PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Aeromonas sobria* LP004

PONGTHARIN LOTRAKUL

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

TH
P796p
1995

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อ *Aeromonas sobria* สายพันธุ์ LP004.
ผู้วิจัย	พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, Ph.D.
	วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.
	ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.
	กัญจนา ธีระกุล, D. Agr.
วันที่สำเร็จการศึกษา	14 มิถุนายน พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ LP004 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ค่อนข้างดี ได้ถูกแยกจากตัวอย่างนมดิบ จากการจำแนกพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ LP004นี้คือ *Aeromonas sobria* เชื้อ *A. sobria* LP004 นี้สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งเขย่าที่ 37°C การสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *A. sobria* LP004 ที่เจริญใน NB สามารถกระตุ้นให้สูงขึ้นได้ ด้วยการเติมกัมอราบิค 0.1% หรือ แคลเซียมคลอไรด์ 0.01% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB การผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถชักนำให้สูงขึ้นได้ถึง 10 เท่าของระดับปกติในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *A. sobria* LP004 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงซึ่งประกอบด้วย minimum medium P salts, yeast extract 0.5%, หางน้ำนม 25.0%, น้ำตาลกลูโคส 0.1% และ กากถั่วเหลือง 1.0% เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดยเชื้อ *A sobria* LP004 ที่เจริญใน NB ซึ่งเติม กัมอราบิค สามารถถูกทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยการทำอัลตราฟิลเตรชัน ตามด้วย Phenyl Sepharose และ Sephadex G-200 column chromatography เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดยเชื้อ *A sobria* LP004 มีขนาดประมาณ 97kDa และมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดที่ pH6.0 และ อุณหภูมิ 45°C เอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *A. sobria* LP004 มีความเสถียรดีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดยเชื้อ *A. sobria* LP004 จัดเป็น metalloenzyme ซึ่งจะทำงานได้เมื่อมี divalent cations โดยเฉพาะกับ Ca^{2+} การเติม Ca^{2+} ลงในเอนไซม์ไลเปสที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะช่วยเพิ่ม

Copyright by Mahidol University

ความเสถียรที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์ให้มากขึ้นได้ เอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *A sobria* LP004 นี้สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้ดีกับสารตั้งต้น triglyceride ได้หลายชนิด และแสดงความจำเพาะต่อกรดไขมันที่ตำแหน่ง 1 และ 3 ในโมเลกุลของ triglyceride

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Production, Purification and Characterization of Lipase from *Aeromonas sobria* LP004
Name	Pongtharin Lotrakul
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	14 June B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

From raw milk sample, the bacterium strain LP004 which produced relative thermostable lipase was isolated by screening on tributyrin and calcium-triolein agar plate The strain LP004 was identified as *Aeromonas sobria* *A. sobria* LP004 could grow and produce lipase well in NB at 37°C with shaking. Lipase production by *A. sobria* LP004 in NB could be induced by addition of 0 1% (W/V) gum arabic and 0 01% (W/V) $CaCl_2$ The lipase production level could be elevated upto approximate 10 folds higher than that in NB when *A. sobria* LP004 was cultivated in the developed medium containing minimum medium P salts, 0 5% (W/V) yeast extract, 25% (V/V) whey, 0 1% (W/V) glucose and 1 0% (W/V) soybean meal The *A. sobria* LP004 crude lipase prepared from culture cultivated in NB supplemented with gum arabic was purified to 10 29 fold homogenous state by ultrafiltration and column chromatographies on Phenyl Sepharose and Sephadex G-200 The molecular weight of the lipase determined by SDS PAGE was 97 kDa The purified *A. sobria* LP004 lipase exhibited maximum activity at pH 6 0 and 45°C The lipase was stable at alkaline condition and temperature lower than 40°C The *A. sobria* LP004 lipase was a

Copyright by Mahidol University

metalloenzyme with dependence on divalent cations, especially Ca^{2+} Addition of Ca^{2+} to the crude lipase could increase its stability significantly The *A. sobria* LP004 lipase was 1,3-specific and exhibited a wide range of specificity to commercial and purified triglycerides

Copyright by Mahidol University