ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก 1. Rhodamine B-olive oil agar (ต่อน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

1.	Nutrient broth	28	g.
2.	NaCl	4	g.
3.	Rhodamine B solution (1 ml/ml)	10	g.
4.	Olive oil	32.25	g.
5.	Arabic gum	10	g.
6.	Agar	15	g.

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ชั่ง Nutrient broth และ NaCl เติมน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที
- กรอง Rhodamine B solution (1 mg/ml) เติมลงไปในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มล.
- เติม Olive oil 31.25 มล. และเติม Arabic gum 10 กรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแม่เหล็ก และ hot plate stirrer กวนทิ้งไว้ให้ฟองหายไป
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

หมายเหตุ Enrichment medium broth เตรียมเช่นเดียวกันกับ Rhodamine B-olive oil agar เพียงแต่ไม่มีการเติม ผงวุ้น (agar) ลงไปในอาหาร

ก 2. อาหารสำหรับวิเคราะห์ Lipolytic activity

1.	Nutrient broth	0.325% (w/v)
2.	$CaCl_2$	0.1% (w/v)
3.	Olive oil	2.5% (w/v)
4.	Gum Arabic	1% (w/v)

ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5

ก 2. Modified freezing medium (ต่อน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

1.	K_2HPO_4	0.7	g.
2.	KH_2PO_4	0.3	g.
3.	Sodium citrate . $2H_2O$	0.05	g.
4.	$MgSO_4 . 7H_2O$	0.01	g.
5.	Glycerol	50	ml.

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลดิบ และวิธีการทดลอง

ข.1 การสกัดน้ำมัน และการวิเคราะห์น้ำมันโดยใช้วิธีซอกเล็ต (Soxhlet extraction)

หลักการ การวิเคราะห์หาน้ำมันด้วยวิธีการสกัดแบบซอกเล็ต เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำลายอินทรีย์เช่นอะซิโตน อีเทอร์ หรือเฮกเซนเป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดน้ำมันจากวัตถุดิบต่าง ๆ โดยใช้เครื่องมือ Soxhlet extraction apparatus โดยตัวทำละลายจะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมามีความเข้มข้นมากพอ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องสกัดน้ำมัน (Soxhlet extraction apparatus)
2. หลอดกระดาษใส่สารตัวอย่าง
3. เตาอบ และโถดูดความชื้น
4. เฮกเซน

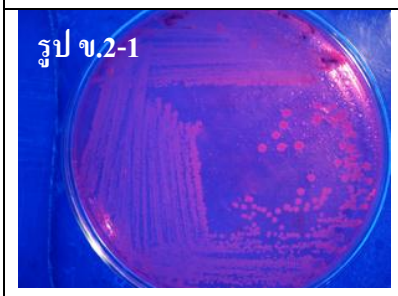
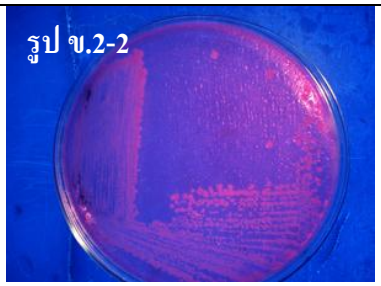
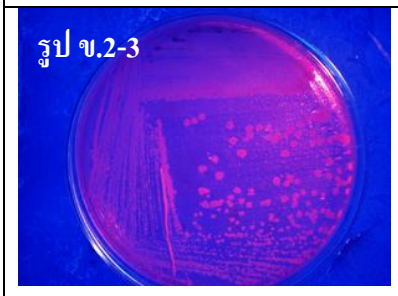
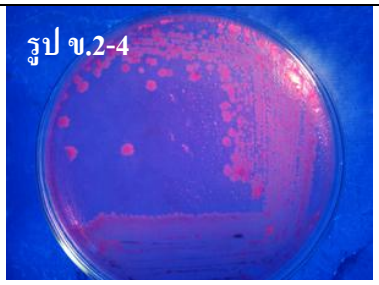
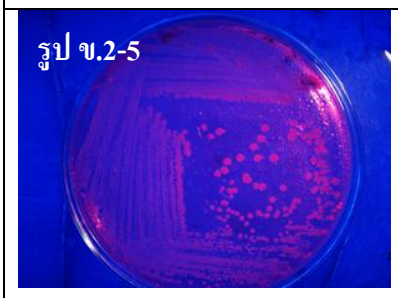
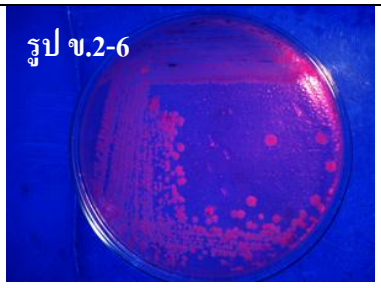
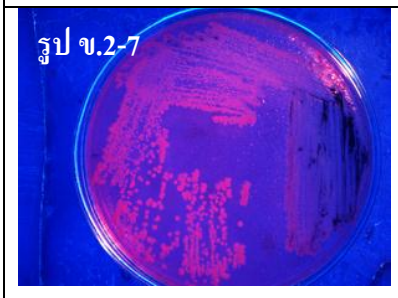
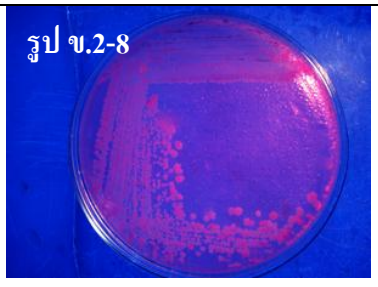
วิธีการ

1. นำสาหร่ายแห้งมาบด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งละเอียด
2. จากนั้นนำสาหร่ายมาห่อด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble
3. นำหลอด Thimble ใส่ลงในเครื่องสกัดน้ำมัน (Soxhlet) แล้วต่อเข้ากับขวดก้นกลม (เติมเฮกเซนลงไปในขวดก้นกลมประมาณ ¾ ส่วนของขวด
4. ต่อ Condenser เข้ากับเครื่อง Soxhlet ให้ความร้อนในอัตราเร็วของความควบแน่น 2-3 หยดต่อวินาที ทำการสกัด 6-8 ชั่วโมง หรือดูจนกระทั่งน้ำมันถูกชะจาก Thimble ลงในขวดก้นกลมหมดแล้ว ซึ่งสังเกตจากสารละลายที่ไหลออกจาก Thimble ไมมีสี
5. แยกขวดก้นกลม จากนั้นนำไปกลั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเฮกเซนออกมา
6. หลักจากกลั่นเสร็จ ทิ้งขวดก้นกลมไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

รูป ข.1 น้ำมันจากสาหร่าย (microalgae oil) ที่สกัดได้ด้วยวิธี Soxhlet extraction

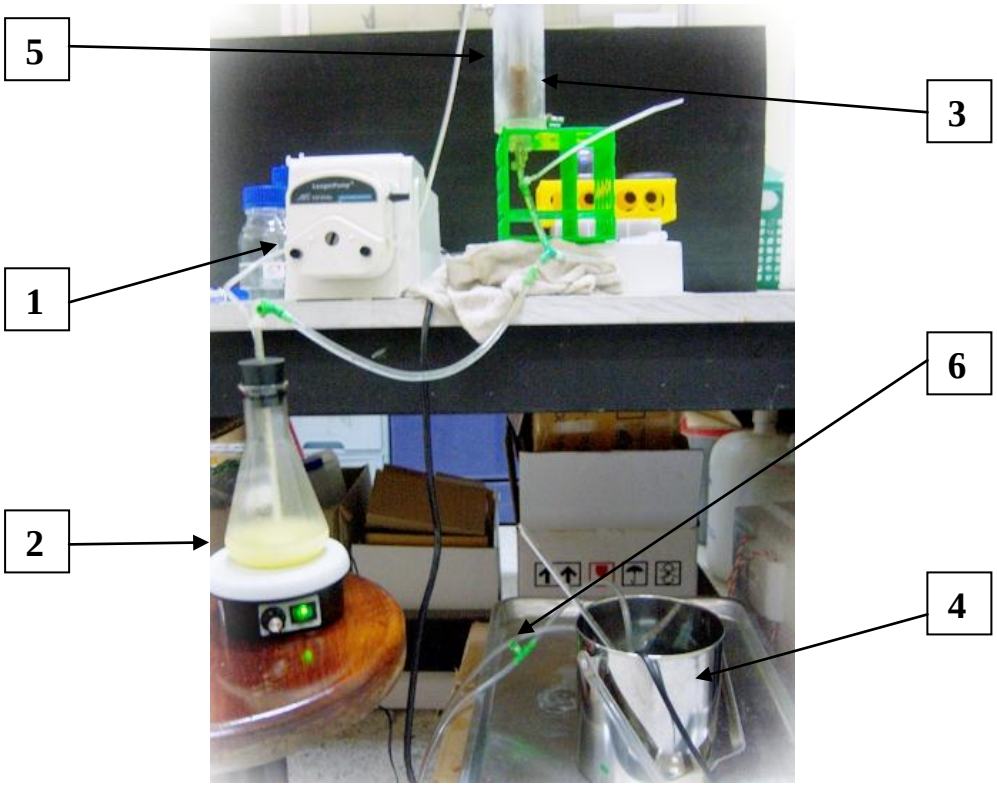
ข.2 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Rhodamin B olive oil agar ภายใต้แสง UV

โคโลนีของแบคทีเรียที่คาดว่าจะสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการขีดลากบนอาหาร Rhodamin B olive oil agar ที่คัดแยกได้ เพื่อให้ทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยว (single colony) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (UV 340 nm.)

การเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร	ไอโซเลท	การเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร	ไอโซเลท
 รูป ข.2-1	LH 3	 รูป ข.2-2	LH 5
 รูป ข.2-3	LH 6	 รูป ข.2-4	LH 9
 รูป ข.2-5	LH 15	 รูป ข.2-6	LH 21
 รูป ข.2-7	LH 25	 รูป ข.2-8	LH 26

ข.3 การทำปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

ประกอบไปด้วย Packed-Bed Tower บรรจุเซลล์จุลิทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเซลล์ ปริมาตรทำการ ที่ 0.038ลิตร และสารละลายตั้งต้นถูกกวนผสมในขวดทดลองที่ประกอบกับชุด magnetic stirrer จะถูกดูดเข้าตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากบนสู่ล่าง (downward feeding) ด้วยเครื่องperistaltic pump ที่มีชุดควบคุมอุณหภูมิหุ้มอยู่ด้านนอก ในการเตรียมปฏิกิริยาจะทำการเตรียมซับสเตรตในขวดทดลองที่ประกอบกับ magnetic stirrer



รูป ข.3 ชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

สำหรับทำปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสำหรับน้ำมันสกัดจากสาหร่าย

หมายเลข 1 peristaltic pump

หมายเลข 2 ชุดกวนผสมซับสเตรต (magnetic stirrer)

หมายเลข 3 Packed Tower

หมายเลข 4 Water bath with temperature control

หมายเลข 5 Water heating socket

หมายเลข 6 หน่วยเติมเมทิลแอลกอฮอล์เป็นลำดับขั้น

ข.4 การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลอง ด้วยวิธี แก๊สโครมาโตกราฟี

- เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เพื่อเอาส่วนใส ซึ่งจะทำการเจือจางด้วย นอร์มอล เฮปเทน (ปริมาณสารตัวอย่างที่จะใช้ฉีดใน 1 ไมโครลิตรของสารละลายที่ 2% ในเฮกเซน) เมทิลเอสเทอร์ซึ่งเป็นส่วนประกอบ

- จากนั้นนำสารผสมวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas chromatography) Shimadzu No.2014 ซึ่งประกอบด้วยcapillary columnAgilent J&W DB-5 GC Columns 30m×0.32mm×0.25µm และใช้ ไฮโดรเจน เป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) อัตราการไหล1.2 มล/นาที

- ตั้งอุณหภูมิของ column เริ่มที่ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 250 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มขึ้น 15 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 1 นาที จากนั้นรักษาระดับอุณหภูมิไว้นาน 12 นาที โดย injector และ detector ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 250 และ 280 องศาเซลเซียส ตามลำดับโดยใช้กรดเมทิลเฮปตะเดคาโนอิก เป็น internal standard นำผลการทดลองที่ได้ มาคำนวณค่าสัดส่วนระหว่างพีคของตัวอย่าง (sample peak) ต่อพีค internal standard เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละของการเกิดไบโอดีเซล(% conversion) โดย

$$\%\text{conversion} = \frac{FAMEyeild\ (mole)}{3 \times oil\ (mole)} \times 100$$

รูป ข.4 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography) สำหรับวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ยี่ห้อ Shimazu รุ่น GC-2014

ภาคผนวก ค.

การเผยแพร่งานวิจัยในต่างประเทศ

Poster Presentation ของบบทความวิจัยในการนำเสนอที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1807

Isolation of lipase producing bacteria from soil and waste water samples

Sirinda Yunchalard[a] , Weera Piyatherawong [a] and Tossapol Polkummak [b]

[a] *Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*

[b] *Graduates School, Khon Kaen University, Khon Kaeb 40002, Thailand*

Abstract

Lipase is a water-soluble enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of ester bonds in water–insoluble, lipid substrates. It has been exploited in several industries including the conversion of vegetable oil into biodiesel via transesterification to produce methyl esters. We have isolated lipase producing bacteria from soil and waste water samples using rhodamine B-olive oil agar plate adjusted pH to 7.0 and incubated at 37 ^{o}C for 48 h. Preliminary indicator to be used to screen for lipase activity of each isolated colony was carried out by visualization of a surrounding clear zone around the colony and illuminated as pinkish colour when it was exposed under UV light. Lipase activity was determined by titration of the released fatty acids with 25 mM sodium hydroxide The amount of enzyme that catalyzed the release of 1 mmol of fatty acids per hour at 35 ^{o}C. Among the 55 isolates form soil sample and the 40 isolates from water samples, twelve isolates (4 isolates from soil samples and 8 isolates from water samples) were primarily exhibited preliminary indicating characteristics mentioned above. Among those twelve isolates, isolate number LA5 was able to produce the relatively highest in its lipase activity at 1.21 units/mL in a liquid medium containing 2% olive oil as sole carbon source at 37 ^{o}C, pH 7.0 for 48 h.

Key word : Bacterial lipase, Lipase activity, transesterification, rhodamine B-olive oil agar

Introduction

Lipase or triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3) has great potential in catalyzing a variety of reactions such as esterification, transesterification and inter-esterification (Ishimoto *et al*., 2001). Only about 2% of world's microorganisms have been tested as enzyme sources. The purpose of the present study was to screen for lipase-producing microorganisms from soil and water samples. Transesterification of used oils via lipase has been considered to be an alternative biological catalyst to produce methyl ester for biodiesel production. (Zhang *et al*., 2003)

Materials and Methods

Screening of lipase producing bacteria

Samples from natural soil and waste water were spread on Rhodamine B-olive oil agar [(28 gL^{-1} nutrient agar, 4 gL^{-1}NaCl, 1mg /ml Rhodamine B solution sterilized by membrane filtration (10 ml), olive oil 31.25 ml, 10 gL^{-1} gum arabic)] and were incubated at 37 ^{o}C for 48 h. Lipase producing colonies were revealed by a surrounding clear zone around the colonies and illuminated as pinkish colour when it was exposed under UV light (Kouker and Jaeger. 1986). Lipase activity was determined by titration of the released fatty acids against 25 mM sodium hydroxide. The amount of enzyme that catalyzed the release of 1 mmol of fatty acids per hour at 35 ^{o}C was counted as one unit of lipase activity. All the data presented are the means of three measurements.

Results

Among the 55 isolates from soil samples, 4 isolates: LS3, LS 10, LS21, and LS26 were found to exhibit lipase activity at 0.12, 0.21, 0.15, 0.32 units/mL, respectively. Among the 40 isolates from water samples, 8 isolates: LA5, LA6, LA9, LA15, LA17, LA19, LA26, LA32 were found to possess lipase activity at 1.21, 1.01, 0.45, 1.13, 0.95, 0.23, 0.21, 0.15 units/mL, respectively.

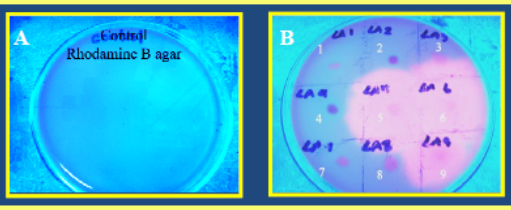


Figure 1. rhodamine B-olive oil agar plate displaying positive lipase producing bacterial colonies with clear surrounding zones which are revealed as a pinkish color when exposed under UV exposure. (A) Control, (B) positive isolates LA5, LA6, and LA9.

Discussion and Conclusion

The binding between rhodamine B and the lipase producing bacterial colony is highly sensitive and specific for detection of the potential lipase producing bacterial strain. (Sheikh *et al*,. 2003) All the twelve isolates were manifested as clear surrounding zones and were revealed as pinkish color under UV exposure and exhibited lipase activities. Isolates from water samples are considered as potential biocatalysts in transesterification reactions.

Acknowledgment

This research work supported by National Research Council of Thailand through Khon Kaen University for the financial year 2009.

References

Kouker, G. and J. Karl-Erich. (1986). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Appl. Environ. Microbiol**.53:211-213

Ishimoto, R., M. Sugimoto, and F. Kawai. (2001). Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase. **FEMS Microbiol Letters**.195:231-235

Zhang, Y., M.A. Dube, D.D. MaLean, and M. Kates. (2003). Biodiesel production fopm waste cooking oil:Process design and technological assessment.**Bioresource Technol.** 89: 1-16

Sheikh, A. H. N. Hee, B. Z. Ong, B. T. Yasin, M. Nazamid, S. and Fatimah, A. B. (2003). Screening and identification of extracellular lipase-producing thermophilic bacteria from a Malaysian hot spring. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 19:961-968

Table 1. Number of isolates and extracellular lipase activities among the positive twelve isolates

Sources	Number of isolates from screening	Number of strains displaying lipase activity on Rhodamine B-olive oil agar	Lipase activity (units/mL)
Soil	55	4 (LS3, LS10, LS21, LS26)	0.12, 0.21, 0.15, 0.32
Water	40	8 (LA5, LA6, LA9, LA15, LA17, LA19, LA26, LA32)	1.21, 1.01, 0.45, 1.13, 0.95, 0.23, 0.21, 0.15