

## การศึกษาไลเปสของแบคทีเรียและรา และการใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซล

Study on Lipases of Bacteria and Fungi and their Uses in the Biodiesel Production

มัทนา ศรีหัตถกรรม<sup>1</sup>      วิภา หงส์ตระกูล<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

สามารถถ่ายฝากยีนไลเปส 4 ยีน ได้แก่ lip ของ *P. aeruginosa*, lip A ของ *S. marcescens*, lip A ของ *B. subtilis* และ alkaline lip ของ *B. cepacia* เข้าใน pET TOPO เวกเตอร์ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนใน BL21 โดยใช้ IPTG 1 mM ใช้เวลาในการเหนี่ยวนำ 6 ชม. วิธีการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์ที่ได้ผลดีที่สุดคือโดยวิธี DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography สามารถผลิตไลเปสในถังหมักที่ 37 °C, 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> 80 % โดยการให้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่ 37 °C, 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> 80 % เป็นเวลา 4-6 ชม. หลังจาก BL21 เจริญถึง O.D.600 0.6-0.8 ได้ไลเปสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์มอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด เมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซลจะเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล 100 % ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมาได้ไบโอดีเซล B100

### คำนำ

ไลเปส เป็น biocatalysts ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และ/หรือ synthesis of long acylglycerols( <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.53.1.315>) ไลเปสที่แตกต่างกันจะมีคุณสมบัติในการเป็น biocatalyst แตกต่างกันในปฏิกิริยา hydrolysis ไลเปสสามารถตัดสายพันธะต่างๆได้ทั้งแบบเฉพาะเจาะจงและแบบไม่เฉพาะเจาะจง ( [http://www.sciencedirect.com/science?ob=articleURL&\\_udi=B6TGN-45DFFGC-1&\\_user=...](http://www.sciencedirect.com/science?ob=articleURL&_udi=B6TGN-45DFFGC-1&_user=...)) และสามารถตัด ester bond ตรงพันธะระหว่าง fatty acids กับ glycerol ในโมเลกุลของ triglyceride ในสภาพ oil-water interface และบน substrate ที่เป็นของแข็ง(Macrae,1983; Jensen, 1983; [http://www.sciencedirect.com/science?ob=articleURL&\\_udi=B6TGN-45DFFGC-1&\\_user=...](http://www.sciencedirect.com/science?ob=articleURL&_udi=B6TGN-45DFFGC-1&_user=...)) ทำให้โมเลกุลไขมันขนาดใหญ่ถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กลง อย่างเฉพาะเจาะจง และแบบไม่เฉพาะเจาะจง อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลาสั้น ได้เป็น fatty acids บริสุทธิ์ และ glyceride สายสั้น ไลเปสจึงถูกนำไปใช้ในทุกสาขาของอุตสาหกรรม ได้แก่ fat and oleochemical industry, production of biodegradable polymers, textile industry, detergent industry, food processing, flavour development and improving quality, resolution of racemic mixtures, diagnostic tool, bakery products, confectionery and cheese flavouring, cosmetics, tea processing, medical applications, biosensors, degreasing of leather, waste/ effluent/sewage treatment, oil biodegradation, pulp and paper industry, biodiesel production( Hasan *et al.*, 2006 ) ไลเปสที่เหมาะสมต่อการ ใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซล และในอุตสาหกรรมแปรรูปต่างๆ จำเป็นต้องเร่งศึกษาเพื่อสนองต่อความต้องการใช้ในปัจจุบันและอนาคต

---

1 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2 ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียและราโดยเทคโนโลยีชีวภาพ
2. เพื่อศึกษาการใช้ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

## วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

การทดลองที่ 1. การศึกษาการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียและราโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

### อุปกรณ์

1. hot start high-fidelity DNA polymerase
2. primer
3. restriction enzyme
4. expression vector
5. expression host( *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* pTGLM , *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Pichia*
6. IPTG
7. benzamidine
8. sodium azide
9. ammonium sulfate
10. potassium phosphate buffer
11. LB
12. PMSF 0.2 mM
13. Sephadex G75 column
14. Q-Sepharose column
15. Sephacryl S-200
16. 30 % acylamide/ 0.8 % bisacrylamide gel
17. ammonium persulfate
18. TEMED
19. butanol
20. Coomassie Blue R-250
21. lysozyme
22. lactose
23. Tween 80
24. mono, -di, tri-glyceride std.
25. *p*-nitrophenyl palmitate
26. sonicator

27. kinetic spectrophotometer

28. อื่นๆ

### วิธีดำเนินการ

แบบและวิธีการทดลอง ไม่มี เพราะไม่ได้เปรียบเทียบ

มีขั้นตอนดังนี้

1.1 construction of expression plasmid

1.2 การศึกษาการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์จาก expression โคลน

1.3 การศึกษาคุณลักษณะของไลเปสที่ผลิตได้

1.4 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียและรา ในถังหมัก

### 1.1 construction of expression plasmid

#### วิธีการ

1. ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนไลเปส 4 ยีนเข้ากับ pET TOPO เวกเตอร์ ยีนไลเปส 4 ยีนได้แก่

1. *lip* จาก *Pseudomonas aeruginosa*

2. *lip A* จาก *Serratia marcescens*

3. *lip A* จาก *Bacillus subtilis*

4. *alkaline lip* จาก *Burkholderia cepacia*

2. ถ่ายฝากยีน *lip* ที่ได้ทำการเชื่อมต่อกับ pET TOPO เวกเตอร์ เข้าใน competent cell pET TOPO TOP10 ตรวจสอบผลโดยเทคนิค PCR และส่งพลาสมิดไปหาลำดับเบส

3. สกัดพลาสมิดและถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมเข้าไปใน expression competent cell BL21 Star (DE3)

4. เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนโดยใช้ 1 mM IPTG ที่ 37 °C บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที เมื่อ BL21 เจริญถึง O.D.600 0.6-0.8 เก็บเซลล์ทุกชั่วโมง นำไปตรวจสอบช่วงเวลาของการแสดงออกของยีนโดย SDS-PAGE

### 1.2 การศึกษาการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์จาก expression โคลน

#### วิธีการ

นำเซลล์แบคทีเรีย BL21 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตไลเปส มาทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freeze-thaw และโดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ/นาที 15 นาที แยกส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่

4 ชม. ข้ามคืน ปั่นเหยียงแยกโปรตีนที่ตกตะกอนได้ที่ 10000 รอบ/นาที 30 นาที แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 วิธีการ

1. Ni-NTA Purification kit

2. DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography

1. Ni-NTA Purification kit

ศึกษาการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์จาก expression โคลน โดยใช้ Ni-NTA Purification System

และตรวจสอบไลเปสที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE วิธีการตามที่แนบมากับชุด kit ของบริษัทกิบไทยและบริษัท GE Healthcare

2. DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography

- equilibrate DEAE resin( anion exchanger )ใน 1 M NaCl in 50 mM Sodium phosphate, pH7

- ปรับความเข้มข้นของ DEAE resin เป็น 50 %

- แฝ่คอลลัมน์ด้วย DEAE resin ที่เตรียมไว้

- นำ recombinant crude lipase เทใส่ลงไป

- เก็บส่วนใสที่ไหลออกมาไว้ เป็น Flow through

- wash ด้วย 50 mM Tris-Cl pH 8.0 2 ครั้งๆละ 5 มล. เก็บส่วนใสไว้เป็น wash 1-2

- elute ด้วย 50 mM Tris-Cl + 20-500 mM CaCl<sub>2</sub> elute ละ 5 มล. . เก็บส่วนใสไว้

- ตรวจสอบผลโดยวิธี SDS-PAGE

### 1.3 การศึกษาคุณลักษณะของไลเปสที่ผลิตได้

ตรวจสอบคุณลักษณะของไลเปสที่ผลิตได้โดยการหยดไลเปสลงในอาหาร Basal Medium Agar + palm oil emulsion 1% (w/v) ใน 10 % gum Arabic solution + Rhodamine B บ่มปฏิริยาไว้ที่ 37<sup>0</sup>ชม. ข้ามคืน นำไปตรวจสอบการเรืองแสงได้แสง black light ที่ 350 nm เรืองแสงมากแสดงว่ามีประสิทธิภาพมาก

### 1.4 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

1. เลี้ยง *E. coli* B121 ที่ได้รับยีน *lipA* ของ *Bacillus subtilis* ในอาหารเหลว LB 400 มล.+ ampicillin 100 ug /ml 800 ul บ่มเชื้อข้ามคืน ที่ 37<sup>0</sup>ชม, 200 rpm

2. อบถังหมักที่มีอาหาร LB 4 ล. บรรจุไว้ในถัง ที่ 121<sup>0</sup>ชม, 15 ปอนด์ 20 นาที ปล่อยให้เย็นข้ามคืน

3. ถ่ายเชื้อ *E. coli* BI21 ที่เลี้ยงไว้ ลงในถังหมัก และเติม ampicillin 100 ug/ml 8 มล. ตั้งโปรแกรม การหมักที่ 37<sup>0</sup> ซ, 200 rpm, pH7 และ pO2 80 %

4. เหนี่ยวนำให้ผลิตไลเปสด้วย IPTG 2 ครั้ง

ครั้งที่ 1 เมื่อเชื้อเจริญถึง O.D600 0.6 - 0.8 เก็บเซลล์ ( T0 ) และเติม IPTG 20 มล.

ครั้งที่ 2 หลังจากครั้งที่ 1 1 ชม. เก็บเซลล์ ( T1 ) และเติม IPTG 20 มล. ( ความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ในถังหมัก 1mM )

5. เก็บเชื้อทุกชั่วโมง จนถึง T46 จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 4<sup>0</sup>ซ 8,000 รอบ/นาที 5 นาที เก็บตะกอนเชื้อไว้ที่ -20<sup>0</sup>ซ

6. ทำให้เซลล์แตก ดังนี้ นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 1X 250 mM sodium phosphate ( NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ) buffer pH 8.0 + lysozyme ใส่ lysozyme อัตรา 4 มก./ตะกอนเชื้อ 30 มก. ผสมให้เข้ากันดี ไม่จับเป็นก้อน บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องข้ามคืน

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4<sup>0</sup>ซ, 8,000 รอบ/นาที 10 นาที เก็บส่วนใสที่มี crude enzyme ไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และ ตรวจสอบโปรตีนที่ T0, T1, T2, T3, T4, T5 และ T6 โดยวิธี SDS-PAGE

8. เก็บ crude lipase ไว้ที่ - 20<sup>0</sup>ซ

## 2. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปส

1. ทำการข่อยน้ำมันปาล์มดิบในถุงพลาสติกขนาด 16x26 นิ้ว ด้วย crude lipase ( 20 ug/ul ) อัตรา crude lipase 500 มล./ น้ำมันปาล์มดิบ 4 ล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37<sup>0</sup>ซ, 80 rpm เป็นเวลา 17 ชม.

2. หยุดปฏิกิริยาที่ 60<sup>0</sup>ซ 3 ชม.

3. ปั่นเหวี่ยงแยกน้ำมันออกจากน้ำและสิ่งสกปรก

4. นำน้ำมันไปผลิตไบโอดีเซล ( อัตรา น้ำมันที่เตรียมไว้ในข้อ 3 5 มล.+KOH 4 % ของ น้ำมัน+methanol 10 มล. )

- เตรียม methoxide ตามอัตราที่กำหนด (KOH 4 % ของ น้ำมัน+methanol 10 มล.)

- เติมน้ำมันลงไป เขย่าให้ผสมกัน

- นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55<sup>0</sup>ซ 15 นาที เขย่าให้ผสมกันเป็นระยะๆ จนเป็น สารละลายใส

- นำไปบ่มปฏิกิริยาต่อบนเครื่องเขย่า 126 รอบ/นาที 20 นาที

- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชม. หรือข้ามคืน หรือนำไปล้างทันที

5. วิธีการล้าง

- นำไบโอดีเซลที่หลงใน separating funnel ล้างด้วยน้ำประปา 3-5 ครั้ง จนน้ำใส

- เก็บไบโอดีเซลที่อยู่ข้างบน ไม่ให้มีน้ำปน ใส่ขวดไว้

6. นำไปเก็บไว้ที่ 4 °C

7. ละลายไบโอดีเซลที่ 37 °C ไบโอดีเซลจะแยกตัวออกจากน้ำที่หลงเหลืออยู่

8. ปั่นเหรียญที่ 8000 รอบ/นาที 10 นาที หรือ กรองผ่าน membrane 0.45 um

9. ส่งตัวอย่างน้ำมันไปทดสอบคุณภาพน้ำมันที่ MTEC และ ที่ ปตท.

ระยะเวลาที่ดำเนินการ ต.ค. 2554 ถึง ก.ย. 2557

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 1. การศึกษาการผลิตไลเปสจากราโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

### 1.1 construction of expression plasmid

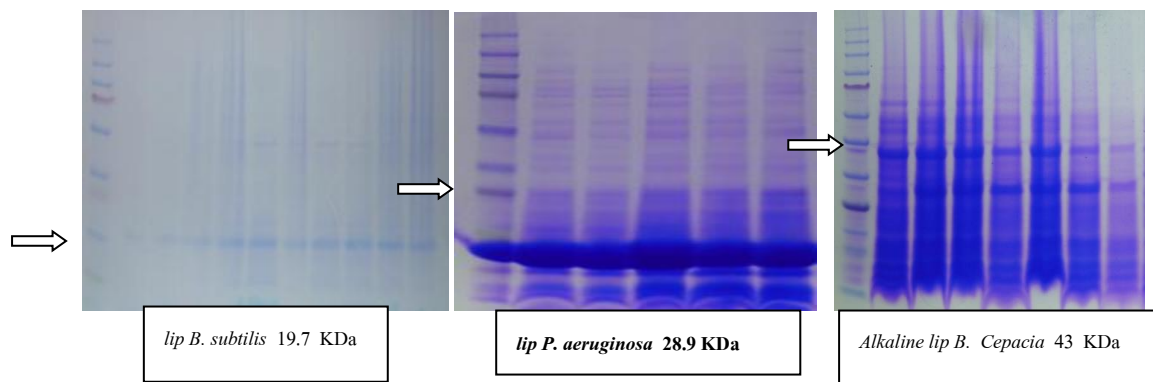
สามารถถ่ายฝากยีนไลเปส 4 ยีน เข้าใน pET TOPO เวกเตอร์ และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนใน BL21

1. *lip* จาก *P. aeruginosa*

2. *lip A* จาก *S. marcescens*

3. *lip A* จาก *B. subtilis*

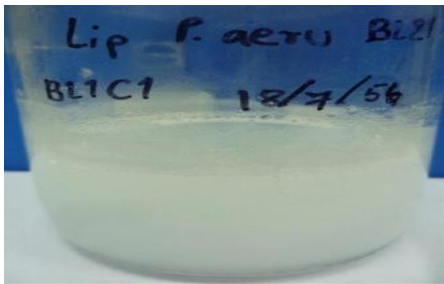
4. *alkaline lip* จาก *B. cepacia*



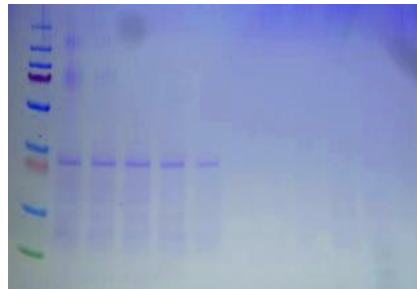
### 1.2 การศึกษาการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์จาก expression โคลน

1. ไม่สามารถแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์ได้โดยใช้ชุด kit โปรีตินเกาะเม็ด bead น้อย ได้โปรตีนบริสุทธิ์น้อย

2. การแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์โดยวิธี DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography ได้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน แต่ได้ปริมาณน้อย ต้องนำ flow through มาทำซ้ำจึงจะได้โปรตีนมากขึ้น



ตกตะกอนโปรตีน



DEAE-cellulose chromatography lip *P. aeruginosa* ๒๕๕๓ (elute)  
 ค่าย 50 mM Tris-Cl + 20-500 mM CaCl<sub>2</sub> (เลนที่ 1 คือ โปรตีน  
 มาตรฐาน เลนที่ 2 คือ flow through เลนที่ 3-4 คือ wash เลนที่ 5-12  
 คือ elute

### 1.3 การศึกษาคุณลักษณะของไลเปสที่ผลิตได้

ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการข่อยน้ำมันดีมาก เรืองแสงมาก

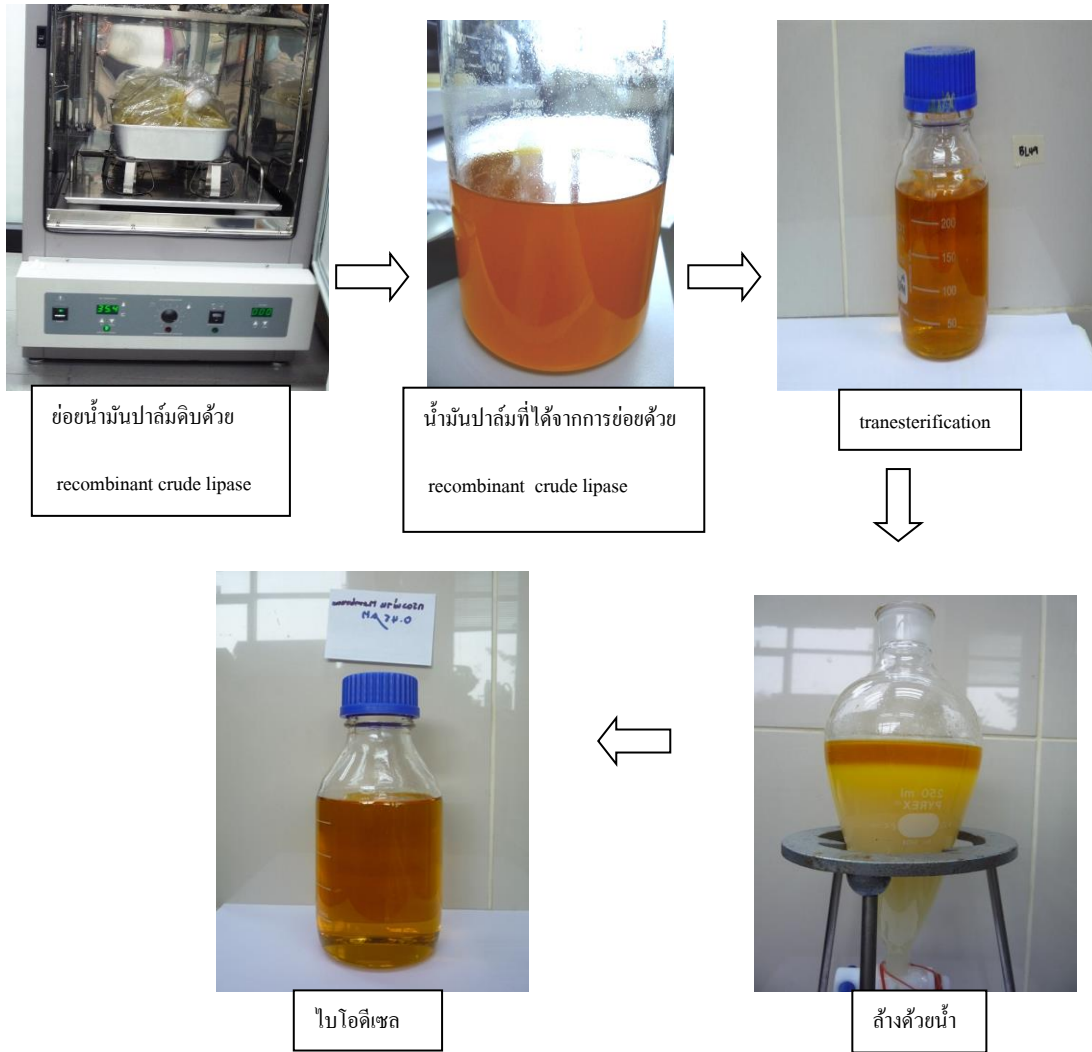
### 1.4 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียและรา ในถังหมัก

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่ 37 °ซ, 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> 80 % เป็นเวลา 4-6 ชม. หลังจาก BL21 เจริญถึง O.D.600 0.6-0.8 ได้ไลเปสที่มีประสิทธิภาพในการข่อยน้ำมัน ปลอดภัยอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด เมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซลจะเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล 100 % ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา



### 2. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปส

สามารถผลิตไบโอดีเซลอย่างง่ายโดยใช้ไลเปส ได้ไบโอดีเซล B100



รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ไบโอดีเซล		หน่วย
		<i>lipA B. subtilis</i>	ASTM specification for biodeisel B100	
1. ค่าความเป็นกรด ( acid number )	ASTM D664	0.33	Max 0.50	มก. KOH/ก. น้ำมัน
2. ค่าความร้อน ( heat of combustion )	ASTM D240	39.75 (128,260 BTU/Gal)	37.27 (127,042 BTU/Gal )	เมกะจูลล์/กก.
3. ค่าความหนาแน่น ณ. 15 °ซ ( density at 15 °ซ )	ASTM D4052	875.70	860-900	กก./ลูกบาศก์เมตร
4. จุดไหลเท	ASTM D97	11	Max. 18	°ซ
5. ปริมาณน้ำและตะกอน ( water and sediment )	ASTM D 2709-96	<0.005	Max. 0.2	%vol.



รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ไบโอดีเซล		หน่วย
		<i>lipA B. subtilis</i>	ASTM specification for biodeisel B100	
6. จุดวาบไฟ ( flash point )	ASTM D93	180	Min 120 Thai Min 130 USA	<sup>0</sup> ซ
7. การกัดกร่อนทองแดง ( copper strip corrosion )	ASTM D 130	1A	No.1 max	-
8. ความหนืดคิเนมาติก ณ. 40 <sup>0</sup> ( viscosity at 40 <sup>0</sup> ซ )	ASTM D455	4.49	3.5-5.0	เซนติสโตกส์ ( cSt)
9. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ( methyl ester )	EN14103	98.87	96.5	% โดยน้ำหนัก
10. โมโนกลีเซอไรด์ ( monoglyceride )	EN14105	0.125	0.8	% โดยน้ำหนัก
11. ไดกลีเซอไรด์ ( diglyceride )	EN14105	0.021	0.2	% โดยน้ำหนัก
12. ไตรกลีเซอไรด์ ( triglyceride )	EN14105	0.071	0.2	% โดยน้ำหนัก
13. กลีเซอรินอิสระ ( free glycerin )	EN14105	0.011	0.02	% โดยน้ำหนัก
14. กลีเซอรินทั้งหมด ( total glycerin )	EN14105	0.011	0.25	% โดยน้ำหนัก
15. เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ 110 <sup>0</sup> ( oxidation stability at 110 <sup>0</sup> ซ )	EN14112	9.62	3 min USA 10min Thai	ชม.
16. ค่าความหล่อลื่น ( lubricity HFRR )	CEC F06-A-96	230	<300	micron
17. sulphated ash	ASTM D 874-06	<0.005	Max. 0.02	% โดยน้ำหนัก
18. phosphorus	ASTM D 4951-09	nil	Max. 10	% โดยน้ำหนัก
19. sulfur content	ASTM D 5453-09	1.4	Max. 10	มก./กก.

รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ไบโอดีเซล		หน่วย
		<i>lipA B. subtilis</i>	ASTM specification for biodeisel B100	
20. Micro carbon residue	ASTM D 4530-06 E1	0.07	Max. 0.30	% wt
21. Sodium plus Potassium	ASTM D 2709-96	nil	Max. 5.0	Mg/kg

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สามารถถ่ายฝากยีนไลเปส 4 ยีน ได้แก่ *lip* ของ *P. aeruginosa*, *lip A* ของ *S. marcescens*, *lip A* ของ *B. subtilis* และ *alkaline lip* ของ *B. cepacia* เข้าใน pET TOPO เวกเตอร์ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนใน BL21 โดยใช้ IPTG 1 mM ใช้เวลาในการเหนี่ยวนำ 6 ชม. วิธีการแยกและสกัดไลเปสบริสุทธิ์ที่ได้ผลดีที่สุดคือโดยวิธี DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography สามารถผลิตไลเปสในถังหมักที่ 37 °ซ, 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> 80 % โดยการให้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่ 37 °ซ, 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> 80 % เป็นเวลา 4-6 ชม. หลังจาก BL21 เจริญถึง O.D.600 0.6-0.8 ได้ไลเปสที่มีประสิทธิภาพในการข่อยน้ำมันปาล์มอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด เมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซลจะเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล 100 % ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมาได้ไบโอดีเซล B100

### การนำผลการทดลองไปใช้ประโยชน์

1. ใช้ในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียโดยเทคโนโลยีชีวภาพ
2. ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล และกรดไขมันที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

### เอกสารอ้างอิง

- กิติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่ผลิตเอนไซม์ lipase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 106 หน้า.
- Abbas ,H., H. Abel, D. Valeria and C. Louis. 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enz. and Micro. Technol.* 31(7): 968- 975.
- Abdel-Fattah, Y.R. and A.A. Gaballa. 2006. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. *Microbiol. Research*, In Press, ( www. Sciencedirect.com. )
- Arpigny J. L. and K.-E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. *Biochem. J.* 343:177-183.

- Ghamgui, H., M. Karra-Chaabouni and Y. Gargouri. 2004. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* : a comparative study between *n*- hexane and solvent-free system. *Enz. Microb. Technol.* 33 : 355-363.
- Gupta, N., S. Vikram and G. Rani. 2006. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans* : Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Proc. Biochem.* (doi : 10.1016/j.procbio.2006.10.006 )
- Hiol, A., J. D. Marie, D. Danielle and C. Louis. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enz. Microb. Technol.* 25(1-2): 421-430.
- Hiol, A., J. D. Marie, R. Nathalie, D. Danielle, S. Louis and C. C. Louis. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enz. Microb. Technol.* 26(5-6): 421-430.
- Jensen, R.G. 1983. Detection and determination of lipase (acyl glycerol hydrolase) activity from various source. *Lipids* 18(9): 650-657.
- Kokusho, Y., H. Machida and S. Iwasaki. 1982b. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. Strin No. 679. *Agr. Biol. Chem.* 46(7): 1743-1750.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61(6): 1067-1071.
- Metzler, D. E. 1977. *Biochemistry : The chemical reactions of living cells*. Academic Press. New York.
- Omar, I.C., N. Nishio and S. Nagai. 1987 b. Production of a thermastable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol corn steep liquor medium. *Agr. Biol. Chem.* 51(8): 214ium. *Agr. Biol. Chem.* 51(8): 214o,T. Sugiura and Y. Minoda. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agr. Biol. Chem.* 46(12): 2885-2893.
- Park, E. Y., M. Sato, S. Kojima. 2006. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. *Enz. Microb. Technol.* 39 : 889-896.
- Rosu, R., Y. Iwasaki, N. Shimizu, N. Doisaki and T. Yamane. Intesification of lipase performance in a transesterification reaction by immobilization on CaCo3 power. *J. Biotech.* 66: 53-58.
- Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresource tech.* 98( 3 ) : 648-653.
- Siciliano, S.D. N. Fortin, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelie, D. Beaumier, D. Ouellette, R. Roy, L. G. Whyte, M. K. Banks, P. Schwab, K. Lee, and C. W. Greer. 2001. Selection of specific endophytic bacteria

genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67( 6 ): 2469-2475.

Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganism, cultural condition and some properties of crude enzyme. *Agr. Bio. Chem.* 41(8): 1353-1358.

Yamaguchi, T., N. Muroya, M. Isobe and M. Sugiura. 1973. Production and properties of lipase from a newly isolated *Cromobacterium*. *Agr. Biol. Chem.* 37(5): 999-1005.

Zinniel, D. K., P. Lambrecht, B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmariski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta and A. K. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and Prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68( 5 ): 2198-2208.

.....