บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ ชนิดที่ผลิตไลเปสที่มีประสิทธิภาพดีที่อุณหภูมิสูงและศึกษาการตรึงเซลล์เพื่อผลิตเอนไซม์ดังกล่าว

ผู้เขียนรายงานการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ทนความร้อนจากน้ำพุร้อนจังหวัดเชียงใหม่สามแห่งคือ ป่าแป๋ ฝาง และเทพพนม และได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสและมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 65 °ซ ขึ้นไปได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส Thermus โดยดูจากลักษณะรูปร่าง สมบัติการติดสีกรัมลบ และความต้องการออกซิเจน แบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ชนิดอื่นเช่น โปรติเอส อะมิเลสได้ด้วย การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวของแบคทีเรียดังกล่าวในขั้นต้นพบว่าสามารถผลิตไลเปสได้ในปริมาณใกล้เคียงกันในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำซึ่งมีแนวโน้มว่าจะสามารถปรับปรุงเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตได้โดยกาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดไว้ 6 ไอโซเลทมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตไลเปสได้เพิ่มขึ้นในอาหารที่ประกอบด้วย Base mixture 10–20% v/v สิ่งสกัดจากยีสต์ 0.25% ทริปโตน 0.25% 10–20% 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 และ 0.01% เลซิทินโดยมีน้ำมันมะกอก 3% v/v เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่ 65 °C นาน 30–48 ชม. และเมื่อลองเลี้ยงแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทในภาวะที่เหมาะสมในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำเอนไซม์ที่ส่งออกนอกเซลล์มาทำให้เข้มข้นแล้วแยก และวิเคราะห์ไลเปสโดยโพลิอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิสพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก 3 แหล่งอาจเป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลต่างกันโดยมี 2 ชนิดที่มีขนาดใหญ่กว่าโปรตีน BSA (M.W. 67,000) และ 1 ชนิดมีขนาดเล็กกว่า 67,000 และสมบัติการทนความร้อนของเอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซม์ไลเปสทั้งสามแหล่งก็แตกต่างกันด้วย

การศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตไลเปสโดยใช้เซลล์ตรึงนั้นได้ใช้ Thermus P1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนความร้อนแยกได้จากน้ำพุร้อนปาแบ่ ซึ่งสามารถผลิตไลเปสได้ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 70 °C ได้ประมาณ 5.3 หน่วย/มล. เป็นต้นแบบในการศึกษาการตรึงเซลล์บนเม็ดเซรามิกส์และแคลเซียมอัลจิเนตและทดสอบการผลิตไลเปสของเซลล์ตรึงอย่างต่อเนื่องพบว่า การตรึงเซลล์ทั้งสองวิธีมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียทนความร้อนเพื่อการผลิตไลเปส หากมีการปรับปรุงและศึกษาในรายละเอียดมากขึ้น

ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโดยใช้ไลเปสจาก Candida cylindracea ตรึงบนพาหะที่ต่างกัน 5 ชนิด ที่พีเอชต่าง ๆ และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตรึงในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าพาหะที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ไลเปสอย่างง่ายแบบดูดติดคือ celite และ Sephadex LH-60 โดยตรึงที่พีเอชใกล้เคียงกับ optimum pH ของเอนไซม์เอง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นแนวโน้มของการนำไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนมาศึกษาการนำไปใช้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title Screening of Microorganisms from Chiang Mai Hot Spring Producing Thermostable Lipases and Cell Immobilization Study for Enzyme Production

Report by Associate Professor Dr. Suree Phutrakul

A number of thermophilic microorganisms were isolated from three hot springs in Chiang Mai ; Papae, Fang and Tepanom. Sixteen isolates of thermophilic bacteria producing extracellular lipase were selected and most of them were classified as bacteria in genus Thermus according to morphology, Gram strain property and the need of oxygen. These bacteria could also produce other extracellular enzymes such as protease and amylase. These bacteria could produce comparatively the same amount of extracellular lipase when cultured in liquid media at 65 °C for 40 h. The amount of enzyme was low but might be increased in a suitable culture condition. Six isolates of these bacteria were cultured in 5 different culture media and it was found that these bacteria could increase lipase production in a medium containing 10-20% v/v base mixture, 0.25% yeast extract, 0.25% tryptone, 10-20% v/v of 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 and 0.01% lecithin using 3% v/v of olive oil as carbon source when cultured at 65 °C for 30-48 h. Crude lipase from 3 isolates cultured at appropriate condition in 1 l

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cultured medium were concentrated, separated and identified by polyacrylamide gel electrophoresis and study for thermal stability. The results shew that lipases from the 3 isolates might be different dued to different molecular sizes, two lipases were larger than BSA (M.W. 67,000) and one lipase was smaller than 67,000. The thermal stability of these lipases was also different.

To increase lipase production by cell immobilization technique, Thermus P1, a thermophilic bacteria isolated from Papae hot spring which produced lipase 5.3 u/ml at 70 °C was used. The cells were immobilized on ceremic beads and calcium alginate beads. Continuous lipase production by the immobilized cells was studied. The results clearly indicated the potential use of ceremic beads and calcium alginate as support for immobilization of thermophiles at elevated temperature and used in a continuous system to improve productivity yield. However more detail experiment, in this matter are needed :

Immobilization of lipase for industrial application was studied using commercial lipase from Candida cylindracea immobilized on 5 different solid supports at various pH and observed its activity in hydrolysis of olive and palm oils in water saturated hexane. All materials tested could be used at appropriate pH. However, celite and Sephadex LH-60 was suggested to be the best support for a simple enzyme immobilization method at pH around the optimum pH of the enzyme. The results lead to the possibility of using simple immobilization method for thermostable lipases to use in water-poor media at elevated temperature.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved