รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้โดยจุลชีพที่แยกจากน้ำพุร้อนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมัน และ / หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์

Development of Thermostable Lipases Production from Hot Spring Thermophiles Applicable for Fat and Oil Industry and/or Bioorganic Synthesis

รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

นายบัณฑิต บุญศิลป์ไทย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ทุนอุดหนุนการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประจำปี 2540

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้โดยจุลชีพที่แยกจากน้ำพุร้อนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์" เป็นโครงการหนึ่งในหลายโครงการที่ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีงบประมาณ 2540 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัยในโครงการนี้ซึ่งทำให้นักวิจัยสามารถดำเนินการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาประเทศไปได้ด้วยดีและได้ข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์สำหรับดำเนินการวิจัยในระดับสูงต่อไป

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้สถานที่ตลอดจนการใช้เครื่องมือ สารเคมีที่จำเป็นสำหรับงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ในท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.วรชาติ สิรวราภรณ์ ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ช่วยโคลนยีนของเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้เพื่อการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย "การพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้โดยจุลชีพที่แยกจากน้ำพุร้อนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์"

ผู้เขียนรายงานการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

เอนไซม์ไลเปสมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมไขมันเนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงคุณภาพอาหารประเภทน้ำมันและไขมันโดยการย่อยสลายไขมันได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอร์ไรด์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์และมีราคาสูง ปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าวิธีย่อยสลายทางเคมีซึ่งใช้อุณหภูมิสูงถึง 220°C และความดันสูง นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหลายอย่างและสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ในภาวะที่มีน้ำน้อยซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารเคมี ในการวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสได้สูงที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่มาทำการศึกษาเพื่อพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนสูงได้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์

ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสนอกเซลล์ได้มากกว่าไอโซเลทอื่นๆ ที่แยกได้มา 5 ไอโซเลท คือ P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 มาศึกษาการผลิต และลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างเหมาะสมและมีประโยชน์สูงสุดต่อไป ในแง่การผลิตได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทที่ 65°ซ ในอาหาร 3 สูตร สูตร A ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์ เปปโตน และน้ำมันมะกอก สูตร B ประกอบด้วยแบคโต-เปปโตน สิ่งสกัดจากยีสต์ soymeal น้ำมันมะกอก, Triton X-100, K_2HPO_4, $MgSO_4$ และ Na_2CO_3 และสูตร C คือสูตร A ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ 50% โดยปริมาตร เทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทเจริญได้ดี และผลิตไลเปสได้สูงในอาหารสูตร A และการผลิตไลเปสในอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์นั้นจะมีปริมาณลดลงตามค่า log P ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมอยู่ ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท จะค่อนข้างเสถียรต่อความร้อนในช่วงพีเอชที่กว้างจาก 4.0-10.0 มีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานกว้าง (pH 6.0-8.0 และอุณหภูมิ 40-80°C ตามลำดับ) ความคงทนของเอนไซม์ในพีเอชที่เป็นทั้งกรดและเบสนี้ที่อุณหภูมิสูงชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ในการนำไปใช้ในผงซัก-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟอกที่ใช้กับงานซักล้างที่อุณหภูมิต่าง ๆ และงานทางชีวสังเคราะห์ ไลเปสจากทั้ง 5 ไอโซเลทมีรูปแบบเหมือนกันในการสลายสับสเตรทไขมันและน้ำมันชนิดต่าง ๆ คือ มีความจำเพาะต่อการสลายน้ำมันในช่วงกว้างโดยที่จะมีความจำเพาะมากต่อการไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของกรดโอเลอิคมากกว่ากรด ไขมันชนิดอื่น ๆ

ได้ทดสอบแอคติวิตีและเสถียรภาพของไลเปสนอกเซลล์จากเทอร์มอไฟล์ P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 เมื่อมีไอออนโลหะ ตัวยับยั้งและสารลดแรงตึงผิวบางชนิด พบว่าไอออน Co^{2+} และ Ag^{+} ยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดและ Zn^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสจาก TP614 ได้ดี เอนไซม์มีความคงทนมากขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะที่มีไอออน Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Pb^{2+} ทั้ง EDTA, EGTA และ $CaCl_2$ เข้มข้น 10 mM ต่างก็ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ในภาวะที่มี PMSF เข้มข้น 10 mM แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งบางส่วนยกเว้นไลเปสจาก TP614 จะถูกยับยั้งทั้งหมด ในขณะที่ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อมี Triton X-100 เข้มข้น 4% (v/v) และยูเรียเข้มข้น 3M และจะสูญเสียแอคติวิตีเกือบทั้งหมดเมื่อมี SDS เข้มข้นมากกว่า 0.5% (w/v) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสเหล่านี้ไม่มีส่วนจับแคลเซียมในโมเลกุล และไม่เป็นเมทัลโลโปรตีน กรดอะมิโนเซรีนอาจเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่พันธะไดซัลไฟด์ไม่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา Triton X-100 และยูเรียที่ความเข้มข้นแน่นอนค่าหนึ่ง สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่ SDS จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ

ได้ทดลองการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการแยกยีนสำหรับการสร้างไลเปสจากแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ P1, TP404 และ TP811 ใส่เข้าไปในพาหะ pUC19 แล้วโคลนเข้าไปในแบคทีเรีย E. coli DH5α แล้วคัดเลือกโดยดูวงใสรอบโคโลนีบน Tributyrin agar plate ได้โคลนมา 3 ชนิด ชื่อ pUCP1, pUC-TP404 และ pUCTP-811 ตามลำดับ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเทียบกับ Native strains พบว่าโคลนทั้งสามสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์โดยมีแอคติวิตีเป็น 2 เท่าของสายพันธุ์ธรรมชาติ ซึ่งแสดงว่าการแสดงออกของยีนยังต่ำอยู่ต้องทำการปรับปรุง การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของไลเปสจากโคลนทั้งสามเทียบกับสายพันธุ์ธรรมชาติพบว่าเหมือนกันทุกประการแสดงว่าการโคลนยีนประสบผลสำเร็จแต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น

ผลการศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสนั้นยังไม่ได้ผลดีเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่นำมาศึกษายังมีปริมาณต่ำจะต้องหาวิธีปรับปรุงการแยกบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณผลผลิตสูง และมีความบริสุทธิ์สูงโดยใช้ขั้นตอนน้อย ๆ เพื่อนำไปศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title Development of Thermostable Lipases Production from Hot Spring Thermophiles Applicable for Fat and Oil Industry and / or Bioorganic Synthesis

Report by Associate Professor Dr.Suree Phutrakul

Lipases are useful enzymes for fat industries since they play an important role in modification of fat and oil for food industries. The main advantages of using lipases for hydrolysis of fats and oils over the conventional high pressure stream for fat splitting are a cleaner product due to a more specific reaction and a lower energy requirement. Enzymatic reaction at lower temperature is being developed to replace the reaction process at 220°C for the industrial production of high value fatty acids and glycerides. Furthermore, lipases can catalyze the synthetic reaction in organic media at low water content which open the possibility of bioorganic synthesis for industrial application. In this study a number of thermophilic bacteria producing high lipase activity isolated from hot spring in Chiang Mai have been selected for development of thermostable lipase production applicable for fat and oil industry and/or bioorganic synthesis.

Five isolates of thermophilic bacteria producing higher lipase activity than other isolates to study the enzyme production and characteristic of the enzymes for their potential application in industries. For lipase production, the thermophiles were comparatively cultured at 65°C in there liquid media containing yeast extract, tryptone and olive oil in base mixture (medium A); bacto-peptone, soymeal, yeast extract, oilve oil, Triton X-100, K_2HPO_4, $MgSO_4$ and Na_2CO_3 in distrilled water (medium B); and medium A containing 50% v/v of organic solvents (medium C). The thermophile could grow and produce the highest lipolytic activity in medium A. The productivity of the enzyme in medium C were gradually decrease from high to low log P values of organic solvents when compared to the enzymes productivity in medium A. Most of the thermostable lipases had a wide range of optimum pH and temperature (pH 6.0-8.0 and 50-80°C) with the maximum activity around pH 7.2 at 65°C. The enzymes were fairly stable in the pH range from 4.0-10.0 at 70°C for 1 h. The stability of the enzymes in acidic and alkali pH and at high temperatures indicates their usefulness for applications in a heavy-duty laundry and bioorganic synthesis. Hydrolytic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

activity of lipases on various oil and pure triglyceride substrates at their optimum conditions indicates that the enzyme from five bacterial isolates have broad substrate specificity and more specific to ester bond of oleic acid. Extracellular lipases from thermophile isolates P1, TLS63, TP404, TP614 and TP811 were tested for the activity and stability in the presence of some metal ions, inhibitors and surfactants. All the lipases were generally inhibited by Co^{2+} and Ag^{+}, and lipase from TP614 was markedly inhibited by Zn^{2+} while Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Pb^{2+} could stabilized the lipolytic activities after pre-incubated at 30°C for 24 h. The lipases were neither inhibited by 10 mM EDTA and EGTA nor activated by 10 mM $CaCl_2$. In the presence of 10 mM PMSF, the enzymes were partially inhibited except lipase from TP614 was completely inhibited whereas 10 mM 2-mercaptoethanol caused no significant inhibition of lipolytic activity. Enzymes activity were significantly enhanced about 2 folds by 4% (v/v) Triton X-100 and 3M urea and strongly inhibited by 0.5% (w/v) of sodiumdodecyl sulfate (SDS). The results suggest that a calcium binding site do not exist and the enzymes are not metalloproteins. The involvement of a serine residue in the catalytic triads of the enzymes is possible but disulfide bonding is not necessary to the catalytic function. The lipase activity is activated by certain concentration of Triton X-100 and urea but deactivated by SDS.

Cloning of lipase genes from 3 isolates of thermophilic bacteria (P1, TP404 and TP811) had been investigated using pUC19 as vector and cloned into E. coli DH5α and selected the clons that produce clear zone on tributyrin agar plate named as pUCP1, pUCTP404 and pUCTP811 respectively. The three clones could produce lipase activities 2 times higher than the native strains which indicates low expression of the enzyme. The properties of the enzymes from the tree cleaned had been found to similar to the lipase from native strains which may indicate that the cloning process was success. However, the expression and secretion of the lipases have to be improved.

Purification of extracellular lipases from Thermophiles had not yet been success due to low amount of enzymes were used. More detail experiments are needed to get the efficient purification process that give higher purified enzyme with higher yield.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญ

	หน้า
คำขอบคุณ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	จ
รายการตารางประกอบ	ฌ
รายการภาพประกอบ	ญ
รายการอักษรย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย	1
1.2 หลักการ เหตุผล และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
1.6 หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์	6
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	7
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	7
2.1.1 สารเคมี	7
2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	8
2.1.3 อุปกรณ์	8
2.2 วิธีการทดลอง	9
2.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส	10
2.2.2 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส	10
2.2.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Protein - dye binding (39)	12
2.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์	13
2.2.5 การคัดเลือกเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสนอกเซลล์ในปริมาณสูงและทดสอบสมบัติเบื้องต้นเพื่อดูแนวโน้มที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม	15
2.2.6 การโคลนยีนไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียทนความร้อน	17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

2.2.7 การเปรียบเทียบแอคติวิตี้ของไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย P1, TP404 และ TP-811 กับโคลน pUC-P1, pUC-TP811 ในอาหารเหลวตามลำดับ 17
2.2.8 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสนอกเซลล์จากแบคทีเรีย เทอร์โมไฟล์ 3 ไอโซเลท และโคลนของเอนไซม์เหล่านี้ 18
2.2.8.1 การศึกษาความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ไลเปส 18
2.2.8.2 การศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรท ชนิดต่าง ๆ ของไลเปส 18
2.2.8.3 การศึกษาความคงทนของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ 18
2.2.8.4 การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 18
2.2.8.5 การศึกษาผลของตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 19
2.2.8.6 การศึกษาผลของสารแรงตึงผิวบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 19
2.2.9 การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ไลเปสบางส่วน 19
2.2.9.1 การทำให้ไลเปสเข้มข้นขึ้นโดยวิธี ultrafiltration 19
2.2.9.2 การศึกษาการทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน 19
2.2.9.3 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน 20
2.2.9.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 21
2.2.9.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE 22

บทที่ 3 ผลการทดลอง 25
3.1 ผลการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลท คือ P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 ในอาหารเหลว 3 สูตร 25
3.2 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท 26
3.3 การศึกษาผลของแคลเซียมไอออนต่อความเสถียรของไลเปส 27
3.4 ผลการศึกษาสมบัติการสลายสับสเตรทน้ำมันชนิดต่าง ๆ โดยไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท 28
3.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตี้และเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 5 ไอโซเลท 30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

3.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด 33
3.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด 33
3.8 ผลการโคลนยีนที่ผลิตไลเปสและการแสดงออกของยีนจาก P1, TP404 และ TP811 35
3.9 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีและสมบัติบางประการของไลเปสนอกเซลล์แบคทีเรีย P1, TP404 และ TP811 กับโคลนของเอนไซม์เหล่านี้ 37
3.10 ผลการศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ T20 และ TP614 ให้บริสุทธิ์บางส่วน 42

บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 50
4.1 การผลิตไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน 5 ไอโซเลท ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ 50
4.2 การศึกษาสมบัติของไลเปสในรูปแบบของ crude เอนไซม์ 51
4.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว แอคติวิตีและสมบัติบางประการของ crude lipases จากเทอร์โมไฟล์ไอโซเลท P1, TO404 และ TP811 กับโคลนของเอนไซม์จากไอโซเลทดังกล่าว 53
4.4 การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 55
4.5 สรุปผลการวิจัย 55

เอกสารอ้างอิง 57
การเสนอผลงานวิจัยนี้ 61

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างการทำ first derivative titration เพื่อหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น	12
2.2	อัตราส่วน การเติมสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Protein - dye binding	13
2.3	องค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท	16
3.1	การผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย	25
3.2	สรุปสมบัติทางกายภาพทั่วไปของไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท	26
3.3	สารละลายอินทรีย์ต่อความคงทนของไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่ 37° และ 65°C	27
3.4	สมบัติการสลายลิปิดสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท	29
3.5	ผลของไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปสจากเทอร์มอไฟล์ 5 ไอโซเลท ที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30
3.6	การเปรียบเทียบสมบัติบางประการของไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 3 ไอโซเลท และโคลนของมัน	39
3.7	แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก 3 ไอโซเลท และโคลนของมันในการไฮโดรไลส์สับสเตรทน้ำมันและไขมันชนิดต่าง ๆ	40
3.8	อิทธิพลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก native strains และ cloned ของมัน	42
3.9	การประมาณค่ามวลโมเลกุลของไลเปสจาก T20 โดยเจลฟิลเตรชันและ SDS-PAGE	47
3.10	การแยกไลเปสจาก T20 ให้บริสุทธิ์บางส่วน	49

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	ปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยไลเปส (ก) Esterification และ (ข) Alcoholysis	3
2.1	ตัวอย่างการคำนวณหาแอคติวิตี้ของไลเปส	11
3.1	ผลของการเติม 5 mM $CaCl_2$ ต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน (คำนวณแอคติวิตี้โดยเทียบเป็นเปอร์เซนต์ของแอคติวิตี้เริ่มต้นในสภาพที่ไม่ได้เติม $CaCl_2$)	28
3.2	ผลของ EGTA เข้มข้น 10 mM ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	31
3.3	ผลของ EDTA เข้มข้น 10 mM ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	31
3.4	ผลของ PMSF ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	32
3.5	ผลของ 2-mercaptoethanol ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	32
3.6	ผลของยูเรียต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	33
3.7	ผลของ Triton X-100 เข้มข้น 4% ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	34
3.8	ผลของ SDS ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	34
3.9	การผลิตเอนไซม์ไลเปสของโคลน pUC-P1 และแบคทีเรียไอโซเลท P1	35
3.10	ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก pUC-P1 และ P1	35
3.11	ผลการไฮโดรไลส์สับสเตรทต่างชนิดของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1	36
3.12	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1	36
3.13	ความเสถียรต่อความร้อนของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1 เมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 30^{o} - 90^{o}ซ เป็นเวลา 1 ชม.	36
3.14	รูปแบบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ P1 และ pUC-P1	37
3.15	รูปแบบการผลิตไลเปสของ TP-404 และ pUC-TP-404	38
3.16	รูปแบบการผลิตไลเปสของ TP-811 และ pUC-TP-811โคลนของมัน	38
3.17	ผลของ 10 mM EGTA ต่อไลเปสแอคติวิตี	43
3.18	ผลของ 10 mM EDTA ต่อไลเปสแอคติวิตี	43

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่		หน้า
3.19	ผลของ 2-mercaptoethanol (10% v/v) ต่อไลเปสแอคติวิตี	44
3.20	ผลของ PMSF ต่อไลเปสแอคติวิตี	44
3.21	ผลของ 3M Urea ต่อไลเปสแอคติวิตี	45
3.22	ผลของ Triton X-100 (4% v/v) ต่อไลเปสแอคติวิตี	45
3.23	ผลของโซเดียมโดซิซิลซัลเฟท (SDS) ต่อไลเปสแอคติวิตี	46
3.24	การแยกเอนไซม์ไลเปสจาก T20 โดย Sephadex G-100 คอลัมน์ โครมาโทกราฟี ชะด้วย 0.05 M phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.2	47
3.25	การหามวลโมเลกุลของไลเปสที่แยกโดย (a) เจลฟิลเตรชันบน Sephadex G-100 และ (b) โดย SDS-PAGE	48

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการอักษรย่อ

A	=	absorbant
^{o}C	=	degree celcius
g	=	gram
h	=	hour
mM	=	millimolar
M	=	Molar
min	=	minute
ml	=	millimetre
%	=	percent
μ	=	micro
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
SDS-PAGE	=	sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมและกำลังเป็นที่สนใจกันอย่างกว้า
ขวางเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ triglycerides ให้ได้ glycerol และกรดไขมันไ
สภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ไลเปสจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดจะสามารถเร่งปฏิกิริยา 1, 3 specific trans-
esterification ได้ คุณสมบัติดังกล่าวมีความสำคัญและมีบทบาทในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการแ
อาหารประเภทน้ำมัน นอกจากนี้ไลเปสจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์
สารอินทรีย์ได้ ในภาวะที่เหมาะสมและยังมีความจำเพาะในการเลือกทางสเตอริโอเคมีด้วยทำให้
สามารถสังเคราะห์สารอนิทรีย์หลายชนิดที่ไม่สามารถจะสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมีธรรมดาได้ กา
ใช้เอนไซม์ไลเปสทนความร้อน (Thermostable lipases) ในงานดังกล่าวข้างต้นจะก่อให้เกิดผลดี
หลายประการ กล่าวคือ สามารถใช้ได้ดีในขบวนการที่ต้องการอุณหภูมิสูงและเป็นผลให้อัตราเร็วใน
การเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการผลิตสารเพิ่มมากขึ้น ตัวทำละลายต่าง ๆ และสา
ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่กาซสามารถละลายได้ดีขึ้นที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยั
ลดการเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ และมีความเสถียรต่อสภาวะที่ทำให้โปรตีนเสี
สภาพได้ดีกว่าเอนไซม์ที่เสถียรที่อุณหภูมิต่ำทำให้มีอายุการใช้งานได้นานขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่า
ทำให้ไลเปสที่ทนความร้อนได้สูงได้รับความสนใจจากภาคอุตสาหกรรมมาก

กลุ่มวิจัยนี้ได้ทำการแยกเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้หลายสา
พันธุ์ จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลเปสจากแบคทีเรียเหล่านี้พบว่ามีไลเปสจากแบคทีเรีย 2-
3 ชนิด ที่มีคุณสมบัติเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมไขมัน ผงซักฟอก และ/หรื
การสังเคราะห์สารอินทรีย์ แต่โดยปกติไลเปสที่ผลิตได้จากจุลชีพที่มีในธรรมชาติมักจะมีปริมาณต่ำ
ไม่เพียงพอแก่การศึกษาในรายละเอียดและการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะ
พัฒนาการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสทนความร้อนจากแหล่งธรรมชาติโดยการปรับสูตรอาหารและ
สภาวะการเลี้ยงและการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนยีน ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีในแ
ต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ได้เหมาะสมและมีประโยชน์สูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 หลักการ เหตุผล และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาการผลิต และการใช้เอนไซม์ทนความร้อนเพื่อเร่งปฏิกิริยาเคมีมีความก้าวหน้
มากขึ้นเรื่อย ๆ และเป็นประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรม มีเอนไซม์หลายชนิดได้ถูกนำมาประยุกต์ใ
ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมายและมีการแสวงหาเอนไซม์ใหม่ ๆ ที่มีสมบัติพิเศษเหมาะสมแก่การ

นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเอนไซม์ที่มีสมบัติทนความร้อนสูงสามารถทำงานได้ในปฏิกรณ์ที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งแหล่งของเอนไซม์มักเป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงได้ (1) ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่มีแนวโน้มสูงในการประยุกต์ใช้มากในอุตสาหกรรมและกำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบัน

เอนไซม์ไลเปสหรือ Triacylglycerol, EC 3.1.1.3 เป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมไขมันเนื่องจากเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยไขมันให้ได้เป็น fatty acid และ glycerol และเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ คือการสร้าง glycerides จาก glycerol และ fatty acids ซึ่งในปัจจุบันการผลิต fatty acids และ glycerides ต่าง ๆ ส่วนใหญ่ได้จากการย่อยสลายไขมันที่ความร้อนและความดันสูง (2-4) ซึ่งผลผลิตที่ได้บางครั้งมีปัญหาในด้านของสีและกลิ่น ซึ่งคล้ำเกินควร การใช้เอนไซม์ไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ ช่วยให้ประหยัดพลังงานทั้งยังไม่มีปัญหาในด้านสีและกลิ่นอีกด้วย ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการย่อยสลายไขมันปลาเพื่อเพิ่มปริมาณของ n-3-polyunsaturated fatty acid ในไขมันปลาเพื่อใช้ในการหมักน้ำมันตับปลา (5) ไลเปสสามารถใช้แทนปฏิกิริยา glycerolysis ที่ความร้อนสูงเพื่อย่อยสลายไขมันในการผลิต monoglycerides เพื่อใช้ในเป็น emulsifying agents ในอุตสาหกรรมอาหาร (2,3) นอกจากนี้ไลเปสยังใช้ในการปรับปรุงคุณภาพและ/หรือคุณสมบัติของไขมันเพื่อช่วยเพิ่มรสชาดกลิ่น และความนุ่มของผลิตภัณฑ์ขนมอบและผลิตภัณฑ์นม (6) นอกจากนี้ไลเปสยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรทจึงทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่แยกออกไปได้โดยง่ายจากปฏิกิริยาโดยไม่มีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงปนมา (7-10) ในปัจจุบันได้มีความเจริญก้าวหน้าทางด้านเอนไซม์เทคโนโลยีทำให้สามารถนำไลเปสตรึงไปใช้เร่งปฏิกิริยาในสารละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ (11-12) จึงทำให้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาการใช้ไลเปสโดยที่เทคโนโลยีนี้ได้ช่วยลดปัญหาการละลายของสับสเตรทของไลเปสซึ่งส่วนมากไม่ละลายน้ำและสามารถนำเอนไซม์ตรึงกลับคืนมาใช้ได้ใหม่ เนื่องจากไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงสามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นและสามารถใช้ได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์

การใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์หรือใน non-aqueous media ทำให้มีโอกาสพบการสังเคราะห์ชนิดใหม่ และการประยุกต์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมชนิดต่าง ๆในด้านอาหาร เครื่องสำอางค์ เภสัชกรรม และการแพทย์ นักเอนไซม์วิทยา (Enzymologists) ยอมรับเป็นเวลานานแล้วว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาในทิศทางตรงข้ามกับที่ทำหน้าที่ในสิ่งมีชีวิต ในปี ค.ศ. 1898 มีการสังเคราะห์ maltose จาก glucose โดยการเร่งปฏิกิริยาของ yeast maltase (13) และในปี ค.ศ.1900 ได้มีการค้นพบการเร่งปฏิกิริยาตรงข้ามกับไฮโดรไลซิสของไลเปสจากตับอ่อน ซึ่งใช้สังเคราะห์ ethyl butyrate แต่อย่างไรก็ตามการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของไฮโดรไลซิส โดยเอนไซม์สร้างความสงสัยในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาหลายสิบปี ปฏิกิริยานี้ถูกค้นพบครั้งแรกใน

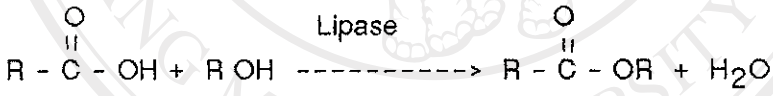
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ราวปี ค.ศ.1970 และพัฒนาจนเป็นการทดลองที่มีกฎเกณฑ์ในราวปี ค.ศ.1980 การใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำปริมาณต่ำ(water-poor organic solvent) มีประโยชน์เหนือการใช้ปฏิกิริยาในน้ำดังนี้ (15,16)

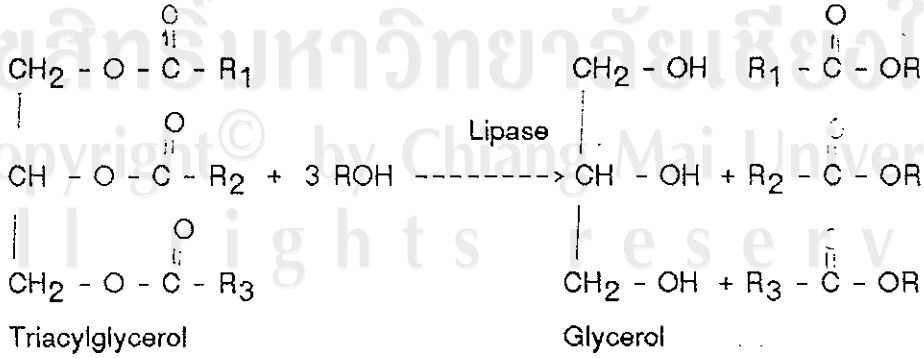
- ช่วยให้สับสเตรทที่ละลายน้ำได้ยากมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์
- สามารถใช้เอนไซม์พวก hydrolases ในการสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับของไฮโดรไลซิส
- ผลของปฏิกิริยาข้างเคียงที่เกิดจากปฏิกิริยาในน้ำจะลดลง
- สามารถใช้กับเอนไซม์ที่ตรึงแบบ adsorption ได้เป็นอย่างดี
- สามารถใช้สังเคราะห์สารอินทรีย์ด้วยการเร่งของปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว
- ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ซึ่งพบเมื่อใช้เอนไซม์ในบัฟเฟอร์
- เอนไซม์จะมี enantioselective มากขึ้น

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายหรือสร้างพันธะเอสเตอร์ ในขณะที่อยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายจะเกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเตอร์ ในทางตรงข้ามเมื่อไลเปสอยู่ในสารละลายที่มีตัวทำละลายอินทรีย์จะเกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเตอร์ (Esterification) หรือสร้างและทำลาย พันธะเอสเตอร์พร้อมกันซึ่งได้แก่ปฏิกิริยา Interesterification ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาอัลกอฮอไลซิส (alcoholysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสลายไตรกลีเซอร์ไรด์ด้วยอัลกอฮอล์ ดังสมการในรูป 1.1

ก. Esterification



ข. Alcoholysis



รูป 1.1 ปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยไลเปส (ก) Esterification และ (ข) Alcoholysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทั้งสองคือเอสเตอร์ เป็นสารที่ใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์สารเคมีต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ของกรดคาร์บอซิลิก ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ (17) สารเติมแต่งความยืดหยุ่นของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สารป้องกันการขึ้นสนิม (18) และถ้าเป็น methyl และ ethyl เอสเตอร์ มีผู้พบว่ามีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล (19)

แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปสมีทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียให้ไลเปสที่มีคุณสมบัติที่มีความทนทานดีที่สุด ทั้งยังสามารถผลิตได้ในปริมาณสูงในระยะเวลาสั้น เนื่องจากระยะเวลาการเจริญของเชื้อเร็ว (20) เอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี จะมีประโยชน์เพราะสามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ง่ายโดยวิธีที่ใช้กับเอนไซม์ทั่ว ๆ ไป ทั้งยังไม่ต้องระวังมากในการที่จะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับต่ำเพื่อให้เอนไซม์คงสภาพอยู่ได้ (21) ได้มีการทดลองแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งผลิตแบคทีเรียหลายชนิด (2, 22-26) ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางที่จะใช้ประโยชน์สูงสุดจากเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้น ๆ การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียอาจทำได้โดยการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อทั้งในด้านอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพและความเป็นกรดด่างที่ระดับต่าง ๆ กัน (27-31) นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลาย ๆ กลุ่มได้ทำการทดลองแยกยีนส์ที่ควบคุมการสร้างไลเปสออกมา ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการศึกษาในระดับของโครงสร้างลำดับยีนส์ และประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนยีนส์ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์นี้ในแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ อีกด้วย (32-38) ในการศึกษานี้จะได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสำคัญคือสร้างไลเปสที่ทำงานได้ดี และทนทานที่อุณหภูมิสูง จากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์ด้านต่าง ๆ ทำการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ไลเปสโดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวให้ผลิตไลเปสได้ปริมาณมากโดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ หาสภาวะการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียที่ที่ปรับปรุงแล้วในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และศึกษาการแยกบริสุทธิ์ไลเปสเพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีในแง่ต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางการประยุกต์ใช้ไลเปสชนิดใหม่ที่ผลิตได้ให้เหมาะสมและให้ได้ประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.3.1 เพื่อศึกษาหาวิธีการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสทนความร้อนสูงได้ โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และได้คัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตไลเปสได้ในปริมาณที่สูงและมีสมบัติเบื้องต้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันหรือไขมันและ/หรือใช้เป็นตัวคะตะลิสต์ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.2 เพื่อปรับปรุงขบวนการผลิตเอนไซม์โดยแบคทีเรียที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้วในด้านสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารราคาถูกที่สามารถทำให้เชื้อเจริญได้ดีและสร้างเอนไซม์ได้มากในราคาต้นทุนที่ต่ำลง อันจะเป็นแนวทางให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ภายในประเทศ

1.3.3 เพื่อให้ได้ไลเปสชนิดใหม่ที่มีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีในแง่ต่าง ๆ ตลอดจนแนวทางการนำไปประยุกต์ใช้ให้ได้ประโยชน์สูงสุด

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

1.4.1 ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ที่ผลิตไลเปสส่งออกจากเซลล์ได้ปริมาณสูงและทดสอบสมบัติเบื้องต้นแล้วว่าทนต่ออุณหภูมิสูงและมีแนวโน้มที่เหมาะสมจะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและ/หรือผงซักฟอกและ/หรือการสังเคราะห์สารอินทรีย์มา 2-3 สายพันธุ์

1.4.2 ทำการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วโดยการเพิ่มจำนวนยีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวซึ่งทำโดยการแยกยีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ของเชื้อนั้น ๆ เพื่อใส่เข้าไปในพลาสมิดที่เพิ่มจำนวนได้มากในแบคทีเรียเจ้าบ้านที่มีสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์

1.4.3 ทดลองเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1.4.2 ในอาหารเหลวเพื่อศึกษาปริมาณการผลิตเอน-ไซม์ไลเปส ทำการแยกบริสุทธิ์ไลเปสที่ผลิตได้และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีในแง่ต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมต่อไป

1.4.4 ทดลองภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์ให้ได้ปริมาณมาก โดยการปรับปรุงสูตรอาหารให้ได้สูตรอาหารที่ดี ราคาถูก ปรับปรุงภาวะเหมาะสมด้านอุณหภูมิ pH และอื่น ๆ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียจะใช้เฉพาะที่แยกได้จากน้ำพุร้อนบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ และการพัฒนาการผลิตไลเปสจะศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการที่จะนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 จะได้วิธีการเพิ่มผลผลิตไลเปสชนิดใหม่โดยการเพิ่มจำนวนยีนและมีไลเปสมากพอที่จะศึกษาสมบัติต่าง ๆ การแยกบริสุทธิ์ และแนวทางการนำไปใช้ให้ได้ประโยชน์สูงสุด

1.5.2 จะได้ภาวะการผลิตไลเปสในปริมาณมากในอาหารราคาถูก อันจะเป็นแนวทางที่เป็นไปได้ในการผลิตเชิงพานิชย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5.3 จะได้ไลเปสชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น

1.6 หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.6.1 อุตสาหกรรมไขมันและน้ำมัน

1.6.2 อุตสาหกรรมผงซักฟอก

1.6.3 อุตสาหกรรมอาหาร

1.6.4 อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์

1.6.5 อุตสาหกรรมการผลิตสารอินทรีย์

1.6.6 หน่วยวิจัยเอนไซม์เทคโนโลยีและพันธุวิศวกรรม

1.6.7 หน่วย/สถาบันวิจัยทางวิศวกรรมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid (glacial)	BDH
Acetone 98%	MERCK
Acrylamide	SIGMA
Agar	SIGMA
Ammonium sulphate	Carlo Erba
Ammonium persulphate	MERCK
Bule dextrane	SIGMA
Bromophenol blue	MERCK
Bovine Serum Albumin	SIGMA
Bis-Acrylamide	SIGMA
Calcium chloride	MERCK
Comassie Brilliant Blue G-250	FLUKA
Comassie Brilliant Blue R-250	FLUKA
DEAE Sephadex A-50	PHAMACIA
Dipotassium Hydrogen Phosphate	MERCK
Dithiothreitol	SIGMA
Ethanol 95%	AYUTHYA
Ethanol 98%	MERCK
EDTA	MERCK
Ferric (III) citrate	MERCK
Formaldehyde	MERCK
Glutaraldehyde	FLUKA
Glycine	BDH
Hydrochloric acid	MERCK

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Magnesium chloride	FLUKA
Manganese chloride	M&B
Methanol 95%	MERCK
Nutrient Broth	DIFCO
Olive oil	องค์การเภสัชกรรม
Phenalphthalein	MERCK
Phosphoric acid	FLUKA
Potassium dihydrogen phosphate	FLUKA
Potassium hydrogen phthalate	FLUKA
Potassium hydroxide	BDH
Sephadex G-75	PHAMACIA
Sodium acetate	BDH
Sodium chloride	MERCK
Sodium hydroxide	MERCK
Sucrose	FLUKA
TEMED	FLUKA
Titriplex I	MERCK
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane	FLUKA
Tryptone	DIFCO
Yeast extract	DIFCO

2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave Model HL-42A-DY	Hirayama
Centrifuge Model Sorval RC-5B	Dupont

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Constant Power Supply 3-1500	BUCHLER
Electrophoresis set	
Fraction Collector mode 700	LKB/BROMMA
Freeze Dryer (Flexi-Dry MP)	FIS SYSTEMS
Hot plate & Stirrer Model PC-351	CORNING
Incubator	MEMERT
Member (ultrafiltration)	SPECTRUM
Microcentrifuge Model 101-S	SIGMA
Micropipett	GILSON
Mixer	LABLINE
pH meter	RADIO METER
Shaking bath GFL 1083	GESLLSCHAFT FUR
Shaking incubator GFL 3032	GESLLSCHAFT FUR
Ultrafiltration Apparatus model UHP	TOYOROSHI
UV-VIS Spectrophotometer PU 8620 Series	PHILIPS

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส

2.2.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง

อาหารแข็งประกอบด้วย

Nutrient broth	0.8	กรัม
Agar	2.5	กรัม
ในน้ำกลั่น	100	มล.

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.0 kg/cm^2 อุณหภูมิ 121^{o}C 20 นาที จากนั้นนำไปเทลงใน plate และ slant เตรียมเป็นอาหารแข็ง สำหรับเชื้อแบคทีเรียต่อไป

2.2.1.2 การเตรียมอาหารเหลว

อาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบไปด้วย

น้ำกลั่น	700	มล.
yeast extract	2.5	กรัม
tryptone	2.5	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.2 M phosphate buffer pH 7.2	100	มล.
Base mixture pH 7.2	200	มล.

หมายเหตุ

ก. การเตรียม 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 100 มล.

ใช้ KH_2PO_4 1.3765 กรัม ผสมกับ K_2HPO_4 1.7217 กรัม ละลายน้ำให้ครบ 100 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.2

ข. การเตรียม Base mixture pH 7.2 ปริมาตร 500 มล.

น้ำกลั่น	495	มล.
triplex I	0.5	กรัม
NaOH	0.1	กรัม
$CaSO_4.2H_2O$	0.2	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	1.0	กรัม
0.01 M Ferric citrate	2.5	มล.

หลังจากเตรียมอาหารเหลวแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.0 kg/cm^2 อุณหภูมิ 121°C 20 นาที

2.2.1.3 การเตรียม preculture และการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำ preculture โดยเขี่ยเชื้อที่แยกเป็น colony นำอาหารแข็งมา 1 loop ใส่ในอาหารเหลวประมาณ 100 มล. แล้วนำมาบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. จากนั้นถ่ายเชื้อจาก preculture ลงใน culture เป็นปริมาณ 1% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. เมื่อครบ 30 ชั่วโมง นำ culture นั้นมาวัด OD_{280} โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ทำการเขี่ยเชื้อเป็น blank แล้วนำน้ำเลี้ยงมาปั่นแยกเซลล์โดย centrifuge ที่ 15,000 rpm. เป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาตรของ supernatant เก็บ supernatant ไว้ตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปส และหาปริมาณโปรตีนต่อไป และ supernatant ที่ได้เราจะเรียกว่า Crude enzyme

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งการสลายไขมัน เป็นกรดไขมัน ในการตรวจหาแอคติวิตีของไลเปสทำโดยการวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นหลังทำปฏิกิริยา วิธีที่ใช้ในการทดลองนี้คือการไตเตรทแบบวัด pH (First derivative titration)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 0.5 มล. เติมลงใน flask ที่มี 0.15 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 4 มล. จากนั้นเติม 0.01 M $CaCl_2$ 0.3 มล. น้ำมันมะกอก 0.2 มล. incubate ที่ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจะหยุดปฏิกิริยาด้วย ethanol : acetone (อัตราส่วน 1 : 1) ปริมาตร 20 มล. (ใน blank จะไม่เติมสารละลายเอนไซม์ในตอนแรกแต่จะเติมหลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้ว) จากนั้นนำน้ำ 2 flask มาไตเตรทด้วย 0.05 M NaOH เพื่อหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น โดยใช้ฟีนอลฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปกับปริมาตร KOH ที่เติม คำนวณหาค่า pH และ V ในแต่ละช่อง นำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟระหว่าง $\Delta pH/\Delta V$ และหาค่าเฉลี่ยของปริมาตรที่เติม $(V_1 + V_2)/2$ หาจุดยุติที่แน่นอนเทียบกับ blank ตัวอย่างการหาแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีนี้แสดงในตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.1

จากรูปที่ 2.1 V จากกราฟ = 3.0 ml.

เราสามารถคำนวณแอคติวิตีของไลเปส ได้จาก

$$\text{Lipase activity} = \frac{\Delta V \times [KOH] \times 10^3}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้} \times \text{เวลาที่ทำปฏิกิริยา (นาที)}}$$

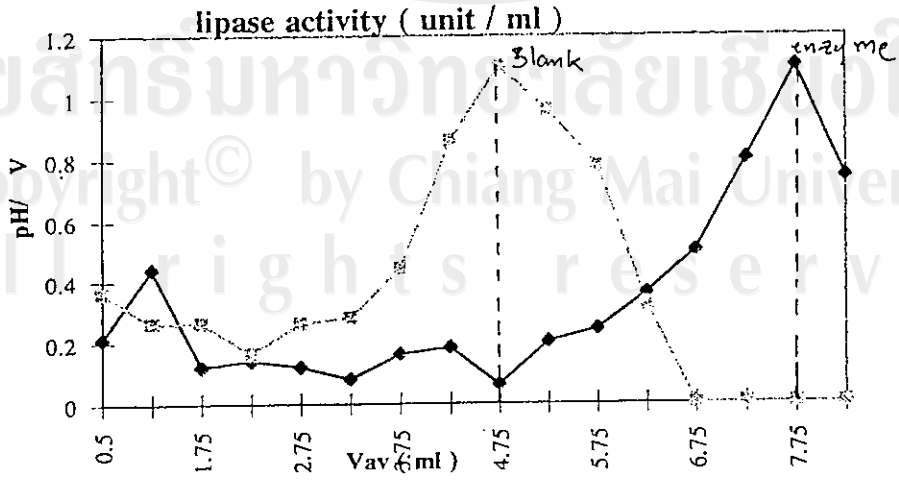
$$= \frac{\Delta V \times [KOH] \times 10^3}{0.5 \times 60}$$

ΔV = ความแตกต่างของปริมาตรเบสที่ใช้

[KOH] = ความเข้มข้นที่แน่นอนของ KOH หลังจากไตเตรทกับ KHP แล้วไลเปสแอคติวิตีที่ได้มีหน่วยเป็น umit/ml. ของสารละลายเอนไซม์

หมายเหตุ

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 umol ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างการคำนวณหาแอคติวิตีของไลเปส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างการทำ first derivative titration เพื่อหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น

KOH (ml)	pH		KOH_{av}(ml)	$\Delta pH/\Delta V$	
	sample	blank		sample	blank
0	8.49	8.48	-	-	-
1.0	8.70	8.84	0.50	0.21	0.36
1.5	8.77	8.97	1.25	0.44	0.26
2.0	8.83	9.10	1.75	0.12	0.26
2.5	8.90	9.18	2.25	0.14	0.16
3.0	8.96	9.31	2.75	0.12	0.26
3.5	9.00	9.45	3.25	0.08	0.28
4.0	9.08	9.67	3.75	0.16	0.44
4.5	9.17	10.10	4.25	0.18	0.86
5.0	9.20	10.65	4.75	0.06	1.1
5.5	9.30	11.13	5.25	0.2	0.96
6.0	9.42	11.52	5.75	0.24	0.78
6.5	9.60	11.68	6.25	0.36	0.32
7.0	9.85	-	6.75	0.5	-
7.5	10.25	-	7.25	0.8	-
8.0	10.85	-	7.75	1.1	-
8.5	11.22	-	8.25	0.74	-
9.0	11.45	-	8.75	0.46	-
9.5	11.58		9.25	0.16	
10.0	11.70		9.75	0.24	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Protein - dye binding (39)

2.2.3.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 1 mg/ml

ชั่ง BSA 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล.

ข. 0.15 M NaCl ปริมาตร 100 มล.

ชั่ง NaCl 0.5766 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.

ค. สารละลายสีย้อม

ละลาย coomassie brilliant blue G - 250 0.01 กรัม ใน 99.8% เอธานอล 4.7 มล. เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม 85% phosphoric acid 8.5 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C สารละลายสีย้อมที่เตรียมแต่ละครั้ง จะใช้ได้ประมาณ 1 อาทิตย์

2.2.3.2 วิธีการหาปริมาณโปรตีน

นำสารละลายข้างต้น มาผสมกันตามอัตราส่วนดังแสดงในตาราง 2.2

ตาราง 2.2 อัตราส่วน การเติมสารละลายในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Protein - dye binding

หลอดที่ / สารเคมี	1	2	3	4	5	6	sample
BSA(mg/ml)	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	-
sample	-	-	-	-	-	-	0.60
น้ำกลั่น	0.60	0.59	0.58	0.57	0.56	0.55	0.00
0.5 M NaCl	0.10	0.10.58	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
dye reagent	4.30	4.30.57	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. นำข้อมูลการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 1-6 ไปเขียนกราฟโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด เทียบหาปริมาณโปรตีนในการละลายตัวอย่างที่ได้

2.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 2.2.1.3 มาหาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำ crude enzyme มาหาแอคติวิตีของไลเปส ตามข้อ 2.2.2.2 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นำสารละลายจากปฏิกิริยาไปไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้ standardize KOH

2.2.4.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ก. การเตรียมสาร

การเตรียมสารละลาย 0.15 M acetate buffer pH 4

เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 1.2306 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 0.15 M acetic acid (ซึ่งเตรียมโดยละลาย glacial acetic acid 0.5 มล. ในน้ำกลั่น 50 มล.) เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 0.15 M acetate buffer pH 5

เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 1.2306 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ

การเตรียมสารละลาย 0.15 M phosphate buffer pH 6

เตรียมโดยชั่ง K_2HPO_4 0.1518 กรัม กับ KH_2PO_4 1.9230 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 6 M NaOH และ 6 M HCl เติมน้ำให้ครบ 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 0.15 M phosphate buffer pH 7

เตรียมโดยชั่ง K_2HPO_4 0.9652 กรัม กับ KH_2PO_4 1.2627 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 6 M NaOH และ 6 M HCl เติมน้ำให้ครบ 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 0.15 M phosphate buffer pH 8

เตรียมโดยชั่ง K_2HPO_4 0.460 กรัม กับ KH_2PO_4 1.1180 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 6 M NaOH และ 6 M HCl เติมน้ำให้ครบ 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 0.15 M Tris-HCl buffer pH 9

เตรียมโดยชั่ง Tris (hydroaymethyl) 1.8172 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 0.15 M HCl (ซึ่งเตรียมโดยการผสม 6 M HCl 1 ml. กับน้ำกลั่น 39 ml.) เติมน้ำจนปริมาตรครบ 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 0.15 M Tris-HCl buffer pH 10

เตรียมเหมือนกับที่ พีเอช 9 แต่ปรับ pH จนกระทั่ง pH เป็น 10 เติมน้ำจนปริมาตรครบ 100 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หาแอคติวิตีของไลเปสใน crude enzyme (จากข้อ 2.2.1.3) แต่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้จาก 0.15 M phosphate buffer pH 7.2 พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่ 4, 5, 6, 7, 8,9 และ 10

2.2.5 การคัดเลือกเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสนอกเซลล์ในปริมาณสูงและทดสอบสมบัติเบื้องต้นเพื่อดูแนวโน้มที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์ที่นำมาคัดเลือกได้แก่จุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนมและน้ำพุร้อนป่าแป๋ในจังหวัดเชียงใหม่และได้ผ่านการคัดเลือกมาแล้วหนึ่งครั้งจาก 30 ไอโซเลทเหลือเพียง 15 ไอโซเลทที่สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ในปริมาณที่สูงโดยเทียบความกว้างของวงใสในอาหารวุ้นที่มี Tributyrin 0.5% แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลทมีชื่อต่าง ๆ ดังนี้

P1	T20	TP431	TP432	TP433
TP434	TP441	TP442	TLO11	TLO13
TLO41	TLS33	TLS42	TLS61	TLS63

ในผลการวิจัยของกลุ่มวิจัยนี้เรื่อง 'การสังเคราะห์เอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มโดยไลเปสที่ผลิตจากเทอร์โมไฟล์ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนท้องถิ่น' ได้เปรียบเทียบการเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 15 ไอโซเลทดังกล่าวบนจานอาหารวุ้นที่มี Tributyrin 0.5% และ skim milk 1% ตามลำดับด้วยการใช้วิธีเพาะเชื้อแบบ spread plate แล้วสังเกตุดูวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่เจริญขึ้นหลังการบ่มเชื้อที่ 65°ซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าอาหารวุ้นทั้งสองชนิดมีวงใสเกิดขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่จุลินทรีย์เจริญกล่าวคือจุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสและโปรติเอสจะย่อยสลาย Tributyrin และ skim milk ตามลำดับ ก่อให้เกิดวงใสจากเดิมซึ่งเป็นสีขาวขุ่น ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว พบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลทสามารถผลิตไลเปสได้ในปริมาณที่ไม่ต่างกันมากนักจึงได้เลือกมา 5 ไอโซเลท คือ T20 P1 TLS63 TLO13 และ TP434 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และศึกษาภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตไลเปสในปริมาณสูงได้ภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทเพื่อการผลิตไลเปสและศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ผลิตได้ทั้ง 5 ไอโซเลท อาทิความคงทนต่อความร้อน อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม ตลอดจนแนวโน้มของการนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยา การเกิดเอสเทอร์ในภาวะที่มีน้ำน้อยซึ่งพบว่าไลเปสจากไอโซเลทท P1 สามารถเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดี รองลงมาคือไลเปสจาก T20 และ TLS63 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียดังกล่าวยังผลิตไลเปสได้ในปริมาณต่ำไม่เพียงพอแก่การนำไปใช้ และในการศึกษาในรายละเอียดจึงได้คัดเลือกแบคทีเรีย P1 และ TLS63 มาศึกษาต่อร่วมกับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ใหม่ที่ผลิตไลเปสในปริมาณค่อนข้างสูงจากน้ำพุร้อนเทพพนมอีก 3 ไอโซเลท คือ TP404, TP614 และ TP811 มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสและความคงทนของเชื้อในตัวทำละลายอินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทในอาหารเหลว

นำแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่เลือกไว้ คือ P1 TP404 TP614 TP811 และ TLS63 มาศึกษาการเจริญและการผลิตไลเปสในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท

อาหารเหลว/สายพันธุ์แบคทีเรีย	องค์ประกอบของอาหารใน 100 มล.
A	น้ำกลั่น 70 มล. สารละลายเบสผสม* 20 มล. 0.2 M ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ pH 7.2 10 มล. น้ำมันมะกอก 3 มล. และสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโตนอย่างละ 0.25 กรัม
B	น้ำกลั่น 80 มล. สารละลายเบสผสม* 10 มล. 0.2 M ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ pH 7.2 10 มล. น้ำมันมะกอก 0.5 มล. สิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโตนอย่างละ 0.25 กรัม
C	อาหารเหลวสูตร A ที่มี 50% โดยปริมาตรของ cyclo-hexane (log P = 3.44) diisopropyl ether (log P = 1.88) หรือ isopropanol (log P = 0.05) ในการเลี้ยงแต่ละครั้ง

* สารละลายของ 0.1 g Nitrilo triacetic acid (Titriplex 1) 0.04 g $CaSO_4.2H_2O$, 0.2 g $MgCl_2.2H_2O$, 0.5 ml 0.01 M Ferric (III) citrate ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 1 M NaOH และปริมาตรของสารละลายทั้งหมดเป็น 100 มล.

หลังจากที่บ่มเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทในสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงที่ 65°C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วทำการปิเปตหัวเชื้อลงในสูตรอาหารที่เตรียมไว้ 1% โดยปริมาตรแล้วบ่มเชื้อที่ 65°C พร้อมกับเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในการเก็บเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้น แบคทีเรียที่เลี้ยงใน medium A จะเก็บที่ 30 ชม. (strains TLS63, TP404, TP614 และ TP811 หรือ 48 ชั่วโมงสำหรับ P1 สารละลาย crude enzyme ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกที่ 15,000 x g 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมา assay หา activity ของไลเปส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำโดยวัดความขุ่นที่ OD_{620} ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง และการผลิตเอนไซม์ไลเปสในแต่ละช่วงของการเลี้ยงทำโดยการนำน้ำเลี้ยงมา assay หาแอคติวิตี้ของไลเปสในแต่ละช่วงเวลาของการเลี้ยง

2.2.5.2 การตรวจสอบแอคติวิตี้ของไลเปสในอาหารเหลว

นำสารละลายเอนไซม์ที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 0.5 มล. เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มี 0.15 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 4 มล. จากนั้นเติม 0.01 M $CaCl_2$ 0.3 มล. น้ำมันมะกอก 0.2 มล. บ่มที่ 65°ซ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยเอธานอลต่ออะซีโตน (อัตราส่วน 1 : 1) ปริมาตร 20 มล. แล้วไตเตรทด้วย 0.05 M KOH เพื่อหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 u mol ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะการทดลองและแสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์เป็นหน่วย/มล. ของสารละลายเอนไซม์

2.2.6 การโคลนยีนไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียทนความร้อน

ผู้วิจัยได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย P1, TP404 และ TP811 เพื่อโคลนยีนไลเปส โดยกลุ่มวิจัยภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ทำการตัด genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย P1, TP404 และ TP811 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau 3A1 แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้เข้าไปยังพาหะ pUC19 ที่ตำแหน่ง BamHI หลังจากทำการ transform เข้าไปในแบคทีเรีย E. coli DH5α ได้พบโคลนที่มีวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหารวุ้นที่มี tributyrin และเรียกโคลนที่ได้ว่า pUC-P1, pUV-TP404 และ pUC-TP811 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นได้ข้อมูลว่าโคลนทั้งสามชนิดมีชิ้น DNA ขนาด 2.2 กิโลเบส

2.2.7 การเปรียบเทียบแอคติวิตี้ของไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย P1, TP404 และ TP-811 กับโคลน pUC-P1, pUC-TP811 ในอาหารเหลวตามลำดับ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเหลวในภาวะที่เหมาะสมสำหรับแต่ละสายพันธุ์ในการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงสุดเทียบกับ clone ของมันแล้วหาแอคติวิตี้เปรียบเทียบกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.8 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสนอกเซลล์จากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ 3 ไอโซเลท และโคลนของเอนไซม์เหล่านี้

ได้ทำการศึกษาสมบัติทางเคมีในแง่ต่าง ๆของเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย P1, TP404 และ TP811 เปรียบเทียบกับโคลน pUC-P1, pUC-TP404 และ pUC-TP811 ดังต่อไปนี้

2.2.8.1 การศึกษาความทนต่อความร้อนของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์ไลเปส จากข้อ 2.2.1.3 ใส่ flask เล็ก 6 flask แต่ละ flask ใส่เอนไซม์ประมาณ 3 มล. นำ flask แรกไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นมาหาแอคติวิตี้ ตามข้อ 2.2.2.2 นำ flask ที่เหลือทำแบบเดียวกัน แต่เปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มเป็น 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

2.2.8.2 การศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรทชนิดต่าง ๆ ของไลเปส

นำ crude enzyme จากข้อ 2.2.1.3 มาหาแอคติวิตี ตามวิธีในข้อ 2.2.2.2 แต่เปลี่ยนสับสเตรท จากน้ำมันมะกอกเป็นน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู น้ำมันปาล์มไตรโอเลอีน และน้ำมันปาล์มไตรโอเลอีนบริสุทธิ์ และน้ำมันอื่น ๆ

2.2.8.3 การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

เลี้ยงแบคทีเรียและเก็บเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มาแบ่งใส่หลอดทดลอง เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องการทดสอบด้วยความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิ 37°C และ 65°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที คำนวณแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ (residual activity) ตั้งแต่เวลา 1-7 ชั่วโมง ของการบ่มโดยไม่ใช้เอนไซม์ที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นกลุ่มควบคุมที่เวลา 0 ชม.

2.2.8.4 การศึกษาผลของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์มาเติมเกลือของโลหะชนิดต่าง ๆ ดังนี้ $FeSO_4$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, KCl, $MgCl_2$, $PbCl_2$, NaCl, $CaCl_2$, $CoCl_2$, V_2O_5, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $ZnSO_4$, $MnCl_2$, $MnSO_4$ และ $AgNO_3$ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเท่ากับ 10 mM บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาแอคติวิตีที่คงเหลือของเอนไซม์เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ไม่มีเกลือของโลหะซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.8.5 การศึกษาผลของตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์มาเติมตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ดังนี้ ethylenediaminete - traacetate (EDTA) ethyleneglycol-bis [-aminoethylether]-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 2-mercaptoethanol (2-ME) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเท่ากับ 10 mM บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาแอคติวิตีที่คงเหลือของเอนไซม์เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ไม่มีตัวยับยั้งซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

2.2.8.6 การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์มาเติมเกลือของโลหะชนิดต่างๆ ดังนี้ ยูเรีย Sodium dodecyl (SDS) และ octylphenoxypolyhydroxyethanol (Triton X-100) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดดังนี้ ยูเรีย (0-10 M) SDS (0-1 % w/v) และ Triton X-100 (0-10 % v/v) บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาแอคติวิตีที่คงเหลือของเอนไซม์เปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

2.2.9 การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ไลเปสบางส่วน

2.2.9.1 การทำให้ไลเปสเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยวิธี ultrafiltration

นำ crude enzyme จากข้อ 2.2.1.3 มาหาแอคติวิตี และปริมาณโปรตีน วัดปริมาตรได้ 900 มล. กรองผ่าน molecular filtration membrane ซึ่งมี MW cut off เป็น 50,000 โดยใช้อุปกรณ์ Ultrafiltration (Model UHP-75) ทำการกรองสารภายใต้แรงดันของกาซไนโตรเจน 2.5 psi ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งเหลือสารละลายโปรตีน ปริมาตร 85 มล.

2.2.9.2 การศึกษาการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นโดยโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

ก. การเตรียมเจล

ชั่ง DEAE Sephadex A-50 กรัม ละลายใน 0.15 M phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.2 ปริมาตร 1.5 ลิตร (0.15 M phosphate buffer pH 7.2 1 ลิตร ประกอบด้วย KH_2PO_4 9.9652 กรัม และ K_2HPO_4 12.6273 กรัม รวมกับโซเดียมเอไซด์ 0.1 กรัม ปรับ pH ด้วย 6 M HCl และ NaOH) ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การเตรียมคอลัมน์

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. บรรจุเจลขณะพองตัวเต็มที่และไล่อากาศออกโดยการ suction ด้วยน้ำ ปริมาตร 1 ลิตร ลงในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟ-เฟอร์ (เป็นบัฟเฟอร์เดียวกันกับที่ใช้เตรียมเจล แต่ไม่มีโซเดียมเอไซม์) พร้อมทั้งปรับอัตราการไหลออกของสารละลายให้มีอัตราการไหลเป็น 15 มล./ซม. ทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน ค่อย ๆ ใส่เอนไซม์จากข้อ 2.2.1.3 ปริมาตร 798 มล. เก็บแฟรคชั่น (fraction) โดยใช้ fraction collector แฟรคชั่นละ 5 มล. เมื่อเอนไซม์หมดล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์อีกครั้ง ปริมาตร 500 มล. จากนั้นชะเอนไซม์ออกโดยใช้โซเดียมคลอไรด์แกรเดียนท์ (sodium chloride gradient) ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เริ่มต้น 0-2.0 M ใน 0.15 M phosphate buffer pH 7.0 เก็บแฟรคชั่นจนกระทั่งเมื่อนำสารละลายในแฟรคชั่นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วไม่ให้ค่าการดูดกลืนแสง (ให้นำสารละลายในแฟรคชั่นไปวัดปริมาตรที่แน่นอนก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง) เมื่อนำแฟรคชั่นทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าเทียบกับค่าการนำไฟฟ้ามาตรฐานของ NaCl

ทำให้ไลเปสเข้มข้นขึ้นโดยวิธี Freeze-drying และการไล่เกลือออกโดยการ dialysis ที่ 4°C

2.2.9.3 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.2.9 มาแยกต่อโดยเจลฟิลเตรชัน เพื่อการศึกษามวลโมเลกุลและเป็นการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

ก. การเตรียมเจล

ชั่ง Sephadex G-75 20 กรัม ละลายใน 0.15 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 400 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน นำเจลที่พองตัวเต็มที่แล้วไปไล่อากาศออกโดยใช้ water suction จะได้เจลที่พร้อมจะนำไปใช้

ก. การเตรียม Sephadex G-75 column

บรรจุเจลจากข้อ 2.2.10.1 ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. ยาว 200 ซม. ที่มีสำลีปิดอยู่ที่ปลายคอลัมน์ด้านล่างเพื่อป้องกันการรั่วของเจลจนกระทั่งได้ความสูงของเจลขณะที่แพคอยู่ตัวแล้วสูงประมาณ 183 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์โดยให้มีอัตราการไหลออก 12 มล./ซม. ปริมาตรบัฟเฟอร์ประมาณ 300-400 มล.

หลังจากผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานแล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ประมาณ 300-400 มล. จากนั้นจึงผ่านไลเปสที่ได้จากโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน freeze drying และไดอะไลซีสแล้ว ปริมาตร 1.0 มล. ด้วยอัตราการชะออก 12 มล./ซม. เก็บ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แฟรคชันละ 3.0 มล. นำแต่ละแฟรคชันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และหาแอคติวิตีของเอนไซม์รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกัน จากการผ่านสารละลายไลเปสทั้งหมด 12 ครั้ง ๆ ละ 1 มล. รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีได้ 117 มล.

2.2.9.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสด้วย **Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)**

เมื่อได้สารละลายเอนไซม์ในขั้นตอนนี้แล้วตรวจสอบแอคติวิตีและหาปริมาณโปรตีนอีกครั้ง สารละลายเอนไซม์นี้ก็พร้อมที่จะนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย PAGE และหามวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE ได้

ขั้นตอนในการทำ PAGE

ก. การเตรียมสาร

การเตรียม stock acrylamide

เตรียม 100 มล. ของ stock acrylamide ประกอบด้วย acrylamide 30 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (ควรมชุถุงมือในการเตรียม และมีความระมัดระวัง

การเตรียม separating gel buffer

เตรียม 1.5 M Tris-HCl โดยชั่ง Tris-hydroxymethyl aminomethane 18.171 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน จนได้ปริมาตร 100 มล. ปรับพีเอชให้ได้ 8.8 โดยใช้ 6.0 M HCl

การเตรียม stacking gel buffer

เตรียม 0.5 M Tris-HCl โดยชั่ง Tris-hydroxymethyl aminomethane 6.054 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน จนได้ปริมาตร 100 มล. ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 โดยใช้ 6.0 M HCl

การเตรียม 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่ง 0.1 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 1.0 มล.

การเตรียม sample buffer

ชั่งซูโครส 0.4 กรัม ละลายใน 1 มล. ของเอนไซม์ที่จะใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ เติม bromophenol blue ไมโครลิตร และ mercaptoethanol ไมโครลิตร ละลายให้เข้ากันก่อนที่จะ load แช่ sample buffer ที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณครึ่งชั่วโมง

การเตรียม electrophoresis buffer

ละลาย tris-hydroxymethyl aminomethane 3.0 กรัม และ glycine 14.4 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออน ปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. การเตรียมสาร

ในการเตรียม separating gel ผสม stock acrylamide 16.5 มล. (11% acrylamide) กับ separating gel buffer 7.5 มล. เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 14.85 มล. และ 15% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 150 ไมโครลิตร ก่อนที่จะ load เติม TEMED 15 ไมโครลิตร แล้วใส่เจลลงไปในชุดอุปกรณ์ดังแสดงในภาพ 1.8 เมื่อ load เสร็จหยดน้ำทับเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ปล่อยทิ้งไว้ 40 นาที

เมื่อ separating gel แข็งตัวดีแล้วจึงเทน้ำออกก่อน จึงค่อยใส่ stacking gel ซึ่งประกอบด้วย stock acrylamide 2.0 มล. กับ stacking buffer 3.0 มล. เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 6.9 มล. และ 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 ไมโครลิตร ก่อนที่จะ load เติม TEMED 15 ไมโครลิตร เมื่อเสร็จแล้วใส่หวีลงไปทันที ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติม electrophoresis buffer ทั้งข้างบนและข้างล่างของชุด electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้า 110 โวลท์ ก่อนใส่ sample ประมาณ 15 นาที ใส่ sample และรอจนเมื่อขอบสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาถึงข้างล่างของชุด electrophoresis ให้แกะเอาเจลออกล้างด้วยน้ำกลั่น ก่อนที่จะนำไปย้อมสี

2.2.9.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลไลเปสด้วย Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide

การเตรียมสาร

ก. stock acrylamide เหมือนในข้อ 2.2.9.4 ข้อ ก.

ข. buffer

เตรียม 1.875 M Tris-HCl พีเอช 8.8 โดยการชั่ง Tris-hydroxymethyl aminomethane 22.7138 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 100 มล. และปรับพีเอชด้วย 6.0 M HCl

เตรียม 0.6 M Tris-HCl พีเอช 6.8 โดยการชั่ง Tris-hydroxymethyl aminomethane 7.2864 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 100 มล. และปรับพีเอช ด้วย 6.0 M HCl

ค. Miscellaneous

เตรียม 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เหมือนในข้อ 2.2.11.2 ข้อ ก. ส่วน 10% SDS เตรียมโดยชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 100 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง. Electrode Buffer

ประกอบด้วย Tris-HCl 6.06 กรัม และ Glycine 28.8 กรัม รวมทั้ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 1,000 มล.

จ. Sample Buffer

ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. 10% SDS 50 ไมโครลิตร ซูโครส 0.5 กรัม mercaptoethanol 25 ไมโครลิตร และ bromophenol blue 0.5 มล.

วิธีการ

ก. การเตรียมแผ่นเจล

ผสม Tris-HCl pH 8.8 6.0 ml กับน้ำที่ปราศจากไอออน 13.6 มล. 10% SDS 0.3 มล. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.15 มล. และ stock acrylamide 13.5 มล. (11% polyacrylamide) ก่อน load เติม TEMED 10 ไมโครลิตร เมื่อ load เสร็จแล้วเติมน้ำทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที เมื่อ separating gel แข็งตัวดีแล้วเทน้ำออกแล้วจึง load stacking gel ซึ่งมีส่วนประกอบคือ Tris-HCl pH 6.8 1.0 ml กับน้ำที่ปราศจากไอออน 7.5 มล. 10% SDS 0.1 มล. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.05 มล. และ stock acrylamide 1.35 มล. (11% polyacrylamide) ก่อน load เติม TEMED 10 ไมโครลิตร เมื่อ load เสร็จแล้วเสียบหวีทันที ทิ้งไว้ 30 นาที เติม electrode buffer ทั้งข้างบนและข้างล่างของชุด electrophoresis ผ่านกระแส 110 โวลท์ ประมาณ 15 นาที ก่อนที่จะ load sample เมื่อแถบสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาจนถึงข้างล่าง หยุดการให้กระแส ค่อย ๆ แกะแผ่นเจลออก ล้างด้วยน้ำ แล้วนำไปย้อมสี

การย้อมแผ่นเจลโดยวิธี Silver stain ของ Morrisey

นำแผ่นเจลที่ล้างน้ำแล้ว ลงแช่ในสารละลายต่าง ๆ ตามลำดับต่อไปนี้

ก. แช่แผ่นเจลลงในสารละลายที่มี 50% เมธานอล และ 10% กรดอะซิติกอยู่ ซึ่งเตรียมโดยผสมเมธานอล 95% 125 มล. กับกรดอะซิติกเข้มข้น 25 มล. ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 250 มล. เขย่าอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 30 นาที

ข. เอาแผ่นเจลออกจากสารละลายในข้อ ก. แช่ลงในสารละลาย 50% เมธานอล และ 70% กรดอะซิติก ซึ่งเตรียมโดยการผสมเมธานอล 95% 12.5 มล. กับกรดอะวิติกเข้มข้น 17.5 มล. เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 250 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. เอาแผ่นเจลออกจากสารละลายในข้อ ข. ใส่ลงในสารละลาย 10% glutaraldehyde ซึ่งเตรียมโดยผสม glutaraldehyde 10 มล. กับน้ำกลั่น 90 มล. เขย่าอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 30 นาที

ง. นำแผ่นเจลจากข้อ ค. มาล้างโดยการเขย่ากับน้ำเป็นเวลา 15 นาที

จ. หลังจากล้างแผ่นเจลแล้ว แช่แผ่นเจลลงในสารละลาย dithiothreitol เข้มข้น 5 ไมโครกรัม ต่อ มล. ซึ่งเตรียมโดยชั่ง dithiothreitol 0.0026 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. เขย่าอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 30 นาที

ฉ. นำแผ่นเจลจากข้อ จ. มาย้อมด้วย 0.1% สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งเตรียมโดยชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.25 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน จนได้ปริมาตร 250 มล. เขย่าอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 30 นาที

ช. นำแผ่นเจลจากข้อ ฉ. มาแช่ใน developer ซึ่งเตรียมโดย ชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติม formaldehyde 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มล. เขย่าอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 30 นาที

ซ. หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลท คือ **P1, TLS63, TP404, TP614** และ **TP811** ในอาหารเหลว 3 สูตร (medium A, B และ C) แสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเหลวสูตร A ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงแต่เดิมแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ผลิตไลเปสแอคติวิตี้ได้สูงสุดและสามารถเจริญเติบโตและผลิตไลเปส

ตารางที่ 3.1 การผลิตไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน 5 ไอโซเลทในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ที่ 65°ซ

Thermophiles	Cultured time (h)	Maximum lipase activity (U/dm^3) in various media				
		Medium A	Medium B	Medium C (Medium A + Organic solvent)		
				Cyclohexane (log P=3.44)	Diisopropyl ether (log P=1.88)	Isopropanol (log P=0.05)
P1	48	3300	2100	2400	2200	2000
TLS63	30	2700	1600	1300	1300	1200
TP404	30	2800	1700	2300	1900	1400
TP614	30	3600	1900	3100	2500	1900
TP811	30	3200	2000	2300	2000	1200

ได้ในปริมาณต่ำกว่าในอาหารเหลวสูตร B และสูตร C (อาหารสูตร A + ตัวทำละลายอินทรีย์) สำหรับอาหารสูตร C นั้น ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P สูง (log ของค่า partition coefficient (P) ของตัวทำละลายระหว่าง n-Octanol และน้ำ ค่านี้มักใช้เป็นตัววัด ความมีขั้วของตัวทำละลาย) จะสามารถผลิตไลเปสแอคติวิตี้ได้มากกว่าตัวทำลายที่มีค่า log P ต่ำกว่า การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวสูตร A ที่มี cyclohexane (log P = 3.44) จะลดลงจากการเลี้ยงในอาหารสูตร A อย่างเดียวประมาณหนึ่งในสามและลดลงครึ่งหนึ่งถ้าตัวทำละลายเป็น diisopropyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ether (log P = 1.88) และ isopropanol (log P = 0.05) การลดลงของการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีตัวทำละลายอินทรีย์นั้นเชื่อกันว่าอาจเป็นผลกระทบโดยตรงของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแบคทีเรีย

3.2 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท

ตารางที่ 3.2 เป็นข้อมูลสรุปสำหรับสมบัติทางกายภาพของไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่จะมี pH ที่เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาในช่วงกว้าง คือ pH 6.0 - 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 50-80°ซ ซึ่งจะมีแอคติวิตี้สูงสุดอยู่ในช่วง pH 7.2 ที่ 65°ซ

ตารางที่ 3.2 สรุปสมบัติทางกายภาพทั่วไปของไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท

Source of lipase	Optimum conditions		* pH stability		**thermal stability (°C)
	pH	Temperature(°C)	at 37°C	at 70°C	
P1	5.0-10.0	40-80	4.0-10.0	5.0-9.0	85
TLS63	6.5-7.5	50-70	4.5-10.0	5.0-10.0	75
TP404	6.6-8.0	40-80	4.0-9.0	5.0-9.0	75
TP614	6.0-8.0	50-80	not determined	5.5-8.5	50
TP811	6.6-8.0	50-80	4.0-9.0	5.0-9.0	80

* residual activity greater than 50% of initial activity after preincubated for 1 h

** activity decrease to 50% of initial activity after preincubated for 1 h

ไลเปสทุกตัวจะมีความคงทนต่อความร้อนในช่วง pH 4.0-10.0 ที่ 37°C และมีแอคติวิตี้ลดลงเล็กน้อยเมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 1 ชม. ในสารละลาย pH 5.0-9.0 ไลเปสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีแอคติวิตี้เหลืออยู่มากกว่า 80% จากตั้งต้นที่ pH 7.0-8.0 ที่อุณหภูมิสูงและแอคติวิตี้ของไลเปสจากแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท จะเหลือมากกว่า 50% ที่ 75-85°C ส่วนไลเปสจาก TP614 จะสูญเสียแอคติวิตี้ไป 50% ที่อุณหภูมิ 50°C

สมบัติการคงทนของไลเปสจากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทในตัวทำละลายอินทรีย์สรุป ในตารางที่ 3.3 ซึ่งพบว่าไลเปสจากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทค่อนข้างเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความคงทนของไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่ 37° และ 65°C

Organic Solvents (50% v/v)	Stability (%)									
	P1		TLS63		TP404		TP614		TP811	
	37°C	65°C	37°C	65°C	37°C	65°C	37°C	65°C	37°C	65°C
Control (no organic solvent)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Cyclohexane (log P=3.44)	88	73	94	79	94	70	88	79	92	73
Diisopropyl ether (log P=1.88)	85	69	87	73	85	73	81	69	89	70
Isopropanol (log P=0.05)	80	66	82	64	83	73	82	67	80	73

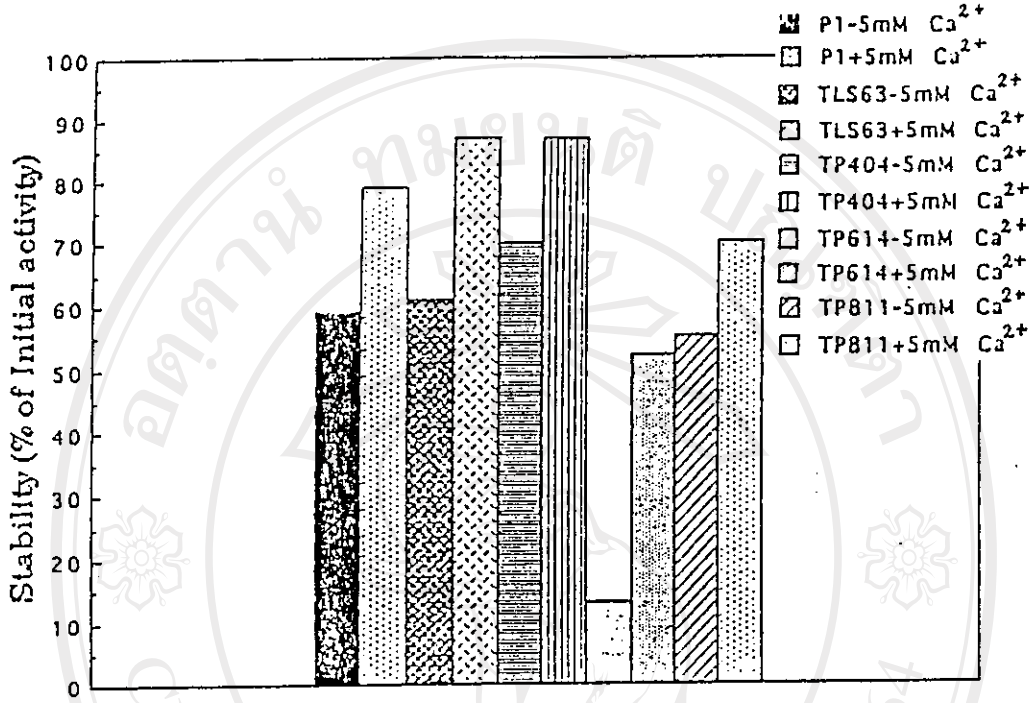
* The stability was calculated at 6 h as percentage of initial activity of the non-solvent-containing control

ไลเปสจะสูญเสียแอคติวิตี้ประมาณ 50% จากเริ่มต้นเมื่อบ่มใน 50% cyclohexane (log P = 3.44) ที่ 37°C และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ต่ำที่ 65°C แอคติวิตี้ในการสลายลิปิดของโดยเอนไซม์จะเหลืออยู่ถึง 70% จากเริ่มต้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่รวมตัวกับน้ำได้เป็นเวลา 6 ชม. ที่อุณหภูมิสูง

3.3 การศึกษาผลของแคลเซียมไอออนต่อความเสถียรของไลเปสได้ผลสรุปในรูปที่ 3.1

Crude lipase ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 5 ไอโซเลท เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1 เดือน ยังมีแอคติวิตี้ครบ 100% รูปที่ 3.1 เป็นผลการศึกษาการเก็บ crude ไลเปสไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพที่เติม 5 mM Ca^{2+} และไม่เติมเป็นเวลา 15 วัน พบว่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่เก็บในสภาพที่ไม่เติม Ca^{2+} ที่อุณหภูมิห้องจะลดลงเกือบ 50% ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจาก TP614 จะลดลงมากเหลือประมาณ 15% จากเริ่มต้น แต่ในสภาพที่มี Ca^{2+} ปรากฏว่าแอคติวิตี้ของไลเปสทั้ง 5 ไอโซเลทจะเหลืออยู่มากกว่า คือในช่วง 52-87% จากเริ่มต้น ส่วนโปรตีนมีความ เข้มข้นเท่าเดิมทุกไอโซเลท ดังนั้นการเติม $CaCl_2$ ลงไปใน crude enzyme สามารถที่จะ รักษาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ให้ยาวนานขึ้นได้เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง แต่ Ca^{2+} ไม่ได้มีผลอย่างนัย สำคัญต่อแอคติวิตี้ของไลเปสหรือความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ที่ 70°C เป็นเวลา 1 ชม. ผลของแคลเซียมไอออนต่อความเสถียรของไลเปสนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 ผลของการเติม 5 mM $CaCl_2$ ต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน (คำนวณแอคติวิตี้โดยเทียบเป็นเปอร์เซนต์ของแอคติวิตี้เริ่มต้นในสภาพที่ไม่ได้เติม $CaCl_2$)

3.4 ผลการศึกษาสมบัติการสลายสับสเตรทน้ำมันชนิดต่าง ๆ โดยไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท สรุปในตารางที่ 3.4 ซึ่งพบว่าไลเปสจากทุกไอโซเลทจะมีรูปแบบการไฮโดรไลส์ไขมันชนิดต่างๆ แบบเดียวกันภายใต้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตี้ของมัน โดยมีแอคติวิตี้สูงสุดต่อไตรโอเลอิน(triolein) ในพวกไตรกลีเซอไรด์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าไลเปสเหล่านี้สามารถไฮโดรไลส์ลิปิดสับสเตรทที่ประกอบด้วยกรดโอเลอิค (C_{18} : 1) ดีกว่ากรดไขมันชนิดอื่น ผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทจำเพาะสำหรับพันธะเอสเทอร์ของกรดโอ-เลอิค และยังมีแอคติวิตี้สูงสำหรับพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนสูงมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว อย่างไรก็ตามผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มที่เหมือนกันของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ในแง่ที่มีความจำเพาะกว้างสำหรับพันธะของเอสเทอร์ของกรดไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.4 สมบัติการสลายลิปิดสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท

Substrates (4% v/v)	Main fatty acid composition (%)	Lipolytic activity (U/cm^3)				
		P1	TLS63	TP404	TP614	TP811
Triglycerides						
Tributyrin	Butyrin (100)	5000	2000	1800	2400	1800
Tripalmitin	Palmitic (100	5300	2500	2200	2800	2300
Triolein	Oleic (100)	6300	2800	2600	3600	2800
Trilinolein	Linoleic (100)	5700	2700	2500	2800	2700
Vegetable oils						
Castor seed oil	Linoic(45), oleic(40)	4400	2100	2200	2800	2400
Coconut oil	Lauric(45), Myristic(18)	3800	1600	1900	1200	2000
Corn seed oil	Linolein(56), Oleic(31)	5300	2400	2500	2000	2400
Cotton seed oil	Linoleic(60),Palmitic(20)	5300	2500	2500	2000	2400
Eucalyptis oil	not specify	3100	1100	1600	800	1800
Linseed oil	Linoleic(50), Oleic(40)	5400	2500	2500	2000	2600
Olive oil	Oleic(80), Palmitic(10)	5800	2800	2700	2800	2900
Palm seed oil	Palmitic(46), Oleic(40)	5400	2300	2600	2000	2800
Rice bran oil	Lionoleic(55), Oleic(37)	5500	2300	2200	2000	2300
Safflower seed oil	Linoleic(76), Oleic(17)	5200	2800	2600	2800	2700
Sandal wood oil	not specify	3500	1900	1800	1200	1900
Sesame seed oil	Oleic(50), Linoleic(45)	5500	2500	2600	2400	2700
Soybean seed oil	Linoleic(54), Oleic(24)	5500	2300	2500	1600	2300
Sunflower seed oil	Linoleic(48), Oleic(40)	5200	2600	2400	1200	2500
Animal oils						
Cod liver oil	Oleic(23), Palmitic(15)	4900	2700	2800	2000	2700
Creamy butter	Oleic(31), Palmitic(30)	5200	2100	2200	2000	2300
*Fish oil	EPA(18), Oleic(15) DHA(12), Palmitic(10)	4600	2500	2600	1600	2700
Lard oil	Oleic(45), Palmitic(15)	4100	1900	2000	2600	2200

*enriched of ω-3 fatty acids (e.g., EPA : Eicosapentaenoic acid, DHA : Docosahexaenoic acid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์มอไฟล์ 5 ไอโซเลท

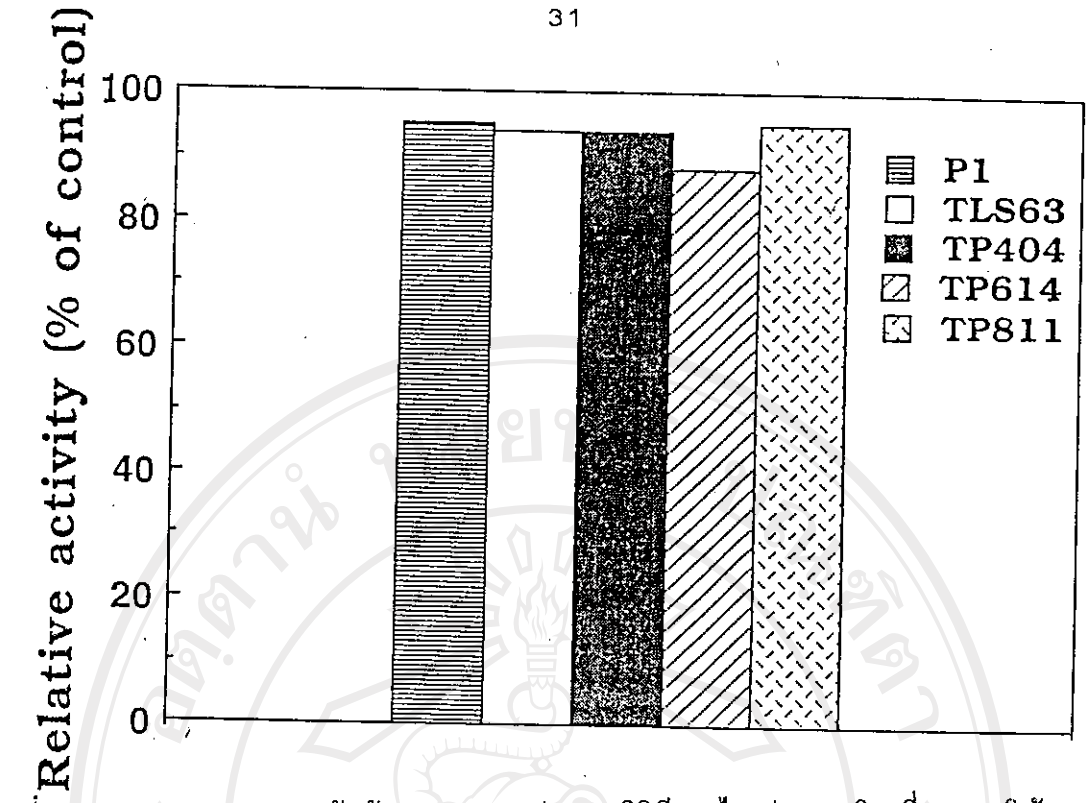
ผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์มอไฟล์ 5 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ผลของไอออนโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปสจากเทอร์มอไฟล์ 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

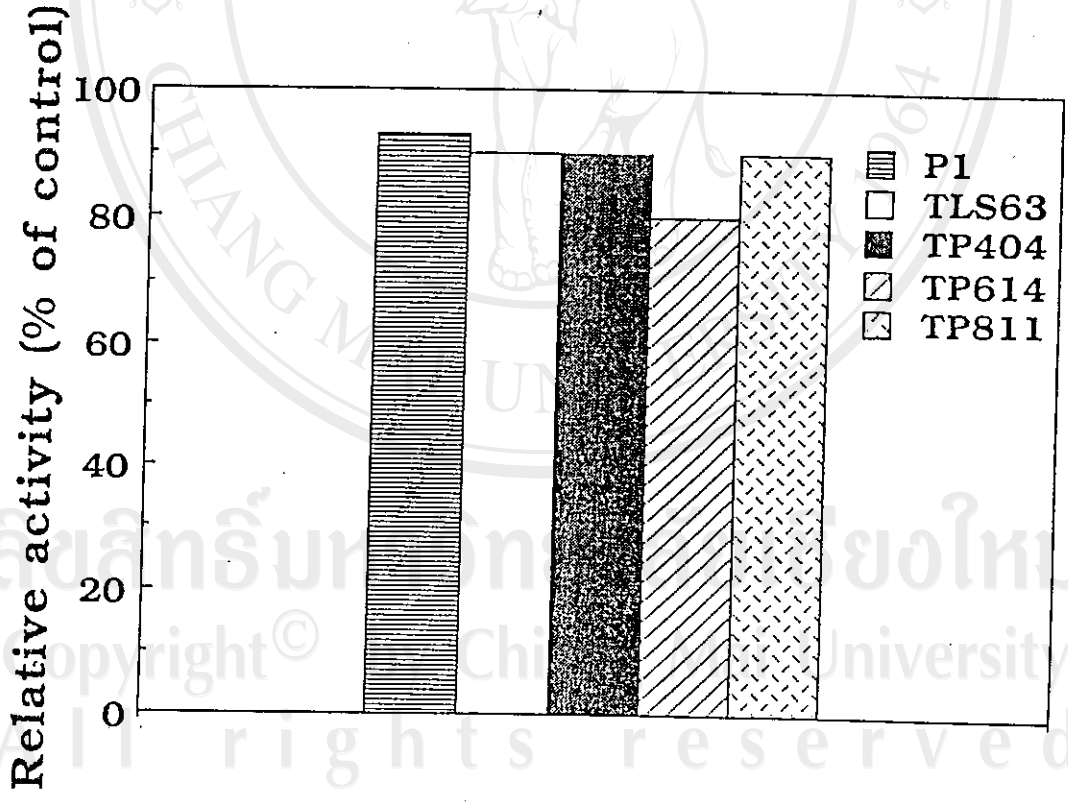
Chemical (10 mM)	Relative activity (% of control)				
	P1	TLS63	TP404	TP614	TP811
Control	100	100	100	100	100
$FeSO_4$	81	84	84	69	85
$FeCl_2$	80	83	80	68	80
$FeCl_3$	82	83	80	68	81
KCl	125	100	100	112	105
$MgCl_2$	128	110	86	114	90
$MgSO_4$	122	115	100	121	100
$PbCl_2$	115	112	98	120	100
NaCl	112	116	100	100	100
$CaCl_2$	105	108	108	110	105
$CoCl_2$	55	48	47	45	50
V_2O_5	50	68	72	68	70
$CuCl_2$	85	75	72	80	75
$ZnCl_2$	85	79	90	50	85
$ZnSO_4$	85	82	77	50	80
$MnCl_2$	97	90	87	90	85
$MnSO_4$	97	90	87	91	85
$AgNO_3$	52	55	48	45	50

จากตาราง 3.5 จะเห็นว่า Ag^+ และ Co^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดได้ปริมาณ 50% Fe^{2+}, Fe^{3+}, V^{2+}, Cu^{2+} และ Zn^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดได้เล็กน้อย โดยเฉพาะ Zn^{2+} ยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสจาก TP614 ได้ประมาณ 50% ในขณะที่ Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mn^{2+} และ Pb^{2+} สามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสทุกชนิดโดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีเท่าเดิมหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

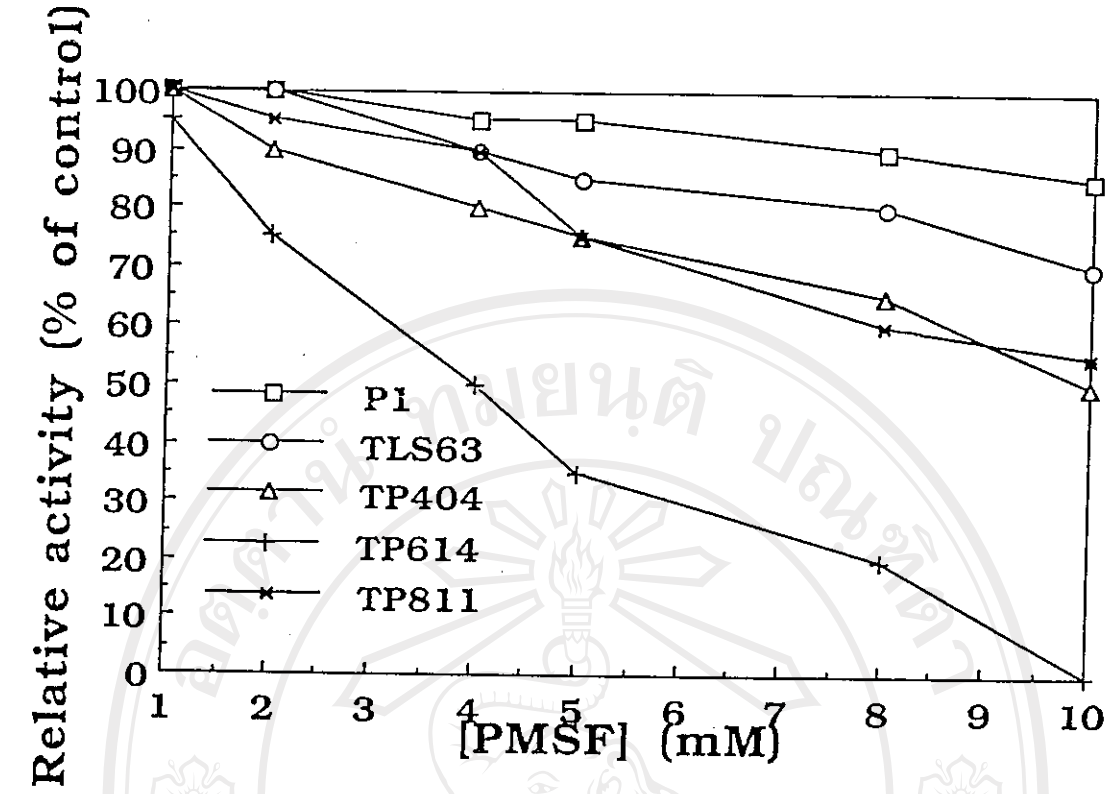


รูปที่ 3.2 ผลของ EGTA เข้มข้น 10 mM ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

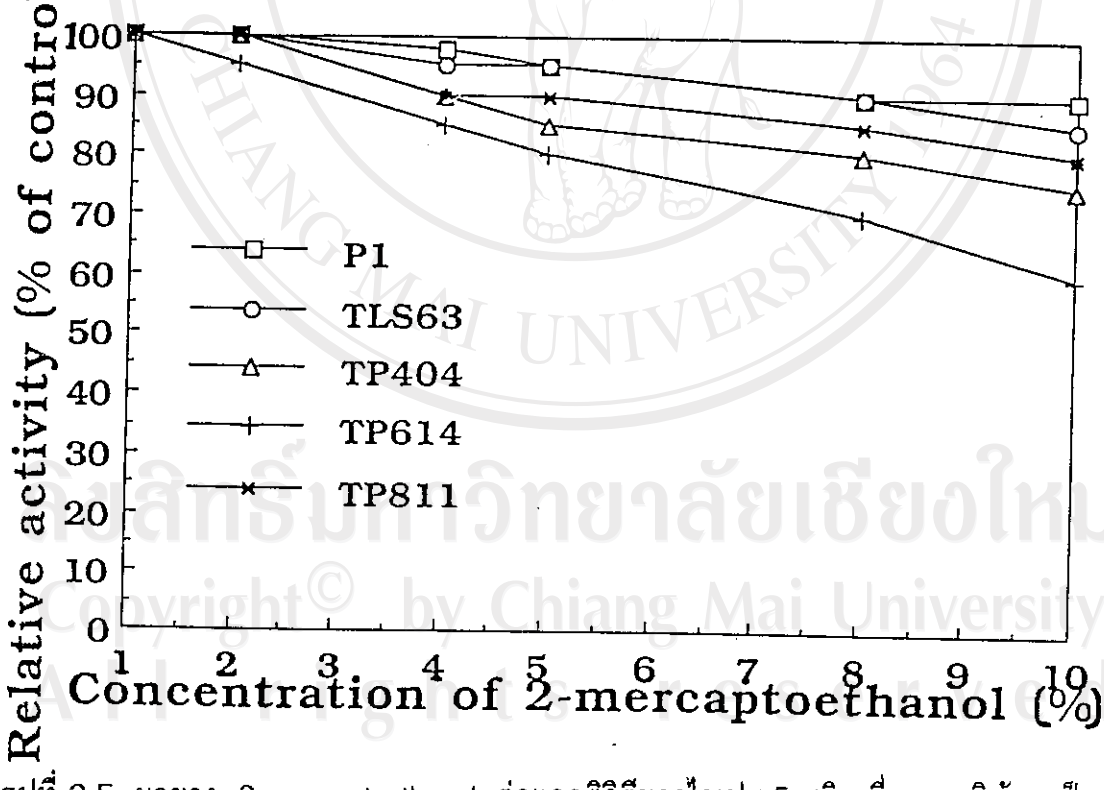


รูปที่ 3.3 ผลของ EDTA เข้มข้น 10 mM ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.4 ผลของ PMSF ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.5 ผลของ 2-mercaptoethanol ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

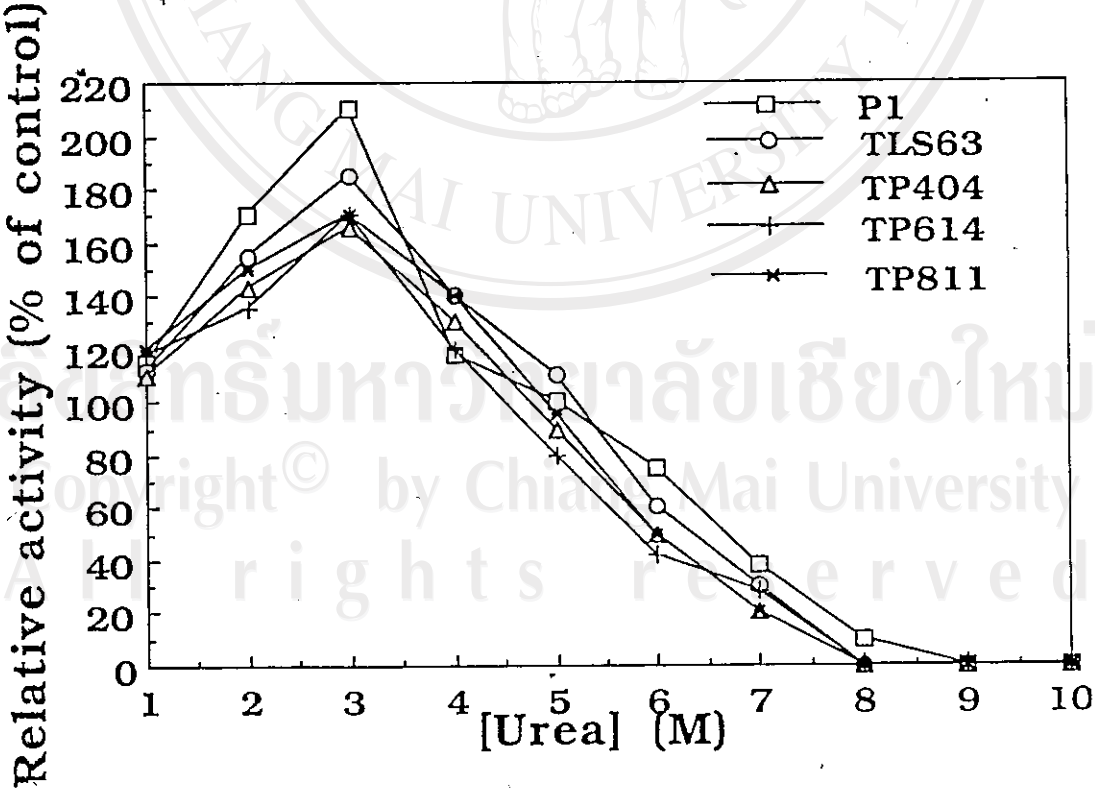
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 3.2-3.5

จะเห็นว่าตัวจับไอออนโลหะทั้ง EGTA และ EDTA ที่ความเข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ประกอบกับไอออนโลหะทุกชนิดโดยเฉพาะ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 mM ก็ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกัน แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสเหล่านี้ไม่ต้องการโคแฟ็กเตอร์ ไม่มีส่วนจับแคลเซียมในโมเลกุลเอนไซม์และไม่เป็นเมทัลโลโปรตีนในขณะที่ PMSF เข้มข้น 10 mM สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดได้โดยเฉพาะไลเปสจาก TP614 ถูกยับยั้งแอคติวิตีโดยสมบูรณ์

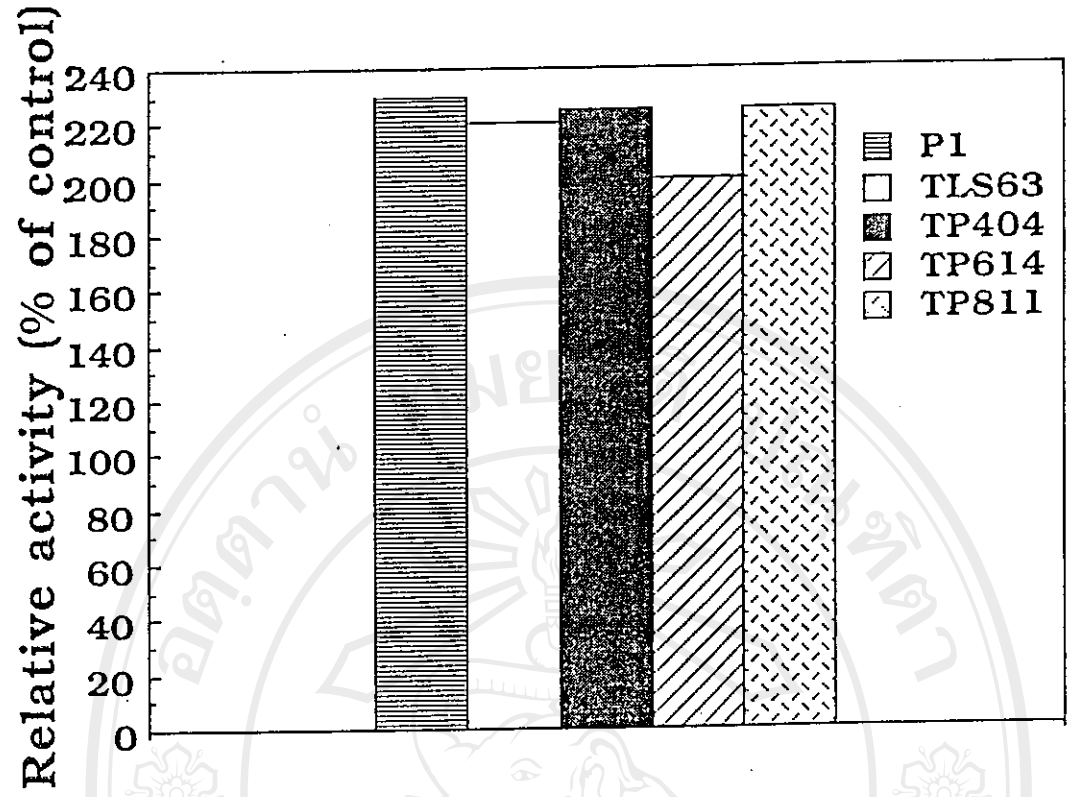
3.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.6-3.8 ซึ่งจะเห็นว่ายูเรียที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 3M ทำให้แอคติวิตีของไลเปสทุกชนิดเพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้น 3 M จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากที่สุดประมาณ 2 เท่าของแอคติวิตีเริ่มต้น สำหรับ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันสามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้นประมาณ 4% โดยปริมาตรจะทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของแอคติวิตีเริ่มต้น ส่วน sodiumdodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนต์ชนิดประจุลบ สามารถจับกับแคลเซียมไอออนในสารละลายเอนไซม์และจับกับประจุบวกบนโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ

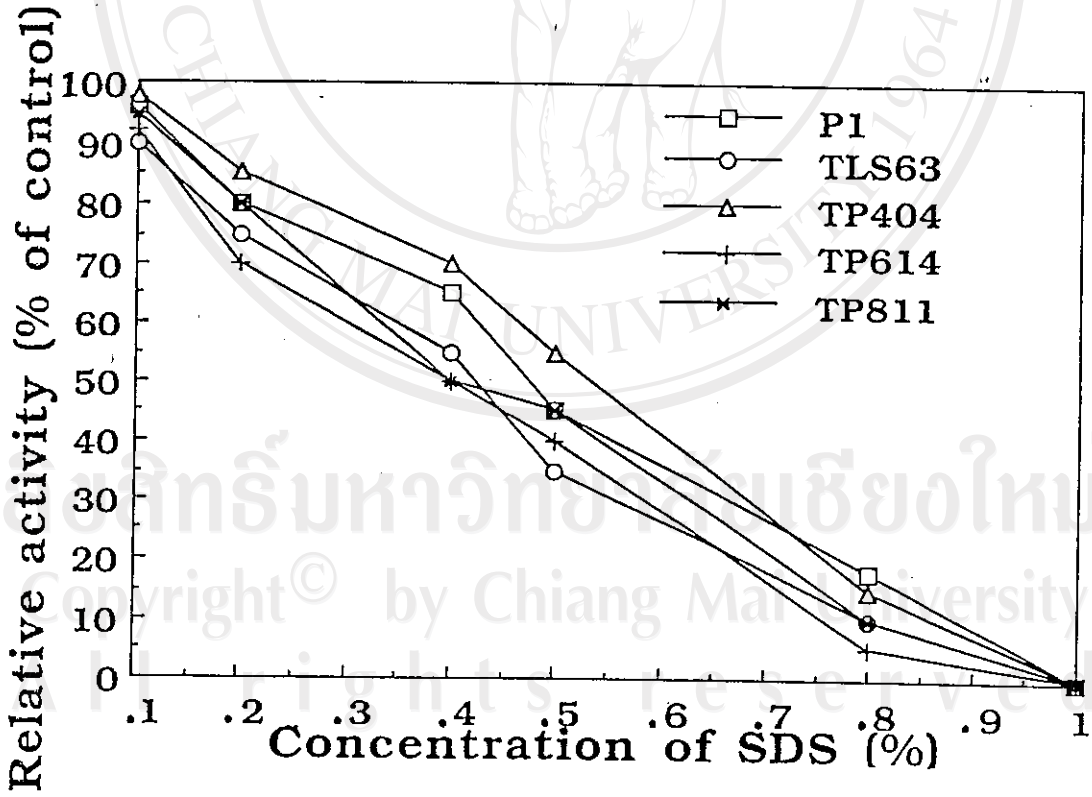


รูปที่ 3.6 ผลของยูเรียต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.7 ผลของ Triton X-100 เข้มข้น 4% ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

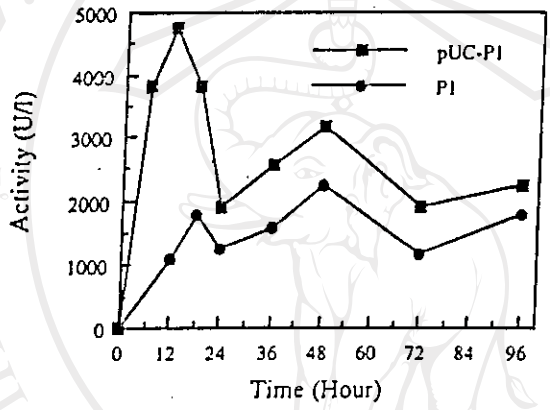


รูปที่ 3.8 ผลของ SDS ต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

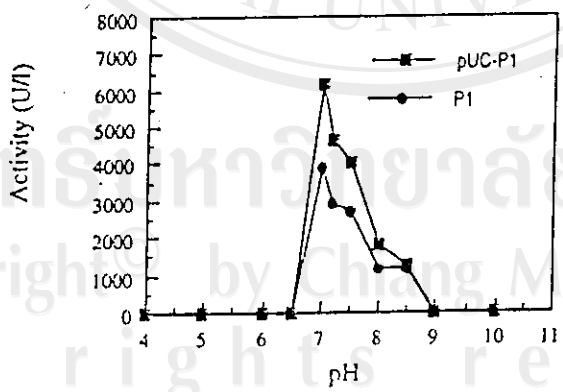
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8 ผลการโคลนยีนที่ผลิตไลเปสและการแสดงออกของยีนจาก P1, TP404 และ TP811

ผู้ร่วมงานจากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ช่วยแยกยีนไลเปสจาก P1 TP404 และ TP811 แล้วใส่เข้าไปในพาหะ pUC 19 แล้วใส่ในแบคทีเรีย E. coli DH5 จากนั้นก็ทำการแยก clone ที่ผลิตไลเปสโดยเลี้ยงในอาหารวุ้นที่มี tributyrin และแยกโคโลนีที่ผลิตวงใสออกมา เรียกชื่อแบคทีเรียที่โคลนได้นี้ว่า pUC-P1, pUC-TP404 และ pU-TP811 ตามลำดับ จากนั้นได้นำโคลนเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารเหลวเทียบกับการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์เดิมเพื่อดูการผลิตไลเปสในช่วงแรกนี้ได้นำ clone pUC-P1 มาศึกษาเทียบกับไอโซเลท P1 ก่อนทั้งในแง่การผลิตและสมบัติบางประการ ผลการทดลองสรุปในรูปที่ 3.9-3.13

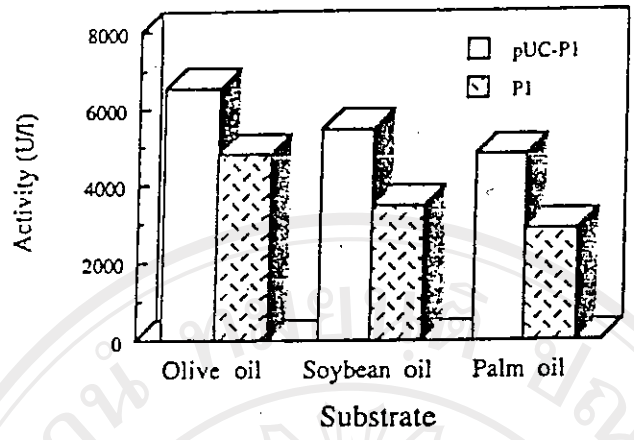


รูปที่ 3.9 การผลิตเอนไซม์ไลเปสของโคลน pUC-P1 และแบคทีเรียไอโซเลท P1

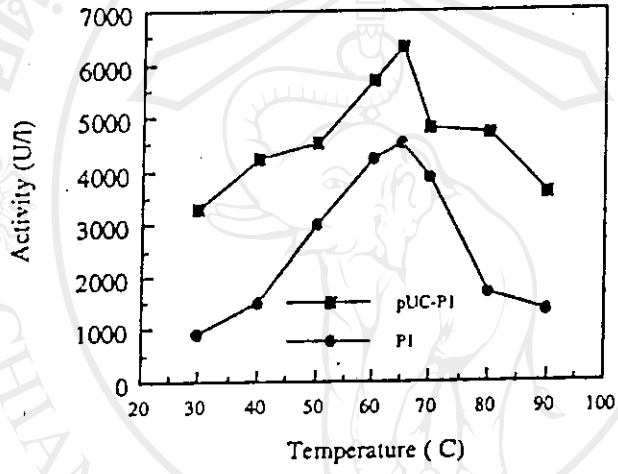


รูปที่ 3.10 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก pUC-P1 และ P1

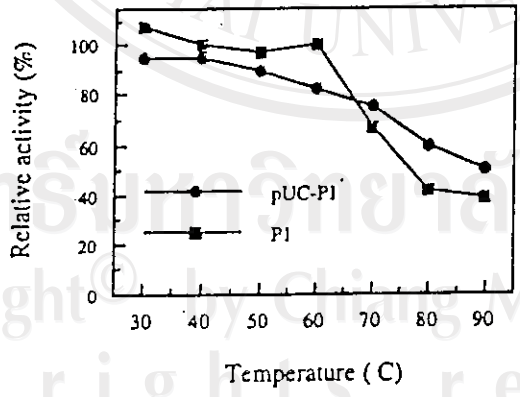
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.11 ผลการไฮโดรไลส์สับสเตรทต่างชนิดของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1



รูปที่ 3.12 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1



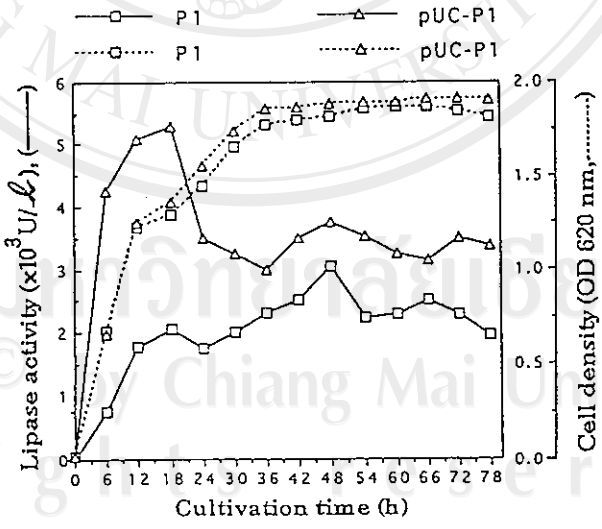
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3.13 ความเสถียรต่อความร้อนของไลเปสจาก pUC-P1 และ P1 เมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 30° - 90°ซ เป็นเวลา 1 ชม.

ผลการศึกษาเปรียบเทียบพบว่ารูปแบบการผลิตเอนไซม์ไลเปสส่งออกนอกเซลล์และสมบัติบางประการของไลเปสจาก pUC-P1 (cloned lipase) และแบคทีเรียไอโซเลท P1 (Native strain) ได้แก่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม ความคงทนต่อความร้อน และความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรทต่างชนิดเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน ไลเปสจากโคลน pUC-P1 นั้นจะมีแอคติวิตีสูงขึ้นเป็น 2 เท่าของไลเปสจาก P1 เท่านั้น และมีความคงทนต่อความร้อนเพิ่มขึ้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโคลน pUC-P1 มียีนที่ผลิตไลเปสของ P1 แต่ยังมีการแสดงออกต่ำต้องปรับปรุงต่อไป

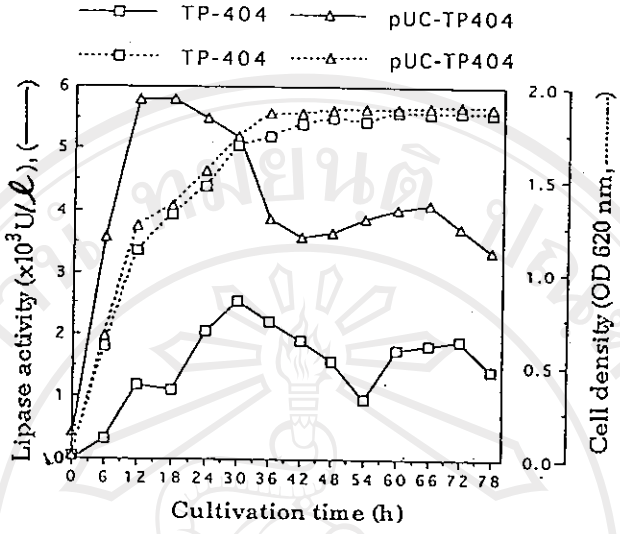
3.9 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีและสมบัติบางประการของไลเปสนอกเซลล์แบคทีเรีย P1, TP404 และ TP811 กับโคลนของเอนไซม์เหล่านี้

รูปแบบของการผลิตไลเปสนอกเซลล์แบคทีเรียเทอร์มอไฟล์ 3 ไอโซเลทและโคลนของเอนไซม์เหล่านี้แสดงในรูปที่ 3.14-3.16 ซึ่งพบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นไปในทางเดียวกับการเจริญของเซลล์ เซลล์จะเริ่มผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ในระยะต้น ๆ ของ log phase (ประมาณ 3 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงและเพิ่มขึ้นในรูปแบบที่เกือบจะขนานกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การผลิตไล - เปสสูงสุดของโคลนของเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทจะอยู่ในช่วงกลางของ log phase ในขณะที่การผลิตของแบคทีเรียดั้งเดิมจะผลิตสูงสุดที่ปลายๆ log phase และสามารถพบแอคติวิตีของไลเปสในช่วงปลาย stationary phase ระดับของการแสดงออกของไลเปสยีนจากโคลนทั้งสามชนิดจะประมาณ 2 เท่าของ native strains ซึ่งนับว่ายังต่ำมาก ไม่เพียงพอแก่การนำไปศึกษาการนำไปใช้หรือการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์เพื่อศึกษารายละเอียดต่างๆ ของเอนไซม์

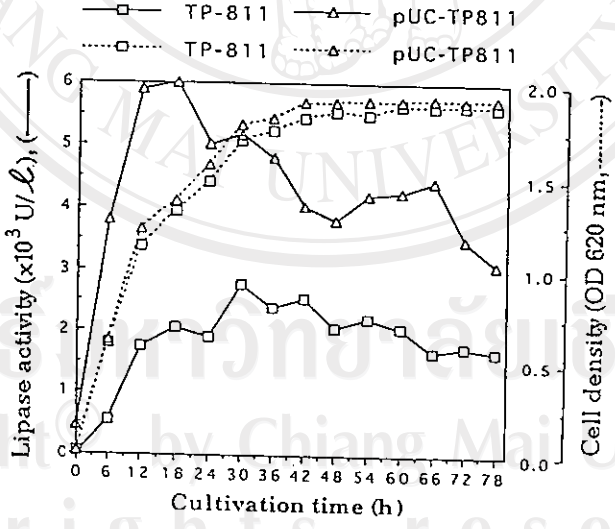


รูปที่ 3.14 รูปแบบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ P1 และ pUC-P1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.15 รูปแบบการผลิตไลเปสของ TP-404 และ pUC-TP-404



รูปที่ 3.16 รูปแบบการผลิตไลเปสของ TP-811 และ pUC-TP-811

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการศึกษาอิทธิพลของ pH และอุณหภูมิตลอดจนความคงทนต่อความร้อนและ pH ที่อุณหภูมิ 37° และ 70°ซ ของไลเปสจาก native strains ของ P1, TP404 และ TP811 เปรียบเทียบกับไลเปสจาก pUC-P1, pUC-TP404 และ pUC-TP811 ตามลำดับ สรุปไว้ในตารางที่ 3.6 ไลเปสจากทุกไอโซเลทและโคลนของมันจะมี pH และที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงกว้างคือ pH 6.0-8.0 และอุณหภูมิ 48-80°C ซึ่งจะมีแอคติวิตีสูงสุดประมาณ

ตารางที่ 3.6 การเปรียบเทียบสมบัติบางประการของไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 3 ไอโซเลท และโคลนของมัน

Source of lipase	Optimum conditions		*pH stability		**Thermal stability(°C)
	pH	Temperature	at 37°C	at 70°C	
P1	5.0-10.0	40-80	4.0-10.0	5.0-9.0	85
pUC-P1	5.0-10.0	40-80	4.0-10.0	5.0-9.0	85
TP-404	6.6-8.0	40-80	4.0-9.0	5.0-9.0	75
pUC-TP404	6.8-8.0	40-85	4.0-9.0	5.0-9.0	75
TP-811	6.6-8.0	50-80	4.0-9.0	5.0-9.0	80
pUC-TP811	6.7-8.0	50-80	4.0-10.0	5.0-9.-	80

*residual activity greater than 50% of initial activity after pre-incubated for 1 h

**activity decrease to 50% of initial activity after pre-incubated for 1 h

pH 7.2 ที่ 65°ซ และมีความคงทนต่อความร้อน และ pH ใกล้เคียงกัน คือไลเปสจากทุกไอโซเลทที่ทดสอบจะมีความเสถียรใน pH ที่กว้างที่ 37°C (4.0-10.0) และสูญเสียแอคติวิตีเล็กน้อยเมื่อบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 1 ชม. ที่ pH ต่าง ๆ และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 70°C เป็นเวลา 1 ชม. แอคติวิตียังเหลืออยู่ 80% จากเริ่มต้น สมบัติทั่วไปของไลเปสจาก TP404 และ TP811 เหมือนกันและใกล้เคียงกับ P1 โดยที่ P1 ไลเปสจะมี pH ที่เหมาะสมในช่วงที่กว้างกว่าทนต่อความร้อนได้สูงกว่าเล็กน้อย อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าไลเปสจาก native strains และโคลนของมันจะมีสมบัติต่าง ๆ โดยทั่วไปเหมือนกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ทำการตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ไลเปส 3 ไอโซเลทและโคลนของมันในการสลายสับสเตรทที่เป็น Triglycerides ชนิดต่าง ๆ ไขมันและน้ำมันซึ่งผลที่ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3.7 ซึ่งจะ

ตารางที่ 3.7 แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก 3 ไอโซเลท และโคลนของมันในการไฮโดรไลส์สับสเตรทน้ำมันและไขมันชนิดต่าง ๆ

Substrates (4% v/v)	Main fatty acid composition (%)	Lipolytic activity (U/cm^3)					
		P1	pUC-P1	TP404	pUC-TP404	TP-811	TP811
Triglycerides							
Tributyrin	Butyrin (100)	2300	5000	1800	4100	1800	4200
Tripalmitin	Palmitic (100	2400	5300	2200	5000	2300	5500
Triolein	Oleic (100)	3300	6300	2600	5900	2800	6400
Trilinolein	Linoleic (100)	2800	5700	2500	5700	2700	5900
Vegetable oils							
Castor seed oil	Linoic(45), oleic(40)	1900	4400	2200	4800	2400	5200
Coconut oil	Lauric(45), Myristic(18)	1300	3800	1900	4200	2000	4300
Corn seed oil	Linolein(56), Oleic(31)	2400	5300	2500	5400	2400	5500
Cotton seed oil	Linoleic(60),Palmitic(20)	2400	5300	2500	5600	2400	5200
Eucalyptis oil	not specify	1900	3100	1600	3800	1800	4100
Linseed oil	Linoleic(50), Oleic(40)	2400	5400	2500	5500	2600	5800
Olive oil	Oleic(80), Palmitic(10)	3300	5800	2700	5900	2900	6400
Palm seed oil	Palmitic(46), Oleic(40)	2500	5400	2600	5500	2800	6100
Rice bran oil	Lionoleic(55), Oleic(37)	2700	5500	2200	4900	2300	4800
Safflower seed oil	Linoleic(76), Oleic(17)	2400	5200	2600	5800	2700	5900
Sandal wood oil	not specify	1900	3500	1800	3800	1900	4300
Sesame seed oil	Oleic(50), Linoleic(45)	2900	5500	2600	5700	2700	5800
Soybean seed oil	Linoleic(54), Oleic(24)	2800	5500	2500	5700	2300	5000
Sunflower seed oil	Linoleic(48), Oleic(40)	2400	5200	2400	5500	2500	5700
Animal oils							
Cod liver oil	Oleic(23), Palmitic(15)	2100	4900	2800	5700	2700	5900
Creamy butter	Oleic(31), Palmitic(30)	2300	5200	2200	5000	2300	5300
*Fish oil	EPA(18), Oleic(15) DHA(12), Palmitic(10)	2000	4600	2600	5700	2700	5700
Lard oil	Oleic(15), Palmitic(15)	1500	4100	2000	4500	2200	4700

*enriched of ω-3 fatty acids (e.g., EPA : Eicosapentaenoic acid, DHA : Docosahexaenoic acid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

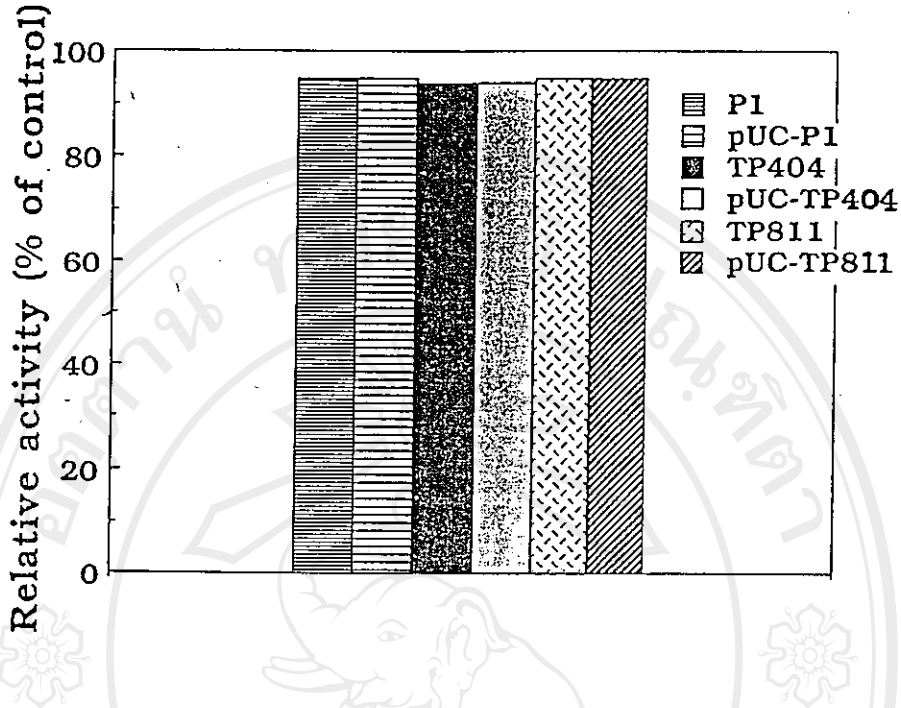
เห็นได้ว่าไลเปสจากทุกไอโซเลทและโคลนของมันจะมีรูปแบบในการไฮโดรไลส์สับสเตรทชนิดต่าง ๆ ที่ภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ไปในทำนองเดียวกันกล่าวคือ crude enzyme จะมีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อมี Triolein (C18:1) เป็นสับสเตรทเทียบกับ Tributyrin(C_4), Tripalmitic (C_{10}) และ Trilinolein ($C_{18:2}$) ตามลำดับ การไฮโดรไลส์น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ นั้น น้ำมันมะกอกที่มีเปอร์เซนต์กรดโอเลอิค (C18:1) เป็นองค์ประกอบสูง (80%) จะมีแอคติวิตีสูงสุด การไฮโดรไลส์ไขมันและน้ำมันจากสัตว์ก็เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปไลเปสจากทุกไอโซเลทที่ทดสอบมีความจำเพาะต่อการตัดพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันในช่วงกว้าง และการที่ไลเปสจากโคลนทั้งสามชนิดมีแอคติวิตีสูงกว่าเมื่อเทียบกับไลเปสจาก native strains เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์มากกว่า

ผลการเปรียบเทียบอิทธิพลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก native strains และโคลนของมันแสดงในตารางที่ 3.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าอิทธิพลของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก native strain และโคลนของมันจะเหมือนกันทุกประการ กล่าวคือ $CoCl_2$, V_2O_5 และ $AgNO_3$ ในความเข้มข้น 10 mM จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์มากในขณะที่ $FeSO_4$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ และ $ZnSO_4$ จะยับยั้งเล็กน้อย ส่วน $MnCl_2$ และ $MnSO_4$ ไม่มีผลต่อไลเปสแอคติวิตี เอนไซม์แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเติม KCl, NaCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$, $PbCl_2$ หรือ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 10 mM

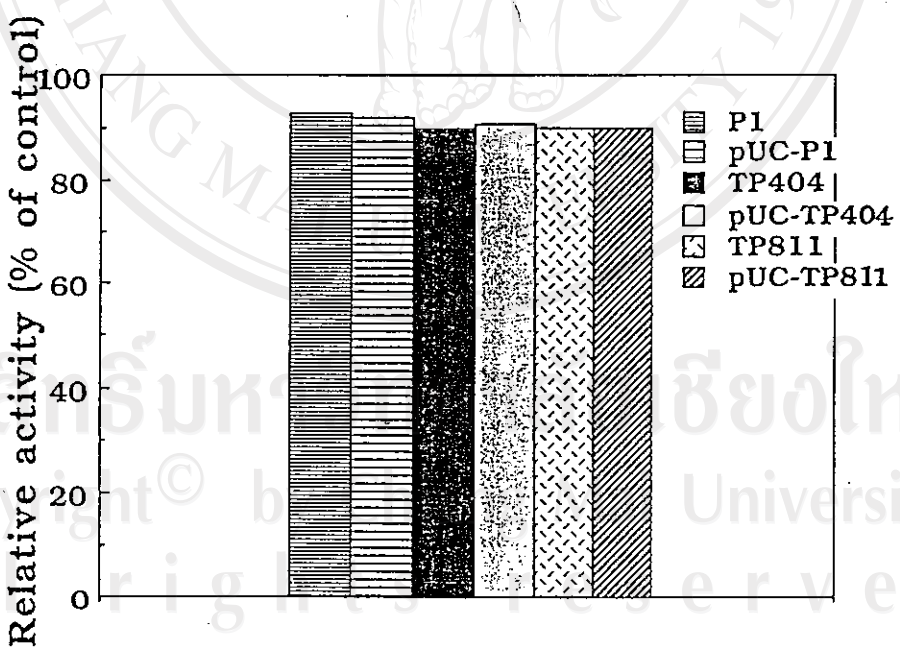
ผลของตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสแสดงในรูปที่ 3.17-3.20 พบว่าพวก divalent metalchelating agents เช่น EGTA และ EDTA ในความเข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อไลเปสแอคติวิตีและ 2-mercaptoethanol มีผลทำให้แอคติวิตีลดลงเล็กน้อยในขณะที่ PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะในการจับกับกรดอะมิโนเซอรีนของเอนไซม์มีอิทธิพลในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสอย่างมีนัยสำคัญ

อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิว (surfactants) ชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของไลเปสแสดงในรูปที่ 3.21-3.23 ซึ่งพบว่าแอคติวิตีของไลเปสจะเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มกับ 3M urea และยังคงมีแอคติวิตีเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็น 4-5 M แอคติวิตียังคงตรวจสอบได้แม้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็น 7 M (ไม่ได้แสดงผล) การเติม Triton X-100 ลงไปในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไลเปส 10% โดยปริมาตร จะทำให้แอคติวิตีของไลเปสเพิ่มขึ้นและเพิ่มมากที่สุดเมื่อเติม Triton X-100 4% โดยปริมาตร ส่วน sodium dodecylsulfate หรือ SDS นั้นเป็น anionic detergent ซึ่งจะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นที่เติมเนื่องจากไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนโดยทั่วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

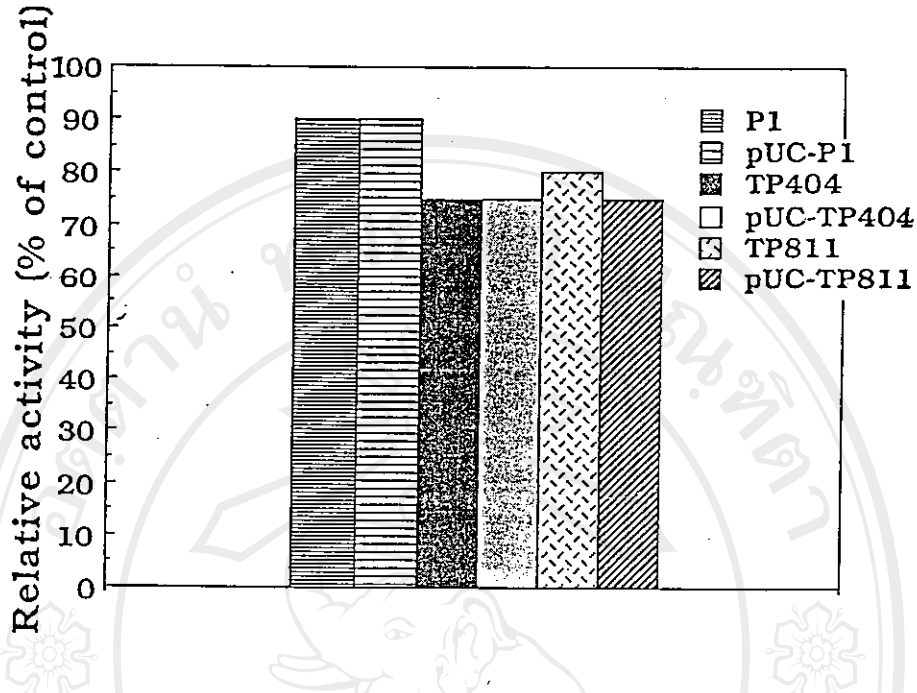


รูปที่ 3.17 ผลของ 10 mM EGTA ต่อไลเปสแอคติวิตี

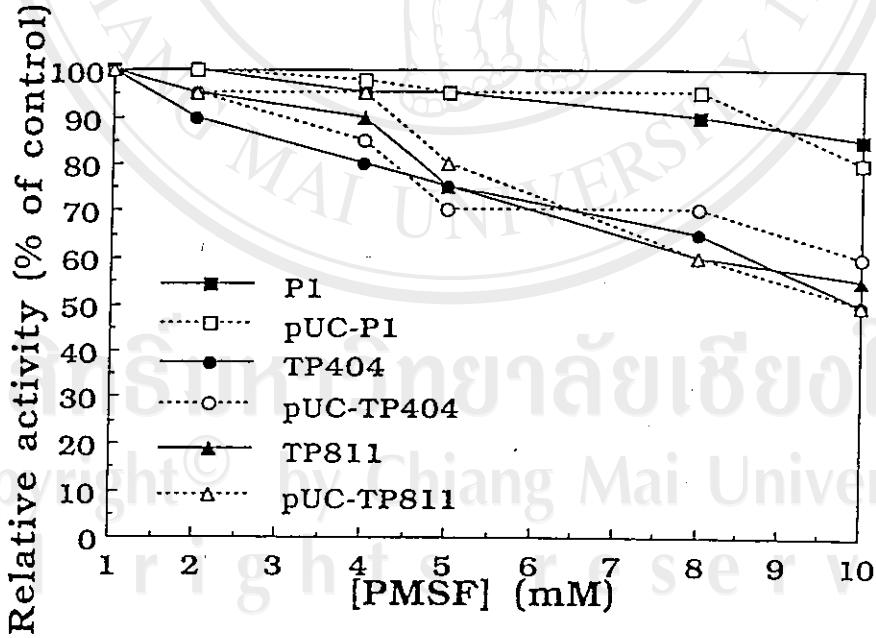


รูปที่ 3.18 ผลของ 10 mM EDTA ต่อไลเปสแอคติวิตี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

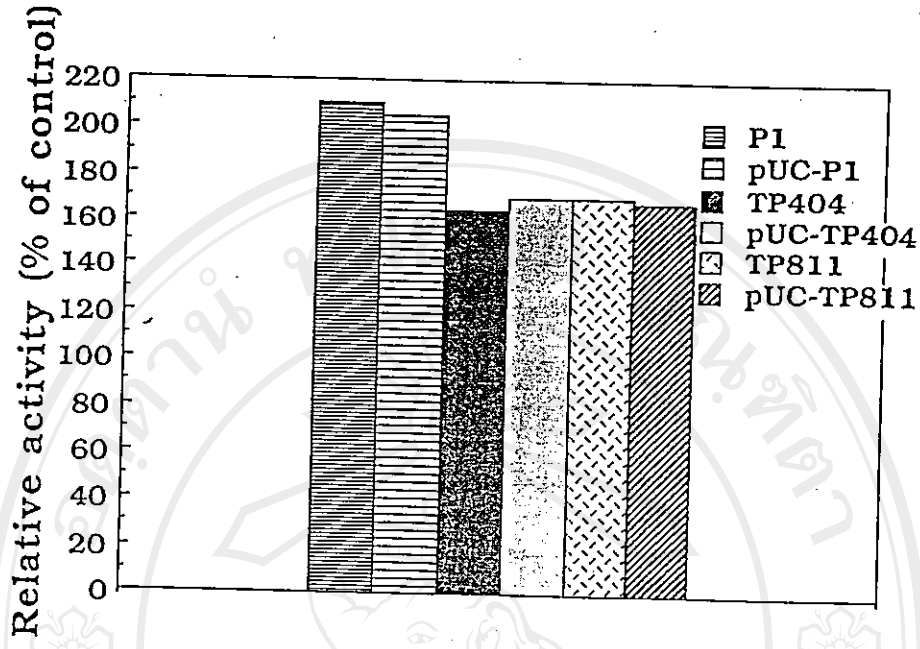


รูปที่ 3.19 ผลของ 2-mercaptoethanol (10% v/v) ต่อไลเปสแอคติวิตี

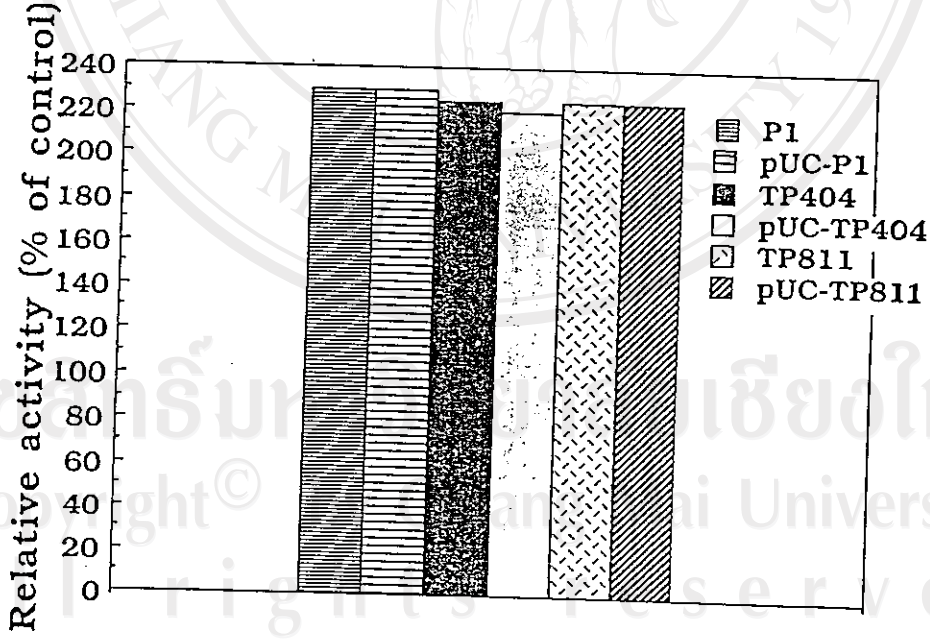


รูปที่ 3.20 ผลของ PMSF ต่อไลเปสแอคติวิตี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.21 ผลของ 3M Urea ต่อไลเปสแอคติวิตี



รูปที่ 3.22 ผลของ Triton X-100 (4% v/v) ต่อไลเปสแอคติวิตี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

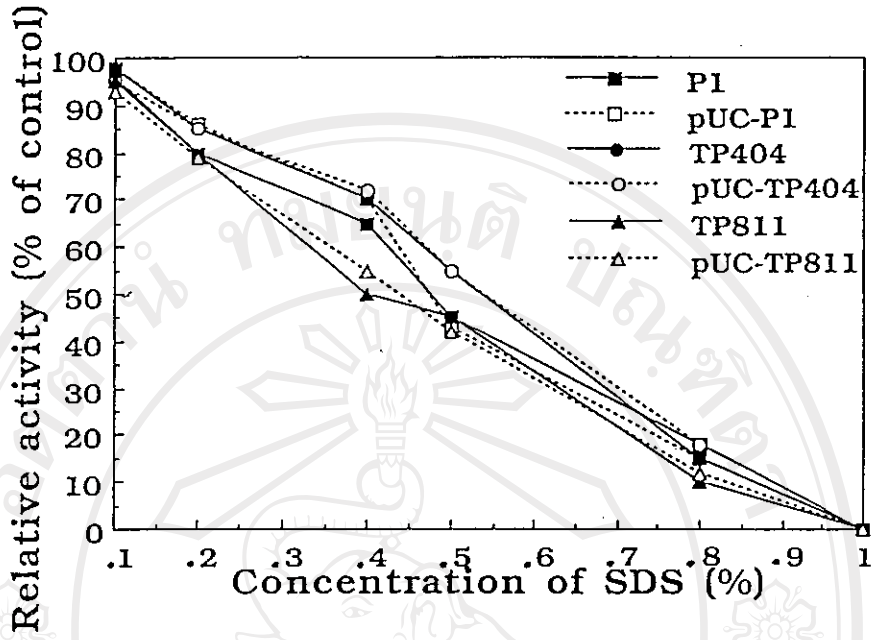
ตารางที่ 3.8 อิทธิพลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของไลเปสจาก native strains และ cloned ของมัน

Chemical (10 mM)	Relative activity (% of control)					
	P1	pUC-P1	TP404	pUC-TP404	TP811	pUC-TP404
Control	100	100	100	100	100	100
$FeSO_4$	81	83	84	87	85	86
$FeCl_2$	80	85	80	90	80	83
$FeCl_3$	82	80	80	85	81	80
KCl	125	120	100	115	105	100
$MgCl_2$	128	115	100	116	100	105
$MgSO_4$	122	130	86	108	90	95
$PbCl_2$	115	132	100	120	100	106
NaCl	112	110	98	100	100	100
$CaCl_2$	105	103	108	105	105	110
$CoCl_2$	55	52	47	45	50	48
V_2O_5	50	75	72	66	70	66
$CuCl_2$	85	81	72	75	75	75
$ZnCl_2$	85	82	90	87	85	85
$ZnSO_4$	85	80	77	80	80	80
$MnCl_2$	97	95	87	85	85	82
$MnSO_4$	97	98	87	80	85	85
$AgNO_3$	52	50	48	45	80	45

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10 ผลการศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ T20 และ TP614 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

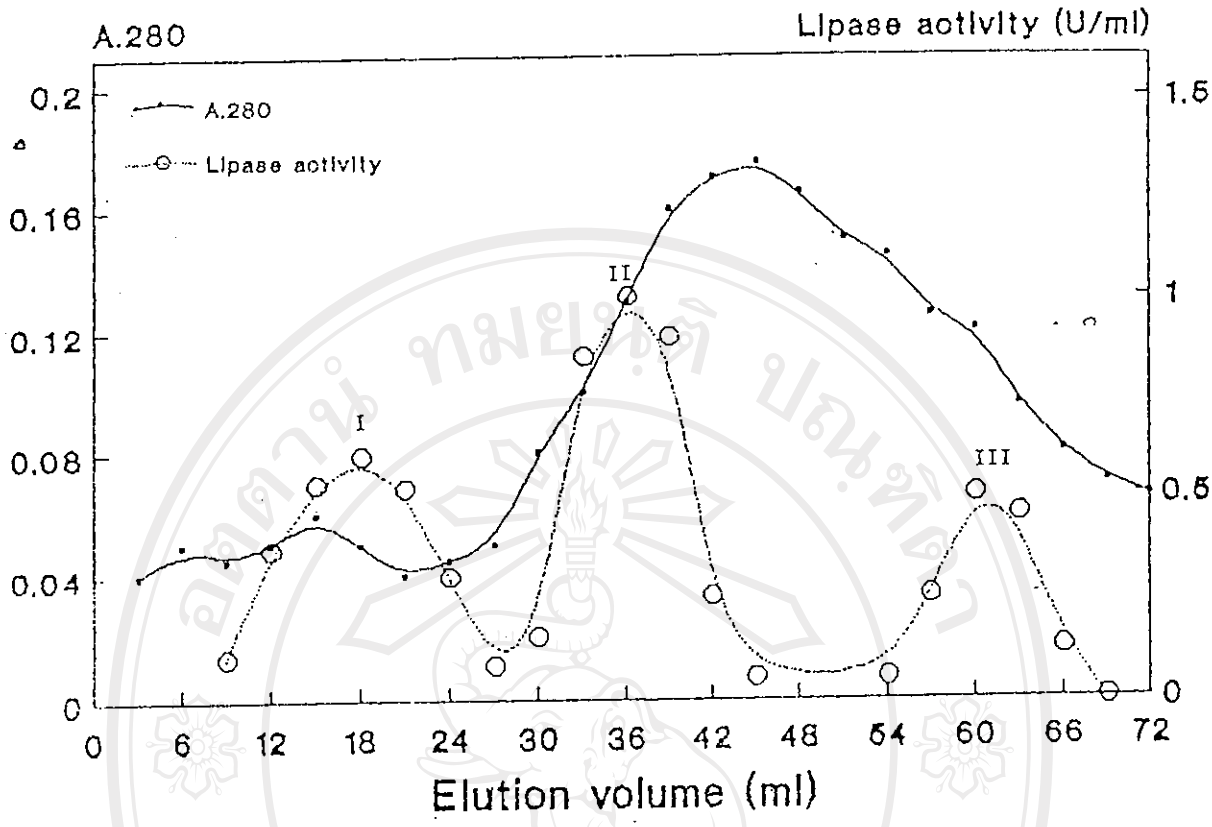
จากการศึกษาที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยพบว่าไลเปสจากไอโซเลท T20 และ TP614 เป็นเอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม จึงใช้เป็นเอนไซม์ต้นแบบในการศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ให้บริสุทธิ์บางส่วน



รูปที่ 3.23 ผลของโซเดียมโดดิซิลซัลเฟท (SDS) ต่อไลเปสแอคติวิตี

ผลการทำเอนไซม์ไลเปสจาก T20 ให้บริสุทธิ์โดยทำการเลี้ยงเทอร์โมไฟล์ T20 ในอาหารเหลว แยกเอนไซม์ออกมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดย ultrafiltration แล้วตกตะกอนด้วย 66% 2-propanol ที่ 4°C เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนมาละลายใน 25 mM Tris-HCl pH 7.0 และทำไดอะไลซีสเพื่อขจัด 2-propanol ที่ติดค้างอยู่ ปรับพีเอชของสารละลายเอนไซม์เป็น 3.3 ด้วยกรดเกลือ แล้วแยกสารละลายใสออกมาปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วย 1 M NaOH แล้วทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสโดย gel filtration chromatography ใช้ Sephadex G-100 คอลัมน์ ผลการแยกแสดงในรูปที่ 3.24 ซึ่งจะแยกได้ 3 peaks ที่มีไลเปสแอคติวิตี ซึ่งเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลมาผ่านคอลัมน์เดียวกันก็สามารถประมาณค่ามวลโมเลกุลของไลเปสทั้ง 3 peaks ได้ผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 3.9 และนำไลเปสแอคติวิตี peak ที่แยกได้ไปหามวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE ได้ค่ามวลโมเลกุลใกล้เคียงกันสำหรับไลเปสแอคติวิตี peak ที่ 2 คือ ประมาณ 46,000-47,000 ดาลตัน ผลการแยกกึ่งบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไลเปสจาก T20 สรุปรวมไว้ในตารางที่ 3.10 ซึ่งพบว่าได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 50 เท่า และมีเปอร์เซนต์ผลผลิตประมาณ 50% อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีของไลเปสจาก T-20 คือ 60-65°C และ pH 7.2 ตามลำดับ เอนไซม์นี้มีความคงทนต่อความร้อนที่ 55°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

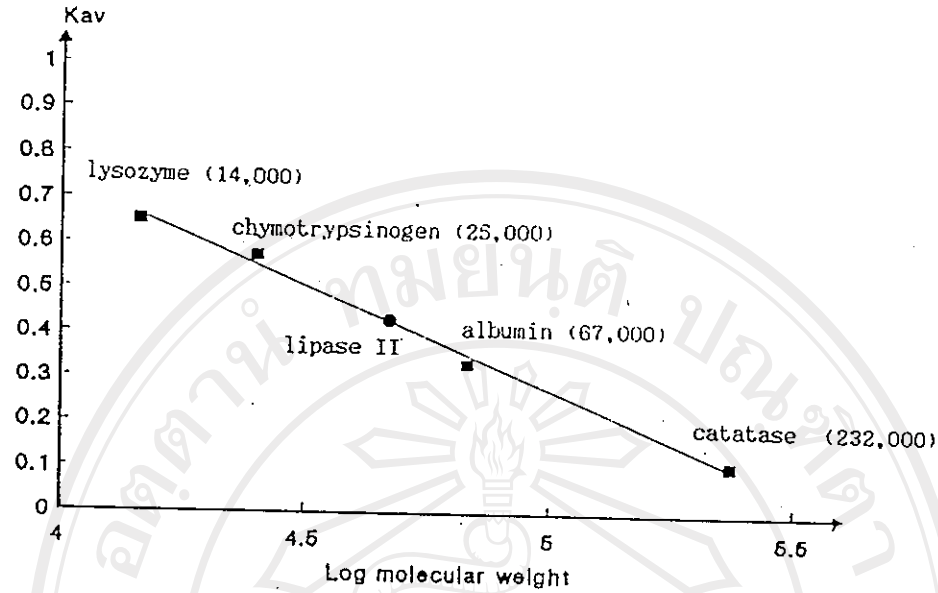


รูปที่ 3.24 การแยกเอนไซม์ไลเปสจาก T20 โดย Sephadex G-100 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 0.05 M phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.2

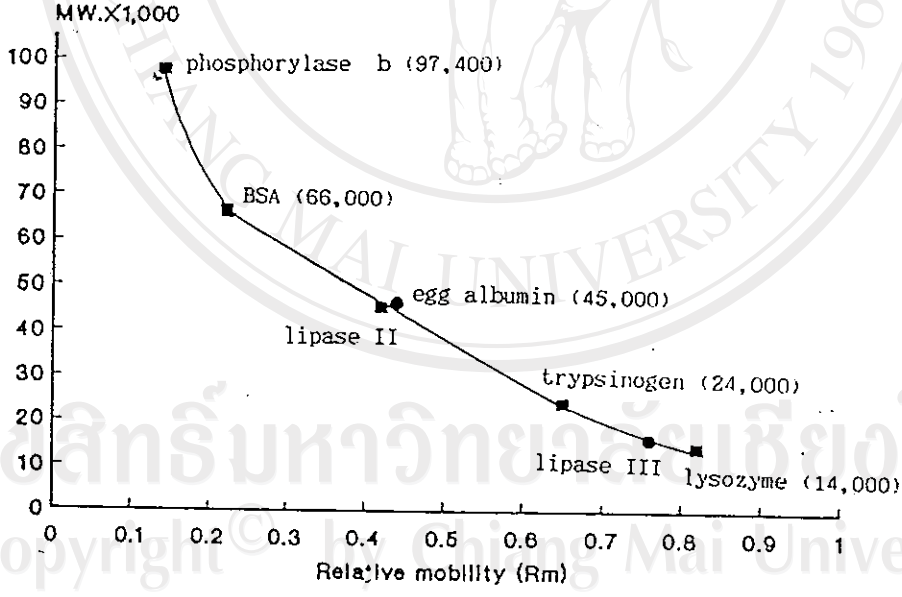
ตารางที่ 3.9 การประมาณค่ามวลโมเลกุลของไลเปสจาก T20 โดยเจลฟิลเตรชัน และ SDS-PAGE

Lipase activity peak	Molecular weight (Dalton)	
	By gel filtration	By SDS-PAGE
I	> 232,000	> 98,000
II	47,000	46,000
III	< 14,000	16,000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



(a)



(c)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3.25 การหามวลโมเลกุลของไลเปสที่แยกโดย (a) เจลฟิลเตรชันบน Sephadex G-100 และ (b) โดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 3.10 การแยกไลเปสจาก T20 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Speficic activity (u/mg)	Purification fold	% yield
Crude	55.7	18.4	0.3	1	100
Alcohol treatment and dialysis	4.6	10.3	2.2	6.7	55.9
Acid	2.5	8.0	3.2	9.6	43.5
Sephadex G-100					
activity peak I	1.4	24.3	17.5	53.0	132.0
activity peak II	0.2	10.2	56.5	171.2	55.3
activity peak III	0.4	7.2	16.0	48.5	39.0

ได้ทดลองทำไลเปสจาก TP614 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ anion exchange column chromatography คือใช้ DEAE-Sephadex A-50 พบว่าเอนไซม์ไลเปสจะถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้นของ NaCl ในตัวชะ 0.1-0.5 M เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้นไม่มากและแอคติวิตีหายไปประมาณ 50% ไม่เหมาะที่จะใช้จึงลองแยกโดยเจลฟิลเตรชันบน Sephadex G-75 ได้ peak ของเอนไซม์ไลเปส 2 peak ที่มีมวลโมเลกุลต่ำคือ ตัวที่ 1 มีมวลโมเลกุล 20,600 และตัวที่ 2 ขนาดเล็กกว่า cytochrome C ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน คือ MW < 12,400 ซึ่งในการแยกบริสุทธิ์โมเลกุลขนาดเล็กนั้นใช้ Sephadex G-75 อาจจะไม่เหมาะสมต้องใช้ Sephadex ที่มีค่า G ต่ำลง

ไลเปสจาก TP614 มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานเป็น 7 และ 60°C ตามลำดับ และมีความคงทนต่อความร้อนต่ำกว่าไลเปสจากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียตัวอื่นที่แยกมา ส่วนความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรทไขมันชนิดต่าง ๆ เหมือนกับตัวอื่น ๆ การศึกษาการเก็บไลเปสชนิดนี้ในสภาพที่มีไอออนของโลหะเช่น Mg^{2+}, Na^{+} และ Ca^{+2} ที่ 4°C ความเข้มข้นไอออนเป็น 3.75 mM ในเวลา 120 ชม. activity ลดลงน้อยกว่า 20% และที่ 25°C แอคติวิตีจะลดลง 50% เมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน

กน 574.19253
เลขทะเบียน.....เลขหมู่ ส 473 ก
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การผลิตไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน 5 ไอโซเลทในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ

ได้ทำการคัดเลือกเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท จาก 15 ไอโซเลทซึ่งผลิตไลเปสนอกเซลล์ได้ในปริมาณสูงและผลิตโปรติเอสในปริมาณต่ำกว่าไอโซเลทอื่น ๆ คือ T20, P1, TLS63, TLO13 และ TP434 มาเลี้ยงในอาหารเหลวและทดสอบการนำไปใช้สังเคราะห์เอสเทอร์ในภาวะที่มีน้ำน้อยพบว่าไลเปสจาก P1 สามารถเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดีรองลงมาคือไลเปสจาก T20 และ TLS33 (40) จึงเลือก 3 ไอโซเลทนี้มาผนวกกับไลเปสที่คัดเลือกใหม่ที่ผลิตไลเปสในปริมาณสูงจากน้ำพุร้อนเทพพนมอีก 3 ไอโซเลท คือ TP404, TP614 และ TP811 มาเพื่อทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างกันและดูการผลิตเอนไซม์ไลเปสและตรวจสอบความคงทนของเชื้อในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อศึกษาการเพิ่มผลผลิตไลเปสให้เพียงพอแก่การนำไปใช้และศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดเพื่อดูแนวโน้มในการไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม

การนำแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่เลือกไว้คือ P1, TP404, TP614, TP811 และ TLS33 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตรโดยสูตร A อาหารสูตร P คืออาหารสูตร A ที่มี 50% โดยปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อดูความทนทานของเชื้อในตัวทำละลายอินทรีย์ ผลการทดลองทราบว่าอาหารเหลวสูตร A ซึ่งใช้เลี้ยงแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์มาแต่เดิมจะเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตไลเปสมากกว่าอาหารสูตร B ซึ่งปรับใหม่โดยต่างกันเฉพาะปริมาณสารละลายเบสผสมซึ่งในสูตร B มีน้อยกว่าสูตร A 1 เท่า ส่วนการเจริญในอาหารสูตร C นั้น ถ้าตัวทำละลายอินทรีย์มีค่า log P สูงมาผสมจะมีแอคติวิตีได้สูงกว่าตัวทำละลายที่มีค่า log P ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามเอนไซม์แอคติวิตีที่ผลิตขึ้นในภาวะที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมในอาหารจะมีค่าสูงกว่าซึ่งเป็นความเสถียรของตัวเอนไซม์ไลเปสเองตามที่มีการศึกษาไว้แล้วส่วนการที่การผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลงในอาหารเหลวที่มีตัวทำละลายอินทรีย์นั้น เชื่อกันว่าอาจเป็นผลกระทบโดยตรงของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อแบคทีเรีย ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียเหล่านี้ในการทดลองต่อไปอาจจะต้องทำการทดลองหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใหม่ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นวัตถุดิบราคาถูก เพื่อให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ที่มีราคาถูกหลังจากทราบ minimum requirement ของเชื้อแล้ว อย่างไรก็ตามก่อนที่จะทำการทดลองนี้ สิ่งจำเป็นที่ต้องทำก่อนคือหาวิธีเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสให้มีปริมาณมากขึ้นและศึกษาสมบัติและแนวโน้มในการประยุกต์ในอุตสาหกรรมก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การศึกษาสมบัติของไลเปสในรูปแบบของ crude enzyme

ได้ทำการศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อ activity และ stability ของ crude enzyme จากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ 5 ไอโซเลท ที่คัดเลือกมาศึกษาพบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานจะอยู่ในช่วงกว้างคือ 6.0-8.0 และ 50-80°C ตามลำดับ และจะให้แอคติวิตีสูงสุดในช่วง pH 7.2 ที่ 65°ซ ไลเปสทุกตัวจะมีความคงทนต่อความร้อนในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้างด้วยคือ pH 4.0-10.0 และอุณหภูมิ 37-70°C ตามลำดับ ซึ่งสมบัติโดยทั่วไปนี้ชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทนี้จะคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ Bacillus sp. 398 กล่าวคือมีความทนทานต่อพีเอชในช่วงกว้างและอุณหภูมิสูงเหมือนกันแต่ไลเปสจาก Bacillus sp.938 จะมีเสถียรภาพดีในภาวะที่ค่อนข้างเป็นเบส (pH 8.0-11.0) ไลเปสจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทมีความทนทานต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้างกว่าไลเปสนอกเซลล์จากเชื้อ Fusarium oxysporum 41, Pseudomonas cepacia (42), Bacillus subtilis 168 (43) Pseudomonas fragi 22.393 (44) และ P. fragi IFO12049 (45)

การศึกษาความคงทนของไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทนี้ต่อตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าไลเปสเหล่านี้จะมีความคงทนในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P สูง เช่น cyclohexane (log P = 3.44) ได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ต่ำ เช่น isopropanol (log P = 0.05) การทดลองนี้ได้ผลตรงกันข้ามกับความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของไลเปสจาก mesophilic bacteria อย่างไรก็ตามความคงทนของเอนไซม์ใน pH ที่เป็นกรดและเบสที่อุณหภูมิสูงเหมือนกับผลที่มีผู้รายงานไว้สำหรับไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ Bacillus sp. strain 398 (46) ผลการทดลองแสดงให้เห็นแนวโน้มของการนำเอาไลเปสจากแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์

การศึกษาสมบัติการสลายสับสเตรทน้ำมันชนิดต่าง ๆ โดยไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทมีรูปแบบการไฮโดรไลส์ไขมันชนิดต่าง ๆ แบบเดียวกันภายใต้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแอคติวิตีของมัน โดยที่ crude enzyme สามารถไฮโดรไลส์ลิปิดสับสเตรทที่มีกรดโอเลอิค (C18:1) มากกว่ากรดไขมันชนิดอื่น ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 5 ไอโซเลทมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ของกรดโอเลอิคและมีแอคติวิตีต่อพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนที่สูงมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ผลการทดลองนี้มีแนวโน้มที่เหมือนกับไลเปสทนความร้อนจากแหล่งอื่นที่มีความจำเพาะกว่างต่อพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมัน (47-48)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาผลของไอออนของโลหะบางชนิดต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์จากเทอร์โมไฟล์ 5 ไอโซเลท พบว่าไอออนโลหะแต่ละชนิดอาจจะมีผลต่อแอคติวิตีและเสถียรภาพของไลเปสในลักษณะต่าง ๆ กัน เช่น Ag^{+}, Cu^{2+}, V^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} และ Mn^{2+} อาจจะจับกับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เปลี่ยนไปและแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (49-51) ในขณะที่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Pb^{2+} ไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อเสถียรภาพของเอนไซม์แต่น่าจะมีส่วนช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มหรือรวมตัวกันระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับโมเลกุลที่มีประจุลบ เช่น ไลโปพอลิแซคคาไรด์และกรดไขมัน ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบย้อนกลับของเอนไซม์ไลเปส (52-53) สำหรับ Mn^{2+} ซึ่งทำให้แอคติวิตี้ของไลเปสทั้ง 5 ชนิด ลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเป็นเพราะว่า นอกจากจะสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์แล้วยังสามารถรวมตัวกับตัวยับยั้งแบบย้อนกลับของเอนไซม์ไลเปสได้อีกด้วย จึงน่าจะมีการศึกษารายละเอียดในเรื่องนี้ต่อไป ส่วน Na^{+} และ K^{+} อาจจะมีส่วนช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเชื้อแบคทีเรีย จึงไม่มีผลกระทบใด ๆ ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ (54) ดังมีรายงานว่าการผลิตไลเปสโดยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudo monas pseudoalcaligenes* F-111 ซึ่งเป็นอัลคาไลน์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกควบคุมโดย Na^{+} และ K^{+} อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว (55)

การศึกษาตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 5 ไอโซเลท พบว่า chelating agent 2 ชนิด คือ EGTA และ EDTA ที่ความเข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ไลเปสเหล่านี้ไม่ต้องการไอออนของโลหะในแอคติวิตีของการเร่งปฏิกิริยาและไม่ใช่เมทัลโลโปรตีน ในขณะที่ PMSF ในความเข้มข้น 10 mM สามารถยับยั้งได้ทุกชนิดโดยเฉพาะไลเปส TP614 เนื่องจาก PMSF เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงต่อกรดอะมิโนเซรีน แสดงว่ากรดอะมิโนเซรีนอาจเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่นเดียวกับไลเปสจาก *Mucor meihei* (56) และ Geotrichum candidum (57) ส่วน 2-mercaptoethanol เข้มข้น 10 mM ทำให้แอคติวิตี้ของไลเปสทุกชนิดลดลงเพียงเล็กน้อยแสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์อาจจะไม่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะคล้ายคลึงกับไลเปสจาก Staphylococcus aureus (58) Chromobacterium viscosum (59) Serratia marcescens Sr41-8000 (60) และ Aeromonas sobria LP004 (61)

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงดึงผิวบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส 5 ชนิด จะเห็นว่ายูเรียที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 3 M ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากที่สุดประมาณ 2 เท่าของแอคติวิตีเริ่มต้นที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่ายูเรียช่วยลดการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลเอนไซม์ซึ่งเกิดจากแรงดึงดูดระหว่างหมู่ที่ไม่มีประจุของกรดอะมิโน โดยยูเรียจะถึงดูดหมู่ที่มีประจุด้วยแรงมากกว่าแล้วทำให้โมเลกุลเอนไซม์แยกออกกัน เมื่อความเข้มข้นของยูเรียมากกว่า 3 M จะทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติแอคติวิตี้จึงลดลง (62) สำหรับ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันสามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้นประมาณ 4% (v/v) ทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าของแอคติวิตีเริ่มต้น สันนิษฐานได้ว่า Triton X-100 ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนต์ชนิดไม่มีประจุสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโมเลกุลเอนไซม์ป้องกันโมเลกุลเอนไซม์คูดติดบนผิวภาชนะบรรจุและช่วยละลายสับสเตรททำให้โมเลกุลสับสเตรทและเอนไซม์ทำปฏิกิริยากันได้ดีขึ้น (63) ส่วน SDS ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนต์ชนิดประจุลบสามารถจับกับแคลเซียมไอออนในสารละลายเอนไซม์และจับกับประจุบวกในโมเลกุลเอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นลักษณะปกติของโปรตีนโดยทั่วไป

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าไลเปสจากเชื้อเทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลท มีเสถียรภาพดีขึ้นในภาวะที่มีไอออนโลหะบางชนิดโดยเฉพาะ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เอนไซม์ถูกกระตุ้นได้โดยยูเรีย และ Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นแน่นอนค่าหนึ่ง ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับการแยกบริสุทธิ์และการหาคุณลักษณะของเอนไซม์ต่อไป

4.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว แอคติวิตีและสมบัติบางประการของ crude enzyme จากเทอร์โมไฟล์ไอโซเลท P1, TP404 และ TP811 กับโคลนของเอนไซม์จากไอโซเลทดังกล่าว

การทดลองการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ที่คัดเลือกเบื้องต้น 3 ไอโซเลท โดยการแยกยีนของเทอร์โมไฟล์ใส่เข้าไปในพาหะ pUC19 และโคลนในแบคทีเรีย E. coli DH5 แล้วเลือกโคโลนีที่ผลิตไลเปสโดยดูวงใสจากจานอาหารวุ้นที่มี Tributyrin แล้วเลือกโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตไลเปสนอกเซลล์พบว่ารูปแบบของการผลิตเอนไซม์ของ native strain กับโคลนของมันจะเหมือนกันและสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรีย ระดับของการแสดงออกของยีนไลเปสใน recombinant sstrains จะเป็น 2 เท่าของไอโซเลทดั้งเดิม ซึ่งแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรีย E. coli นั้นโดยปกติจะไม่หลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ ดังนั้นขีดจำกัดของการแสดงออกของยีนไลเปสและการหลั่งออกนอกเซลล์ E. coli DH5α อาจเนื่องมาจากระบบโปรโมเตอร์ (promoter) ของแบคทีเรียเอง และเพื่อที่จะผลิตโปรตีนที่ยากที่จะให้มีการแสดงออกมาก ๆ ใน E. coli จึงได้มีการออกแบบให้มีการแสดงออกโดยรวมตัวกับส่วนของ lac Z (β-galactosidase) gene ใน pUC19 การมี in-frane fusion กับ α-เปปไทด์ของ lac z gene ในพลาสมิดทำให้มีการแสดงออกของยีนได้สูงจาก E. coli lac Z promoter ในการทดลองนี้โคลนที่ได้ทั้งหมดยังคงผลิตไลเปสในปริมาณต่ำซึ่งต้องการการปรับปรุงต่อไป กลไกการหลั่งไลเปสจากเซลล์เป็นวิถีที่ซับซ้อนและส่วนใหญ่ต้องการ chaperone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับไลเปสสำหรับขบวนการหลังการสังเคราะห์โปรตีน (64) ดังนั้นการแสดงออกของยีนไลเปสในเซลล์ E. coli นั้นส่วนใหญ่อาจจะยังคงอยู่ในเซลล์ซึ่งผลเช่นนี้ไม่เหมาะจะใช้ในอุตสาหกรรมเพราะการแยกไลเปสออกจากโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ของ E. coli นั้นเป็นขบวนการที่แพงและซับซ้อน อย่างไรก็ตามไลเปสทนความร้อนมีข้อดีบางประการเป็นต้นว่าสามารถที่จะให้ความร้อนสูงแก่สารละลายผสมเพื่อให้โปรตีนอื่น ๆ จาก E. coli ตกตะกอนออกไป การศึกษาขั้นต่อไปเกี่ยวกับเรื่องนี้ควรเน้นการศึกษาการแสดงของยีนไลเปสและการหลั่งไลเปสออกจากเซลล์ในเซลล์เจ้าบ้านชนิดอื่น เช่น Bacillus sp. หรือยีสต์และใช้พลาสมิดที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบสมบัติบางประการของไลเปสจาก native strains กับ cloned ของเอนไซม์เหล่านี้จะให้ผลเหมือนกันทุกประการ คือจะมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงกว้าง (พีเอช 6.0-8.0) และอุณหภูมิ 40-80°C และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 7.2 อุณหภูมิ 65°C เอนไซม์ไลเปสจากทั้งสามไอโซเลทและจากโคลนของมันจะมีความคงทนต่อความร้อนที่ 70°ซ ในช่วงพีเอชที่กว้าง (pH 5.0-9.0) ซึ่งสมบัตินี้เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกและการสังเคราะห์สารอินทรีย์ในการไฮโดรไลส์สับสเตรทลิปิดชนิดต่าง ๆ พบว่าสามารถทำได้ในความจำเพาะที่กว้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งสับสเตรทที่มีพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนสูง ๆ เช่น กรดโอเลอิค (C18 : 1) จากการใช้ตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ พบว่าไลเปสเหล่านี้ไม่ใช่เมทัลโลโปรตีนแต่ถูกยับยั้งได้โดย 10 mM PMAF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะสำหรับหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซอรีนในโมเลกุลของเอนไซม์แต่ 10 mM 2-mercaptoethanol ไม่มีผล ซึ่งสรุปได้ว่าหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซอรีนอาจเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่พันธะไดซัลไฟด์ไม่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา สารลดแรงตึงผิวบางชนิด เช่น Triton X-100 และยูเรียที่ความเข้มข้นแน่นอนค่าหนึ่งจะสามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ SDS จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ จากการที่ไลเปสจากโคลน pUC-P1, pUC-TP404 และ pUC-TP811 มีสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวเหมือนกับ native strains คือ P1, TP404 และ TP811 ตามลำดับ อาจจะสรุปได้ว่า การโคลนยีนไลเปสทั้งสามไอโซเลทประสบความสำเร็จ ซึ่งถ้าจะให้แน่นอนว่าเป็นยีนไลเปสครบสมบูรณ์หรือไม่คงต้องทำการหาลำดับเบสในยีนดังกล่าวต่อไป คณะผู้วิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดลได้หาลำดับเบสของยีนจาก TP404 และ TP811 เปรียบเทียบกับยีนไลเปสจากเทอร์โมไฟล์อื่น ๆ ที่มีผู้หาลำดับไว้แล้วพบว่ามีความเหมือนกับยีนของไลเปสจาก Bacillus sp. ถึง 98% และยีนของไลเปสจาก TP404 และ TP811 จะมีลำดับเหมือนกันซึ่ง Native strains ทั้งสองไอโซเลทอาจจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ส่วนการหาลำดับยีนของ P1 กำลังดำเนินต่อไปเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงการแสดงออกของยีนและการหลั่งโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านในลำดับต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์

ได้ทดลองศึกษาการแยกบริสุทธิ์ไลเปสจาก T20 โดยใช้วิธีเดียวกันกับการแยกบริสุทธิ์ไลเปสที่ทนกรดจากเชื้อรา Aspergillus niger โดยการตกตะกอนโปรตีนอื่นด้วยกรดแล้วตามด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี (65) พบว่าได้ไลเปสสามชนิดที่มีมากที่สุดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 171 เท่า และมีมวลโมเลกุลประมาณ 46.5 kd และการแยกบริสุทธิ์ไลเปสจาก TP614 โดยใช้เจลฟิลเตร-ชันโครมาโทกราฟีนั้นก็ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ไม่มากและเสียแอคติวิตีในระหว่างขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์มากทำให้ได้ yield ต่ำ ควรมีการปรับปรุงโดยหาวิธีแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพโดยมีขั้นตอนน้อย ซึ่งเมื่อได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้นแล้วการศึกษาขั้นต่อไปคือรายละเอียดเกี่ยวกับความจำเพาะของเอนไซม์ทั้งความจำเพาะต่อสับสเตรทและต่อตำแหน่ง ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างเพื่อดูโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงเอนไซม์ให้เหมาะกับการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคต

4.5 สรุปผลการวิจัย

4.5.1 จากการศึกษาเบื้องต้นได้พบว่าเชื้อเทอร์โมไฟล์ไอโซเลท P1, TLS63, TP404, TP614 และ TP811 ซึ่งคัดแยกจากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเทอร์โมไฟล์ไอโซเลทอื่นๆ ที่คัดแยกจากแหล่งเดียวกัน จึงได้หาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับแต่ละไอโซเลทและศึกษาสมบัติต่าง ๆ พบว่าไลเปสที่ได้มีช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาค่อนข้างกว้าง มีเสถียรภาพดีในช่วงพีเอชกว้างและที่อุณหภูมิสูง ทั้งเอนไซม์และเซลล์มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทจึงเหมาะแก่การใช้เป็นแบคทีเรียต้นแบบเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงขบวนการผลิตเอนไซม์ตลอดจนคุณลักษณะของเอนไซม์ต่อไป

4.5.2 การศึกษาสมบัติอื่น ๆ ของเอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ทั้ง 5 ไอโซเลทนี้พบว่าเอนไซม์เหล่านี้เร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ได้และถูกยับยั้งได้โดยไอออนของโลหะหลายชนิด เช่น Co^{2+}, Zn^{2+} และ Ag^{+} และมีเสถียรภาพดีขึ้นในภาวะที่มี Ca^{2+} และ Mg^{2+} เอนไซม์นี้ไม่ใช่เมทัลโลเอนไซม์ไม่ต้องการไอออนโลหะในโมเลกุลเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยา หมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนกลีเซอรีนอาจเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และพันธะไดซัลไฟด์อาจจะไม่มีความจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไลเปสจากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทสามารถไฮโดรไลส์ลิปิดสับสเตรทได้ในช่วงความจำเพาะที่กว้างและมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ของกรดโอเลอิคได้ดีกว่ากรดไขมันชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.3 ได้เลือกเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียจาก 5 ไอโซเลทมาเพียง 3 ไอโซเลท คือ P1, TP-404 และ TP-811 มาทำการโคลนยีนที่ผลิตไลเปสโดยใช้พลาสมิด pUC19 เป็นพาหะ และโคลนเข้า E. coli DH5 และศึกษาการผลิตไลเปสของยีนดังกล่าวในอาหารเหลวพบว่ามีไลเปสแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของ native strains ซึ่งเป็นการแสดงออกที่ต่ำต้องทำการปรับปรุงต่อไป

4.5.4 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติต่าง ๆ ของไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ 3 ไอโซเลท กับไลเปสจากโคลนของมันพบว่ามีสมบัติต่าง ๆ เหมือนไลเปสจาก native strains ทุกประการ ซึ่งอาจเป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่าการโคลนยีนดังกล่าวประสบความสำเร็จ แต่เพื่อเพิ่มผลผลิตไลเปส และปรับปรุงการแสดงออกของยีนอาจจะต้องทำการหาลำดับยีนจากโคลนของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทสำหรับเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อไป

4.5.5 ได้ทำการศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสจากเทอร์โมไฟล์ T20 และ TP614 พบว่าไลเปสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นไม่มากและเสียแอคติวิตีในขั้นตอนการแยกมาก ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ ต้องปรับปรุงต่อไปและหาวิธีแยกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพได้ผลผลิตสูงโดยมีขั้นตอนต่าง ๆ น้อยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Zuber, H. ed. (1976) in "Enzymes and Protease and Proteins from Thermophilic Microorganisms", Birkhanser, Based.
2. Macrae, A.R. 1983) Extracellular microbial lipases. In "Microbial Enzymes and Biotechnology" W.M. Forgarty (ed). Applied Science Publishers, New York. p. 225-250.
3. McNeil, G.P., S. Shimizu and T. Yamane. 1990. Solid phase enzyme glycerolysis of beef tallow redulting in a high yield of monoglyceride. *JAOCS* 67 : 779-783.
4. McNeil, G.P., S. Shimizu and T. Yamane. 1991. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. JAOCS 68 : 1-5.
5. Hoshino, T., T. Yamane and S. Shimizu. 1990, Agric. Biol. Chem. 54 : 1459-1467.
6. Sztajer, H. and E. Zbolnska. 1988, Acta Biotechnol. 2 : 169-175.
7. Hog, M.M., Yamane, T., Shimizu, S., Funda, T. and Ishida, S. (1985) J. Am. Oil Chem. Soc. 62 : 1016-1021.
8. Kirchner, G., Scoller, M.P. and Klibanov, A.M. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107 : 7072-7076.
9. Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serata, S. and Barauskas, R.A. (1985) J. Am. Oil Chem. Soc. 61 : 1067-1071.
10. Yokozeki, K., Yamanaka, S., Takinami, K., Hirose, Y., Tanaka, A. Sonomoto, K. and Fukui, S. (1982) Appl. Microbiol. Biotechnol. 14 : 1-5.
11. Dordick, J.S. (1989) Enzyme Microb. technol. 11 : 194.
12. Khmelnitsky, Y.L., Leevashov, A.V., Klyachko, N.Y. and Martinek, K. (1988) Enzyme Microb. Technol. 10 : 709.
13. Hill, A.C. (1898) J. Chem. Soc. 73 : 634-658.
14. Kaastle, J.H. and Loevenhart, A.S. (1900) Amer. Chem. J. 24 : 491-525.
15. Halling, P. (1987) Biotech. Adv. 5 : 47-84.
16. Halling, P. (1990) Fat Sci. Technol. 92 : 74-79.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

17. Zaks, A. and Brooks, D. (1990) World Patent WO 90/04033.
18. Kao Corp. (1987) Japanese Patent JP 1010994.
19. Brockerhoff, H. (1975) Methods in Enzymol. 35B : 315-325.
20. Sugiura, M. (1984) Bacterial lipases. In "Lipases" B. Borgstrom and H.L. Brockman (eds). Elsevier. New York. p. 505-523.
21. Kristjansson, J.K. (1989). TIBTECH 7 : 349-353.
22. Mencher, J. R. and J. A. Alford. (1967). J. gen. Microbial. 48 : 317-328.
23. Tyski, S., W. Hryniewicz and J. Jeljaszcwicz. 1983, Biochem. Biophys. Acta 749 : 312-317.
24. Stuer, W., K. E. Jaeger and U.K. Winkler. (1986), J. Bacteriol. 168 : 1070-1074.
25. Kordel, M., B. Hofmann, D. Schomburg and R. D. Schmid. (1991) J. Bacteriol. 173 : 4836-4841.
26. Shabtai, Y. and N. Daya-Mishne. (1992), Appl. Environ. Microbiol. 58 : 174-180.
27. Breuil, C., D. B. Shindler, J. S. Sijher and D. J. Kushner. (1978), lipase J. Bacteriol. 133 : 601-606.
28. Nahas, E. (1988), J. gen. Microbiol. 134 : 227-233.
29. Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane and S. Shimiza. (1988), Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 417-422.
30. Gilbert, E. J., J. W. Drozd and C. W. Jones. (1991) J. Gen. Microbiol. 137 : 2215-2221.
31. Hoshino., T., A. Mizutani, S. S. Shimiza, H. Hidaka and T. Yamane. (1991), J. Biochem. 110 : 457-461.
32. Wohlfarth, R. and U.K. Winkler. (1988), J. gen Microbiol. 134 : 433-440.
33. Kugimiya, W., Y. Otani, Y. Hashimoto and Y. Takagi. (1986), Biochem. Biophys. Res. Comm. 141 : 185-190.
34. Aoyama, S., N. Yoshida and S. Inouye (1988), FEBS Letters 242 : 36-40.
35. Smeltzer, M.S., S.R. Gill and I.J. landolo. (1992), J. Bacteriol. 174 : 4000-4006.
36. Ihare, F., Y. Kageyama, M. Hirata, T. Nihara and Y. Yamada (1991), J. Biol. Chem. 266 : 18135-18140.
37. Jorgensen, S. K. W. Skov and B. Diderichsen. (1991), J. Bacteriol. 173. : 559-567.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

38. Brady, I., A.M. Brozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim and U. Menge (1990), Nature 343 : 767.770.

39. Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254.

40. Limmongkon, A., Kanasawud, P. and Phutrakul, S. (1995) Biopolymer and Bioproducts : Structure, Function and Applications, 577-584.

41. Lee, S.Y. and Rhee, J.S. (1993) Enz. Microb. Technol., 15, 617-622.

42. Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. (1992). J. Biochem., 112, 598-603.

43. Lesuisse, E., Schanck, K. and Cobon, C. (1993). Eur. J. Biochem., 216, 155-160.

44. Nishio, T., Chikano, T. and Raminura, M. (1987) Agric. Biol. Chem., 51, 181-187.

45. Aroyama, S., Yoshida, N. and Inouye, S. (1988) FIBS Lett., 242, 36.

46. Kim, H.W., Sung, M.H. and Oh, T.K. (1994) Biosci. Biotech. Biochem., 58, 961-962.

47. Commenil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. and Dehorter, B. (1995), Lipids, 30, 351-356.

48. Jaeger, K.B., Steinbuchel. A. and Jendrossek, D. (1995) Appl. Environ, Microbiol., 61, 3113-3118.

49. Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdman, H., Menge, U. and Schmid, R.D. (1992) Biochim. Biophys. Acta., 1124 : 253-261.

50. Iwai, M., Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J. (1970) J. Gen. Appl. Microbiol., 16 ; 81-90.

51. Kgandopulo, G.B. and Ruben, E.L. (1974) Microbiologiga, 43 ; 814-819.

52. Stuer, W.E., Jaeger, K. and Winkler, U.K. (1986) J Bacteriol., 168 ; 1070-1074.

53. Lee, S.Y. and Rhee, J.S. (1993) Enzyme Microb. Technol., 15 ; 617-623.

54. Deretic, V., Konyecsni, W.M., Mohr, C.D., Martin, D.W. and Hibler, N.S. (1989) Biol. technol., 7 ; 123-128.

55. Lim, S.F. (1996) J. Ferment. Bioeng., 82(5) ; 448-451.

56. Huge-Jensen, B., Gulluzzo, D.D. and Jensen, R.G. (1989) Lipids, 27 ; 559-565.

57. Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S. and Cygler, M. (1991) Nature, 351 ; 761-764.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

58. Tyski, S., Hryniewicz, W. and Jeliaszewicz, J. (1983) Biochim. Biophys. Acta., 749 ; 312-317.

59. Sugihara, M. and Isobe, M. (1974) Biochim. Biophys. Acta., 341 ; 195-200.

60. Matsumae, H. and Shibatani, T. (1994) J. Ferment. Bioeng., 77 ; 152-158.

61. Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S. (1997) J. Biotech., 54 ; 113-120.

62. De Yong, L.R., Dill, K.A. and Fink, A.L. (1993) Biochemistry, 32 ; 3877-3886.

63. Trevor, M.D.S. and Oriel, P. (1992) Appl. Biochem. Biotech., 36 ; 183-198.

64. Duong, F. Soscia, C., Lagdunski, A. and Murgier, M. (1994) Molecular. Microbiol., 11, 117-126.

65. Torossian, K. and Bell, A.W. (1991) Biotechnol. and Appl. Biochem., 13, 205-210.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเสนอผลงานวิจัยนี้

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการและวารสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

การประชุมวิชาการ

1. Puatanachokchai, R., Kanasawud, P., Phutrakul, S. (1995) "A Comparative Extracellular Lipase Activity of the Cloned pUC P1 to Thermophile Isolate P1" in International Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development, Bangkok, August 7-10, p.207.
2. Boonsinthai, B., Preechanukul, N. and Phutrakul, S. (1997) "Production and Properties of Lipases from Five Isolates of Thermophilic Bacteria" in International Conference on Biodiversity and Bioresources : Conservation and Utilization (IUPAC conference) 23-27 November 1997, Phuket, Thailand, P.107.
3. Boonsinthai, B. and Phutrakul, S. (1997) A Comparative Extracellular Lipases Activity of Thermophiles Isolate P1, TP-404 and TP-811 to Their Clones, JSPS-NRCT-DUST-LIPI-VCC 2nd Seminar on The Large Scale Cooperative Research Program in the Field of Biotechnology, 19-21 November, Suranaree University of Technology, Nakornratchasima, Thailand.

การตีพิมพ์ในวารสาร

1. Boonsinthai, B. and Phutrakul, S. (1991-1993) Secretion of Lipases from Organic Solvent-Tolerant Bacteria and Stability of Enzymes in Organic Solvents, J. Sci. Fac. CMU. Thailand, vol. 18-20, 2-10.
2. Puatanacjokchai, R., Kanasawud, P., Phutrakul, S. (1996) "A Comparative Extracellular Lipase Activity of the Cloned pUC P1 to Thermophile Isolate P1", J. Sci. Fac. CMU, 23, 21-25.
3. Boonsinthai, B., Preechanukul, N. and Phutrakul, S. (1998) "Effect of Metal Ions, Inhibitors and Surfactants on Extracellular Lipase from Three Thermophile Isolates and Their Clones, J. Sci. Fac. CMU (submitted).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved