



9 AUG 1996

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION  
OF THERMOTOLERANT LIPASE (S)  
FROM A MICROORGANISM ISOLATED  
FROM RAW MILK**

**PALANEE AMMARANOND**

๓

**With compliments  
of**

.....

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(BIOTECHNOLOGY)**

**IN  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**1996**

Copyright by Mahidol University

TH  
P 254 P  
1996

36099

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำมันดิบ
ผู้วิจัย	पालนี อัมรานนท์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	เสาวนีย์ ธรรมสฤติ, Ph D วิทยา มีวุฒิสม, Ph D ชินฉัตร บุญเจิด, Ph D กัญจนา วีระกุล, D Agr
วันที่สำเร็จการศึกษา	14 พฤษภาคม 2539

#### บทคัดย่อ

เชื้อยีสต์สายพันธุ์ LP005 เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำมันดิบ พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส  
ได้ปริมาณสูง จากการจำแนกเชื้อพบว่าเป็นชนิด *Trichosporon asteroides* จากการศึกษาพบว่า  
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 30 องศาเซลเซียส การสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *T*  
*asteroides* LP005 สามารถทำให้เพิ่มมากขึ้นได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย Mineral Salts of  
Medium A, 0.5% beef extract, 0.5% กากถั่วเหลืองและ 0.5% น้ำมันปาล์ม เอนไซม์ไลเปสที่สร้างขึ้น  
โดยเชื้อ *T. asteroides* LP005 สามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่  
ความเข้มข้นอิ่มตัว 70% และ ผ่านกระบวนการ gel filtration ด้วย Sephadex G-200 เอนไซม์บริสุทธิ์ที่  
ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีขนาดประมาณ 45 kDa  
จากการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 60 องศา  
เซลเซียส ที่ pH 5.0 และเอนไซม์ยังมีความคงทนเมื่ออยู่ในสถานะที่เป็นกรด และที่อุณหภูมิสูงกว่า 70

องศาเซลเซียส จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่มีอิออนชนิดต่างๆพบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องอาศัยอิออนเหล่านั้น จากการที่พบว่า EDTA ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงเป็นไปได้อย่างมากว่าไม่ใช่เอนไซม์ชนิด metalloenzyme ไลเปสนี้ยังไม่แสดงความจำเพาะที่ตำแหน่งใดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์อีกด้วย เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *T asteroides* LP005 สามารถย่อยน้ำมันปลาได้ดี จึงสามารถนำเอาเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้ในการเพิ่มปริมาณของ EPA และ DHA โดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *T asteroides* LP005 สามารถเพิ่มการสร้าง EPA และ DHA ที่มีอยู่ในน้ำมันปลาได้ประมาณ 33% และ 47% ตามลำดับ รวมทั้งคุณสมบัติในการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *T asteroides* LP005 ลดค่า BOD ของน้ำเสียจากโรงงาน S&P ที่มีไขมันอยู่ปริมาณมาก โดยสามารถลดค่า BOD ได้ประมาณ 50%

Thesis	Purification and Characterization of Thermotolerant Lipase (s) from a Microorganism Isolated from Raw Milk
Name	Palanee Ammaranond
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervisory Committee	Saovanee Dharmsthiti, Ph D Vithaya Meevootisom, Ph D Chuenchit Boonchird, Ph D Gunjana Theeragool, D Agr
Date of Graduation	May 14 <sup>th</sup> , 1996

### ABSTRACT

A lipase-producing microorganism yeast strain was isolated from raw milk. It was identified as *Trichosporon asteroides* LP005. Optimum physical condition for cultivation was at 30°C temperature with agitation 200 rpm. A production medium has been developed for *T. asteroides* LP005 lipase which composes of mineral salts of medium A supplemented with 0.5% soybean meal, 0.5% beef extract and 0.5% palm oil. The purification process of *T. asteroides* LP005 lipase included ammonium sulphate precipitation at 70% saturation and gel filtration chromatography on Sephadex G-200. The molecular weight of the lipase determined by SDS-PAGE was 45 kDa. The optimum pH and temperature of *T. asteroides* LP005 for activity are pH

50 and 60°C, respectively. This lipase was stable at acidic condition and temperature lower than 70°C. The chelating agent, EDTA, did not affect the activity of the enzyme which suggesting that it was not a metalloenzyme. *T. asteroides* LP005 lipase was positional non-specificity. The ability of this lipase to efficiently hydrolyze tuna oil indicated its potential to be applied for the production of EPA and DHA. *T. asteroides* LP005 could increase the concentration of EPA and DHA approximately 33% and 47%, respectively. *T. asteroides* LP005 lipase could also potentially be used for lipid-riched wastewater treatment as it could decrease the BOD value of the wastewater from S&P bakery factory by approximately 50%.