- 5 SEP 1996

STUDY ON LIPASE FROM MESOCARP OF OIL - PALM (ELAEIS GUINEENSIS)

SUREERAT TUDTAMMAKUN

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

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
S9618
1996

36071

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเนื้อปาล์มน้ำมัน
ผู้วิจัย	สุรีรัตน์ เทอดธรรมคุณ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	ประหยัด โกมารทัต, Ph.D.
	ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D.
	พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	7 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

ผลปาล์มน้ำมันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จะมีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาของการเก็บ แสดงว่าในเนื้อผลปาล์มมีเอนไซม์ไลเปสที่ถูกกระตุ้นได้ด้วยความเย็น จากการปั่นแยกส่วนเนื้อของผลปาล์ม พบว่ามีเอนไซม์นี้อยู่มากที่สุดในชั้นไขมัน ได้ทำการสกัดเอนไซม์เพื่อเตรียมเอนไซม์เข้าสู่ขบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการนำชั้นไขมันนี้มาละลายใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ประกอบด้วย 1 mM DTT และ 2 mM EDTA และทำการสกัดแยกไขมันออกด้วยไดเอธีลอีเธอร์ พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20°ซ และที่ พีเอช 7.0 ทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 7.0 สามารถรักษาสภาพการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 2 สัปดาห์ ถ้าเก็บที่ -80°ซ และ 1 สัปดาห์ ถ้าเก็บที่ -20°ซ การเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°ซ จะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพการทำงานอย่างรวดเร็ว เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นการทำงานได้โดย

Copyright by Mahidol University

1 mM EDTA, 4 mM DTT และ 5% BSA แต่ ถูกยับยั้งโดย 1mM $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $MnCl_2$, 5mM PMSF และ 5mM EDTA เมื่อทดสอบสภาพการทำงานขณะที่มีสารดีเทอร์เจ้นที่ความเข้มข้น 0.1% ปรากฏว่า DOC และ CHAPS สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ขณะที่ Tween 40, Brij W-1, SDS, Teepol และ AOT ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างรุนแรง การเติมสารต่างๆเช่น BSA, DTT, $MgCl_2$, glycerol, sucrose, CHAPS, DOC, ethanol, isopropanol และ ATP ลงในเอนไซม์ พบว่าไม่มีสารใดที่สามารถป้องกันการสูญเสียสภาพการทำงานอย่างรวดเร็วของเอนไซม์ได้ สำหรับความจำเพาะต่อสับสเตรต เอนไซม์นี้ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดี รวมทั้งย่อยสลายน้ำมันพืชอื่นๆ อาทิเช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันมะกอกได้ดีอีกด้วย ความสามารถของเอนไซม์ในการตัดพันธะเอสเธอร์ของไตรกลีเซอไรด์ พบว่าตัดที่ตำแหน่งที่1 และ 3 ได้ดีกว่าตำแหน่งที่2 ได้ทำการแยกโปรตีนจากเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้บน SDS-PAGE พบว่าโปรตีนหลักอยู่ที่ตำแหน่ง61 กิโลดาลตัน เมื่อทดลองใช้ซีไลท์จับเอนไซม์ไว้พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ก็ยังคง สูญเสียสภาพการทำงานคล้ายกับเอนไซม์อิสระ การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ด้วยวิธีใช้สารดูดซับน้ำ (aquacide), lyophilization และการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพการทำงานอย่างรุนแรงและรวดเร็ว ความพยายามที่จะทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี reversed micellar extraction,phenyl Sepharose CL-4Bคอลัมน์โครมา-โตกราฟีหรือ FPLC บน Superose12-column ไม่ประสบความสำเร็จ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะปกติ ผลงานวิจัยเรื่องนี้สรุปได้ว่าถ้าจะนำไลเปสจากผลปาล์มไปใช้ประโยชน์ควรจะใช้โดยตรงหลังจากสกัดออกจากผลปาล์ม

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Study on Lipase from Mesocarp of Oil-palm (*Elaeis guineensis*)
Name	Sureerat Tudtammakun
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	
	Prayad Komaratat, Ph.D.
	Dhirayos Wititsuwannakul, Ph.D.
	Pichit Tosukhowong, Ph.D.
Date of Graduation	7 May B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The mesocarp of oil-palm fruit contained a very active endogenous lipase which was stimulated by low temperature stress (4°C) resulted in an increase in free fatty acid level in palm oil. The major portion of lipase activity was recovered in the oil layer fraction obtained by centrifugation of mesocarp homogenate. The active crude enzyme was prepared from the oil layer fraction suspended in 0.1 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 1 mM EDTA and 2 mM DTT after removal of oil by ether extraction. The enzyme exhibited an optimum activity at pH 7.0 and a temperature of 20°C and it was stable in a pH range 6.0-7.0. The enzyme rapidly lost activities when it was stored at room temperature and 4°C. However storage at -20°C and -80°C could maintain lipase activity for 1 and 2 weeks respectively. The enzyme activity was inhibited by 1 mM of $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $MnCl_2$, 5 mM PMSF and 5 mM EDTA but was slightly enhanced by 1 mM EDTA,

Copyright by Mahidol University

4 mM DTT and 5% BSA. In the presence of 0.1% detergents, DOC and CHAPS enhanced lipase activity whereas Tween 40, Brij W-1, SDS, Teepol and AOT had inhibitory effects. The addition of compounds namely BSA, DTT, $MgCl_2$, glycerol, sucrose, CHAPS, DOC, ethanol, isopropanol and ATP in the crude enzyme could not prevent the continuous loss of enzyme activity. The enzyme showed highest activity toward its natural substrate, palm oil but it also hydrolyzed natural oils containing unsaturated fatty acids and cleaved the ester bond at 1- and 3-positions faster than at 2- position. The crude enzyme showed six minor and one major protein bands at 61 kDa on SDS-PAGE. Adsorption of the enzyme on celite could not improve the stability. Concentration of the enzyme solution by aquacide treatment, lyophilization and ammonium sulfate precipitation as well as dialysis caused severe loss of activity. Attempts to purify the enzyme by reversed micellar extraction, hydrophobic column chromatography on phenyl Sepharose CL-4B and FPLC on Superose 12-column were unsuccessful. The major problem was probably due to instability and aggregated features of the enzyme. It is suggested that the oil-palm lipase may be used for biotechnological application in the form of crude extract from mesocarp without further purification.

Copyright by Mahidol University