortzis *et al.* [23] synthesised a range of GOS mixtures from lactose using β-galactosidases from different bifidobacteria. Subsequently it was shown that these different mixtures typically resulted in better growth of that strain that had served as the source of the enzyme for GOS production. This concept may serve as the basis for a new generation of functionally enhanced, targeted oligosaccharides, and has increased the interest in β-galactosidases from beneficial probiotic organisms.

The objective of this work was to study the β-galactosidase from *L. pentosus* in detail and to compare it to other lactobacillal β-galactosidases isolated from organisms of typical animal origin. Recent data indicate that *L. pentosus* might be of interest as a beneficial LAB, making it attractive as a probiotic strain, based on, for example, immunomodulating properties [24] or the reduction of pathogens in animals [25].

2 Materials and methods

2.1 Strain and culture conditions

L. pentosus KUB-ST10-1 was obtained from the culture collection of Kasetsart University (Bangkok, Thailand). It was isolated from soil of a dairy farm in Thailand and identified using both the API 50 CH carbohydrate fermentation stripes test (bioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France) and sequence analysis of the amplified chromosomal 16S rDNA. It was stored at –70°C in MRS broth medium (Merck, Darmstadt, Germany) containing 15% glycerol. To prepare fresh inocula, it was transferred twice after an 18-h cultivation period to fresh MRS broth medium supplemented with lactose (final concentration of 2%).

L. pentosus KUB-ST10-1 was grown anaerobically in 10 L MRS broth medium containing 2% lactose at 37°C with slight agitation and without pH control. A preculture, grown overnight in MRS medium (2% lactose), was used to inoculate the fresh medium to a final concentration of 1% inoculum. Cells were harvested at an optical density (OD_{600}) of 13 by centrifugation at $8800 \times g$ for 15 min at 4°C.

2.2 Enzyme purification

β-Galactosidase was purified from the crude extract using a previously described protocol [9]. Wet biomass (100 g) was resuspended in 200 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5) and homogenized (APV-2000; Silkeborg, Denmark) to disrupt the cells. Cell debris was removed by ultracentrifu-

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

gation (36 000 × *g*, 30 min, 4°C) to obtain the crude enzyme extract.

Ammonium sulphate was added in small portions to the crude extract to a final concentration of 50% saturation under continuous stirring at 4°C. The precipitated protein was collected by centrifugation (6200 × *g*, 15 min, 4°C), and the pellet was re-dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 1 M ammonium sulphate (buffer A).

For hydrophobic interaction chromatography, the dissolved pellet was loaded onto a 20-mL phenyl-Sepharose fast-flow column (50 mm × 200 mm; Amersham, Uppsala, Sweden) that had been pre-equilibrated with buffer A. Proteins were eluted by a linear gradient of 0–100% buffer B (50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5) over ten column volumes (CV) and at a flow rate of 1.5 mL/min. Fractions with high β-galactosidase activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (30-kDa cut-off; Amicon, Beverly, MA).

For affinity chromatography, the concentrated protein solution was applied to a 5-mL column containing cross-linked (4%) beaded agarose immobilized with *p*-aminobenzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (Sigma, St. Louis, MO, USA) that was pre-equilibrated with 50 mM phosphate buffer pH 6.5. The enzyme was eluted using a flow rate of 0.5 mL/min and a linear gradient (0–1 M NaCl in the same buffer) over ten CV. Active fractions were pooled, desalted and concentrated by ultrafiltration. The purified enzyme was stored in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C.

2.3 Enzyme assays

β-Galactosidase activity was determined using both the artificial chromogenic substrate *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) and the natural substrate lactose as described previously [9]. When using *o*NPG as the substrate, the reaction was performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) and using a 10-min incubation at 30°C, after which the reaction was stopped. One unit of *o*NPG activity (U_{oNPG}) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol *o*NP/min under the assay conditions described above. When lactose was used as the substrate, the reaction was done in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) for 10 min at 30°C, after which the reaction was stopped. The release of D-glucose was determined colourimetrically using the glucose oxidase/peroxidase (GOD/POD) assay [26]. One unit of lactase activity (U_{Lac}) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol D-glucose/min under the conditions listed above.

2.4 Protein analysis and gel electrophoresis

Protein concentrations were determined by the method of Bradford [27] using BSA as the standard. The PhastSystem unit (Amersham) and precast polyacrylamide gels (Phastgel 8–25, Amersham) were used for performing native and SDS-PAGE. Samples were treated as described by Laemmli [28] with slight modifications. The enzyme was diluted to 1–2 mg protein/mL and incubated with 2 × Laemmli buffer at 60°C for 5 min. Protein bands were stained using either Coomassie Blue staining or 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside (MUG) as substrate for active staining. For SDS-PAGE and native PAGE, molecular masses were estimated using the Precision Plus Protein Dual Color Kit (Bio-Rad) and the High Molecular Weight calibration Kit (Amersham), respectively.

2.5 Steady-state kinetic measurement

Catalytic constants were determined at 30°C and pH 6.5 for the two substrates *o*NPG and lactose with their concentrations in 50 mM phosphate buffer varying from 0.1–22 mM and 0.1–600 mM, respectively. The kinetic parameters were calculated by non-linear regression, and the obtained data were fit to the Henri-Michaelis-Menten equation (using SigmaPlot, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.6 Effects of temperature and pH on enzyme activity and stability

The temperature dependence of β-galactosidase activity (both *o*NPG and lactose) was determined by assaying the enzyme samples over 20–70°C for 10 min. To study thermal stability, enzyme samples were incubated in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, at 4, 23, 30, 37, and 42°C. At certain time intervals samples were taken and the residual *o*NPG activity was measured. For measuring the pH dependence of β-galactosidase activity three buffer systems (sodium citrate, 50 mM, pH 4.0–5.5; sodium phosphate, 50 mM, pH 5.5–7.5; glycine, 50 mM, pH 7.5–9.0) were used. For determination of the pH stability, enzyme samples were incubated at various pH values and 37°C for up to 72 h, and the remaining enzyme activity was measured at certain time intervals using *o*NPG as substrate under standard assay conditions.

2.7 Substrate specificity

To determine the substrate specificity of the *L. pentosus* β-galactosidase for various structurally related substrates *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranosi-

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

de, *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *o*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside and *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside were used. Activities were determined in accordance to standard *o*NPG assay conditions using the respective substrate in concentrations of 22 mM.

2.8 Transgalactosylation activity

Purified β-galactosidase from *L. pentosus* (5 U_{oNPG}/mL reaction mixture) was used for the discontinuous formation of GOS at 30°C using 205 g/L lactose in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5, 2 mM $MgCl_2$) as substrate. Samples were taken at various intervals and the composition of the GOS mixture was analyzed by capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection as described previously [13].

3 Results

3.1 Formation and purification of β-galactosidase from *L. pentosus*

L. pentosus KUB-ST10-1 was selected for detailed studies on its β-galactosidase since this strain grew very well on lactose, showing high β-gal activity in a screening in which several LAB were compared for their ability to form this enzyme activity (data not shown), and since its β-galactosidase had not been studied in any detail previously. Batch cultivations of *L. pentosus* were carried out in a 10-L laboratory fermenter at 37°C without pH control using lactose-based MRS medium. The biomass was harvested after 18 h of growth when β-gal activity reached a maximum of 644 U_{oNPG}/L fermentation broth. β-Galactosidase was purified to apparent homogeneity from the crude cell extract using a two-step purification protocol based on hydrophobic interaction and affinity chromatography. The enzyme was purified 16-fold to a specific activity of 97 U/mg protein, using standard assay conditions with *o*NPG as the substrate.

3.2 Properties of β-galactosidase from *L. pentosus*

L. pentosus β-galactosidase is a heterodimer (M_r ~107 kDa) consisting of a small (~35 kDa) and large (~72 kDa) subunit as judged by SDS-PAGE (Fig. 1A) and native PAGE (Fig. 1B). The additional protein band (~80 kDa) in native PAGE when staining with Coomassie Blue presumably results from degradation of the intact ~107-kDa enzyme, as was previously shown for the related β-gal from *L. reuteri* using mass spectrometry [9]. Active staining on native PAGE with MUG yielded only one band with β-galactosidase activity, corresponding to the larger band in Fig 1B. Active staining on the SDS-PAGE gel after treating the enzyme in SDS buffer at 60°C for 5 min, thus separating the two subunits without unfolding, showed that one band corresponding to the large subunit exhibited activity with MUG (not shown). In contrast, the small subunit by itself did not show any activity. When the enzyme was treated in SDS buffer at ~100°C for 5 min, no activity was detected after active staining on the gel.

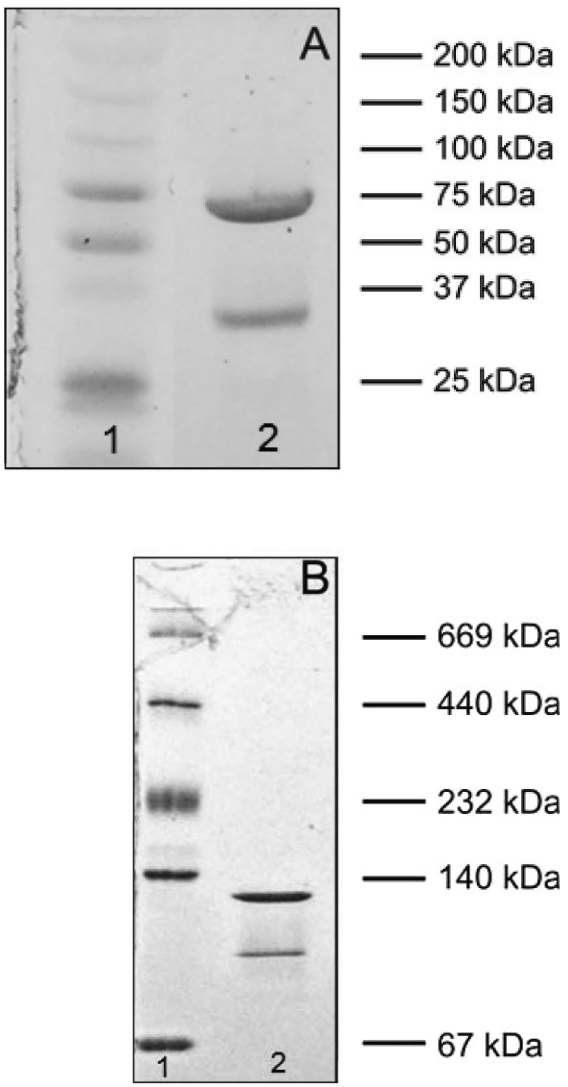


Figure 1. SDS-PAGE (A) and native PAGE (B) of purified β-galactosidase from *L. pentosus*. (A) Lane 1, molecular weight marker (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad), CBB staining; lane 2, enzyme sample after treatment in SDS buffer at 100°C for 5 min, CBB staining. (B) Lane 1, molecular weight marker (High Molecular Weight Calibration Kit for electrophoresis, Amersham); lane 2, CBB staining.

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 1. Kinetic properties of β-galactosidase from *Lactobacillus pentosus* for the hydrolysis of lactose and *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG)

Substrate	Method for determination of enzyme activity	Kinetic parameter	*L. pentosus* β-galactosidase
Lactose	Release of D-glucose	v_{max} (μmol min^{-1} mg^{-1})	11.3 ± 0.75
		K_m (mM)	37.8 ± 9.41
		k_{cat} (s^{-1})	20.1
		k_{cat}/K_m (mM^{-1} s^{-1})	0.532
*o*NPG	Release of *o*NP	v_{max} (μmol min^{-1} mg^{-1})	304 ± 24.6
		K_m (mM)	1.67 ± 0.64
		k_{cat} (s^{-1})	543
		k_{cat}/K_m (mM^{-1} s^{-1})	325

3.3 Substrate specificity

To study the substrate specificity of *L. pentosus* β-galactosidase various structurally related artificial substrates were tested under standard assay conditions and compared to *o*NPG. No appreciable activity was detected when using *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *o*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside and *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside as substrates for the activity assay.

3.4 Enzyme kinetics

Steady-state kinetic studies were performed with the preferred substrates lactose and *o*NPG and the kinetic constants K_m, v_{max}, and k_{cat} were determined. The k_{cat} values were calculated on the basis of theoretical v_{max} values obtained by nonlinear regression using SigmaPlot. Data are summarized in Table 1. The catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) for the two substrates, *o*NPG and lactose, indicate that *o*NPG is the preferred substrate in accordance with other microbial β-galactosidases.

