ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการหาลักษณะเฉพาะของไลเปสที่ทนความร้อนจากเทอร์มอฟิลิค Thermus

ชื่อผู้เขียน นางสาวกนกพร บุญเผื่อน

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี คณาสวัสดิ์ กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิโชค แสงโสดา กรรมการ

บทคัดย่อ

เทอร์มอฟิลิคแบคทีเรีย Thermus T20 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ มีความสามารถในการผลิตไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์ได้ และผลิตโปรติเอสในปริมาณต่ำ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยสารละลายเบสผสม 10% (v/v) 0.2M phosphate buffer pH 7.2 10% (v/v) nutrient broth 0.25% (w/v) และน้ำมันมะกอก 0.5% (v/v) ในปริมาตร 1 ลิตร ในshake flask โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงปริมาตร 1% (v/v) ที่อุณหภูมิ 65°ซ ใช้ความเร็วในการเขย่า 200 รอบ/นาที เทอร์มอไฟล์จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในชั่วโมงการเลี้ยงที่ 55 โดยมีไลเปสแอคทิวิตี 0.45 U/ml เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเทอร์มอไฟล์ใน fermentor ขนาด 1.5 ลิตรในปริมาตร 1 ลิตรโดยใช้เวลาการเลี้ยงเท่ากัน มีอัตราการหมุนของใบพัด 200 รอบ/นาทีเท่ากัน และมีอัตราการให้อากาศ 150 มล./นาที เทอร์มอไฟล์ผลิตไลเปสได้ 0.65 U/ml ซึ่งเป็นอัตราการผลิตไลเปสที่สูงกว่าการเลี้ยงใน shake flask เล็กน้อย การมีไลเปสแอคทิวิตีเพิ่มขึ้นนี้น่าจะเนื่องมาจากการให้อากาศเพิ่มเข้าไปและระบบการกวนจะทำให้น้ำมันแพร่กระจายได้ดีกว่าการเขย่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาการตรึงเซลล์ Thermus T20 เพื่อการผลิตไลเปสโดยใช้วิธีการตรึงแบบ adsorption บนเม็ดเซรามิกส์และชิ้นฟองน้ำและการตรึงแบบ entrapment ในแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อหาค่าความพรุนของวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์แบบ adsorption พบว่าเม็ดเซรามิกส์ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาด 2.0 x 25.0 ซม หนัก 52.9 กรัม มีความพรุน 0.096 ซม^3/กรัม สามารถดูดซับเซลล์เปียกได้สูงสุด 0.185 กรัม ส่วนชิ้นฟองน้ำที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดเดียวกัน หนัก 3.57 กรัม มีความพรุน 27.08 ซม^3/กรัม สามารถดูดซับเซลล์เปียกได้สูงสุด 0.406 กรัม เมื่อศึกษาการผลิตไลเปสจากเซลล์ตรึงบนพาหะทั้ง 3 ชนิดในระบบต่อเนื่องพบว่า เซลล์ตรึงบนฟองน้ำผลิตไลเปสได้สูงสุด 0.52 U/ml รองลงมาได้แก่เซลล์ตรึงบนเม็ดเซรามิกส์ 0.34 U/ml เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ที่ถูกดูดซับได้น้อยกว่า ส่วนเซลล์ตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตไม่ผลิตไลเปสในระบบต่อเนื่อง เมื่อเลี้ยงเซลล์ตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตในระบบ batch พบว่าเซลล์ตรึงผลิตไลเปสได้สูงสุด 1.22 U/ml ซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่ผลิตไลเปสได้สูงสุด 0.54 U/ml เนื่องจากเซลล์ตรึงมีปริมาณเซลล์อยู่มากกว่าและไลเปสแอคทิวิตีที่ได้จะมาจากทั้งการผลิตของเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ตรึงและการผลิตของเซลล์ที่เจริญและหลุดออกจากเซลล์ตรึงมาเป็นเซลล์อิสระในน้ำเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรึงดังที่กล่าวมาทั้งหมด เซลล์ตรึงแบบ entrapment ในแคลเซียมอัลจิเนตที่เลี้ยงในระบบ batch จะผลิตไลเปสได้สูงกว่าเซลล์ตรึงแบบ adsorption บนเม็ดเซรามิกส์และชิ้นฟองน้ำ เนื่องจากมีปริมาณเซลล์สูงกว่าและการเลี้ยงในระบบ batch จะช่วยลดปัญหาการแยกตัวลอยสูงขึ้นของน้ำมัน ขณะผ่านเข้าในคอลัมน์ที่มักเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในระบบต่อเนื่อง

การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ได้จาก Thermus T20 พบว่าเป็นไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65°ซ pH 7.2 สามารถทนต่อความร้อนจากการแช่นานเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 65°ซ โดยคงเหลือแอคทิวิตี 50% ของแอคทิวิตีเริ่มต้น ความเสถียรของเอนไซม์ต่อการทำเอนไซม์ให้ข้นขึ้น โดย ultrafiltration นั้นจะมีแอคทิวิตีเหลือ 32% ของแอคทิวิตีเริ่มต้น แต่ไม่มีความเสถียรเมื่อทำเอนไซม์ให้ข้นขึ้นโดย lyophilization เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์แล้วทำ dialysis ตามด้วยการตกตะกอนด้วยกรดและการผ่าน gel filtration สามารถแยกไลเปสแอคทิวิตีพีคออกเป็น 3 พีคด้วยกัน และเอน-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมาก โดยมีค่า purification fold ของไลเปสทั้งสามพีคสูงถึง 53 171.2 และ 48.48 และมี specific activity เป็น 17.48 56.5 และ 16.0 U/mg protein ตามลำดับ เมื่อหามวลโมเลกุลของไลเปสโดยวิธี gel filtration และ SDS-PAGE พบว่ามีไลเปสอยู่ 3 ขนาดด้วยกัน ได้แก่ ขนาดที่มวลโมเลกุลสูงกว่า 232,000 ขนาด 46,500 และขนาด 16,000 ดาลตันตามลำดับ อย่างไรก็ดีการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสเช่น ความจำเพาะต่อตำแหน่งในการเร่งปฏิกริยา ความจำเพาะต่อชนิดของสับสเตรท และความสามารถในการเร่งปฏิกริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ น่าจะได้มีการศึกษาต่อไปเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Tittle Production and Characterization of a Thermostable Lipase from a Thermophilic Thermus

Author MS. Kanokporn Boonpuan

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr.Suree Phutrakul Chiarman

Assoc. Prof. Dr.Pawinee Kanasawud Member

Assist. Prof. Dr.Siddhichoke Sangsoda Member

Abstract

Thermophilic bacteria Thermus T20 isolated from Tepanom hot spring in Chiang Mai could produce significant extracellular lipase activity and low protease activity in a medium containing 10% (v/v) base mixture, 10% (v/v) 0.2 M phosphate buffer pH 7.2, 0.25% (w/v) nutrient broth and 0.5% (v/v) olive oil in 1l shake flask. The bacterium was precultured for 24 h and 1% (v/v) was inoculated and cultured at 65°C, 200 rpm. The maximum lipase activity (0.45 U/ml) was produced after cultivation for 55 h. Production of lipase (0.65 U/ml) was slightly higher when the bacterium was cultured in 1l medium using 1.5 l fermentor at the same condition including aeration at the flow

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

rate of 150 ml/min. This might be due to the effective aeration and agitation system in the fermentor.

Comparison study on cell immobilization of Thermus T20 for production of lipase by adsorption on ceramic beads and sponge and entrapment in calcium alginate was made. The porosity of 52.9 g ceramic beads that contained in 2.0 x 25.0 cm column was 0.096 cm^3/g and could adsorb 0.185 g of wet cells but 3.57g of sponge contained in same column has porosity 27.08 cm^3/g and could adsorb 0.406 g of wet cells. Studied on production of lipase from immobilized cells on the three supports in continuous system found that cell immobilized on sponge produced highest lipase activity (0.62 U/ml), and lower lipase activity was produced from immobilized cell in ceramic beads (0.34 U/ml) because of the lower amount of wet cells adsorbed, however cell entrapped in calcium alginate beads did not produce lipase in continuous system. The cultivation of cells entrapped in calcium alginate beads in batch system produced lipase activity (1.22 U/ml) higher than free cells (0.54 U/ml) dued to the higher amount of cells were entrapped and lipase activity in culture medium obtained both from the immobilized cells and the leaked cells which grow in the medium as free cells. Cells entrapped in calcium alginate beads cultivated in batch system seemed to produce higher lipase activity than cells adsorption on ceramic beads and sponge dued to the higher amount of cells and the cultivation in batch system decreased the separation of oil to flow to the upper part of the column which easily occurred in the continuous system.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Some properties of the lipase produced from Thermus T20 were studied. It was found that the optimum temperature and pH are 65°C and 7.2 respectively. The enzyme could be stable up to 65°C when incubated for 1 h and 50% of the activity remained. Thirty two percents of the activity remained when concentrated the enzyme by ultrafiltration and no activity left by lyophilization. Partial purification of the enzyme by alcohol precipitation, dialysis, pH precipitation and gel filtration gave 3 lipase activity peaks with high purification folds 53, 171.2 and 48.48 and specific activity 17.48, 56.5 and 16.0 U/mg protein respectively. Determination for molecular weight of lipases by gel filtration and SDS-PAGE found 3 types of lipases with molecular weight of 232,000, 46,500 and 16,000, respectively. Detail study on other properties of lipase including position specificity, substrate specificity and catalization of the enzyme in organic solvents are needed for proper industrial application.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved