

บทคัดย่อ

เรื่อง การพัฒนาการผลิตและการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์เพื่อการแปรรูปไขมันและน้ำมัน
ผู้เขียน ภาวินี กณาสวัสดิ์

โครงการวิจัยนี้ได้สังเกตเห็นประโยชน์ของการใช้ทรัพยากรในท้องถิ่น เช่น บ่อน้ำร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งนี้เพื่อแยกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสสำหรับการแปรรูปไขมันและน้ำมันจากของเสียในอุตสาหกรรมผลิตแทนมให้เป็นสารที่มีราคา เช่น กรดไขมันและเอสเทอร์ของมัน โครงการนี้วางแผนไว้ 2 ปี ในปีแรก แบคทีเรียที่ผลิตไลเปสได้ถูกแยกจากตัวอย่างดินและน้ำ 10 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บมาจากบ่อน้ำร้อนเทพพนม ป่าแป๋ และฝาง แบคทีเรีย 5 ชนิด ถูกคัดเลือกจาก 38 ชนิด ด้วยการเปรียบเทียบบริเวณเสียน้ำเงินเขียวบนอาหารวุ้น แบคทีเรีย T63 ถูกเลือกไว้เพื่อการเตรียมไลเปส เนื่องจากสามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้มากที่สุด การเลี้ยงแบคทีเรีย T63 ในอาหาร 1 ลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอก 3% โคบน้ำหนัก/ปริมาตร และสิ่งสกปรกจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.25% ในสารละลายเบสผสม (0.1% Titriplex L, 0.2% $MgCl_2$, 0.04% $CaSO_4$, 0.5% 10 mM ferric citrate ที่ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 6 M NaOH) ที่ $65^{\circ}C$ 24 ชั่วโมง ทำให้ได้เซลล์เปียก 7 กรัม และโปรตีน 9.4 มก พร้อมกับไลเปสแอกติวิตี 2470 หน่วยในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ไลเปสมีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ $60-70^{\circ}C$ และพีเอช 6 หลังจากเก็บไว้ที่ $40^{\circ}C$ 1 ชั่วโมง ทำให้แอกติวิตีลดลงมากกว่า 50% การระเหิดแห้งสารละลายไลเปสดิบ 1 ลิตร ทำให้ได้ไลเปสผง 7.02 กรัม ซึ่งมีแอกติวิตีเหลือ 90.01%

ในปีที่สอง ไลเปสได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ของ Sephadex G-100, affinity thermoprecipitation ด้วย Eudragit-Cibacron blue และระบบนำสองวัฏภาค การทำบริสุทธิ์ด้วยระบบนำสองวัฏภาค 2 ระบบ ต่อเนื่องกัน ซึ่งใช้ 7% PEG - 7% เด็กแทรน และ 7% PEG - 7% $(KH_2PO_4-K_2HPO_4)$ ทำให้ได้ไลเปสบริสุทธิ์ 9.1 เท่า และมีผลผลิต 69% ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีที่สุดในบรรดา 3 วิธี ไลเปสบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 15,400 ดาลตัน โดยมีแอกติวิตีสูงสุดที่ $70^{\circ}C$ และพีเอช 6 แอกติวิตีลดลง 20% หลังจากบ่มที่ $70^{\circ}C$ 2 ชั่วโมง การศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและเอทาโนไลซิสด้วยไลเปสพบว่า ไลเปส *Candida cylindracea* ตรึง ไลเปส *Pseudomonas fluorescens* ตรึง และ Lipozyme บ่งชี้ว่าการเติมน้ำ 5-10% ลงในเอนไซม์ตรึงและการใช้ตัวทำละลายร่วม ทำให้ได้ผลผลิตของเอสเทอร์เพิ่มขึ้น ไลเปสดิบและไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย T63 ถูกตรึงบนซิลิกา ก่อนที่จะใช้สังเคราะห์เอทิล-เอสเทอร์โดยเอสเทอร์ฟิเคชันและเอทาโนไลซิส ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่า 10% การบ่งชี้ชนิดของเอสเทอร์โดย GC-MS พบว่าเอทาโนไลซิสของน้ำมันหมู่มหาทำให้ได้เอทิลเอสเทอร์ของไมริสเททพาลมิเตท โอลิเอท และสเตียเรท ดังนั้นเพื่อทำให้ได้ผลผลิตของเอสเทอร์จากการเปลี่ยนน้ำมันหมู่มหาด้วยไลเปสจากแบคทีเรีย T63 สูงขึ้น ควรจะต้องปรับปรุงผลผลิตของการเตรียมไลเปสและผลผลิตการสังเคราะห์เอสเทอร์ในโครงการวิจัยในอนาคต

ABSTRACT

Title Development of Production and Utilization of Lipase from Thermophilic Microorganism for Conversion of Fat and Oil

Author Pawinee Kanasawud

The aim of this project focus on the utilization of the natural resource such many hot-well in Chiang Mai in order to isolate the thermophilic bacteria producing lipase for the conversion of fat and oil from the waste of the sour pork industries to the higher valuated compounds such as fatty acids and its esters. This project planned for 2 years. In the first year, lipase producing bacteria were isolated from ten samples of soil and water collected from the hot-well of Teppanom, Papae and Fhang. Five bacteria were selected from thirty-eight isolates by the comparison of bluish-green zone on agar media. Bacteria T63 was chosen for lipase preparation since it produced the highest extracellular lipase activity. The cultivation of Bacteria T63 in one litre of medium containing 3% w/v olive oil and 0.25% of yeast extract and tryptone each in base mixture (0.1% Titriplex I, 0.2% $MgCl_2$, 0.04% $CaSO_4$, 0.5% 10 mM ferric citrate and adjust pH 7.2 with 6 M NaOH) at 65°C 24 hours, provided 7 g wet cell and 9.4 mg protein with 2470 units of lipase activity in cultivation medium. The activity of lipase was maximum at 60-70°C and pH 7. After keeping at 40°C 1 hour, lipase activity was decreased more than 50%. Lipase powder of 7.02 g was obtained with 90.01% activity after lyophilization of one litre of crude lipase.

In the second year, lipase was purified by a Sephadex G-100 column, an affinity thermoprecipitation with Eudragit-cibacron blue and the aqueous two-phase. The purification by the two systems of the aqueous two-phase in consequent : 7% PEG -7% dextran and 7% PEG - 10% (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) resulted a purified lipase with purification fold of 9.1 and 69% yield. This method is the best among the three techniques. Purified lipase possessed molecular weight at 15,400 daltons with the maximum activity at 70°C and pH6. The activity was decreased to 20% after incubation at 70°C for 2 hours. The study on lipase-catalyze esterification and ethanolysis by immobilized *Candida cylindracea* lipase, immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase and Lipozyme indicated that 5-10% water added to immobilized enzyme and the using of co-solvent could be enhanced the esters yield. Crude and purified lipase from Bacteria T63 were immobilized on celite before using in ethyl ester synthesis by esterification and ethanolysis. Less than 10% yield were obtained. The identification of ethyl ester by GC-MS indicated that ethanolysis of lard yielded ethyl esters of myristate, palmitate, oleate and stearate. Therefore, in order to obtain the higher yield of esters from the conversion of lard by lipase from Bacteria T63, the improvement of lipase preparation yield and ester synthesis yield will be needed for the future project.