

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้แบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ถูกแยกจากตัวอย่างดินและน้ำจำนวน 22 ตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดลำปาง เชียงใหม่ ชลบุรี สมุทรปราการ ตรัง และนครราชสีมา โดยพบว่าจุลินทรีย์จำนวน 38 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งแข็งที่มี 2.5%(v/v) isopropanol จุลินทรีย์ทั้ง 38 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส มีจำนวน 21, 3 และ 22 ไอโซเลต ตามลำดับ จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 เป็นจุลินทรีย์ที่มีการผลิตโปรติเอสในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลตที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ในขณะที่ความสามารถในการผลิตออกซิเดสของจุลินทรีย์ทั้ง 22 ไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ไอโซเลต เลต KY21, SK21, SC3, KY32, WB22 และ J31 จึงถูกเลือกมาเพื่อศึกษาผลของเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 แสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสได้ดีมาก ทั้งสองไอโซเลตจึงถูกนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม acetone, methanol, isopropanol, toluene และ hexane เพื่อศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 สามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อมีการเติม hexane ลงไป ในทางตรงข้ามตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 จุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวถูกระบุสายพันธุ์ว่าเป็น *Bacillus* sp. โดยใช้การวิเคราะห์ 16S ribosomal DNA ไลเปสจาก *Bacillus* sp. SC3 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. SC3 ยังคงสามารถมีความสามารถในการสลายลิพิดได้สูงสุด ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือภาวะที่มี 50%(v/v) hexane สำหรับการศึกษาศักยภาพ transesterification ระหว่าง vinyl stearate และ pentanol เอนไซม์หยาบของ *Bacillus* sp. SC3 ให้ผลผลิตของ pentyl stearate ที่สูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีผลผลิตสูงกว่า pentyl stearate ที่เกิดจากเซลล์ของ *Bacillus* sp. SC3 เอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แสดงความสามารถในการเลือกทำ transesterification ปฏิกิริยากับสารตั้งต้นโดยสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เป็น vinyl ester สายสั้นได้ดี เช่นเดียวกับการเลือกทำปฏิกิริยากับ secondary alcohol เพื่อสามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์กับอุตสาหกรรมหรือมองภาพการนำไปใช้ในอนาคตได้ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol จึงถูกนำมาใช้ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี alginate สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ *p*-nitrophenyl palmitate ได้สูงที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย alginate สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ถึง 5 ครั้งโดยยังคงมีการทำงานที่สูงกว่า 10% ในขณะที่ pentyl stearate ไม่สามารถตรวจพบได้จากโดยการใช้อเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol จากสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. SC3 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง การบำบัดของเสียที่มีองค์ประกอบของน้ำมันหรือไขมัน และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา hydrolysis

คำสำคัญ: ไลเปส, *Bacillus* sp., ตัวทำละลายอินทรีย์

Abstract

In this study, organic solvent-tolerant bacteria were isolated from 22 soils and water samples from Lampang, Chiang Mai, Chonburi, Samutprakan, Trang and Nakhonratchasima. It was found that 38 isolates were able to grow on semisolid medium containing 2.5%(v/v) isopropanol. All 38 isolates were examined for production of protease, lipase and oxidase. The results showed that bacteria produced protease, lipase and oxidase were 21, 3, and 22 isolates, respectively. There were 3 isolates, KY21, SK21 and SC3, produced extracellular lipase. Among 21 extracellular protease producers, the isolate KY32, WB22 and J31 showed high protease activity. Therefore, the isolate KY32, WB22, J31, KY21, SK21 and SC3 were selected to study time course of growth and enzyme production. The isolate SC3 and J31 showed the greatest ability to produce lipase and protease, respectively. Both isolates were then selected and cultivated in medium containing acetone, methanol, isopropanol, toluene and hexane in order to study the effect of organic solvent on growth and enzyme production. The results showed that the highest lipase production of the isolate SC3 was achieved when hexane was supplemented. On the other hands, all tested organic solvents had no effect on protease production of isolate J31. These organic solvent-tolerant bacteria were identified using 16s ribosomal DNA analysis as *Bacillus* sp. The lipase from *Bacillus* sp. SC3 exhibited the optimum hydrolysis reaction in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 at 30°C. The highest remaining lipolytic activity of lipase from *Bacillus* sp. SC3 was performed in either 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, at 4°C, or 50%(v/v) hexane. For transesterification study between vinyl stearate and pentanol, the crude enzyme of *Bacillus* sp. SC3 gave maximum pentyl stearate production at 24 hours, which higher than pentyl stearate formation of whole *Bacillus* sp. SC3 cells. This organic-solvent tolerant lipase showed a selectivity regarding the structure of the substrates in the transesterification of short chain vinyl ester as well as secondary alcohols. Three immobilization methods, alginate, polyacrylamide and polyvinyl alcohol, were introduced for industrial applications and future perspectives. Among three immobilization methods, the highest *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis activity was observed in alginate. In addition, the recycling results showed that the immobilized of the SC3 lipase with alginate remained active higher than 10% at the fifth cycle. While, the yields of pentyl stearate obtained from alginate, polyacrylamide and polyvinyl alcohol was not able to detect. On the whole, the organic-solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. SC3 showed an interesting ability for detergent industries, treatment of fat-containing waste effluents and hydrolysis processing.

Keywords: lipase, *Bacillus* sp., organic solvent