บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย "การพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้โดยจุลชีพที่แยกจากน้ำพุร้อนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์"

ผู้เขียนรายงานการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

เอนไซม์ไลเปสมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมไขมันเนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงคุณภาพอาหารประเภทน้ำมันและไขมันโดยการย่อยสลายไขมันได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอร์ไรด์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาสูง ปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าวิธีย่อยสลายทางเคมีซึ่งใช้อุณหภูมิสูงถึง 220°C และความดันสูง นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหลายอย่างและสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ในภาวะที่มีน้ำน้อยซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารเคมี ในการวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสได้สูงที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่มาทำการศึกษาเพื่อพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์

ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสนอกเซลล์ได้มากกว่าไอโซเลทอื่นๆ ที่แยกได้มา 5 ไอโซเลท คือ P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 มาศึกษาการผลิต และลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างเหมาะสมและมีประโยชน์สูงสุดต่อไป ในแง่การผลิตได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทที่ 65°ซ ในอาหาร 3 สูตร สูตร A ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์ เปปโตน และน้ำมันมะกอก สูตร B ประกอบด้วยแบคโต-เปปโตน สิ่งสกัดจากยีสต์ soymeal น้ำมันมะกอก, Triton X-100, K_2HPO_4, $MgSO_4$ และ Na_2CO_3 และสูตร C คือสูตร A ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ 50% โดยปริมาตร เทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทเจริญได้ดี และผลิตไลเปสได้สูงในอาหารสูตร A และการผลิตไลเปสในอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์นั้นจะมีปริมาณลดลงตามค่า log P ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมอยู่ ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท จะค่อนข้างเสถียรต่อความร้อนในช่วงพีเอชที่กว้างจาก 4.0-10.0 มีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานกว้าง (pH 6.0-8.0 และอุณหภูมิ 40-80°C ตามลำดับ) ความคงทนของเอนไซม์ในพีเอชที่เป็นทั้งกรดและเบสนี้ที่อุณหภูมิสูงชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ในการนำไปใช้ในผงซัก-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟอกที่ใช้กับงานซักล้างที่อุณหภูมิต่าง ๆ และงานทางชีวสังเคราะห์ ไลเปสจากทั้ง 5 ไอโซเลทมีรูปแบบเหมือนกันในการสลายสับสเตรทไขมันและน้ำมันชนิดต่าง ๆ คือ มีความจำเพาะต่อการสลายน้ำมันในช่วงกว้างโดยที่จะมีความจำเพาะมากต่อการไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของกรดโอเลอิคมากกว่ากรด ไขมันชนิดอื่น ๆ

ได้ทดสอบแอคติวิตีและเสถียรภาพของไลเปสนอกเซลล์จากเทอร์มอไฟล์ P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 เมื่อมีไอออนโลหะ ตัวยับยั้งและสารลดแรงตึงผิวบางชนิด พบว่าไอออน Co^{2+} และ Ag^{+} ยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดและ Zn^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสจาก TP614 ได้ดี เอนไซม์มีความคงทนมากขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะที่มีไอออน Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Pb^{2+} ทั้ง EDTA, EGTA และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 mM ต่างก็ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ในภาวะที่มี PMSF เข้มข้น 10 mM แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งบางส่วนยกเว้นไลเปสจาก TP614 จะถูกยับยั้งทั้งหมด ในขณะที่ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อมี Triton X-100 เข้มข้น 4% (v/v) และยูเรียเข้มข้น 3M และจะสูญเสียแอคติวิตีเกือบทั้งหมดเมื่อมี SDS เข้มข้นมากกว่า 0.5% (w/v) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสเหล่านี้ไม่มีส่วนจับแคลเซียมในโมเลกุล และไม่เป็นเมทัลโลโปรตีน กรดอะมิโนเซรีนอาจเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่พันธะไดซัลไฟด์ไม่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา Triton X-100 และยูเรียที่ความเข้มข้นแน่นอนค่าหนึ่ง สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ SDS จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ

ได้ทดลองการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการแยกยีนสำหรับการสร้างไลเปสจากแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ P1, TP404 และ TP811 ใส่เข้าไปในพาหะ pUC19 แล้วโคลนเข้าไปในแบคทีเรีย E. coli DH5α แล้วคัดเลือกโดยดูวงใสรอบโคโลนีบน Tributyrin agar plate ได้โคลนมา 3 ชนิด ชื่อ pUCP1, pUC-TP404 และ pUCTP-811 ตามลำดับ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเทียบกับ Native strains พบว่าโคลนทั้งสามสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์โดยมีแอคติวิตีเป็น 2 เท่าของสายพันธุ์ธรรมชาติ ซึ่งแสดงว่าการแสดงออกของยีนยังต่ำอยู่ต้องทำการปรับปรุง การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของไลเปสจากโคลนทั้งสามเทียบกับสายพันธุ์ธรรมชาติพบว่าเหมือนกันทุกประการแสดงว่าการโคลนยีนประสบผลสำเร็จแต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น

ผลการศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสนั้นยังไม่ได้ผลดีเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่นำมาศึกษายังมีปริมาณต่ำจะต้องหาวิธีปรับปรุงการแยกบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณผลผลิตสูง และมีความบริสุทธิ์สูงโดยใช้ขั้นตอนน้อย ๆ เพื่อนำไปศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title Development of Thermostable Lipases Production from Hot Spring Thermophiles Applicable for Fat and Oil Industry and / or Bioorganic Synthesis

Report by Associate Professor Dr.Suree Phutrakul

Lipases are useful enzymes for fat industries since they play an important role in modification of fat and oil for food industries. The main advantages of using lipases for hydrolysis of fats and oils over the conventional high pressure stream for fat splitting are a cleaner product due to a more specific reaction and a lower energy requirement. Enzymatic reaction at lower temperature is being developed to replace the reaction process at 220°C for the industrial production of high value fatty acids and glycerides. Furthermore, lipases can catalyze the synthetic reaction in organic media at low water content which open the possibility of bioorganic synthesis for industrial application. In this study a number of thermophilic bacteria producing high lipase activity isolated from hot spring in Chiang Mai have been selected for development of thermostable lipase production applicable for fat and oil industry and/or bioorganic synthesis.

Five isolates of thermophilic bacteria producing higher lipase activity than other isolates to study the enzyme production and characteristic of the enzymes for their potential application in industries. For lipase production, the thermophiles were comparatively cultured at 65°C in there liquid media containing yeast extract, tryptone and olive oil in base mixture (medium A); bacto-peptone, soymeal, yeast extract, oilve oil, Triton X-100, K_2HPO_4, $MgSO_4$ and Na_2CO_3 in distrilled water (medium B); and medium A containing 50% v/v of organic solvents (medium C). The thermophile could grow and produce the highest lipolytic activity in medium A. The productivity of the enzyme in medium C were gradually decrease from high to low log P values of organic solvents when compared to the enzymes productivity in medium A. Most of the thermostable lipases had a wide range of optimum pH and temperature (pH 6.0-8.0 and 50-80°C) with the maximum activity around pH 7.2 at 65°C. The enzymes were fairly stable in the pH range from 4.0-10.0 at 70°C for 1 h. The stability of the enzymes in acidic and alkali pH and at high temperatures indicates their usefulness for applications in a heavy-duty laundry and bioorganic synthesis. Hydrolytic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

activity of lipases on various oil and pure triglyceride substrates at their optimum conditions indicates that the enzyme from five bacterial isolates have broad substrate specificity and more specific to ester bond of oleic acid. Extracellular lipases from thermophile isolates P1, TLS63, TP404, TP614 and TP811 were tested for the activity and stability in the presence of some metal ions, inhibitors and surfactants. All the lipases were generally inhibited by Co^{2+} and Ag^{+}, and lipase from TP614 was markedly inhibited by Zn^{2+} while Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Pb^{2+} could stabilized the lipolytic activities after pre-incubated at 30°C for 24 h. The lipases were neither inhibited by 10 mM EDTA and EGTA nor activated by 10 mM $CaCl_2$. In the presence of 10 mM PMSF, the enzymes were partially inhibited except lipase from TP614 was completely inhibited whereas 10 mM 2-mercaptoethanol caused no significant inhibition of lipolytic activity. Enzymes activity were significantly enhanced about 2 folds by 4% (v/v) Triton X-100 and 3M urea and strongly inhibited by 0.5% (w/v) of sodiumdodecyl sulfate (SDS). The results suggest that a calcium binding site do not exist and the enzymes are not metalloproteins. The involvement of a serine residue in the catalytic triads of the enzymes is possible but disulfide bonding is not necessary to the catalytic function. The lipase activity is activated by certain concentration of Triton X-100 and urea but deactivated by SDS.

Cloning of lipase genes from 3 isolates of thermophilic bacteria (P1, TP404 and TP811) had been investigated using pUC19 as vector and cloned into E. coli DH5α and selected the clons that produce clear zone on tributyrin agar plate named as pUCP1, pUCTP404 and pUCTP811 respectively. The three clones could produce lipase activities 2 times higher than the native strains which indicates low expression of the enzyme. The properties of the enzymes from the tree cleaned had been found to similar to the lipase from native strains which may indicate that the cloning process was success. However, the expression and secretion of the lipases have to be improved.

Purification of extracellular lipases from Thermophiles had not yet been success due to low amount of enzymes were used. More detail experiments are needed to get the efficient purification process that give higher purified enzyme with higher yield.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved