ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ TLS 63 ให้บริสุทธิ์และการหาลักษณะเฉพาะ

ชื่อผู้เขียน นางสาวพรทิพพา อังคนุรักษ์พันธุ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี คณาสวัสดิ์ ประธานกรรมการ

อาจารย์ ดร.บัณฑิต ลีละศาสตร์ กรรมการ

อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ กิจจนะพานิช กรรมการ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ TLS 63 สามารถผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ส่งออกนอกเซลล์ 2,470 ยูนิต/ลิตร ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 65°ซ 24 ชั่วโมง ไลเปสดิบที่เข้มข้นขึ้นด้วยไลโอฟิไลเซชันมีแอคติวิตีคงเหลือ 90% การสกัดไลโอฟิไลส์ไลเปสด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค 7%PEG — 7%Dx และ 7%PEG — 10%(KH_2PO_4 — K_2HPO_4) ต่อเนื่องกัน ทำให้ได้ไลเปสบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.1 เท่าและแอคติวิตีของไลเปสคงเหลือ 69% การแยกไลโอฟิไลส์ไลเปสด้วยคอลัมน์ของ Sephadex G—100 ได้ไลเปสบริสุทธิ์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.9 เท่า และแอคติวิตีคงเหลือ 64% การตกตะกอนไลเปสบริสุทธิ์ด้วย Eudragit-Cibacron blue ความบริสุทธิ์ของไลเปสลดลงเหลือ 0.9 เท่า และมีแอคติวิตีคงเหลือ 13% ไลเปสบริสุทธิ์มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 70°ซ และพีเอช 6 ตามลำดับ มีแอคติวิตีเหลือ 20% ภายหลังบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ 1 ชั่วโมง และพบมวลโมเลกุลที่ 15,400 ดาลตันโดย SDS — PAGE

การศึกษาเอสเตอริฟิเคชัน และเอทาโนไลซีสโดยไลเปสต่าง ๆ พบว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* ซึ่งตรึงบนซีไลท์ (A_w = 0.41, C_w = 0.55%) ที่เพิ่มน้ำ 10% w/w เร่งเอสเตอริฟิเคชันของกรดพาลมิติคและกรดโอลีอิคได้ดีที่สุดในเอทานอล — เฮกเซน และเอทานอล — อีเธอร์ที่ 30°ซ ได้เอทิลพาลมิเตท และเอทิลโอลีเอท 20.6 และ 14.4% ตามลำดับ แต่ไม่มีแอคติวิตีต่อเอทาโนไลซีสของไตรโอลีอิน ในขณะที่ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ตรึง (A_w = 0.21, C_w =

0.35%) ที่เพิ่มน้ำ 10% w/w เร่งเอสเตอริฟิเคชันที่ 30°ซ ของกรดพาลมิติคในเอทานอล และกรดโอลีอิคในเอทานอล — เพนเทน ได้เอทิลพาลมิเตท 61.5% และเอทิลโอลีเอท 61.4% ตามลำดับ นอกจากนั้นได้พบเอทิลโอลีเอท 47.7% และเอทิลเอสเตอร์ทั้งหมด 63.2% จากเอทาโนไลซีสของไตรโอลีอินในเอทานอล — ไอโซออคเทนและของน้ำมันหมูในเอทานอล — คลอโรฟอร์มตามลำดับ การวิเคราะห์ด้วย GC — MS พบเอทิลไมริสเตท เอทิลพาลมิเตท เอทิลโอลีเอท และเอทิลสเตียเรทในเอทิลเอสเตอร์จากเอทาโนไลซีสของน้ำมันหมู ส่วน Lipozyme IM 20 (A_w = 0.15, C_w = 3.78%) ที่เพิ่มน้ำ 5% w/w เร่งเอสเตอริฟิเคชันของกรดโอลีอิคและกรดพาลมิติคในเอทานอลที่ 30°ซ ได้เอทิลโอลีเอท 87.3% และเอทิลพาลมิเตท 41.4% ตามลำดับ ในขณะที่เอทาโนไลซีสของไตรโอลีอินได้เอทิลโอลีเอท 39.4% เอทาโนไลซีสของน้ำมันหมูในเอทานอล — คลอโรฟอร์มโดย Lipozyme ที่เพิ่มน้ำ 10% w/w ได้ผลผลิตเอทิลเอสเตอร์ 45.8% ไลเปสดิบและไลเปสบริสุทธิ์จาก TLS 63 ซึ่งตรึงบนซีไลท์ (A_w = 1.02, C_w = 5.22% และ A_w = 0.50, C_w = 0.18% ตามลำดับ) เร่งเอสเตอริฟิเคชันของกรดบิวทีริคและกรดโอลีอิค รวมทั้งเอทาโนไลซีสของไตรบิวทีริน และไตรโอลีอินได้ผลผลิตเอทิลเอสเตอร์ที่ต่ำกว่า 10%

