199947

อนันต์ บุญปาน 2550: การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D. 179 หน้า

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 20 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มี Tween 80 2.0 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลท PB233 เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปทำการจัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PB233 คือ *Staphylococcus warneri* และมีสมบัติเป็นแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) โดยมีการผลิตควบคู่ไปกับการเจริญและมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้เอทานอล เจลฟิลเตรชั่น และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็คโทรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *S. warneri* PB233 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีสมบัติเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์)

การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก พบว่า การเติมเอนไซม์ร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid) ซึ่งมีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้นได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือสำหรับใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาคือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (1.5 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407 เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (0.5 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 และเอนไซม์ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียทนเกลือ *S. warneri* PB233 ลงไปร่วมกับการหมัก พบว่าปริมาณฟอร์มอลไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด สารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ

199947

Anan Boonpan 2007: Studies on Production and Characterization of Halophilic Lipase from Halotolerant Bacteria for Fish Sauce Fermentation. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Werasit Sanpamongkolchai, Ph.D. 179 pages.

Twenty pure bacterial cultures isolated from raw Thai fish sauce were selected for lipase producing ability on Sehgal and Gibbons Complex (SGC) agar medium containing 2.0% Tween 80 and SGC liquid medium containing 1.0% olive oil, both media contained 3.0 M (18.0%) NaCl. The results showed that isolate PB233 could produce the highest lipase activity. This isolate was identified based on morphology, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence database of other bacteria, it was classified as *Staphylococcus warneri*. This strain could grow in 0-4.0 M (0-24.0%) NaCl but the best growth was observed at 0 M NaCl, therefore, *S. warneri* PB233 was could be grouped in halotolerant bacteria. A halotolerant *S. warneri* PB233 could produce the highest lipase activity in SGC liquid medium containing 1.0% olive oil and 3.0 M NaCl, a typical pattern of lipase production showed that enzyme secretion was coupled to active cell multiplication and maximum activity was obtained at stationary phase. Lipase was purified by ethanol precipitation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE Toyopearl 650M anion-exchange chromatography. The purity and molecular weight were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the molecular weight of lipase from halotolerant *S. warneri* PB233 was 45,000 Da. Crude and purified lipase were optimal at pH 7.0 and at temperature of 40 °C. They were stable between pH 7.0 and 9.0 and at temperatures between 30 and 40 °C. Crude and purified lipase had marked halophilic enzyme properties, showing maximal activities in the presence of 2.5 M (15.0%) NaCl.

Application of halophilic lipase to fish sauce fermentation was successful in these preliminary experiments. The results showed that increasing of halophilic lipase cause increasing of volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and valeric acid) that have been identified as aroma in fish sauce. The optimum halophilic lipase concentration that apply to fish sauce was 1.0%. In addition, the feasibility of making fish sauce by application of halophilic protease (1.5%) from *Halobacterium salinarum* PB407, halophilic ribonuclease (0.5%) from *Pseudomonas* sp. No. 3241 and halophilic lipase (1.0%) from *S. warneri* PB233 was studied. The results showed that halophilic enzymes added fish sauce contained significantly more formal nitrogen, total nitrogen, 5′-GMP and volatile fatty acids content compared to fish sauce without enzyme added.