ชื่อวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์ชูการ์เอสเทอร์และเมธิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มและกรดไขมันที่ได้จากการทำบริสุทธิ์น้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสองชนิด

ผู้เขียน นายทนงศักดิ์ ไชยาโส

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

การคัดเลือกไลเปสทางการค้า 8 ชนิดสำหรับการสังเคราะห์ชูการ์เอสเทอร์ (Sugar esters, SE) จากกลูโคสและกรดปาล์มมิติกในอะซิโตน พบว่า Novozym 435 (หรือ lipase B ตรึงรูปทางการค้าจากเชื้อ *Candida antarctica*) เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น เมื่อทำการสังเคราะห์ชูการ์เอสเทอร์โดยใช้กลูโคสเป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl acceptor) กับน้ำมันปาล์มหรือกรดไขมันที่ได้จากการทำบริสุทธิ์น้ำมันปาล์ม (PFAD) เป็นตัวให้หมู่เอซิล (acyl donor) โดยใช้ Novozym 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเฉพาะ PFAD เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสเอสเทอร์ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์กลูโคสเอสเทอร์ของ PFAD คือ สังเคราะห์ในอะซิโตน ค่าวอเทอร์แอคติวิตี้ (water activity, a_w) 0.07 ปริมาณตัวดูดซับน้ำ (molecular sieves, 4°A) 1 กรัม อัตราส่วนโมลของกลูโคสต่อ PFAD เป็น 1:1 (0.5:0.5 มิลลิโมลต่อมิลลิโมล) เอนไซม์ Novozym 435 ปริมาณ 75 มิลลิกรัม (750 ยูนิต) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกลูโคสเอสเทอร์ของ PFAD ได้สูงสุดร้อยละ 76.3 หรือ 31.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตัวทำละลาย ที่ 72 ชั่วโมง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสจำนวน 303 สายพันธุ์ พบว่ามีจุลินทรีย์จำนวน 8 สายพันธุ์เท่านั้นที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้แก่ สายพันธุ์ PSU-AH55 PSU-AH56 PSU-AH130 PSU-AH191 PSU-AH192 ME168 และ ME177 โดยสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีค่ากิจกรรมคือ 0.06 0.10 2.66 0.35 0.37 0.09 0.30 และ 0.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ข้างต้นบนซีไลท์สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ SE พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อสายพันธุ์ ME168 สามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ของกลูโคสโดยใช้ไวนิลอะซิเตต ไวนิลบิวทีเรตและไวนิลคาโปรเอตเป็นตัวให้หมู่เอซิล ในตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของเทอร์เทียรีบิวทานอลต่อไพริดีน (*tert*-butanol/pyridine) ในอัตราส่วน 55:45 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ของกลูโคสได้สูงสุดร้อยละ 93.4 66.7 และ 56.2 ตามลำดับ

จากการศึกษาการสังเคราะห์ SE โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อสายพันธุ์ ME168 โดยเปรียบเทียบการใช้ตัวรับหมู่เอซิล 6 ชนิดและตัวให้หมู่เอซิล 6 ชนิด พบว่ากลูโคสเป็นตัวรับหมู่เอซิลที่ดีและไวนิลคาโปรเอตเป็นตัวให้หมู่เอซิลที่ดี โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์กลูโคสคาโปรเอต คือ ทำการสังเคราะห์ในตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของเทอร์เทียรีบิวทานอลต่อไพริดีนในอัตราส่วน 55:45 โดยปริมาตร อัตราส่วนโมลของกลูโคสต่อไวนิลคาโปรเอตเป็น 1:1 (0.3:0.3 มิลลิโมลต่อมิลลิโมล) ค่า a_w 0.33 ปริมาณตัวดูดซับน้ำ 0.5 กรัม ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 100 ยูนิต อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์กลูโคสคาโปรเอตได้ร้อยละ 82.0 หรือ 25.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตัวทำละลาย ที่ 72 ชั่วโมง

เมื่อทำการเทียบเคียงเชื้อสายพันธุ์ ME168 โดยใช้การเรียงตัวของลำดับเบสของ 16 เอสอาร์ดีเอ็นเอ พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกับของเชื้อ *Streptomyces thermocarboxydus* ร้อยละ 99.9 (1,465/1,466 bp) ดังนั้นจึงเทียบเคียงเชื้อนี้เป็น *S. thermocarboxydus* ME168 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์นี้ในอาหารM65ดัดแปลง พบว่าส่วนประกอบอาหารที่เหมาะสม (ต่อลิตร) คือ กากน้ำตาล 8 กรัม มอล์ทสกัด 10 กรัม ยีสต์สกัด 4 กรัม น้ำมันปาล์ม 10 กรัม โดยใช้กัมอะราบิก 1 กรัมเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ พีเอชเริ่มต้น 7.5 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ เขย่าที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (3.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และปริมาณเซลล์โปรตีนสูงสุด (0.98 กรัมต่อลิตร)

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *S. thermocarboxydus* ME168 โดยผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตน โครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (Resource Q) และเจลโครมาโตรกราฟฟี (Superdex 200) ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.6 เท่า และเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 20.3 เอนไซม์ไลเปสที่ได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตันโดย SDS-PAGE เอนไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 8.5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง 5-9 ทนอุณหภูมิในช่วง 35-45 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 180 นาที ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ คือ 0.28 มิลลิโมลาร์ และ 1,428 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตามลำดับ โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรต เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl esters ที่มีกรดไขมันสายปานกลางและสายยาว (C_8-C_{16}) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย Zn^{2+} dithiothreitol EDTA และตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เอธานอล เทอร์เทียรีบิวทานอลและไพริดีน

แบคทีเรียสายพันธุ์ PSU-AH130 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง เมื่อใช้ในการผลิตกลูโคสคาโปรเอต พบว่าให้ปริมาณผลผลิตค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์ PSU-AH130 สามารถใช้ในการสังเคราะห์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) จากน้ำมันปาล์มและ

เมธานอลได้ดี เมื่อทำการเทียบเคียงเชื้อสายพันธุ์ PSU-AH130 โดยใช้การเรียงตัวของลำดับเบสของ 16 เอสอาร์ดีเอ็นเอ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับของเชื้อ *Burkholderia multivorans* ร้อยละ 99.5 (1,482/1,490 bp) ดังนั้นจึงเทียบเคียงเชื้อนี้เป็น *B. multivorans* PSU-AH130

ตัวพยุงที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *B. multivorans* PSU-AH130 คือ Accurel EP100 โดยให้ค่ากิจกรรมการย่อยเป็น 0.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต FAME โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *B. multivorans* PSU-AH130 คือ อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อเมธานอล 1:4 โมลต่อโมล ปริมาณน้ำร้อยละ 20 ของน้ำหนักสับสเตรตโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 เอนไซม์ตรึงรูป 15 ยูนิต อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิต FAME ได้สูงสุดร้อยละ 94.3 ที่ 48 ชั่วโมง

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *B. multivorans* PSU-AH130 ในอาหารพื้นฐาน พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสม (ต่อลิตร) คือ ทริปโตน 2 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม น้ำมันมะกอก 15 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมและ แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.2 กรัม พีเอชเริ่มต้น 8.0 สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสคือ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (38.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และปริมาณเซลล์โปรตีนสูงสุด (1.24 กรัมต่อลิตร)

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *B. multivorans* PSU-AH130 โดยผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (DEAE-Toyopearl) และเจลโครมาโตรกราฟฟี (Sephadex G-150) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 21.6 เท่า และเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 12.1 เอนไซม์ไลเปสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตัน โดย SDS-PAGE เอนไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 8.0 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง 7-9 ทนอุณหภูมิในช่วง 35-50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 120 นาที ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ คือ 4.0 มิลลิโมลาร์ และ 4,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรต เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายปานกลาง โดยมีค่าความจำเพาะสัมพัทธ์สูงสุดต่อกรดคาปริลิก (C_8) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Zn^{2+} Co^{2+} EDTA โซเดียมซิเตรต แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตและตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เมธานอล ไดออกเซน อะซิโตนและไพริดีน

Thesis Title	Synthesis of Sugar Esters and Fatty Acid Methyl Esters from Palm Oil and Palm Fatty Acid Distillates by Two Bacterial Lipases
Author	Mr. Thanongsak Chaiyaso
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Eight commercial lipases were screened for sugar esters (SE) synthesis from glucose and palmitic acid in acetone. Novozym 435 (immobilized lipase B from *Candida antarctica*) was the most suitable enzyme. Synthesis of sugar esters using glucose as acyl acceptor with palm oil or palm fatty acid distillates (PFAD) as acyl donors catalyzed by Novozym 435 showed that only PFAD could be converted to glucose ester. The optimal conditions of glucose esters synthesis from PFAD were equi-molar of 0.5 mmol glucose and PFAD, initial water activity (a_w) of 0.07, 1.0 g molecular sieves (4°A), 75 mg Novozym 435 (750 U). The highest conversion of 76.3% or 31.8 mg/mL solvent of glucose esters was obtained in acetone at 40°C for 72 h.

Three hundred and three bacterial strains were screened for lipase activity. Only 8 isolates, PSU-AH55, PSU-AH56, PSU-AH130, PSU-AH191, PSU-AH192, LS, ME168 and ME177 could produce lipase with the hydrolytic activity of 0.06, 0.10, 2.66, 0.35, 0.37, 0.09, 0.30 and 0.65 U/mL, respectively. The immobilized lipases obtained from the 8 strains on celite were used for SE synthesis. The immobilized lipase from the strain ME168 could produce glucose ester using vinyl acetate, vinyl butyrate and vinyl caproate as acyl donors in *tert*-butanol/pyridine (55:45 v/v) mixture at 45°C for 72 h with the highest conversion of 93.4, 66.7 and 56.2%, respectively.

Synthesis of SE by immobilized lipase from the strain ME168 was studied. Among 6 acyl acceptors and 6 acyl donors used glucose was the best acyl acceptor while vinyl caproate was the best acyl donor for SE synthesis. The optimal conditions for the synthesis of glucose caproate were synthesis in the mixture of *tert*-butanol/pyridine (55:45 v/v), using the equi-molar of 0.3 mmol glucose and vinyl caproate, initial a_w of 0.33, 0.5 g molecular sieves (4°A) and 100 U of immobilized lipase on celite. The highest yield of glucose caproate with 82.0% or 25.3 mg/mL solvent was obtained at 50°C for 72 h.

The strain ME168 was identified based on the nucleotide sequence of its 16S rDNA gene and showed 99.9% similarity to *Streptomyces thermocarboxydus* (1,465/1,466

bp). Therefore, this strain was identified as *S. thermocarboxydus* ME168. The optimization of the lipase production from this strain was studied based on the modification of M65 medium compositions. The optimal modified M65 medium was consisted of molasses (8 g/L), malt extract (10 g/L), yeast extract (4 g/L), palm oil (10 g/L) and gum arabic as emulsifier (1.0 g/L), initial pH of 7.5. The optimal environment conditions for production of lipase from *S. thermocarboxydus* ME168 were shaking at 175 rpm and incubation at 40°C for 120 h. The highest lipase activity (3.01 U/mL) and total cell protein (0.98 g/L) were obtained under these conditions.

The lipase from *S. thermocarboxydus* ME168 was purified by acetone precipitation, anion-exchange chromatography (Resource Q) and gel filtration chromatography (Superdex 200), respectively. The enzyme was purified to 9.6 folds with 20.3% yield. It had the apparent molecular mass of 21 kDa by SDS-PAGE and optimal activity at pH 8.5 and 50°C. It showed high stability at pH 5-9 and at temperature 35-45°C. Its half-life was more than 180 min at 65°C. The K_m and V_{max} values of the enzyme were 0.28 mM and 1,428 U/mg, respectively with *p*-nitrophenyl palmitate as substrate. It was active toward *p*-nitrophenyl esters with medium to long acyl chain (C_8-C_{16}). The lipase activity was inhibited in the presence of Zn^{2+}, dithiothreitol, EDTA, ethanol, *tert*-butanol and pyridine.

The strain PSU-AH130 produced high lipase activity and its lipase could apply for synthesis of glucose caproate but the conversion yield was very low. However, the lipase from PSU-AH130 showed good ability to produce fatty acid methyl esters (FAME) from palm olein and methanol. The strain PSU-AH130 was identified based on the nucleotide sequence of its 16S rDNA gene and showed 99.5% similarity to *Burkholderia multiovorans* (1,482/1490 bp). Therefore, this strain was identified as *B. multivorans* PSU-AH130.

The suitable supporter to immobilize the lipase from *B. multivorans* PSU-AH130 was Accurel EP100 (<400 μm) giving the hydrolytic activity of 0.21 U/mg immobilized enzyme. The optimal conditions for FAME production using immobilized lipase from *B. multivorans* PSU-AH130 were palm olein/methanol (1:4 mol/mol), 20% (w/w) of 50 mM phosphate buffers pH 6.0 and 15 U of immobilized lipase. The highest FAME (94.3%) was obtained at 50°C for 48 h.

The optimization of the lipase production from *B. multivorans* PSU-AH130 was studied based on modification of basal medium composition. The optimized medium was consisted of tryptone (2 g/L), ammonium sulphate (1 g/L), olive oil (15 g/L), K_2HPO_4 (2 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0.2 g/L), $CaCl_2.2H_2O$ (0.2 g/L) and initial pH of 8.0. The optimal environment conditions for production of lipase from *B. multivoran* PSU130

were shaking at 150 rpm and incubation at 37°C for 72 h. Under these conditions, the highest lipase activity (38.8 U/mL) and total cell protein (1.24 g/L) were obtained.

The lipase from *B. multivorans* PSU-AH130 was purified by ammonium sulphate precipitation, anion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl) and gel filtration chromatography (Sephadex G-150), respectively. The enzyme was purified to 21.6 folds with 12.1% yield. It had the apparent molecular mass of 58 kDa by SDS-PAGE and had the optimal activity at pH 8.0 and 55°C. It was stable at pH 7-9 and at temperature 35-50°C. Its half-life was more than 120 min at 60°C. The enzyme had K_m and V_{max} values of 4.0 mM and 4,000 U/mg, respectively with *p*-nitrophenyl palmitate as substrate. It was active toward *p*-nitrophenyl esters with medium chain and showed the highest relative activity to *p*-nitrophenyl caprylate (C_8). The lipase activity was stimulated by Ca^{2+} whereas it was inhibited in the presence of Zn^{2+}, Co^{2+}, EDTA, sodium citrate, ammonium persulphate and some organic solvents e.g. methanol, dioxane, acetone and pyridine.