

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปส (Lipases) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของเอสเทอร์ของไขมัน ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนพืชน้ำมันให้กลายเป็นน้ำมันไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) เพื่อให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) สามารถพบเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งจากพืช รวมถึงจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ ในการวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่ได้จากดินและน้ำที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการทิ้งของเสีย โดยในขั้นแรกได้คัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Rhodamine B olive oil ที่ได้รับการปรับสภาพความเป็นกรดต่างให้มี pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หากโคโลนีใดให้ผลบวกซึ่งคาดว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยผลบวกคือลักษณะของทีโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารจะมีสีชมพูพร้อมกับมีโซนใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบๆโคโลนี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวช่วงคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากมีการแสดงกิจกรรมไลเปสก็จะมีกรดไขมันอิสระออกมา ซึ่งสังเกตเห็นได้จากสีที่เกิดขึ้นของอินดิเคเตอร์ งานวิจัยนี้ได้คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 55 ไอโซเลท และจากตัวอย่างน้ำจำนวน 40 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (จากดิน 4 ไอโซเลท, จากน้ำ 8 ไอโซเลท) ซึ่งจากจำนวนทั้ง 12 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท LA 5 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 1.21 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นนำไอโซเลท LA5 มาทำการตรึงเซลล์ ด้วยสารละลายโซเดียมแอลจีเนต พบว่าที่ความเข้มข้น 2% โซเดียมแอลจีเนต ให้ผลการตรึงเซลล์ดีที่สุดคือ เซลล์ไม่เกิดการรั่วและแตก มีความคงตัวของการตรึงเซลล์ และเมื่อทำการตรึงเซลล์เสร็จเรียบร้อยแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้น้ำมันสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil) และเซลล์ที่ตรึงเรียบร้อยแล้ว หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ทำการตรวจหาเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) พบว่า เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นไม่มีความต่างจากเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันดีเซลทั่วไป และเมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพน้ำมันของไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 7.2 และมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 0.884 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานไบโอดีเซลของประเทศสหรัฐอเมริกา

## Abstract

Lipase (EC 3.1.1.3) 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 reaction to produce methyl esters. We have isolated lipase producing bacteria from soil and waste water samples using strain isolation on rhodamine B-olive oil agar plate, pH to 7.0. It was incubated at 37 °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 of each of the positive colony was determined by titration of the amount of released free fatty acids with 25 mM sodium hydroxide with phenolphthalein as an indicator to indicate end point. The amount of enzyme that catalyzed the release of 1 mmol of fatty acids per hour at 35 °C. Among the 55 isolates from 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 lipolytic activities. 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 °C, pH 7.0 for 48 h. Isolate number LA5 was subjected for cell immobilization by entrapment with sodium alginate to improve stability and reuse of its lipase activity. The methyl esters resulted from transesterification for biodiesel production was carried out in a bioreactor. The results is indicated that the 2.0% (w/v) sodium alginate concentration is the optimal concentration to be used for cell immobilization via the entrapment method and microalgal oil was used as the substrate. The immobilized cell of isolate LA5 provides the methyl esters C16 and C18 determined by gas chromatography and were found to be the same as the ones in diesel oil. In addition, biodiesel properties showed in the density and pH value of 0.884 g mL<sup>-1</sup> and 7.2 respectively. These were corresponded to standard limitation established by American Society for Test Material (ASTM).