

การแยกแยะที่เรียบที่ผลิตอัลคาไลน์ไลเปสจากดิน

นายพิเศษ เตียวสกุล



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-346-004-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1919444x

ISOLATION OF ALKALINE LIPASE PRODUCING SOIL BACTERIA



Mr. Pises Liawsakul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Programme of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-346-004-7

Thesis Title Isolation of Alkaline Lipase Producing Soil Bacteria
By Mr. Pises Liawsakul
Programme Biotechnology
Thesis Advisor Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


 Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)


Thesis Committee

 Chairman
(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.)

 Member
(Associate Professor Chaufah Thongthai, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Charnwit Kosittanon, Ph.D.)

 Member
(Pienpak Tasakorn, Ph.D.)

พิเศษ เลี้ยวสกุล : การแยกแบคทีเรียที่ผลิตอัลคาไลโนไลเปสจากดิน (ISOLATION OF ALKALINE LIPASE PRODUCING SOIL BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ปิ่น-ฉวี เวชชานูเคราะห์, 124 หน้า. ISBN 974-346-004-7.

แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คัดจากแบคทีเรียที่สร้างไลเปสจำนวนทั้งหมด 350 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากตัวอย่างดิน โดยให้ชื่อสายพันธุ์คัดว่า สายพันธุ์ ALP-40.3 และสายพันธุ์ ALP-42.11 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Pseudomonas sp.* ทั้งคู่ สายพันธุ์ ALP-40.3 เจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรดอ่อนๆจนเป็นด่าง (ค่าพีเอช 6-10) ณ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ ALP-42.11 กลับเจริญได้ดีในอุณหภูมิไม่สูงมากนัก คือ ตั้งแต่ 25-35 องศาเซลเซียส ถ้าเติมน้ำมันมะกอกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณร้อยละ 2.5 จะให้ผลทำให้สายพันธุ์ ALP-42.11 สร้างเอนไซม์และปล่อยออกนอกเซลล์ในปริมาณสูงมากกว่าปกติ คุณลักษณะบางประการของสารสกัดเบื้องต้นของไลเปสที่สร้างโดยสายพันธุ์คัดทั้งสองมีดังต่อไปนี้ ไลเปสจาก ALP-40.3 จะมีแอกติวิตีสูงสุดคือ 702 หน่วยต่อมิลลิลิตร (มล) เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ก็ยังคงแอกติวิตีไว้สูงไม่ตกลงมาก (328-702 หน่วยต่อมล) เมื่อบ่มเชื้อไว้ในช่วง 35-65 องศาเซลเซียส ส่วนไลเปสจาก ALP-42.11 นั้นจะมีแอกติวิตีสูงสุดคือ 561 หน่วยต่อมล ณ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แต่แอกติวิตีของไลเปสจากสายพันธุ์คัดนี้จะคงแอกติวิตีได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าสายพันธุ์คัดแรกคือ 188 ถึง 561 หน่วยต่อมล ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 15-85 องศาเซลเซียส และแอกติวิตีของไลเปสจากสายพันธุ์คัดทั้งสองจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าพีเอชมีผลต่อแอกติวิตีของไลเปสทั้งสองนี้มากแอกติวิตีสูงสุดของสายพันธุ์คัดแรก (ALP-40.3) อยู่ที่พีเอช 8 ส่วนสายพันธุ์คัดสอง (ALP-42.11) จะอยู่ที่พีเอช 9 และไลเปสจากทั้งสองสายพันธุ์ก็ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8-9 จึงกล่าวได้ว่า เอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัดทั้งสองเป็นอัลคาไลโนไลเปส (Alkaline Lipases) หรือไลเปสชอบสภาพเป็นด่าง

ภาควิชา _____
 สาขาวิชา _____ เทคโนโลยีทางชีวภาพ _____
 ปีการศึกษา _____ 2542 _____

ลายมือชื่อนิติ

อ. ที่ปรึกษา

อ. ที่ปรึกษาร่วม

พิเศษ เลี้ยวสกุล
 ปิ่น-ฉวี เวชชานูเคราะห์

Pises Liawsakul : Isolation of Alkaline Lipase Producing Soil Bacteria. Thesis

Advisor : Assist. Prof. Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D., 124 pp.

ISBN 974-346-004-7.

Two of 350 lipase producing bacterial strains isolated from soils were selected, named ALP-40.3 and ALP-42.11, and identified biochemically and bacteriologically to possibly be *Psuedomomas sp.* ALP-40.3 strain grew under optimum conditions, i. e., at 35°C and wide pH range 6-10. ALP-42.11 grew optimally in lower temperature ranged from 25°-35°C and also wide pH range, and a large number of lipases were excreted when 2.5% olive oil was added into the growth medium. Some characteristics of both lipases were summarized as follow: under optimum conditions, i. e., at 45°C, the highest activity of crude ALP-40.3 lipases was found (702 units/ml), and quite high activity would have maintained in a wide range of temperature from 35°-65°C (328-702 units /ml). At 65°C, the highest activity of crude ALP-42.11 lipases was found (561units/ml), and similar to the first lipase extract, quite high activity of the second lipases extract would have maintained in a wide range of temperature from 15°-65°C. It is noted that the effect of pH on activities of both lipases was quite stronger than effect of temperature. The highest activities of ALP-40.3 and ALP-42.11 lipases were found at pH 8 and 9, respectively, however, the activity of them has maintained in pH range 8-9. It is possible to say that they are alkaline lipases.

ภาควิชา _____
 สาขาวิชา Biotechnology
 ปีการศึกษา 1999

ลายมือชื่อผู้ผลิต

อ. ที่ปรึกษา

อ. ที่ปรึกษาร่วม

พิเชษฐ์ ลิ่วสวัสดิ์
พิเชษฐ์ ลิ่วสวัสดิ์
 อ. ที่ปรึกษา
 อ. ที่ปรึกษาร่วม

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ACKNOWLEDGEMENTS

I am very pleased to thank my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh, who made useful suggestions and guidance throughout the process of this research and for spending time discussing on various points.

I would like to thank assistant Professor Dr. Vichien Rimphanichayakit, Associate Professor Dr. Chafah Thongthai, Assistant Professor Dr. Charnwit Kosittanon and Dr. Pienpak Tasakorn, the member of thesis committee, for their useful comments.

I would also like to acknowledge the Department of General Science, Faculty of Science; the Scanning Electron Microscopic Unit, the Scientific and Technological Instrument Center, Chulalongkorn University, for offering laboratory facilities in this research.

My sincere acknowledgements are due to Assistant Professor Dr. Hunsa Punnapayak, Department of Botany, Chulalongkorn University for lending me some automatic pipettes throughout the assay method and Mr. Permsak Liawsakul, my older brother, for helping with the collection some soil samples.

Thanks to the following people and friends for their help; Ms. Benjamas Ackaramahapanich, Ms. Kongnita Keiniyom, Ms. Suda Itthisupornrat and Ms. Pensri Chubanjong, staff at the Department of General Science.

I am grateful to the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and the Graduate School of Chulalongkorn University for financial supports.

Finally, I want to express my wholeheartedly thanks and the deepest appreciation to my father and mother, and my brothers for their moral and financial supports and strong encouragement.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT THAI.....	iv
ABSTRACT ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF FIGURES.....	xiv
ABBREVIATION.....	xvi
CHAPTER	
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Objectives.....	2
1.2 Scope of Study.....	3
1.3 Place.....	3
1.4 Anticipated Benefits.....	3
1.5 Components of the thesis.....	4
2 LITERATURE SURVEY.....	5
2.1 Lipids.....	6
2.1.1 Sources.....	6
2.1.2 Physical Properties of Lipids.....	6
2.1.3 General Aspects of Triglycerides.....	6
2.2 Enzymatic Hydrolysis of Triglycerides.....	7
2.2.1 General Aspects and Definition.....	7
2.2.2 Structure of Lipases.....	9
2.2.2.1 Bacterial lipases.....	9
2.2.2.2 Fungal lipases.....	10
2.2.2.3 Other lipases.....	10

CONTENTS (CONT.)

	Page
2.2.3 Extracellular Microbial Lipases.....	11
2.2.3.1 Non specific lipases.....	12
2.2.3.2 1,3-Specific lipases.....	12
2.2.3.3 Fatty acid specific lipases.....	13
2.3 Catalytic Reaction of Lipases.....	13
2.3.1 Mechanism of Action at Lipid / Water Interface.....	13
2.3.2 Activation and Inhibition of Lipases.....	14
2.3.3 Biochemically Catalytic Reaction of Triglyceride lipases.....	15
2.4 Lipolytic Bacteria.....	15
2.4.1 General Aspects of Lipolytic Bacteria....	16
2.4.1.1 Habitats.....	16
2.4.1.2 Culture media.....	16
2.4.1.3 Screening and isolation methods..	17
2.4.1.4 The use of fluorescent dye rhodamine B in lipase detection...	17
2.4.1.5 Known lipolytic bacteria.....	19
2.4.1.6 Bacterial metabolism of lipids.....	19
2.4.2 Genetics of Lipolytic Enzymes.....	20
2.4.2.1 Cloning and sequence of bacterial lipase genes.....	20
2.4.2.2 Genetic and regulation of bacterial lipase production.....	21
2.5 Biotechnological Application of Lipases	22
2.5.1 Lipases in Various Industries.....	22
2.5.2 Lipases in Immobilized Form.....	23

CONTENTS (CONT.)

		Page
	2.6 The Future Impact of Industrial Lipases.....	24
3	MATERIALS AND METHODS.....	38
	3.1 Sources of Microorganisms.....	38
	3.1.1 Samples.....	38
	3.1.2 Bacterial Reference Strains.....	38
	3.2 Raw Materials and Sources	38
	3.3 Chemicals, Reagents and Instruments.....	39
	3.3.1 Chemicals and reagents.....	39
	3.3.2 Instruments.....	41
	3.4 Culture Media.....	42
	3.4.1 General Media.....	42
	3.4.2 Selective Media.....	42
	3.4.3 Media for Alkaline Lipase Producing bacteria.....	42
	3.4.3.1 Media for screening and isolation...	42
	3.4.3.2 Media for cultivation and bacterial growth.....	43
	3.5 Strains and Biochemical Tests for Identification...	43
	3.6 Bacteriological Procedures.....	44
	3.6.1 Sampling and Cultivation Procedures.....	44
	3.6.1.1 Sampling procedures.....	44
	3.6.1.2 Screening and isolation of alkaline lipase producing bacteria.....	44
	3.6.1.3 Selection of highly alkaline lipase producing bacteria.....	45
	3.6.1.4 Identification of selected bacterial strains.....	46

CONTENTS (CONT.)

	Page
3.6.2 Effects of Some Environmental Factors on Growth of the Selected Bacterial Strains.....	46
3.6.2.1 Effect of pH.....	46
3.6.2.2 Effect of temperature.....	47
3.6.3 Growth Conditions of the Selected Bacterial Strains.....	47
3.7 Chemical Analysis Procedures.....	48
3.7.1 Effect of Different Media on Lipase Production.....	48
3.7.2 Preparation of lipases.....	49
3.8 Assay for the lipase activity.....	49
3.8.1 Measuring of Released p-Nitrophenol	50
3.8.2 Determination of Free Fatty Acids.....	50
3.9 Effect of Some Environmental Factors on Lipase Activity	51
3.9.1 Effect of pH.....	51
3.9.2 pH Stability.....	52
3.9.3 Effect of Temperature.....	52
3.9.4 Thermal Stability.....	53
3.10 Determination of Substrate Specificity.....	53
4 RESULTS.....	54
4.1 Screening ,Isolation and Selection of Alkaline Lipase Producing Bacteria.....	54
4.2 Effect of Some Environmental Factors on Growth of Alkaline Lipase Producing Bacteria.....	69

CONTENTS (CONT.)

	Page
4.3 Growth Condition of the Selected Bacterial Strains.....	73
4.4 Effect on Different Media on Lipase Production...	78
4.5 Effect of Some Environmental Factors on Activity of lipase from the Selected Bacterial Strains.....	80
4.6 Determination of Substrate Specificity on Alkaline Lipase Activity.....	89
5 DISSCUSSION AND CONCLUSION.....	91
REFERENCES.....	97
APPENDICES.....	107
APPENDIX A Bacterial Sources	108
APPENDIX B Culture Media.....	110
APPENDIX C Media for Biochemical Tests.....	115
APPENDIX D Preparation of Standard Curve of p-Nitrophenol	120
APPENDIX E Preparation of Standard Curve of Cupric Acetate-Pyridine.....	122
BIOGRAPHY	124

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Properties of some recently characterized extracellular microbial lipase.....	30
2.2	Some known lipase producing bacteria.....	33
2.3	Some known lipolytic bacteria with cloned and sequenced lipase genes	36
2.4	The amino acid sequences near the active serine of bacterial lipases.....	36
2.5	Industrial application areas of microbial lipases.....	37
4.1	Alkaline lipase production in cell-free supernatant isolates examined on TRA plate by fluorescent halo.....	55
4.2	Alkaline lipase activity of five highest alkaline lipase producing strains measured confirm by spectrophotometric method.....	56
4.3	Some characteristics and identification of two alkaline lipase producing bacterial isolates.....	57
4.4	Some biochemical tests and selective media for identification of characteristics of the selected bacterial strains.....	62
4.5	Effects of pH on growth of the bacterial isolates.....	70
4.6	Effects of temperature on growth of the selected bacterial strains.....	72
4.7	Relationships between growth and lipase production of strain ALP-40.3.....	74
4.8	Relationships between growth and lipase production of strain ALP-42.11.....	76
4.9	Effect of LOB and LPM on lipase production of the selected bacterial strains.....	79

LIST OF TABLES (CONT.)