Thesis Title Purification and Characterization of Lipases from Thermophile TLS 63

Author Miss Porntippa Ungkanurukpun

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Pawinee Kanasawud — Chiarman

Dr. Bundit Leelasart — Member

Dr. Pirote Kitchanapanitch — Member

Abstract

Thermophilic bacteria TLS 63 could produce thermostable extracellular lipases 2,470 units/l in liquid medium containing olive oil as carbon source at 65°C for 24 hours. Lyophilization of crude lipases provided 90% the residual activity. Extraction of lyophilized lipase with the aqueous two—phase system of 7%PEG — 7%Dx and 7%PEG — 10%(KH_2PO_4—K_2HPO_4) in consequently resulted in a purified lipase with the purification of 9.1 folds whereas the recovery activity was 69%. Separation of lyophilized lipase with Sephadex G—100 gave a purified lipase with the purification of 2.9 folds and 64% recovery activity. Precipitation of lyophilized lipase with Eudragit—Cibacron blue, purification of purified lipase decreased in 0.9 folds and the recovery activity was 13%. Purified lipase showed the optimum temperature at 70°C, the optimum pH 6, 20% residual activity after incubation at 70°C 1 hour, and its molecular mass of 15,400 daltons was obtained according to SDS — PAGE.

The study of esterification and ethanolysis by various lipases indicated that at 30°C immobilized *Candida cylindracea* on Celite (A_W 0.41, C_W 0.55%) with water added 10% (w/w) catalyzed the best esterification of palmitic acid (in ethanol — hexane) and oleic acid in ethanol — ether to produce ethyl palmitate 20.6% and ethyl oleate at 14.4% respectively. But it could not catalyze ethanolysis of triolein. Whereas immobilized *Pseudomonas fluorescens* (A_W 0.21, C_W 0.35%) with water added 10% (w/w) catalyzed the esterification at 30°C of

palmitic acid in ethanol and oleic acid in ethanol — pentane to obtain ethyl palmitate 61.5 and ethyl oleate 61.4% respectively. Furthermore 47.7% ethyl oleate and 63.2% total ethyl ester were performed by ethanolysis of triolein in ethanol — isooctane and lard in ethanol — chloroform respectively. The GC—MS analysis indicated that the ethyl esters from ethanolysis of lard contained ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl oleate and ethyl stearate. Lipozyme IM 20 (A_W 0.15, C_W 3.78%) with 5% water catalyzed the esterification of oleic acid and palmitic acid in ethanol at 30°C to produce 87.3% ethyl oleate and 41.4% ethyl palmitate respectively. Whereas its ethanolysis of triolein yielded 39.4% ethyl oleate. Ethanolysis of lard in ethanol — chloroform by 10% water added Lipozyme induced 45.8% ethyl esters. Crude lipase and purified lipase of TLS 63 immobilizing on Celite (A_W 1.02, C_W 5.22% and A_W 0.50, C_W 0.18% respectively) catalyzed the esterification of butyric acid and oleic acid, and also the ethanolysis of tributyrin and triolein with only lower than 10% yield of ethyl esters obtained.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University