3.5 Effects of pH and temperature

The pH optimum of *L. pentosus* β-galactosidase activity was pH 8.0 and pH 7.5 in glycine buffer when using lactose and *o*NPG as substrate, respectively (Fig. 2). In general, the enzyme was more active in the alkaline range (pH 7.0–8.5), and a pronounced effect of the buffer system used on activity was seen. The effect of different buffers and pH values on stability was subsequently investigated in more detail. Catalytic or kinetic stability, *i.e.* the length of time an enzyme remains active before undergoing irreversible inactivation, was measured at various pH at a constant temperature of 37°C, and the inactivation constants (k_{in}) and the half-life times of denaturation ($\tau_{1/2}$) were determined (Table 2). β-Galactosidase showed first-order inactivation kinetics at all pH values studied when analysed in the ln(residual activity) *versus* time plot (not shown). Highest $\tau_{1/2}$ values were calculated in glycine buffer (pH 8.0 and 8.5) where the stability was increased up to 3.2-fold compared to when using sodium phosphate buffer at pH 6.5. Highest inactivation constants, and hence lowest stabilities, were obtained in sodium acetate buffer (pH 4.0 and 5.0) and glycine buffer (pH 9.0), with $\tau_{1/2}$ values of less than 1.5 h.

The optimum temperature measured under standard assay conditions (10 min) for lactose and *o*NPG hydrolysis was 60–65°C and 55°C, respectively (Fig. 3). The effect of temperature on stability of β-galactosidase from *L. pentosus* was investigated at the pH value of milk, pH 6.5, both in the absence and presence of 2 mM $MgCl_2$. Inactivation constants and half-life times were calculated as described above. The addition of 2 mM $MgCl_2$ to the buffer improved stability significantly, increasing the half life times $\tau_{1/2}$ of the enzyme at 30, 37 and 42°C by 3.2-, 4.9- and 5.6-fold, respectively (Table 3; Fig. 4).

Table 2. Kinetic stability of β-galactosidase from *Lactobacillus pentosus* at various pH values at 37°C

Buffer	pH	Inactivation constant k_{in} (h^{-1})	Half-life $\tau_{1/2}$ (h)
Sodium acetate	4.0	3770×10^{-3}	0.18
Sodium acetate	5.0	504×10^{-3}	1.37
Sodium acetate	5.5	131×10^{-3}	5.31
Sodium acetate	6.0	91.9×10^{-3}	7.54
Sodium phosphate	6.0	63.3×10^{-3}	10.9
Sodium phosphate	6.5	47.6×10^{-3}	14.6
Sodium phosphate	7.0	47.6×10^{-3}	14.6
Sodium phosphate	7.5	95.8×10^{-3}	7.24
Glycine	7.5	43.6×10^{-3}	15.9
Glycine	8.0	14.7×10^{-3}	47.2
Glycine	8.5	16.0×10^{-3}	43.3
Glycine	9.0	1045×10^{-3}	0.66

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

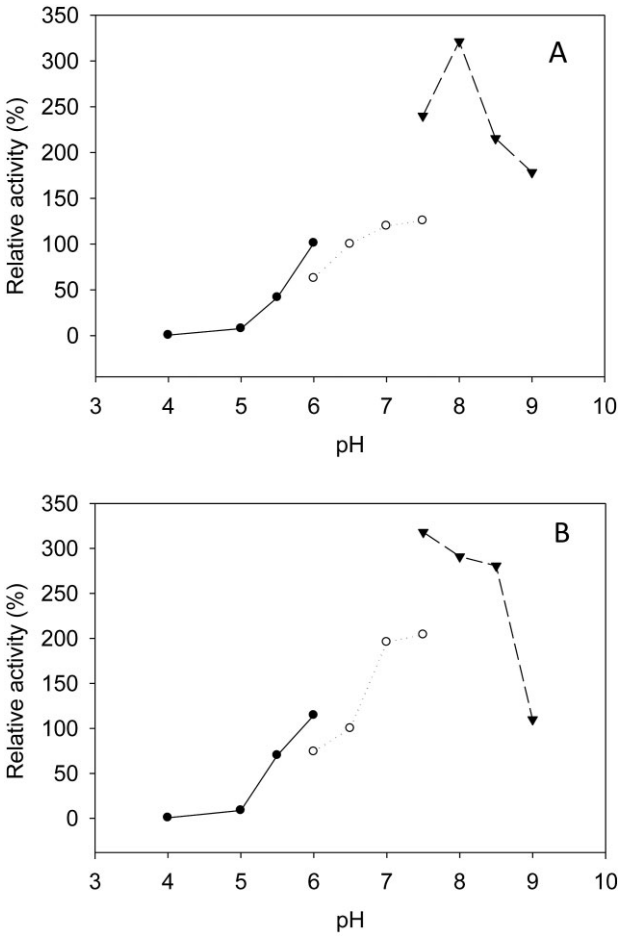


Figure 2. pH optimum of β-galactosidase from *L. pentosus* using lactose (A) and *o*NPG (B) as the substrate. Symbols: (●, sodium acetate buffer; (○ sodium phosphate buffer; (▼ glycine buffer. Activities are given relative to standard assay conditions (sodium phosphate buffer, pH 6.5).

3.6 Transgalactosylation activity

To assess the potential of the novel β-galactosidase from *L. pentoses* for the production of GOS, a discontinuous lactose conversion process was studied at 30°C, using an initial lactose concentration of 205 g/L in 50 mM sodium phosphate buffer (+ 2 mM $MgCl_2$, pH 6.5) and 5 U_{oNPG}/mL β-galactosidase activity to produce GOS. The maximum GOS yield (31%) was obtained at a lactose conversion of 78% (Fig. 5). The newly formed sugar mixture contained 31.5% glucose, 15.9% galactose, 21.9% lactose, 11.4% non-lactose disaccharides, 18.7% trisaccharides and 0.6% tetrasaccharides as analysed by capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, and using authentic sugars and the standard addition technique for comparison. The

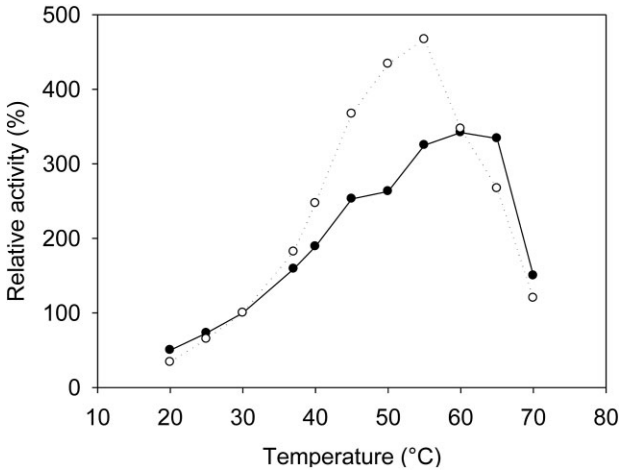


Figure 3. Temperature optimum of β-galactosidase from *L. pentosus* when using lactose (●) and *o*NPG (○) as the substrate. Activities are given relative to standard assay conditions at 30°C.

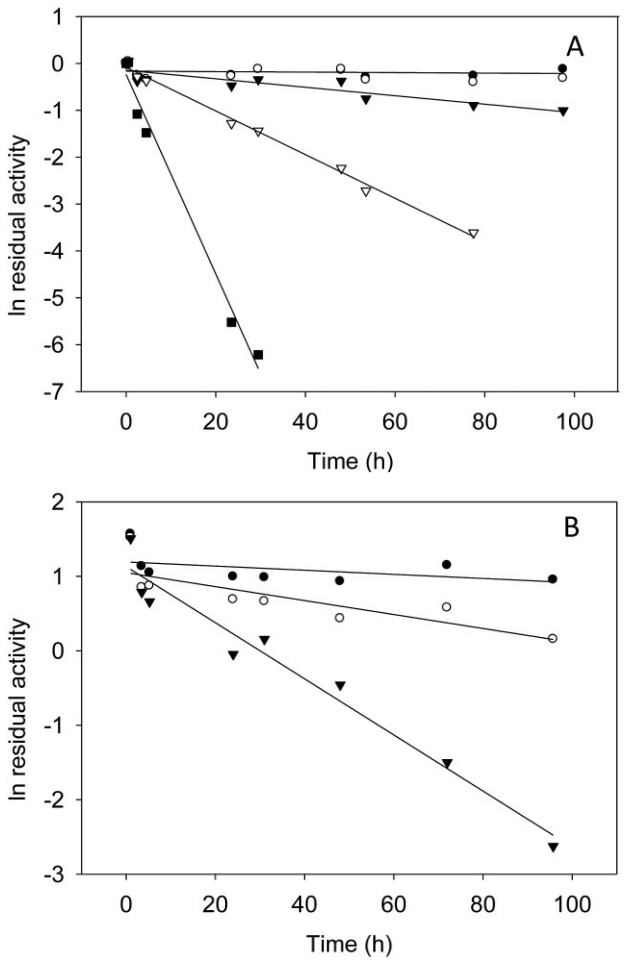


Figure 4. Inactivation kinetics of β-galactosidase from *L. pentosus* in sodium phosphate buffer (A; 50 mM, pH 6.5) and sodium phosphate buffer supplemented with 1 mM $MgSO_4$ (B; 50 mM, pH 6.5) at different temperatures. Symbols: (A): ●, 4°C; ○, 23°C; ▼, 30°C; ▽, 37°C; ■, 42°C; (B): ●, 30°C; ○, 37°C; ▼, 42°C.

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 3. Kinetic stability of β-galactosidase from *Lactobacillus pentosus* at various temperatures with and without $MgCl_2$ supplementation (2 mM)[a)]

	Sodium phosphate buffer (pH 6.5)		Sodium phosphate buffer (pH 6.5, + Mg^{2+})	
Temperature (°C)	**Inactivation constant k_{in} (h^{-1})**	**Half-life $\tau_{1/2}$ (h)**	**Inactivation constant k_{in} (h^{-1})**	**Half-life $\tau_{1/2}$ (h)**
4	0.5×10^{-3}	1386	nd	nd
23	0.8×10^{-3}	866	nd	nd
30	9.0×10^{-3}	77.0	2.8×10^{-3}	248
37	46.6×10^{-3}	14.9	9.4×10^{-3}	73.7
42	212.7×10^{-3}	3.26	37.7×10^{-3}	18.4

a) nd, not determined.

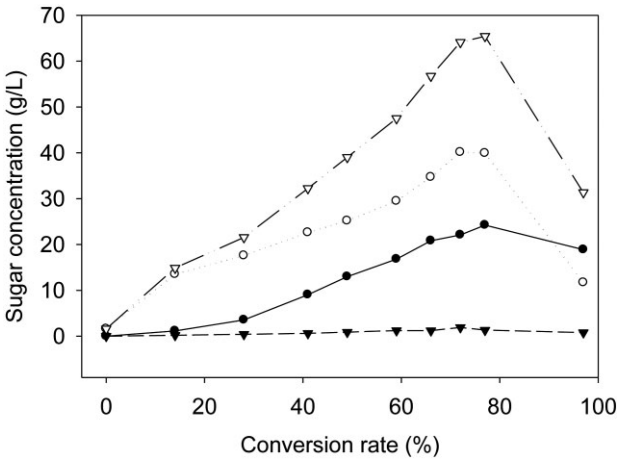


Figure 5. Formation of galacto-oligosaccharides (GOS) by β-galactosidase from *L. pentosus* during the discontinuous conversion reaction of 205 g/L lactose in 50 mM sodium phosphate buffer at 30°C. (A) Formation of disaccharides (●), trisaccharides (○), tetrasaccharides (▼) and total GOS (▽) during lactose conversion. (B) Time course of reaction for lactose conversion; symbols: lactose (▼), glucose (●), galactose (○).

main GOS products identified were non-lactose disaccharides, mainly of the β-(1→3) and β-(1→6) linkage type and the two trisaccharides β-D-Gal*p*-(1→3)-lactose, and β-D-Gal*p*-(1→6)-lactose.

4 Discussion

The genus *Lactobacillus* is the largest among the *Lactobacteriaceae* and includes more than a hundred described species [29]. Lactobacilli are nutritionally fastidious, metabolize a varying range of different carbohydrates, and are associated with a large variety of animals and plants. They are extensively used for fermentations of dairy products, meat, fish and plant material such as vegetables, and thus have been investigated intensively for their industrial applications [30]. Lactose utilisation is a primary function of lactobacilli and other LAB used in the fermentation of milk. The mechanism by which lactose is transported into the cell determines largely the subsequent pathway for the hydrolysis of this disaccharide. In several *Lactobacillus* species lactose is transported via phosphotransferase systems, which results in phosphorylation of lactose concomitant with its uptake. The resulting lactose-6′-phosphate is then hydrolysed by phospho-β-galactosidase. Alternatively, lactose is taken up by secondary transport systems, and lactose is further metabolised by β-galactosidase within the cell [31, 32]. While the organisation of these lactose genes, which often form operons or operon-like structures with modular organisation, has been studied in much detail, the properties of some of the enzymes encoded by the genes organised in these operons, including β-galactosidases, have received significantly less attention. It is thus surprising that the physical and biochemical properties of β-galactosidases from lactobacilli, which play an eminent role in the metabolism of the principal carbohydrate in milk, have only been characterised in detail in a few instances, and little attention has been paid to the catalytic ability of these enzymes with respect to their transglycosylation reactions [12, 19, 33].

Recently, we reported a comprehensive characterisation of the β-galactosidases from *L. reuteri* and *L. acidophilus,* and pointed out their applicability for the biocatalytic production of GOS [9, 13, 34, 35]. Here, we present the detailed biochemical characterisation and the transgalactosylation activity of a novel β-galactosidase from *L. pentosus*. The strain KUB-ST10-1 used throughout this research was isolated from a soil sample in Thailand, and was selected for further characterisation based on a screening and its high β-galactosidase activity when grown on lactose. It was of interest to determine whether a β-galactosidase from a source other than those traditionally used in the dairy industry may have unique properties or characteristics. In a recent phylogenetic analysis based on 16S rRNA genes, the genus *Lactobacillus* was grouped into five major divisions [36]. In this grouping, *L.*

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

acidophilus belongs to group A and *L. reuteri* to group B, while *L. pentosus* is a member of group C [36]; hence it was possible that the latter might differ in its metabolic activities from the β-galactosidases from other sources recently characterised in our group.

The structural features of β-galactosidases from lactobacilli vary extensively. While heterodimeric structures are in general less frequently encountered among microbial β-galactosidases, these seem to prevail among *Lactobacillus* β-galactosidases. Lactobacillal heterodimeric β-galactosidases are encoded by two genes, *lacL* and *lacM*, and have been described in *L. acidophilus* [34, 37], *L. coryniformis* [38], *L. helveticus* [39], *L. johnsonii* [40], *L. plantarum* [41], *L. reuteri* [9] and *L. sakei* [42]. These β-galactosidases of the LacLM type have been classified as members of glycoside family GH2 in the CAZy (carbohydrate-active enzymes) databank (http://www.cazy.org). In contrast to this, β-galactosidase from *L. salivarius* was reported to be a monomer of *ca.* 30 kDa [43], from *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a homodimer of 220 kDa [44], and from *L. helveticus* a homotetramer of 257 kDa [45]; *L. plantarum* forms, in addition to the above-mentioned heterodimeric enzyme, a homohexameric β-galactosidase of *ca.* 325 kDa [46]. Some of these later β-galactosidases are members of glycoside family GH42. β-Galactosidase from *L. pentosus* KUB-ST10-1 is a heterodimer consisting of two subunits of approximately 35 and 72 kDa, which is in agreement with the majority of lactobacillal β-galactosidases reported up to now, and is thus also of the LacLM type.

The steady-state kinetic constants for β-galactosidase from *L. pentosus* were determined for the artificial chromogenic substrate *o*NPG and the natural substrate lactose. The k_{cat}/K_m value for *o*NPG is significantly higher than that of lactose, indicating that *o*NPG is the better substrate. The K_m value of 37.8 mM determined for lactose compares positively with the Michaelis constants reported for commercially employed β-galactosidases, *e.g.* from *Aspergillus niger* (54–100 mM), *A. oryzae* (36–180 mM), *Kluyveromyces fragilis* (15–52 mM) [47] and *Kluyveromyces lactis* (20 mM) [48]. This value is, however, somewhat higher than the values reported for other *Lactobacillus* β-galactosidases: 13 mM for β-gal from *L. reuteri* L103 [9], 1.27 mM for β-gal from *L. kefiranofaciens* [49], and 4.04 mM for β-gal from *L. acidophilus* [34]. The higher $K_{m,lactose}$ value for *L. pentosus* β-gal as compared to other lactobacillal enzymes, especially those of milk origin, could indicate a lesser adaptation of this soil-isolated strain to lactose utilisation. *L. pentosus* β-gal is rather specific for the β-(1→4) galactosyl linkage. When using a range of structurally related nitrophenyl substrates, essentially no activity was measured for the β-(1→4)-linked D-glucoside, D-mannoside, and D-xyloside substrates.

L. pentosus β-galactosidase is optimally active at pH 7.5 (glycine buffer) and 55°C when using *o*NPG as substrate, and pH 8.0 (glycine buffer) and 60–65°C when lactose was used as substrate under otherwise standard activity assay conditions (10-min assay). This pH optimum is slightly more alkaline than reported for most other lactobacillal β-galactosidases, which show an optimum of 6.5–7.0 [9, 34]; however, we observed a pronounced effect of the buffer system used on the optimal pH, and that certainly affected the actual value determined. The temperature optimum of *L. pentosus* β-gal of 60–65°C is considerably higher than reported for most other β-galactosidases from lactobacilli, which are typically optimally active in the range of 45–50°C [9, 34, 43, 50]. *L. pentosus* KUB-ST10-1 can grow at temperatures of up to 45°C. This is higher than typical growth temperatures observed for many *Lactobacillus* spp. The increased temperature optimum and stability of the *L. pentosus* β-galactosidase might reflect an adaptation to these higher growth temperatures. Because of this increased temperature optimum we investigated the thermostability of *L. pentosus* β-gal in more detail, determining the inactivation kinetics at different conditions. With respect to pH, the highest half-life times $\tau_{1/2}$ were obtained in glycine buffer at pH 8.0–8.5 and at 37°C (43–47 h). Again, the buffer system had a pronounced effect on stability, since the inactivation constants k_{in} determined were approximately twice as high at pH 7.5 when using sodium phosphate instead of glycine buffer; however, the use of glycine buffer might be impractical for technical applications. When using the former buffer, the highest stability was observed at pH 6.5–7.0 with $\tau_{1/2}$ of 14.6 h. Addition of 2 mM Mg^{2+} increased stability and hence $\tau_{1/2}$ of β-gal activity significantly by a factor of up to 5.6-fold. For example, $\tau_{1/2}$ values of ~75 h were obtained at pH 6.5, 37°C and when using phosphate buffer containing 2 mM of Mg^{2+}. This increase in stability and activity of *L. pentosus* β-gal could be a considerable advantage when using technical substrates such as cheese whey or whey permeates for the production of GOS, since cheese whey contains approximately 1.5 mM Mg^{2+}. Thus, use of these technical substrates could improve the performance of *L. pentosus* β-gal without the need of adding exogenous Mg^{2+}.

β-Galactosidases have recently attained significant interest for use in biocatalytic processes for synthesising oligosaccharides or various galactosy-

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

lated compounds; for this purpose various galactosides can serve as the galactosyl donor. In particular, GOS, which are formed from lactose as a result of transgalactosylation, have attracted renewed attention in the field of functional food because of their proven benefits for health [16, 17, 19, 20]. As GOS are only transiently formed and are in turn also substrates for β-galactosidase, a maximum GOS yield of 31% was reached at 78% lactose conversion when using *L. pentosus* β-gal. The main GOS spectrum formed from lactose by this enzyme is very similar to those found for β-gal from *L. reuteri* [13] and *L. acidophilus* [34]. *L. pentosus* β-gal shows a high specificity for the formation of β-(1→6) and β-(1→3) linkages, and hence the main transgalactosylation products detected were the disaccharides β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Glc, β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Glc, β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Gal, β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Gal, and the trisaccharides β-D-Gal*p*-(1→3)-D-Lac, β-D-Gal*p*-(1→6)-D-Lac. In a recent study [51], a strong prebiotic effect was attributed to some of these compounds, and it is likely that the GOS mixture formed by *L. pentosus* β-gal has a considerable potential as a prebiotic.

In conclusion, this work presented the characterisation and transgalactosylation capacity of a novel β-galactosidase from *L. pentosus*. Although the β-galactosidase described here is not derived from a proven probiotic *Lactobacillus* strain, the physical and biochemical characteristics are quite similar to those derived from probiotic strains [9, 34] with the exception that it is considerably more stable at higher temperatures. Also the GOS spectrum and yields are comparable with the former studies, making this novel enzyme, which is produced by a well-known food-grade organism, interesting for potential applications in food industry.

This research work was supported financially by the Research Centre Applied Biocatalysis (Graz, Austria) and the National Research Council of Thailand (to MY). OJ thanks the Duo-Thailand 2008 program for a mobility grant.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

[1] Zanoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Collins, M. D., *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987, *37*, 339–341.

[2] Wynne, A. G., Gibson, G. R., Brostoff, J., Composition comprising a *Lactobacillus pentosus* strain and uses thereof. United States Patent 7125708, 10/24/2006, 2006.

[3] Kim, H.-J., Shin, H.-S., Ha, W.-K., Yang, H.-J., Lee, S.-W., Characterization of lactic bacterial strains isolated from raw milk. *Asian Austral. J. Anim.* 2006, *19*, 131–136.

[4] Fred, E. B., Peterson, W. H., Anderson, A.J., The characteristics of certain pentose-destroying bacteria, especially as concerns their action on arabinose and xylose. *J. Biol. Chem.* 1921, *48*, 385–412.

[5] Møller, P. L., Jørgensen, F., Hansen, O. C., Madsen, S. M., Stougaard, P., Intra- and extracellular β-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001, *67*, 2276–2283.

[6] Coombs, J. M., Brenchley, J. E., Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active β-galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999, *65*, 5443–5450.

[7] Nguyen, T.-H., Splechtna, B., Yamabhai, M., Haltrich, D., Peterbauer, C., Cloning and expression of the β-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2007, *129*, 581–591.

[8] Schmidt, B. F., Adams, R. M., Requadt, C., Power, S., Mainzer, S. E., Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* β-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1989, *171*, 625–635.

[9] Nguyen, T.-H., Splechtna, B., Steinböck, M., Kneifel, W. *et al.*, Purification and characterization of two novel β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 4989–4998.

[10] David, S., Stevens, H., van Riel, M., Simons, G., de Vos, W. M., *Leuconostoc lactis* β-galactosidase is encoded by two overlapping genes. *J. Bacteriol.* 1992, *174*, 4475–4481.

[11] Toba, T., Tomita, Y., Itoh, T., Adachi, S., β-Galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.* 1981, *64*, 185–192.

[12] Garman, J., Coolbear, T., Smart, J., The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1996, *46*, 22–27.

[13] Splechtna, B., Nguyen, T.-H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., *et al.*, Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 4999–5006.

[14] Rastall, R. A., Maitin, V., Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2002, *13*, 490–496.

[15] Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B., Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2004, *17*, 259–275.

[16] Macfarlane, G. T., Steed, H., Macfarlane, S., Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2008, *104*, 305–344.

[17] Park, A. R., Oh, D. K., Galacto-oligosaccharide production using microbial β-galactosidase: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010, *85*, 1279–1286.

[18] Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., Gras, S. L., Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chem*. 2010, *121*, 307–318.

[19] Zarate, S., Lopez-Leiva, M. H., Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. *J. Food Prot*. 1990, *53*, 262–268.

[20] Nakayama, T., Amachi, T., β-Galactosidase, enzymology, in: Flickinger, M. C., Drew, S.W. (Eds.) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Biosepa-*

 © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ration; Vol. 3, John Wiley and Sons, New York 1999, pp. 1291–1305.

[21] Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R., Recent progress on research and application of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J*. 1999, *9*, 69–80.

[22] Rabiu, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R., Rastall, R. A., Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001, *67*, 2526–2530.

[23] Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M., Gibson, G. R., A novel galacto-oligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J. Nutr*. 2005, *135*, 1726–1731.

[24] Nonaka, Y., Izumo, T., Izumi, F., Maekawa, T. *et al.,* Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2008, *145*, 249–257.

[25] Casey, P. G., Gardiner, G. E., Casey, G., Bradshaw, B. *et al.,* A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007, *73*, 1858–1863.

[26] Kunst, A., Draeger, B., Ziegenhorn, J., Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase, in: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Graßl, M. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, VCH Publishers, Weinheim 1988, pp. 178–185.

[27] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 1976, *72*, 248–254.

[28] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, *227*, 680–685.

[29] Felis, G. E., Dellaglio, F., Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol*. 2007, *8*, 44–61.

[30] Konings, W. N., Kok, J., Kuipers, O. P., Poolman, B., Lactic acid bacteria: The bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol*. 2000, *3*, 276–282.

[31] de Vos, W. M., Vaughan, E. E., Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 1994, *15*, 217–237.

[32] Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kawai, Y. *et al*., β-Galactosidase, phospho-β-galactosidase and phospho-β-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Lett. Appl. Microbiol*. 2007, *45*, 461–466.

[33] Vasiljevic, T., Jelen, T., Oligosaccharide production and proteolysis during lactose hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Le Lait* 2003, *83*, 453–467.

[34] Nguyen, T.-H., Splechtna, B., Krasteva, S., Kneifel, W. *et al*., Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, *269*, 136–144.

[35] Splechtna, B., Nguyen, T.-H., Zehetner, R., Lettner, H. P. *et al.,* Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β-galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. J*. 2007, *2*, 480–485.

[36] Canchaya, C., Claesson, M. J., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P. W., Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 2006, *152*, 3185–3196.

[37] Halbmayr, E., Mathiesen, G., Nguyen, T.-H., Maischberger, T. *et al*. High-level expression of recombinant β-galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a Sakacin P-based expression system. *J. Agric. Food Chem.* 2008, *56*, 4710–4719.

[38] Corral, J. M., Banuelos, O., Adrio, J. L., Velasco, J., Cloning and characterization of a β-galactosidase encoding region in *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2006, *73*, 640–646.

[39] Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Guglielmetti, S., Manichini, P. L., Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003, *69*, 3238–3243.

[40] Pridmore, R. D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D. *et al*., The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *101*, 2512–2517.

[41] Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D. *et al.,* Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 1990–1995.

[42] Obst, M., Meding, E. R., Vogel, R. F., Hammes, W. P., Two genes encoding the β-galactosidase of *Lactobacillus sake*. *Microbiology* 1995, *141*, 3059–3066.

[43] Bae, H. C., Choi, J. W., Nam, M. S., Purification and characterisation of β-galactosidase from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* Nam27. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*. 2007, *27*, 110–116.

[44] Adams, R. M., Yoast, S., Mainzer, S. E., Moon, K. *et al.,* Characterization of two cold-sensitive mutants of the β-galactosidase from *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Biol. Chem*. 1994, *269*, 5666–5672.

[45] de Macias, M. E., Manca de Nadra, M. C., Strasser de Saad, A. M., Pesce de Ruiz Holgado, A. A., Oliver, G., Isolation and properties of β-galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter. *J. Appl. Biochem*. 1983, *5*, 275–281.

[46] Acebron, I., Curiel, J. A., de Las Rivas, B., Munoz, R., Mancheno, J. M., Cloning, production, purification and preliminary crystallographic analysis of a glycosidase from the food lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* CECT 748(T). *Protein Expr. Purif.* 2009, *68*, 177–182.

[47] de Roos, A., Industrial enzymes: enzymes in dairy applications, in: Aehle, W. (Ed.), *Enzymes in Industry*, Vol. 2, Wiley-VCH, Weinheim 2004, p. 144.

[48] Kim, C. S., Ji, E. S., Oh, D. K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 2003, *25*, 1769–1774.

[49] Itho, K., Toba, T., Itho, T., Adachi, S., Properties of β-galactosidase of *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 isolated from kefir grains. *Lett. Appl. Microbiol*. 1992, *15*, 232–234.

[50] Ito, M., Deguchi, Y., Miyamori, A., Matsumoto, K. *et al.*, Effects of administration of galacto-oligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb. Ecol. Health. D* 1990, *3*, 285–292.

[51] Sanz, M. L., Cote, G. L., Gibson, G. R., Rastall, R. A., Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 9779–9784.

© 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ผลงานเรื่องที่ ๒

เป็นรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ เบต้าแกแลคโตซิเดส จากเชื้อ บาซิลัส ไลเคนิฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๑๓ ซึ่งผลจากการวิจัยพบว่ามีความเหมาะสมในการใช้ ผลิตน้ำนม ไร้แลคโตส หรือแลคโตสต่ำ ผลงานนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ชื่อ Applied Microbiology and Biotechnology ซึ่งมีค่า impact factor 3.689 ชื่อเรื่อง

Juajun, O. et al. Cloning, purification, and characterization of beta-galactosidase from Bacillus licheniformis DSM 13. Appl Microbiol Biotechnol 89, 645-654, doi:10.1007/s00253-010-2862-2 [doi] (2011).
(๑๐ หน้า)

Appl Microbiol Biotechnol (2011) 89:645–654
DOI 10.1007/s00253-010-2862-2

Cloning, purification, and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13

Onladda Juajun · Thu-Ha Nguyen · Thomas Maischberger · Sanaullah Iqbal · Dietmar Haltrich · Montarop Yamabhai

Received: 16 June 2010 / Revised: 21 August 2010 / Accepted: 23 August 2010 / Published online: 18 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The gene encoding homodimeric β-galactosidase (*lacA*) from *Bacillus licheniformis* DSM 13 was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, and the resulting recombinant enzyme was characterized in detail. The optimum temperature and pH of the enzyme, for both *o*-nitrophenyl-β-D-galactoside (*o*NPG) and lactose hydrolysis, were 50°C and 6.5, respectively. The recombinant enzyme is stable in the range of pH 5 to 9 at 37°C and over a wide range of temperatures (4–42°C) at pH 6.5 for up to 1 month. The K_m values of LacA for lactose and *o*NPG are 169 and 13.7 mM, respectively, and it is strongly inhibited by the hydrolysis products, i.e., glucose and galactose. The monovalent ions Na^+ and K^+ in the concentration range of 1–100 mM as well as the divalent metal cations Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Ca^{2+} at a concentration of 1 mM slightly activate enzyme activity. This enzyme can be beneficial for application in lactose hydrolysis especially at elevated temperatures due to its pronounced temperature stability; however, the transgalactosylation potential of this enzyme for the production of galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose was low, with only 12% GOS (*w*/*w*) of total sugars obtained when the initial lactose concentration was 200 g/L.

Keywords β-Galactosidase · *Bacillus licheniformis* · Lactose hydrolysis · Transglycosylation · Recombinant

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-010-2862-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

O. Juajun · M. Yamabhai (✉)
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology,
111 University Avenue,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
e-mail: montarop@g.sut.ac.th

O. Juajun
Department of Food Science and Technology,
Faculty of Agricultural and Technology,
Rajamangala University of Technology Isan,
Surin Campus,
Surin 32000, Thailand

T.-H. Nguyen · T. Maischberger
Applied Biocatalysis Research Center,
8010 Graz, Austria

T.-H. Nguyen · T. Maischberger · S. Iqbal · D. Haltrich
Food Biotechnology Laboratory, Department of Food Science and Technology, BOKU—University of Natural Resources and Life Sciences Vienna,
1190 Vienna, Austria

Introduction

β-Galactosidases (β-gal, lactase, EC 3.2.1.23) catalyze the hydrolysis and transgalactosylation of β-D-galactopyranosides (such as lactose) (Nakayama and Amachi 1999) and are found widespread in nature. β-Galactosidases have been isolated and characterized from many different sources including microorganisms, plants, and animals. At present, more than a hundred putative β-galactosidase sequences can be deduced from various databases, and these can be classified into four different glycoside hydrolase (GH) families GH-1, GH-2, GH-35, and GH-42, based on functional similarities (Cantarel et al. 2009). Microbial β-galactosidases have attracted considerable attention for biotechnological applications, and hence numerous reports (Halbmayr et al. 2008; Nguyen et al. 2006; Rahim and Lee 1991; Rajakala and Karthigai 2006) and reviews (Husain 2010; Nakayama and Amachi 1999; Park and Oh 2010a) on the characterization of these enzymes from various organisms have been published. The hydrolysis of lactose

or related compounds by β-galactosidase can be used to improve digestibility, solubility, and sweetness of dairy products. Furthermore, β-galactosidases can be conveniently used to cleave lactose into glucose and galactose, which in turn serves as an easily metabolizable and renewable substrate for a number of different fermentations. In addition, β-galactosidases can also possess transgalactosylation activity, which has recently gained considerable interest for the production of galacto-oligosaccharides (GOS), prebiotics that can stimulate the growth of beneficial bacteria such as bifidobacteria and lactobacilli (Macfarlane et al. 2008; Rastall and Maitin 2002).

Lactose maldigestion and intolerance are caused by lactase insufficiency or nonpersistence, which results from a decrease in the activity of the lactose-cleaving enzyme, β-galactosidase (lactase), in the brush border membrane of the mucosa of the small intestine of adults. Lactose intolerance occurs in 70% of the world's adult population, and Eastern Asia has the highest number of lactose malabsorbers with more than 90% of its population (de Vrese et al. 2001). Besides lactose maldigestion, crystallization of lactose can be a problem in dairy products such as ice cream and sweetened condensed milk. At high lactose concentrations, crystallization of this disaccharide can occur especially at low temperatures, resulting in sandiness of the products (Ganzle et al. 2008). β-Galactosidases derived from food-grade organisms can be successfully employed for these food-related problems related to the milk sugar lactose. The products of lactose hydrolysis, i.e., glucose and galactose, are sweeter and better digestible than lactose, thus helping to alleviate lactose maldigestion. These monosaccharides are also much more soluble than lactose; hence, sandy defects in dairy products can be avoided (Ganzle et al. 2008). Furthermore, disposal of large quantities of the lactose-containing by-products from cheese manufacturing, whey and whey permeates, causes serious environmental problems. It is estimated that approximately 177 million tons of whey, equaling approximately nine million tons of lactose, are accumulating worldwide, of which roughly one third is still disposed of in the environment or used as animal feed (Ganzle et al. 2008). This can be used as a source of cheap, renewable, and fermentable sugars after β-galactosidase-catalyzed hydrolysis for a number of different large-scale biotechnological processes (Ganzle et al. 2008).

Bacillus licheniformis is a soil-dwelling endospore-forming microorganism, which has been used extensively for the industrial-scale production of important enzymes including thermostable amylase, proteases, β-lactamase, and α-acetolactate decarboxylase, as well as for the production of smaller compounds such as the antibiotic bacitracin and various organic metabolites, e.g., 2,3-butanediol and glycerol (Schallmey et al. 2004). Recently, the complete genome of *B. licheniformis* strain DSM 13 was reported, and it was pointed out that its genome contains several genes encoding enzymes of significant interest for biotechnological applications (Veith et al. 2004). Thus, the elucidation of the genome opened the door for further research on industrially relevant enzymes, and for example, a recombinant *B. licheniformis* chitinase (Songsiriritthigul et al. 2010b), endo-β-mannanase (Songsiriritthigul et al. 2010a), arabinose isomerase (Prabhu et al. 2008), and α-amylase (Hmidet et al. 2008) were studied in detail after cloning and expression of the respective gene. In this paper, we describe the cloning of β-galactosidase from *B. licheniformis* DSM 13 and its expression in *E. coli.* Furthermore, the properties of the recombinant enzyme are reported.

Materials and methods

Chemicals and enzymes

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and were of the highest quality available unless otherwise stated. Glucose oxidase from *Aspergillus niger* (lyophilized, 211 U/mg) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), and horseradish peroxidase (POD) (lyophilized, 181 U/mg) was from Sigma. All restriction enzymes were from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Pfu DNA polymerase was purchased from Promega (Madison, WI, USA), while Phusion High-Fidelity DNA polymerase was from Finnzymes OY (Espoo, Finland), and T4 DNA ligase was from Fermentas (Vilnius, Lithuania). Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was from Roth (Karlsruhe, Germany), and the test kits for determination of D-glucose and D-galactose were from Megazyme (Bray, Ireland).

Bacterial strains and culture conditions

B. licheniformis DSM 13 (ATCC 14580) was obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Braunschweig, Germany). The strain was grown aerobically at 37°C in nutrient broth (NB) containing 5 g/L peptone and 3 g/L meat extract. *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) broth containing 100 μg/mL ampicillin for maintaining the plasmid.

Cloning of *B. licheniformis* β-galactosidase

The gene encoding β-galactosidase from *B. licheniformis* DSM 13 was cloned by a polymerase chain reaction (PCR)-based method as previously described (Yamabhai et al. 2008). The oligonucleotide primers for PCR amplification of the *B. licheniformis lacA* gene were designed from the published genome of *B. licheniformis* DSM 13 (GenBank

accession number AE017333). The primers lacA_F2 GCA AGC TTC GCT CCA TAT GCCA and lacA_R2 GTG GTC GAC AGA TCT CTC GAG CTC TTT TG containing *Nde*I and *Xho*I restriction sites, respectively, were used for cloning into the corresponding sites of pMY201 (Yamabhai 2008). The initial denaturation step at 95°C for 5 min was followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 4.5 min. The final cycle was followed by additional 10-min elongation at 72°C (Yamabhai 2008). The resulting expression plasmid pOJBlilacA2 encodes the recombinant β-galactosidase carrying a C-terminal 10× His-tag followed by the FLAG tag (Fig. 1). The integrity of the construct was confirmed by automated DNA sequence analysis (VBC-Biotech).

Sequence analysis

Assembly and analysis of DNA sequences were done by Vector NTI. The basic local alignment search tool from the National Center for Biotechnology Information website was used for database searches. The comparison of β-galactosidase from *B. licheniformis* DSM 13 with homologous proteins was carried out using the program ClustalW followed by Esprit (Gouet et al. 1999).

Expression of the β-galactosidase gene in *E. coli*

E. coli TOP10 carrying the pOJBlilacA2 plasmid was grown in LB medium containing 100 μg/mL ampicillin at 37°C overnight. The overnight cultures (2% inoculum) were used to inoculate 1,500 mL of TB medium containing 100 μg/mL ampicillin. The cultures were incubated at 37°C until the optical density at 600 nm reached 0.9. The cultures were then induced by adding 0.01 mM IPTG and further incubated at 18°C for 45 h. Subsequently, the induced cells were harvested and washed once with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and then 50 g of cell paste in 300 mL of 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 was disrupted using a continuous homogenizer (APV-2000, Silkeborg, Denmark). Cell debris was removed by centrifugation (25,000×*g*, 4°C, 15 min) to obtain the crude extract.

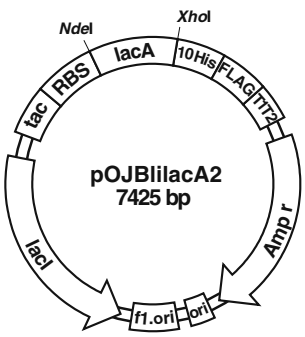


Fig. 1 Schematic overview of the pOJBlilacA2 plasmid. The plasmid is based on the pFLAG-CTS vector (Sigma, St. Louis, MO, USA): *tac* a hybrid of *trp* and *lac* promoter, *RBS* Shine-Dalgarno ribosome-binding site, *lacA* structural gene of β-galactosidase from *B. licheniformis* DSM 13, *10His* deca-histidine tag, *FLAG* octapeptide tag, T_1T_2 ribosomal RNA operon compound terminator, *Amp r* ampicillin resistance marker, *ori* (pBR322 ori) origin of double-strand replication of recombinant plasmid, *f1● ori* origin for single-strand replication of positive strand via M13 K07 Helper Phage, *lacI* repressor of tac promoter

Protein purification

The crude extract was loaded onto a 15-mL Ni Sepharose 6 fast-flow column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) that was pre-equilibrated with buffer A (50 mM sodium phosphate buffer, 0.2 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 6.5). The protein was eluted at a rate of 1.5 mL/min with a 75-mL linear gradient from 0% to 100% buffer B (50 mM sodium phosphate buffer, 0.2 M NaCl, 1 M imidazole, pH 6.5). Active fractions were pooled, desalted, and concentrated by membrane ultrafiltration with a 10-kDa molecular weight cutoff (Amicon, Beverly, MA, USA). The purified enzyme was stored in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 containing 1 mM EDTA at 4°C until used.

Enzyme assays

β-Galactosidase activity was measured at 30°C and pH 6.5 by using *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*NPG) and lactose as substrates according to previously published methods (Nguyen et al. 2006). The range of enzyme activity units used was between 2,000–10,000 and 40–250 U/mL for *o*NPG and lactose, respectively.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard.

Gel electrophoresis and active staining

Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were done using the PhastSystem unit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Active staining using 4-methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside as the substrate was carried out as previously described (Nguyen et al. 2006). Isoelectric focusing was performed on a PhastSystem unit according to the manufacture's instructions. The p*I* marker protein kit (pH 3–10, GE Healthcare) was used to estimate the p*I* value after the proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue.

Steady-state kinetic measurements

All steady-state kinetic measurements were performed at 30°C using *o*NPG and lactose as the substrates in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) with concentrations ranging from 0.1 to 22 mM for *o*NPG and 1 to 600 mM for lactose. Furthermore, the inhibition of *o*NPG hydrolysis by D-galactose and D-glucose as well as that of lactose hydrolysis by D-galactose was investigated. The kinetic parameters and inhibition constants were calculated by nonlinear regression, and the observed data were fitted to the Henri–Michaelis–Menten equation using Sigma Plot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

pH and temperature dependence of activity and stability

The pH dependence of the enzymatic release of *o*NP from *o*NPG and D-glucose from lactose was measured for the range of pH 4 and 8, using Britton–Robinson buffer (containing 20 mM each of phosphoric, acetic, and boric acid) adjusted to the required pH values, under otherwise standard assay conditions. To determine the pH stability, the enzyme samples were incubated at various pH values and 37°C, and the remaining enzyme activity was determined at various time intervals using *o*NPG as the substrate under standard assay conditions.

The temperature dependence of enzyme activity (both *o*NPG and lactose activity) was determined by measuring the activity over the range of 20–70°C for 10 min. The temperature stability of the enzyme was studied by incubating enzyme samples in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5 at various temperatures in the range of 4–65°C. At certain time intervals, samples were withdrawn, and the residual activity was measured with *o*NPG as the substrate under standard assay conditions.

Effect of various cations

To study the effect of various cations on the release of *o*NP from *o*NPG, the enzyme samples were assayed with 22 mM *o*NPG (in 10 mM Bis-Tris buffer, pH 6.5) in the presence of 0.04 mM EDTA and various monovalent and divalent cations with final concentrations of 1.0, 10, and 100 mM (chloride or sulfate form) at 30°C for 10 min (Hmidet et al. 2008). The measured activities were compared with the activity of the enzyme solution without added cations under the same conditions.

Hydrolysis of lactose

Hydrolysis of lactose was carried out in discontinuous mode using eight lactase units per milliliter of reaction mixture. These reactions were carried out at two process temperatures (37°C, 60°C), using either 50 or 200 g/L initial lactose concentration in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) and constant agitation by shaking at 300 rpm. Samples were withdrawn at various intervals, and the composition of the sugar mixtures was analyzed by capillary electrophoresis and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection together with authentic reference materials following methods described previously (Splechtna et al. 2006).

Results

Cloning and expression of β-galactosidase LacA from *B. licheniformis* DSM 13 in *E. coli*

The β-galactosidase LacA from *B. licheniformis* DSM 13, which is encoded by the *lacA* gene, was amplified, cloned, and expressed in *E. coli* TOP10. The *lacA* gene consists of an open reading frame of 2,055 bp, encoding 684 amino acid residues (and a stop codon) with a calculated molecular mass of 79 kDa (Yamabhai et al. 2008). The recombinant enzyme was fused with a C-terminal 10× His-tag followed by the FLAG tag to facilitate purification by one-step affinity chromatography using Ni-NTA agarose. Gene expression was optimized by varying the IPTG concentrations (0.01, 0.1, and 1 mM) and induction temperature (18°C and 25°C). The highest β-galactosidase activity produced by *E. coli* TOP10 carrying pOJBlilacA2 was obtained after 45 h of induction with 0.01 mM IPTG at 18°C. Using these conditions and cultivations in shaken flasks, approximately 74 kU of β-galactosidase activity per liter of fermentation broth with a specific activity of 51 U/mg was obtained; this corresponds to roughly 275 mg of recombinant protein formed per liter.

The His-tagged enzyme was purified to apparent homogeneity by a single-step purification protocol using a Ni Sepharose 6 fast-flow column (Fig. 2). The overall yield was 73%, and approximately 54 kU (200 mg) of purified recombinant enzyme was obtained per liter of fermentation broth with a specific activity of 270 U/mg (Table 1).

The recombinant β-galactosidase from *B. licheniformis* showed a molecular mass of ~75 kDa when analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2a). This relates very well to the calculated mass of 78,851 Da for the LacA β-galactosidase (GenBank AAU43090). Native PAGE analysis (Fig. 2b) gave a molecular mass of approximately 160 kDa, indicating that the enzyme is a homodimer consisting of two identical 79-kDa subunits. Activity staining of the purified recombinant β-galactosidase on native PAGE using 4-methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside as a substrate also yielded a single band of ~160 kDa corresponding to the intact homodimer (Fig. 2b). The isoelectric point of recombinant β-galactosidase overexpressed in *E. coli* was

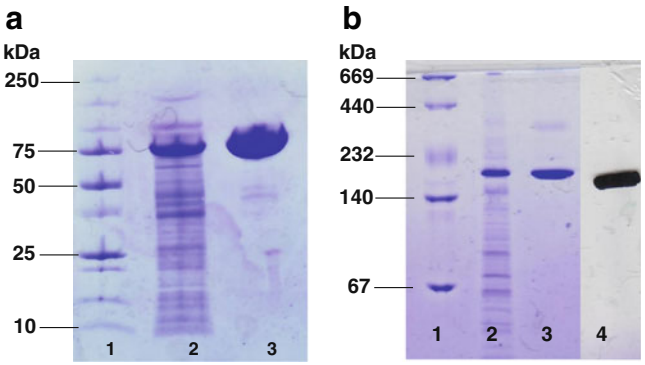


Fig. 2 SDS-PAGE (**a**) and native PAGE (**b**) analysis of β-galactosidase (lacA) from *B. licheniformis* DSM 13 overexpressed in *E. coli* TOP10. **a** *Lane 1*, recombinant molecular mass markers (Bio-Rad); *lanes 2* and *3*, Coomassie blue staining of crude extract and purified recombinant β-galactosidase, respectively. **b** *Lane 1*, high molecular weight markers (GE Healthcare); *lanes 2* and *3*, Coomassie blue staining of crude extract and purified recombinant β-galactosidase, respectively; *lane 4* activity staining with 4-methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside of purified recombinant β-galactosidase. Approximately 5 μg of total protein was loaded onto each lane

found to be in the range of ~5.5 as analyzed by analytical isoelectric focusing (data not shown), which corresponds well to the theoretical value of 5.75.

β-Galactosidase from *B. licheniformis* can be classified as a member of GH-42, based on amino acid similarities and according to the Carbohydrate-Active Enzymes databank (http://www.cazy.org). The amino acid sequence alignment of this enzyme with other bacterial GH-42 members is shown in the Electronic Annex 1 in the online version of this article. Amino acid sequence similarities of β-galactosidase from *B. licheniformis* (GenBank accession number AAU43090) and those from other bacteria are 76.6% for *Bacillus subtilis* β-gal (GenBank accession number ABQM01000009), 47.9% for *Clostridium perfringens* β-gal (GenBank accession number BAB79873), 36.9% for *Bacillus circulans* β-gal (GenBank accession number AAA22258), 35.6% for *Bacillus stearothermophilus* β-gal (GenBank accession number P19668), 26.9% for *Thermotoga neapolitana* β-gal (GenBank accession number AAC24217), 26.8% for *Thermus thermophilus* β-gal (GenBank accession number BAA28362), 25.3% for *Thermotoga maritima* β-gal (GenBank accession number AAD36270), and 24.9% for *Haloferax* sp. (strain Aa 2.2) β-gal (GenBank accession number AAB40123).

Enzyme kinetics

The steady-state kinetic constants as well as the inhibition constants determined for the hydrolysis of lactose and *o*NPG are summarized in Table 2. The k_{cat} values were calculated on the basis of theoretical v_{max} values obtained by nonlinear regression using Sigma Plot. The catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) for the two substrates, lactose and *o*NPG, indicate that *o*NPG is clearly the preferred substrate, both because of more favorable K_m and k_{cat} values.

One of the end products of the β-gal-catalyzed hydrolysis of lactose, D-galactose, competitively inhibited both the hydrolysis of lactose and *o*NPG with inhibition constants of 0.93 and 0.95 mM, respectively. This competitive inhibition is surprisingly strong, also as judged on the basis of the ratios of the inhibition constants for D-galactose during hydrolysis of lactose and *o*NPG and the Michaelis constants for these substrates, $K_{i,Gal}/K_{m,Lac}$=0.0055 and $K_{i,Gal}/K_{m,oNPG}$=0.069, respectively. In addition, inhibition by the second end product, D-glucose, was studied with *o*NPG as the substrate. Again, glucose is a competitive inhibitor of β-gal from *B. licheniformis* (K_i of 83.2 mM, Table 2); however, its inhibiting effect is only moderate compared to D-galactose as is obvious from the ratio of K_i to K_m ($K_{i,Glu}/K_{m,oNPG}$=6.1).

Effects of pH and temperature

The pH optimum of β-galactosidase activity is 6.5 for both lactose and *o*NPG hydrolysis (Fig. 3a). The enzyme is stable in the pH range of 5 to 8, and it is most stable at pH 6.5, retaining more than 90% and 80% of its activity when incubated at pH 6.5 and 37°C for 5 days and 1 month, respectively (Fig. 3b).

The optimum temperature of β-galactosidase activity was 50°C when using both lactose and *o*NPG as substrates under standard 10-min assay conditions (Fig. 4a). The effect of temperature on the stability of the enzyme was also investigated. The enzyme was stable over a wide range of temperatures (4–42°C) and when kept at these temperatures for up to 1 month (Fig. 4b). The enzyme was most stable at 37°C, retaining ~90% of its activity after 1 month at this temperature. The enzyme had a half-life time of activity ($t_{1/2}$) of approximately 7 days, 5 h, and 30 min at 55°C, 60°C, and 65°C, respectively.

Table 1 Purification of recombinant, His-tagged β-galactosidase from *B. licheniformis*

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)[a]	Purification fold	Recovery (%)
Crude enzyme extract	6,000±26	118±1.6	51±0.2	1.0	100
Affinity chromatography (Ni Sepharose fast flow)	4,400±15	16.2±0.6	270±0.9	5.3	73

[a] Activity was measured using *o*NPG as a substrate

Table 2 Kinetic parameters of recombinant β-galactosidase from *B. licheniformis* for the hydrolysis of lactose and *o*NPG

Substrate	v_{max} (μmol min^{-1} mg^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mM^{-1} s^{-1})	$K_{i,Gal}$ (mM)	$K_{i,Glu}$ (mM)
Lactose	13±0.04	169±0.8	34.5±0.1	0.20±0.00	0.93±0.05	–
*o*NPG	299±2.3	13.7±0.1	785±6.1	57.3±0.05	0.95±0.02	83.2±1.1

Values are the average of duplicate experiments and represented as mean ± standard deviation

Effect of various cations on catalytic activity

The hydrolysis of *o*NPG by β-galactosidase from *B. licheniformis* was slightly activated by monovalent ions, i.e., Na^+ and K^+. Concentrations of these ions in the range of 1–100 mM exerted these stimulating effects (Table 3). The effects of K^+, Mg^{2+}, and Ca^{2+} in the presence of 10 mM Na^+ were also tested to determine whether a possible synergism exits with respect to the activation of the enzyme by cations (Table 4). However, these synergistic effects were found to be insignificant. The presence of 1 mM Mn^{2+} together with the presence of 10 mM Na^+ slightly stimulated the activity of the enzyme, while the presence of 10 mM Mn^{2+} inhibited the enzyme activity by ~40%.

Bioconversion of lactose

β-Galactosidase-catalyzed conversion of lactose is of interest both for the hydrolysis of this disaccharide as well as for the formation of GOS. Lactose hydrolysis with low levels of GOS formation could be observed for β-galactosidase from *B. licheniformis* when employing initial lactose concentrations of both 50 and 200 g/L. The time course of lactose conversion (50 g/L initial concentration and pH 6.5 employing 8 U_{Lac}/mL β-galactosidase activity, which corresponds to ~30 mg/L of recombinant β-gal) and formation of monosaccharides in discontinuous lactose hydrolysis processes is shown in Fig. 5a for two different temperatures, i.e., 37°C, at which the enzyme is most stable, and 60°C. Unconverted lactose and monosaccharides are the main components of the sugar mixtures at both process temperatures (37°C and 60°C), and low amounts of GOS were formed. Initially, the reaction proceeded rapidly, and lactose conversion was significantly faster at 60°C than at 37°C. Approximately 45% of lactose were hydrolyzed within the first 3 h of the reaction at 60°C, while ~25% were cleaved at 37°C. Thereafter, the reaction slowed down, most probably as a result of both the unfavorably high K_m and the inhibition by mainly D-galactose (Fig. 5a).

In addition, the formation of GOS was studied at various conditions as well for β-galactosidase from *B. licheniformis*. For initial lactose concentrations of 200 and 50 g/L and at a process temperature of 60°C, the maximum GOS yields were approximately 12% and 7%, respectively (Fig. 5b). The impact of different reaction temperatures (37°C and 60°C) was investigated at the initial lactose concentration of 200 g/L. GOS yields obtained at 60°C were significantly higher than at 37°C, with approximately 12% and 5% of total sugars, respectively (Fig. 5b).

Discussion

We have cloned, expressed in *E. coli*, and studied in detail the biochemical properties of GH-42 β-galactosidase (LacA) from *B. licheniformis*. The recombinant enzyme showed some properties that are appropriate for application in various processes requiring lactose hydrolysis, for example, its broad pH optimum of 5.5 to 8, its stability at

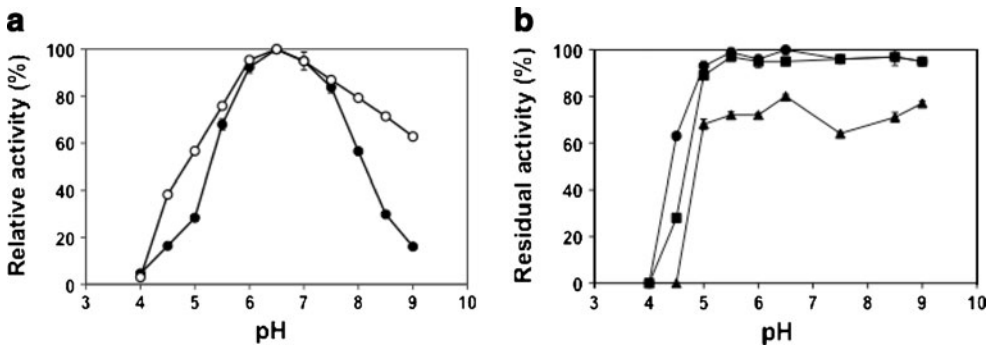


Fig. 3 Effect of the pH value on activity and stability of β-galactosidase (lacA) from *B. licheniformis*. **a** Optimum pH was determined under standard assay conditions using either *o*NPG (*filled circle*) or lactose (*empty circle*) as substrates. **b** pH stability using lactose as substrate is shown as residual activity after an incubation at 37°C for 24 h (*filled circle*), 5 days (*filled square*), and 1 month (*filled triangle*). The buffer system used was Britton–Robinson buffer. Values are the average of duplicate experiments with standard deviation shown as *error bars*

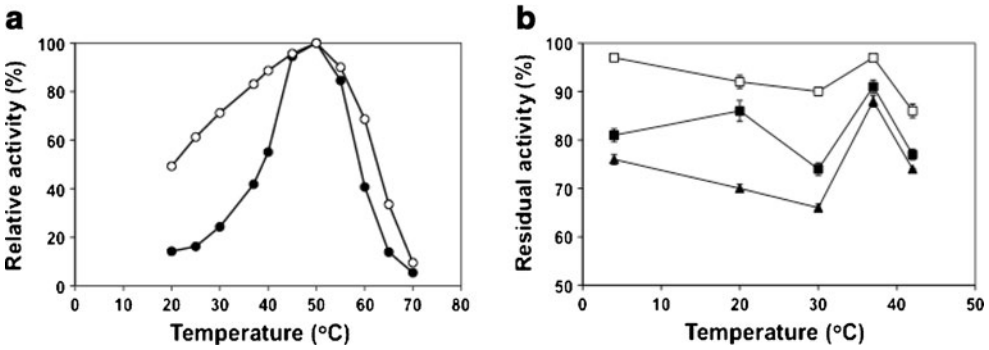


Fig. 4 Effect of temperature on activity and stability of β-galactosidase (lacA) from *B. licheniformis*. **a** Optimum temperature was determined under standard assay conditions (10-min incubation) and varying temperatures using either *o*NPG (*filled circle*) or lactose (*empty circle*) as substrates. **b** Temperature stability using lactose as substrate is shown as residual activity after an incubation at pH 6.5 for 24 h (*empty square*), 5 days (*filled square*), and 1 month (*filled triangle*) in 50 mM sodium phosphate buffer. Values are the average of duplicate experiments with standard deviation shown as *error bars*

process-relevant temperatures, or its insensitivity to Ca^{2+}. So far, there have been many reports dealing with different facets of the characterization of β-galactosidases from various microorganisms, i.e., *Kluyveromyces marxianus* (Rajakala and Karthigai 2006), *B. subtilis* (Rahim and Lee 1991), *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus sakei* (Halbmayr et al. 2008), *Lactobacillus reuteri* (Nguyen et al. 2006), and *Bacillus coagulans* (Navneet et al. 2002). Our results indicate that *B. licheniformis* LacA possesses unique characteristics that should be valuable for various aspects of research on β-galactosidase in the future.

The *lacA* gene of *B. licheniformis* when overexpressed in *E. coli* resulted in the encoded recombinant homodimeric β-galactosidase with a molecular mass of approximately 160 kDa consisting of two identical subunits of ~78 kDa as shown on native and SDS-PAGE. The amino acid sequence alignment of β-galactosidases from *B. licheniformis* DSM 13 with eight other bacterial enzymes (all from glycosyl hydrolase family 42, GH-42) revealed the conservation of Glu141 and Glu312, which are essential for the catalytic mechanism. Interestingly, *E. coli* β-galactosidase is a homotetramer (Matthews 2005), GH-42 β-galactosidase from *T. thermophilus* is a homotrimer (Hidaka et al. 2002), while the β-galactosidases from *L. reuteri* and *B. licheniformis* were proposed to be a heterodimer (Nguyen et al. 2007b) or homodimer (from this study), respectively.

Table 3 Effect of Na^+ and K^+ on the activity of β-galactosidase from *B. licheniformis* DSM13

Cation	Relative activity (%)[a]		
	1 mM	10 mM	100 mM
Na^+	128±0.9	126±0.1	131±0.2
K^+	118±0.7	122±0.2	130±0.2

Values are the average of duplicate experiments and represented as mean ± standard deviation

[a] The relative activity is based on standard conditions without added cations (100%)

The specific activity of *B. licheniformis* LacA compares well with values reported for other microbial β-galactosidases, most notably those isolated from various *Bacillus* spp.-specific activity of 5.1 and 60 U/mg for *B. circulans* and *Bacillus megaterium* β-gal, respectively (Park and Oh 2010a), indicating the high activity of the *B. licheniformis* enzyme (O'Connell and Walsh 2007). The pH optima are slightly different from those reports for purified β-galactosidase from *B. stearothermophilus* (pH 5.5) (Griffiths and Muir 1978) and *B. licheniformis* ATCC 9800 (pH 5.5) (Trân et al. 1998). Analysis of enzyme stability at various pH and temperature indicated that this enzyme is very stable when compared to other industrially used enzymes. While the recombinant *B. licheniformis* β-galactosidase is stable between pH 5 and 9 at 37°C and up to 42°C at pH 6.5 for up to 1 month, *Kluyveromyces fragilis* β-galactosidase has only 50% remaining activity when stored at 40°C at pH 6–7 for 20 h (Ladero et al. 2006). *A. niger* β-galactosidase is stable at pH 2.5–3 at temperature below 70°C in a 5-min assay (Widmer and Leuba 1979), and *B. circulans* β-galactosidase is stable between pH 5 and 9 and at temperatures below 50°C in a 30-min assay (Fujimoto et al. 1998). Therefore, this recombinant enzyme is highly suitable for various biotechnological applications.

The lower Michaelis constant for the chromogenic model substrate (*o*NPG) than that for the natural substrate (lactose) is in accordance with the properties of β-galactosidases from a number of different sources (Nguyen et al. 2006; Samoshina and Samoshin 2005). The K_m value of 169 mM determined for lactose was found to be quite high when compared to other β-galactosidase members of family GH-42, for instance, 3.7, 2.94, and 2.71 mM for three isoforms of β-gal from *B. circulans*, respectively (Vetere and Paoletti 1998); 6.18 mM for β-gal from *Bacillus* sp. MTCC 3088 (Chakraborti et al. 2000); or

Table 4 Synergistic effect of different cations on β-galactosidase activity from *B. licheniformis*

Cation	10 mM Na^+ 1 mM K^+	10 mM Na^+ 10 mM K^+	10 mM Na^+ 1 mM Mn^{2+}	10 mM Na^+ 10 mM Mn^{2+}	10 mM Na^+ 1 mM Mg^{2+}	10 mM Na^+ 10 mM Mg^{2+}	10 mM Na^+ 1 mM Ca^{2+}	10 mM Na^+ 10 mM Ca^{2+}
Relative activity (%)[a]	123±0.8	126±1.1	136±1.3	78±2.9	134±1.5	137±0.3	135±0.1	136±1.3

Values are the average of duplicate experiments and represented as mean± standard deviation

[a] The relative activity is based on standard conditions without added cations (100%)

42 mM for β-gal from *Thermus* sp. IB-21 (Kang et al. 2005). However, this K_m value is comparable to those reported for commercial fungal and yeast enzymes that are commonly employed in biotechnological applications (36–180 mM for β-gal from *Aspergillus oryzae* and 54–99 mM for β-gal from *A. niger*) (De Roos 2004).

Various degrees of inhibition as well as different inhibition types by both end products D-galactose and D-glucose are commonly found for β-galactosidases from different organisms, such as *Bacillus* (*Geobacillus*) *stearothermophilus* ($K_{i,Gal}$=2.5 mM) (Goodman and Pederson 1976), *L. reuteri* ($K_{i,Gal}$, $K_{i,Glu}$=115 and 683 mM, respectively) (Nguyen et al. 2006), *Arthrobacter* sp. ($K_{i,Gal}$=12 mM), *Kluyveromyces lactis* ($K_{i,Gal}$, $K_{i,Glu}$=45 and 758 mM, respectively), *Thermus* sp. ($K_{i,Gal}$, $K_{i,Glu}$=3 and 50 mM, respectively), and *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ($K_{i,Gal}$, $K_{i,Glu}$=12 and 1,170 mM, respectively). While a competitive inhibition is prevailing with D-galactose, which typically is a much stronger inhibitor, the inhibition by D-glucose can be of the competitive, noncompetitive, and uncompetitive type (Park and Oh 2010a). Interestingly, different GH-42 β-galactosidases can vary considerably in their inhibition by D-galactose. β-Gal from *B. licheniformis* shows, as reported in the result section, an unexpectedly high end-product inhibition ($K_{i,Gal}$=0.93 mM; $K_{i,Gal}/K_{m,Lac}$=0.0055), which was almost equally pronounced as that observed in *B. stearothermophilus* β-gal ($K_{i,Gal}$=2.5 mM; $K_{i,Gal}/K_{m,Lac}$=0.023) (Goodman and Pederson 1976). In contrast, the GH-42 β-gal from *C. saccharolyticus* is much less affected by its end product D-galactose ($K_{i,Gal}$=12 mM; $K_{i,Gal}/K_{m,Lac}$=0.4) (Park and Oh 2010b) as judged by the $K_{i,Gal}/K_{m,Lac}$ ratio. This inhibition of β-galactosidase activity by its end products can be a serious technological problem, as close to complete hydrolysis of lactose, either when aiming at producing the hydrolyzate as a renewable feedstock for further fermentations or at food applications, can only be achieved by a significantly prolonged conversion time or by adding disproportionate amounts of enzyme. Very few studies have addressed structure/function relationships of β-galactosidases with respect to this end product inhibition. Some recent preliminary data, however, indicate that some variants of the *C. saccharolyticus* β-gal, in which active site residues were exchanged, show reduced inhibition (Park and Oh 2010a). Because of this pronounced inhibition, β-gal from *B. licheniformis* could be an excellent model protein for future structure/function studies, e.g., in directed evolution approaches or by approaches of semi-rational design, in order to obtain a better fundamental understanding of end-product inhibition of β-galactosidases.

The observations of the effects of various cations are in agreement with the reports on the requirements for monovalent and divalent metal ions for optimal activity

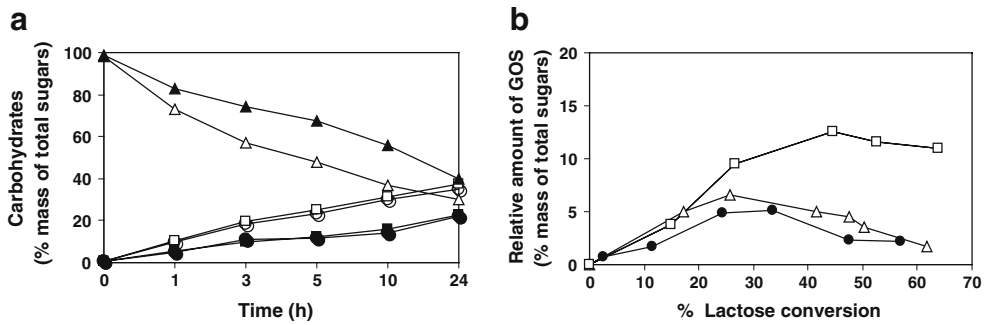


Fig. 5 Bioconversion of lactose. **a** Time course of lactose conversion in discontinuous batch processes. The reactions were carried out using an initial lactose concentration of 50 g/L in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) and 8 U_{Lac}/mL β-galactosidase activity both at 37°C [lactose (*filled triangle*), glucose (*filled square*), galactose (*filled circle*)] and 60°C [lactose (*empty triangle*), glucose (*empty square*), galactose (*empty circle*)]. The amounts of sugars at various time intervals are reported as percentage of mass of total sugars. **b** Formation of GOS during lactose conversion at different temperatures and initial lactose concentrations. The reactions were performed at 60°C, using 50 g/L (*empty triangle*) and 200 g/L (*empty square*) of lactose in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) as substrates, and at 37°C, using 200 g/L lactose in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) (*filled circle*) as substrate. The relative amount of GOS (percent mass of total sugars) at different levels of lactose conversion is shown

and stability for a number of different β-galactosidases (Nakayama and Amachi 1999; Nguyen et al. 2007a; Nguyen et al. 2006). Ca^{2+} is a known inhibitor of some β-galactosidases (Garman et al. 1996; Smart et al. 1985), but interestingly, it could to some extent activate β-galactosidase from *B. licheniformis* (Table 4) when added in concentrations of 1–10 mM, which also correlates to concentrations of free calcium in milk or whey. This property can be advantageous for applications in lactose conversion processes directly in milk or when using lactose-rich substrates based on whey with high level of free Ca^{2+} in solution. In addition, we found that 10 mM of Cu^{2+}, Zn^{2+}, and Fe^{2+} inactivated β-galactosidase activity by 100%, 94%, and 66%, respectively (data not shown).

The results of transglycosylation reaction analysis are in accordance with the previous observations that an increase in the initial lactose concentration is one of the main factors for GOS formation in addition to enzyme source, temperature, and pH of the reaction condition (Gosling et al. 2010; Park and Oh 2010a; Zarate and Lopez-Leiva 1990). Furthermore, the effect of the reaction temperature on GOS yields is remarkable. Generally, higher temperatures in processes aiming at GOS formation are thought after since an increase in temperature improves the solubility of lactose, which is relatively low at ambient temperatures, and increased lactose concentrations are one of the main factors affecting GOS yields (Gosling et al. 2010). A positive effect of the reaction temperature on GOS yields has been reported in very few studies (Boon et al. 2000; Hsu et al. 2007), but it was concluded from a comparative study using four different β-galactosidases that the effect of temperature is small (Boon et al. 2000). An increase in the process temperature from 37°C to 60°C at a constant lactose concentration of 200 g/L (585 mM) could more than double the GOS yields attained when using β-galactosidase from *B. licheniformis*. The different maximal yields were however obtained at different levels of lactose conversion, as can be expected from a kinetically controlled reaction, indicating that the conversion process has to be investigated over the entire range of lactose conversion for conclusive results. The GOS yield observed in this work was not as high as expected. β-Galactosidases from family GH-42 are thought to have lesser activity for both hydrolysis and transfer than GH-2 β-galactosidases, yet no systematic study has been aimed at this comparison of the two GH families (Gosling et al. 2010). The rather low GOS yields obtained with β-galactosidase from *B. licheniformis*, however, seem to corroborate this observation.

One weakness of this enzyme is its strong inhibition by the end products, mainly D-galactose, which slows down the hydrolysis process considerably when accumulating during the hydrolysis process. Nevertheless, the hydrolytic property of β-galactosidase from *B. licheniformis*, an organism that has been widely used for the production of food-approved enzymes, could be beneficial for partial lactose removal in food products, or for improving the quality of dairy products by increasing their solubility and sweetness. It is generally accepted that 50–80% lactose-reduced milk will satisfy the physiological requirements of the majority of lactose-intolerant groups (Indyk et al. 1996). This strong inhibition by D-galactose together with the fact that the enzyme is encoded by a single gene should make it an attractive starting point for detailed structure/function studies on end product inhibition of β-galactosidases, which is not well understood at present and which hampers the efficient utilization of lactose as a renewable sugar, as well as for further improvements by various techniques in directed evolution (Arnold and Volkov 1999).

Acknowledgements This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT), Suranaree University of Technology, Rajamangala University of Technology Isan (Nakhon Ratchasima and Surin), Thailand, and the EURASIA project from the European Commission (Erasmus Mundus ECW project no. 2008-1976). OJ thanks the ASEM-DUO Fellowship Program 2008 (Duo-Thailand) for a mobility grant, and SI thanks the Government of Pakistan (Higher Education Commission—HEC) for a scholarship enabling his studies in Austria.

References

Arnold FH, Volkov AA (1999) Directed evolution of biocatalysts. Curr Opin Chem Biol 3:54–59

Boon MA, Janssen AE, van 't Riet K (2000) Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enzyme Microb Technol 26:271–281

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res 37:D233–D238

Chakraborti S, Sani RK, Banerjee UC, Sobti RC (2000) Purification and characterization of a novel β-galactosidase from *Bacillus* sp. MTCC 3088. J Ind Microbiol Biotechnol 24:58–63

De Roos A (2004) Industrial enzymes: enzymes in dairy applications. In: Aehle W (ed) Enzymes in industry, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim, p 144

de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J (2001) Probiotics—compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr 73(suppl):421S–429S

Fujimoto H, Miyasato M, Ito Y, Sasaki T, Ajisaka K (1998) Purification and properties of recombinant β-galactosidase from *Bacillus circulans*. Glycoconj J 15:155–160

Ganzle MG, Haase G, Jelen P (2008) Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. Int Dairy J 18:685–694

Garman J, Coolbear T, Smart J (1996) The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 46:22–27

Goodman RE, Pederson DM (1976) β-Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Can J Microbiol 22:817–825

Gosling A, Stevens GW, Barber AR, Kentish SE, Gras SL (2010) Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chem 121:307–318

Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. Bioinformatics 15:305–308

Griffiths MW, Muir DD (1978) Properties of a thermostable β-galactosidase from a thermophilic *Bacillus*: comparison of the enzyme activity of whole cells, purified enzyme and immobilised whole cells. J Sci Food Agric 29:753–761

Halbmayr E, Mathiesen G, Nguyen T-H, Maischberger T, Peterbauer CK, Eijsink VGH, Haltrich D (2008) High-level expression of recombinant β-galactosidases in *Lactobacillus plantarum and Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system. J Agric Food Chem 56:4710–4719

Hidaka M, Fushinobu S, Ohtsu N, Motoshima H, Matsuzawa H, Shoun H, Wakagi T (2002) Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. J Mol Biol 322:79–91

Hmidet N, Bayoudh A, Berrin JG, Kanoun S, Juge N, Nasri M (2008) Purification and biochemical characterization of a novel α-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli*. Process Biochem 43:499–510

Hsu CA, Yu RC, Lee SL, Chou CC (2007) Cultural condition affecting the growth and production of β-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. Int J Food Microbiol 116:186–189

Husain Q (2010) β-Galactosidases and their potential applications: a review. Crit Rev Biotechnol 30:41–62

Indyk HE, Edwards MJ, Woollard DC (1996) High performance liquid chromatographic analysis of lactose-hydrolysed milk. Food Chem 57:575–580

Kang SK, Cho KK, Ahn JK, Bok JD, Kang SH, Woo JH, Lee HG, You SK, Choi YJ (2005) Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB-21: cloning, expression, and enzyme characterization. J Biotechnol 116:337–346

Ladero M, Santos A, GarcÌa-Ochoa F (2006) Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microb Technol 38:1–9

Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S (2008) Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. J Appl Microbiol 104:305–344

Matthews BW (2005) The structure of *E. coli* β-galactosidase. C R Biol 328:549–556

Nakayama T, Amachi T (1999) β-Galactosidase, enzymology. In: Flickinger MC, Drew SW (eds) Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. Wiley, New York, pp 1291–1305

Navneet B, Singh J, Banerjee UC, Patnaik PR, Sobti RC (2002) Production and characterization of a thermostable β-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. Biotechnol Appl Biochem 36:1–6

Nguyen T-H, Splechtna B, Steinböck M, Kneifel W, Lettner PH, Kulbe KD, Haltrich D (2006) Purification and characterization of two novel β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J Agric Food Chem 54:4989–4998

Nguyen T-H, Splechtna B, Krasteva S, Kneifel W, Kulbe KD, Divne C, Haltrich D (2007a) Characterization and molecular cloning of a heterodimeric b-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus*R22. FEMS Microbiol Lett 269:136–144

Nguyen TH, Splechtna B, Yamabhai M, Haltrich D, Peterbauer C (2007b) Cloning and expression of the β-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. J Biotechnol 129:581–591

O'Connell S, Walsh G (2007) Purification and properties of a β-galactosidase with potential application as a digestive supplement. Appl Biochem Biotechnol 141:1–14

Park A-R, Oh D-K (2010a) Galacto-oligosaccharide production using microbial β-galactosidase: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 85:1279–1286

Park AR, Oh DK (2010b) Effects of galactose and glucose on the hydrolysis reaction of a thermostable β-galactosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl Microbiol Biotechnol 85:1427–1435

Prabhu P, Tiwari MK, Jeya M, Gunasekaran P, Kim IW, Lee JK (2008) Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. Appl Microbiol Biotechnol 81:283–290

Rahim KAA, Lee BH (1991) Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β-galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88. J Dairy Sci 74:1773–1778

Rajakala P, Karthigai PS (2006) The effect of pH, temperature and alkali metal ions on the hydrolysis of whey lactose catalysed by b-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. Int J Dairy Sci 1:167–172

Rastall RA, Maitin V (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Curr Opin Biotechnol 13:490–496

Samoshina NM, Samoshin VV (2005) The Michaelis constants ratio for two substrates with a series of fungal (mould and yeast) β-galactosidases. Enzyme Microb Technol 36:239–251

Schallmey M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J Microbiol 50:1–17

Smart JB, Crow VL, Thomas TD (1985) Lactose hydrolysis in milk and whey using β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. NZ J Dairy Sci 20:43–56

Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, Yamabhai M (2010a) Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-β-mannosidase from Bacillus licheniformis in Escherichia coli. Microb Cell Fact 9:20

Songsiriritthigul C, Lapboonrueng S, Pechsrichuang P, Pesatcha P, Yamabhai M (2010b) Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. Bioresour Technol 101:4096–4103

Splechtna B, Nguyen T, Steinbock M, Kulbe KD, Lorenz W, Haltrich D (2006) Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Lactobacillus reuteri* β-galactosidase. J Agric Food Chem 54:4999–5006

Trân PL-S, Szabó L, Fülöp L, Orosz L, Sík T, Holczinger A (1998) Isolation of a β-galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. Curr Microbiol 37:39–43

Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Baumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A, Gottschalk G (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM 13, an organism with great industrial potential. J Mol Microbiol Biotechnol 7:204–211

Vetere A, Paoletti S (1998) Separation and characterization of three β-galactosidases from *Bacillus circulans*. Biochim Biophys Acta 1380:223–231

Widmer F, Leuba JL (1979) β-Galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms. Eur J Biochem 100:559–567

Yamabhai M (2008) BAP-fusion: a versatile molecular probe for biotechnology research. In: Richter FW (ed) Biotechnology: research, technology and applications. NOVA, Hauppauge, pp 327–345

Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, Buranabanyat B (2008) Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. J Biotechnol 133:50–57

Zarate S, Lopez-Leiva MH (1990) Oligosaccharides formation during lactose enzymatic hydrolysis; a review of literature. J Food Prot 53:262

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ๒ ชนิด เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นม ๒ ในแนวทางหลัก คือ ๑) ในการผลิต แกแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ กอซ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก และ ๒) สำหรับการผลิตนมที่มีปริมาณแลคโตสต่ำ เพื่อช่วยให้ผู้บริโภคที่ขาดเอนไซม์นี้ซึ่งมีอยู่ ๑ ใน ๓ ของประชากรโลก และมีน้อยกว่าร้อยละ ๑๐ ในประเทศไทย สามารถดื่มนมได้โดยไม่มีผลข้างเคียง เอนไซม์ทั้ง ๒ ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

เอนไซม์แรก เป็นเอนไซม์จากเชื้อ แลคโตบาซิลัส เพนโตซัส เคยูบี-เอสที ๑๐-๑ พัฒนาขึ้นด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ตามด้วย วิธีการคัดแยกด้วยวิธีการโครมาโตกราฟฟีที่คัดแยกโดยปฏิกิริยาแบบไม่ชอบน้ำ และโดยความสามารถในการจับจำเพาะ ผลจากการวิเคราะเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงว่า เอนไซม์มีโครงสร้างเป็นคู่แบบแตกต่าง ที่มีขนาด ๑๐๕ กิโลดาลตัน มีค่าความสามารถในการทำปฏิกริยา วัดจากค่า กิจกรรมจำเพาะ และค่าพลจลศาสตร์ ใกล้เคียงกับเอนไซม์ประเภทเดียวกันนี้จากเชื้อประเภทเดียวกัน แต่คุณสมบัติที่โดดเด่นคือ มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา สูงกว่าเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ แลคโตบาซิลัสอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมา ผลจากการทดลองนำเอนไซม์นี้ไปใช้ผลิต พรีไบโอติก กอซ จากแลคโตส พบว่าได้ผลผลิตสูงสุดมาก โดยมีผลผลิตที่เป็น กอซ ที่มีทั้งความยาว ๒ โมเลกุล และ ๓ โมเลกุล ๒ แบบ ซึ่งมีศักยภาพสูงที่จะเป็น พรีไบโอติก ที่ดี และเนื่องจากเชื้อแลคโตบาซิลัสประเภทนี้นั้น จัดได้ว่าอยู่ในกลุ่มที่ปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

เอนไซม์ตัวที่สองที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ คือเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส จากเชื้อ บาซิลัส ไลเคนนิฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๑๓ ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดได้ว่าปลอดภัย และถูกใช้ในระดับอุตสาหกรรมหลายชนิด เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจากเชื้อนี้ มีโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ข้างต้น คือเป็นโมเลกุลคู่ แต่เป็นแบบเสมือน พัฒนาขึ้นมาโดยการโคลนยีน *lacA* แล้วนำไปแสดงออกในปริมาณสูงในเชื้อ *เอสเชอริเชีย โคไล* ได้เป็นเอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรม แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ซึ่งพบว่า สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง และ เอนไซม์นี้ยังมีความเสถียรในช่วงค่า pH และอุณหภูมิ ที่กว้างจึงเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ดีด้วยผลผลิต ได้แก่ กลูโคส และ กาแลคโตส ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ย่อยแลคโตสในนมที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่ไม่เหมาะกับการนำมาสังเคราะห์ กอซ เพราะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเอนไซม์แรกมาก

ข้อวิจารณ์ และเสนอแนะ

ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ทั้ง ๒ มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมนม ทั้งในการผลิต พรีไบโอติก กอซ และการทำนมไร้แลคโตส หรือแลคโตสต่ำ อย่างไรก็ตาม ก่อนการนำไปใช้จริงควรมีการพัฒนาระบบการแสดงออก และ/หรือ ผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และเป็นที่ยอมรับได้ในอุตสาหกรรมอาหารก่อน อาทิเช่น นำไปแสดงออกในระบบการแสดงออกเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร (Food grade expression system) แล้วทำการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการทางสถิติขั้นสูงเข้าช่วย นอกจากนั้นแล้ว ยังต้องทำการ พัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการ สังเคราะห์ กอซ หรือในการผลิตนมแลคโตสต่ำ โดยคำนึงถึงความคุ้มทุนด้วย อีกทั้งยังต้องทำการประเมินคุณสมบัติของผลผลิตที่ได้ เช่น ความสามารถในการเป็น พรีไบโอติก หรือ ปริมาณ แลคโตสที่คงเหลือ รวมทั้งคุณสมบัติต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ และความพึงพอใจของผู้บริโภคอีกด้วย ก่อนที่จะสามารถทำการผลิตเพื่อพัฒนาออกสู่ตลาดได้อย่างแท้จริง ซึ่งผู้วิจัยได้วางแผนไว้ว่าจะพยายามทำงานวิจัยต่อยอด ผลงานที่ได้สร้างขึ้นมาในครั้งนี้ต่อไป

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน

๑. *ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ*

Haltrich, D., Nitisinprasert, S. & Yamabhai, M. in The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "International Conference on Biotechnology for Healthy Living" (invited oral) (Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010).

Yamabhai, M., and Songsiriritthigul., B.B. (2009). Expression and characterization of Bacillus mannanases. In International meeting on Bio-ethanol: status and future (invited speaker and scientific committee) (Hanoi University of Technology, Hanoi, Vietnam, March 25-26).

๒. *ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ*

Maischberger, T. et al. Beta-galactosidase from Lactobacillus pentosus: purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. Biotechnol J 5, 838-847, doi:10.1002/biot.201000126 [doi] (2010).

Juajun, O. *et al.* Cloning, purification, and characterization of beta-galactosidase from Bacillus licheniformis DSM 13. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 645-654, doi:10.1007/s00253-010-2862-2 [doi] (2011).

Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N. & Songsiriritthigul, C. Efficient E. coli expression systems for the production of recombinant β-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. Bioengineered bugs 2, 1-5 (2011).

๓. *ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ*

อรลัดา เจือจันทร์ และ มณฑารพ ยมาภัย, (2551). ปัญหาการแพ้นมและแนวทางแก้ไข. หนังสือ เกษตรสุรนารี' 51, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, ed. (นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี).

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร

ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งสำหรับวิทยานิพนธ์ ของนักศึกษา ๓ คน ดังนี้

๑. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรลัดา เจือจันทร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาลัยราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

๒. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกของ Dr. Sanaullah Iqbal จาก BOKU, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria

๓. วิทยานิพนธ์ระดับ ปริญญาเอกของ Dr. Thomas Maischberger จาก BOKU, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria

ประวัติผู้วิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๙ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ postdoctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๔๐ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต ๔ คน และดุษฎีบัณฑิต ๔ คน และเป็นหัวหน้า โครงการวิจัยทั้งหมด ๒๔ โครงการ แล้วเสร็จ ๒๐ โครงการ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐

โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐

Email: montarop@g.sut.ac.th