Table		Page
4.10	Effect of pH on lipase activity from the selected bacterial strains.....	81
4.11	pH stability of alkaline lipase from the selected bacterial strains.....	83
4.12	Effect of temperature on alkaline lipase of the selected bacterial strains.....	85
4.13	Thermostability of alkaline lipase of the selected bacterial strains.....	87
4.14	Relative rate of hydrolysis of oils by alkaline lipase from the selected bacterial isolates.....	90
5.1	Some characteristics of the selected bacterial isolates ALP-40.3 and ALP-42.11	95
5.2	Activity of lipases produced from various bacteria Compared to the former investigators.....	96

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Model of mono-, di -,and triglyceride.....	26
2.2 The lipase reaction	27
2.3 The common α/β fold of lipases	28
2.4 Products formed by lipase-catalyzed hydrolysis of triglycerides	29
2.5 Schematic representation of the adsorption and hydrolytic activities of lipases at the oil complex	31
2.6 Types of reaction catalyzed by lipase.....	32
2.7 Degradation metabolism of glycerol.....	34
2.8 Degradation of fatty acid by β -oxidation.....	35
4.1 Colonial characteristics of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-40.3.....	58
4.2 Gram staining and high revolution scanning electron micrograph of alkaline lipase producing bacteria strain ALP-40.3.....	59
4.3 Colonial characteristics of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-42.11.....	60
4.4 Gram staining and high revolution scanning electron micrograph of alkaline lipase producing bacteria strain ALP-42.11.....	61
4.5 Biochemical tests of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-40.3.....	63
4.6 Oxidation-Fermentation tests of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-40.3.....	64

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure	Page
4.7	Clear zone resulted from hydrolysis of starch and colonial characteristics of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-40.3..... 65
4.8	Biochemical tests of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-42.11..... 66
4.9	Oxidation-Fermentation test of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-42.11..... 67
4.10	Colonial characteristics of alkaline lipase producing bacterial strain ALP-42.11..... 68
4.11	Effect of pH on growth of the selected bacterial isolates..... 71
4.12	Growth curve of the selected bacterial strain ALP-40.3..... 75
4.13	Growth curve of the selected bacterial strain ALP-42.11..... 77
4.14	Effect of pH on activity of lipase of the selected bacterial isolates..... 82
4.15	pH stability of alkaline lipases of the selected bacterial isolate..... 84
4.16	Effect of temperature on activity of alkaline lipase of the selected bacterial isolates..... 86
4.17	Thermostability of alkaline lipase of the selected bacterial isolates..... 88
D-1	A linear standard curve of p-nitrophenol detected by this method..... 121
E-1	A linear standard curve of oleic acid detected by this method..... 123

ABBREVIATION

$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celcius
μg	=	Microgram
μmol	=	Micromol
μl	=	Microliter
nmol	=	Nanomole
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
cm	=	Centimeter
mol	=	Mole
Kg	=	Kilogram
g	=	Gram
L	=	Liter
hr	=	Hour
min	=	Minute
kDa	=	KiloDalton
g/m	=	Gram per Liter
rpm	=	Round per Minute
NB	=	Nutrient Broth
NA	=	Nutrient Agar
LOB	=	Lipid Oil Broth
LRA	=	Lipid Rhodamine B Agar
TRA	=	Trioleoylglycerol Rhodamine B Agar
LPM	=	Lipase Production Medium
MGM	=	Measurement Growth Medium
SSA	=	Shigella Salmonella Agar
MA	=	MacConkey Agar
EMB	=	Eosin Methylene Blue Agar

TSI	=	Triple Sugar Iron
PSIA	=	Pseudomonas Selective Isolation Agar
Asp	=	Asparagine
Glu	=	Glutamine
Gly	=	Glycine
His	=	Histidine
Ser	=	Serine
X	=	Any Amino Acids
UV	=	Ultraviolet



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย