

572.8
กา๖๗๐

ปริฉ๑๓

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การเพิ่มผลผลิตสารชีวโมเลกุลที่มีมูลค่าเชิง
พาณิชย์และการสร้างมูลค่าเพิ่มจากทรัพยากร
จุลินทรีย์ทนร้อน

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. โกสุม จันทรศิริและ
คณะ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2548

สารบัญ

หน้า

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย	1
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	2
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3
บทที่ 1 บทนำ	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	33
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้วิจัย	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงการนำไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ต่างๆ	7
ตารางที่ 2 กลุ่มของเอนไซม์ไลเปส	11
ตารางที่ 3 จำแนกหมวดหมู่แบคทีเรีย lipolytic เอนไซม์เพิ่มเติม	14
ตารางที่ 4 ลำดับของกรดอะมิโนที่จับบริเวณ OXYANION HOLE และ ACTIVE SITE ของไลเปส ที่พบในแบคทีเรียชนิดต่างๆ	16
ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Bacillus</i> ของไลเปส	19
ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction	23
ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction	25
ตารางที่ 8 การเตรียม Separating gel	28
ตารางที่ 9 การเตรียม Stacking gel	28
ตารางที่ 10 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบกรด-เบส	30
ตารางที่ 11 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปส <i>Bacillus</i> sp. RN2 ที่ค่า pH ต่างๆ	35
ตารางที่ 12 แสดงความคงทนของเอนไซม์ไลเปส <i>Bacillus</i> sp. RN2 ที่ค่า pH ต่างๆ	36
ตารางที่ 13 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปส <i>Bacillus</i> sp. RN2 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน	37
ตารางที่ 14 แสดงความคงตัวในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. RN2 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน	38
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergents ของ <i>Bacillus</i> sp. RN2	40
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายเสลด	41
ตารางที่ 17 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการนำเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. RN2 มาทดสอบ API50	41
ตารางที่ 18 แสดง %homology ระหว่างยีน Lip-SBRN2 กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	47
ตารางที่ 19 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. RN2 และแบบ Recombinant lipase (Lip-SBRN2)	62
ตารางที่ 20 PURIFICATION OF A ENZYME Lip-SBRN2	63
ตารางที่ 21 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ใน pH ต่างๆกัน	64
ตารางที่ 22 แสดงความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ใน pH ต่างๆ	65
ตารางที่ 23 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในอุณหภูมิต่างๆ	67
ตารางที่ 24 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ที่อุณหภูมิต่างๆ	68

ตารางที่ 25 ผลของความคงตัวของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergents	70
ตารางที่ 26 คุณสมบัติของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ทางชีวเคมีเทียบกับเอ็นไซม์ไลเปส Subfamily I-5 และ subfamily I-4	74



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1	ไลเปส (glycerol-ester-hydrolase)	6
รูปที่ 2	แสดงรูป <i>Bacillus</i> sp. RN2	34
รูปที่ 4	แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์ไลเปสในสารละลายที่เป็นกรด-เบส	35
รูปที่ 5	แสดงการทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ไลเปสในสารละลายที่เป็นกรด-เบส	36
รูปที่ 6	แสดงการทดสอบความเหมาะสมของเอ็นไซม์ไลเปสในอุณหภูมิต่างๆ	39
รูปที่ 7	แสดงการทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ไลเปสในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ	39
รูปที่ 8	แสดงผลของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ Hypervariable region จาก 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. RN2 ได้ PCR product ประมาณ 320 bp	43
รูปที่ 9	แสดง Phylogenetic tree ของ <i>Bacillus</i> sp. RN2 บน HV region ของ 16S rDNA โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0	44
รูปที่ 10	แสดง PCR product ของยีน <i>Lip-SBRN2</i> ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง PCR และแยกดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้าพบว่ายีน <i>Lip-SBRN2</i> ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 bp	45
รูปที่ 11	แสดงการ alignment นิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์ <i>Lip-SBRN2</i> กับ บาซิลลัสชนิดอื่นๆ	46
รูปที่ 12	แสดง phylogenetic tree ของยีน <i>Lip-SBRN2</i> กับบาซิลลัสชนิดต่างๆ	47
รูปที่ 13	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน <i>Lip-SBRN2</i>	48
รูปที่ 14	แสดงการ alignment กรดอะมิโนของเอ็นไซม์ <i>Lip-SBRN2</i> กับ บาซิลลัสชนิดอื่นๆ	49
รูปที่ 15	แสดงแผนที่จำลองการตัดลำดับเบสของยีน <i>Lip-SBRN2</i> ที่ตัดด้วย restriction enzyme ต่างๆ	51
รูปที่ 16	แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติ hydrophilicity/hydrophobicity ของยีน <i>Lip-SBRN2</i>	52
รูปที่ 17	แสดงผลของ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 600 bp โดยทำการเพิ่มขยายมาจากโคลน 10 โคลน ของ <i>Lip-SBRN2</i>	53

รูปที่ 18 แสดงผลจาก acrylamide gel ของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ที่ได้จากการ แยกโดยกระแสไฟฟ้าใน 12.5% SDS-PAGE	54
รูปที่ 19 การเจริญของ Lip-SBRN2 ที่ผลิตไลเปสและแอกติวิตี้ของเอ็นไซม์ไลเปส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB	55
รูปที่ 20 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิด ของแหล่งคาร์บอน	56
รูปที่ 21 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ มอลโทส	56
รูปที่ 22 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันตาม ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง	57
รูปที่ 23 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิด ของแหล่งไนโตรเจน	57
รูปที่ 24 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ ของแหล่งไนโตรเจน	58
รูปที่ 25 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิด ของเกลือแร่	58
รูปที่ 26 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ ของแมกนีเซียมซัลเฟต	59
รูปที่ 27 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ ของเฟอร์ริกคลอไรด์	59
รูปที่ 28 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ ของสังกะสีคลอไรด์	60
รูปที่ 29 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณ ของแคลเซียมคาร์บอเนต	60
รูปที่ 30 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผัน pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	61
รูปที่ 31 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันความเร็ว รอบในการให้อากาศ	61
รูปที่ 32 แอกติวิตี้สัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันอุณหภูมิ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ	62

รูปที่ 33 การทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ใน	64
สารอาหารที่เป็นกรด-เบส	
รูปที่ 34 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการทน	66
สารละลายที่เป็นกรด-เบส	
รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2	66
ในอุณหภูมิต่างๆ	
รูปที่ 36 การทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ	69
รูปที่ 37 ผลการทดสอบความสามารถของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการย่อย	71
ไขมันโดยการใส่สับเสตที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน	
รูปที่ 38 การทดสอบความสามารถของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการย่อยไขมัน	72
โดยการใส่สับเสตที่เป็นไตรเอซิลกลีเซอไรด์	



รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

- ชื่อโครงการวิจัย** การเพิ่มผลผลิตสารชีวโมเลกุลที่มีมูลค่าเชิงพาณิชย์และการ
สร้างมูลค่าเพิ่มจากทรัพยากรจุลินทรีย์ท้องถิ่น
- ผู้วิจัย** รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทศิริ และคณะ
- ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจาก** งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประจำปี
2548 จำนวนเงิน 1,100,000 บาท
- ระยะเวลาการทำวิจัย** 12 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกันยายน
พ.ศ. 2548



บทคัดย่อ

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน จากการศึกษาแยกยีนที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากบาซิลลัสทนร้อนสายพันธุ์ RN2 ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนที่จังหวัดระนอง พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 576 bp ซึ่งถอดรหัสเป็น signal sequence และไลเปสจำนวน 17 และ 174 กรดอะมิโนตามลำดับ หลังจากนั้นทำการศึกษากการแสดงออกของยีนโดยการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และโคลนยีนไลเปสดังกล่าวเข้าไปใน expression vector ชนิด pET 100 หลังจากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้มาเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนไลเปสด้วยสาร IPTG ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อกระตุ้นให้โฮสต์เซลล์สร้างโปรตีนออกมาในปริมาณที่สูงซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างสูงกว่า 20 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม และพบว่ามีแอกติวิตีทั้งหมด 1,100 ยูนิต จากการเลี้ยงทั้งหมด 50 มิลลิลิตร และพบการกระจายของเอนไซม์ภายในเซลล์ต่อเอนไซม์ภายนอกเซลล์เป็นอัตราส่วน 1 : 3 เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ Ni-NTA และทำการแยกวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไลเปสที่ได้มีความเหมาะสมต่อการทำงานที่ค่า pH ช่วง 10-11 แต่การทำงานจะลดลงเมื่อปรับเอนไซม์ที่ค่า pH 9-12 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และมีความเหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60°C การคงตัวของเอนไซม์หลังจากการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าค่าแอกติวิตีเหลือมากกว่า 50% ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไลเปสเมื่อทำการทดสอบด้วย *p*-nitrophenyl esters และ triacylglycerides พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการย่อยสับสเตรทที่มีความยาวของสายคาร์บอนอยู่ในช่วง C6-C12 ซึ่งให้ค่าการย่อยสลายดีที่สุดที่ค่ามีความยาวของสายคาร์บอนเท่ากับ C12 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์กับรีเอเจนต์ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องพบว่าเอนไซม์ไลเปสไม่ขึ้นต่อไอออนของโลหะหนัก, สารยับยั้งต่างๆ และดีเทอร์เจนต์ และแอกติวิตีของเอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นได้เล็กน้อยเมื่อทดสอบกับไอออนของ Ca^{2+} และ Zn^{2+} และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ Lip-SBRN2 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย มอลโทส 15 g/l น้ำมันถั่วเหลือง 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต 10 g/l MgSO_4 0.01g/l ZnCl_2 0.15 g/l FeSO_4 0.05 g/l และ CaCO_3 0.05 g/l. pHของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน production medium ที่มีสูตรอาหารดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 50 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า Lip-SBRN2 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ประมาณ 7.7 เท่า

Abstracts

Lipases are enzymes, which catalyse by hydrolysis of triacylglycerols to give free fatty acids and glycerol. The gene encoding for lipase was isolated from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2 from Ranong hot spring in Thailand. The gene contained an open reading frame of 576 bp coding for the 17 amino acid signal sequence and a mature of 174 amino acids. The lipase gene was amplified by PCR, cloned into pET 100 expression system and transformed into *E. coli* (DM3). Expression of recombinant lipase was induced by IPTG at 37°C which was increased more 20-fold higher than that of *Bacillus* sp. RN2 wild-type strain. The total activity reached up to 1,100 units from 50 ml culture which exhibited a 3 : 1 ratio for the extracellular : intracellular enzyme. The recombinant *Bacillus* sp. RN2 lipase was purified using Ni-NTA affinity chromatography. The recombinant lipase was purified 74 fold with a yield of 51% and specific activity of 118 Umg⁻¹. The purified lipase was analyzed using 12.5% SDS-PAGE indicating the molecular mass of 19 KDa. The purified lipase had optimum pH at 10.5 but its activity was significantly decreased after 4 hrs incubation in various buffers over a pH ranging from 9.0-12.0. The enzyme also exhibited the maximum activity at 60°C and showed thermostability up to 50°C with residual activity of approximately 50%. The substrate specificity test for lipase using *p*-nitrophenyl esters as substrate indicated that the recombinant could hydrolyze fatty acyl group having chain length of C8-C12 and the maximum activity was obtained when *p*-nitrophenyl laurate was used as substrate (C12). In addition, the recombinant lipase hydrolyzed triacylglycerides with short-medium chain lengths of C6-C12. The maximum activity was generated toward trilaurin (C12). The effect of metal ions, detergent and inhibitor revealed that the ions show no significant effect on the activity of recombinant lipase from *Bacillus* sp. RN2. However, enzyme was slightly activated in the presence of 1 mM Ca²⁺ and Zn²⁺. The lipase activity did not significant inhibited by EDTA, DTT, SDS and β-mercaptoethanol. The optimal conditions on recombinant lipase production by Lip-SBRN2 were investigated. The composition of the growth medium to achieve maximum lipase production was determined to be as follows: maltose 15gL⁻¹; soy bean oil 1.5%; NH₄SO₄ 10 g/l; MgSO₄ 0.01g/l; ZnCl₂ 0.15 g/l.; FeSO₄ 0.05 g/l and CaCO₃ 0.05 g/l. at pH 7.0. The recombinant lipase had highest activity when Lip-SBRN2 was cultured in flask shaking at 250 rpm. for 30 hours at 50°C. The optimum lipase activity is about 7.7 folds up to its activity in LB medium at 37°C with the same aeration.

บทที่ 1

บทนำ

ข้อมูลจากกระทรวงพาณิชย์รายงานว่าประเทศไทยใช้งบประมาณในการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี ในจำนวนสินค้านำเข้าที่สำคัญ 20 รายการแรกระหว่างปี 2542-2546 พบว่า มูลค่านำเข้าเคมีภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์เวชกรรมและเภสัชกรรม มีมูลค่าโดยรวมประมาณ 220,000 ล้านบาท ซึ่งเป็นงบประมาณจำนวนมาก ดังนั้นการคิดค้นหรือผลิตสารเคมีภัณฑ์ที่มีศักยภาพใกล้เคียงหรือดีกว่าที่มีจำหน่ายจากต่างประเทศโดยใช้ทรัพยากรในประเทศจะเป็นหนทางที่นำไปสู่การลดการนำเข้าได้ระดับหนึ่ง จากข้อได้เปรียบที่ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) และเนื่องจากตั้งอยู่ในแถบเขตร้อนชื้นจึงเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่ร้อนที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารชีวโมเลกุลและสารประกอบชีวภาพ (biomolecules and bioactive compounds) เช่น biocatalysts, biosurfactants, และ antimicrobial agents เป็นต้น (1, 2)

Biocatalysts สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะ เอนไซม์ไลเปส สามารถถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้ง การผลิตสารซักฟอก (detergent) ซักล้างและการทำความสะอาดโดยไม่มีสารที่ตกค้าง ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ และไม่เป็นพิษต่อการบริโภค โดยคน หรือสัตว์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลที่สลายตัวได้โดยธรรมชาติ นอกจากนี้ยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและน้ำมัน อุตสาหกรรมหนังสัตว์ และการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน รวมถึงการนำไปใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (Biosurfactants) เป็นต้น

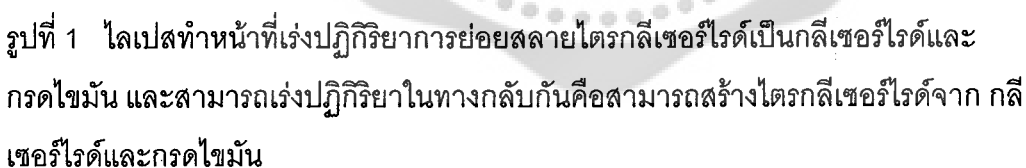
เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาต่างๆ เช่น Hydrolysis ของ Lipids ไปเป็น Triacylglycerol และ Fatty acids ปฏิกิริยา Esterification และ เป็น Biosurfactants เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวางเช่น อุตสาหกรรมซักฟอก เครื่องสำอาง การบำบัดสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ในอุตสาหกรรมที่กล่าวมาส่วนใหญ่ มักจะนำเข้าสารเคมีหรือสารชีวภาพ (Bioactive substance) จากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์ไลเปส ไปพัฒนาและปรับปรุงใช้ในการรักษาโรคพันธุกรรม เช่น โรค Cystic fibrosis เอนไซม์ไลเปส ที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C และสูญเสียสภาพได้ง่ายเมื่อถูกความร้อนและสัมผัสกับสารละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นสภาวะที่หลีกเลี่ยงได้ยากในการรักษาสภาพของไลเปสให้คงทน การควบคุมอุณหภูมิและสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมเพื่อรักษาสภาพและคุณสมบัติของไลเปสจึงต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในส่วนนี้ ดังนั้นการแสวงหาจุลินทรีย์ที่ร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ ไลเปสได้จึงเป็นแนวทางในการลดปัญหาดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยจุลินทรีย์ที่ร้อน ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่

อุณหภูมิประมาณ 37-60°C ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะดังกล่าวมาศึกษาและพัฒนาในการผลิตเอ็นไซม์ไลเปส ที่ทนความร้อนจึงเป็นแนวทางที่สนับสนุนการใช้ทรัพยากรของชาติให้เป็นประโยชน์และเป็นการพึ่งพาตนเอง นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการนำเข้าสารเคมีและสารชีวภาพจากต่างประเทศ ได้มีคณะวิจัยศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อนได้ ระหว่าง 40-60°C รวมทั้ง *Bacillus* sp. ชนิดต่างๆ ด้วย

คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน น้ำ ทRAY และ ตะไคร่ จากแหล่งน้ำพุร้อนและพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ทำการจำแนกสายพันธุ์ทางอนุกรมวิธานและแยกสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ไลเปส ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดจำนวนหนึ่ง และศึกษาระดับยีนและการควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ไลเปส พร้อมทั้งทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเอ็นไซม์ให้มีศักยภาพในการนำไปผลิตใช้เพื่ออุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต โดยจะเป็นการช่วยลดการนำเข้าจากการที่จะต้องใช้งบประมาณนำเข้าสารจากต่างประเทศเพื่อการอุตสาหกรรม โดยเน้นการพึ่งพาตนเอง สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาต่อยอดขยายผลเพื่อการผลิตเชิงพาณิชย์ โดยใช้ต้นทุนต่ำเนื่องจากเน้นการใช้ทรัพยากรท้องถิ่นเป็นหลัก เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรท้องถิ่น รวมถึงเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศได้

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไลเปส (glycerol-ester-hydrolase, EC 3.1.1.3) ทำหน้าที่ทั้งเร่งปฏิกิริยาการสลายและการสร้างเอสเทอร์จากกลีเซอรอลและ กรดไขมันสายยาว (รูปที่ 1) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น จึงทำให้ไลเปสเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่มีความสำคัญทางอินทรีย์เคมี เช่น ความคงตัวของเอ็นไซม์ในสารละลายอินทรีย์ ไม่ต้องใช้สารโคแฟกเตอร์ สามารถเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่หลากหลาย และมีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงมีการผลิตไลเปสเชิงการค้าเป็นจำนวนมากจากราและแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ (5, 7-12)



3. Thermophiles เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่มากกว่า 45°C (13)

2.2 จุลินทรีย์บาซิลลัส

บาซิลลัสเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลายเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียมีลักษณะเป็นรูปแท่ง ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างได้ รวมถึงสามารถทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้เช่นกัน(14) ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไป เช่น ดิน น้ำจืด น้ำเค็ม เป็นต้น บาซิลลัสสามารถเกิดเอ็นโดสปอร์ได้ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อสภาวะในธรรมชาติ (15)

2.3 ประโยชน์ของเอ็นไซม์ไลเปส (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงการนำไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ต่างๆ

แหล่ง	การแพทย์	ยาฆ่าแมลง	การบำบัดของเสีย
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	Heating oil/furnace oil
<i>Arthrobacter</i> spp.	-	Pyrethroids	-
<i>Aspergillus</i> spp.	Prostaglandins	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	Waste hair
<i>Bacillus subtilis</i>	Cephalosporin	-	-
<i>Candida</i> spp.	Pyrolidinedione derivatives	-	-
<i>Candida cylindracea</i>	Racemic naproxen	-	-
<i>Chromobacterium viscosum</i>	VitaminD, Verlukast	-	-
<i>Rhizopus miehei</i>	Ketoprofen	Geraniol	-
<i>Penicillium urticae</i>	Patuloide A	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	Pyrolidinedione derivatives, (-) - Indolmycin	Triazole/morpholine	Petroleum-contaminated soil, poisonous gas
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Rapamycin-42, Nikkomycin-B	Pyrenophorin, fenpropimorph, racemic	-

		morpholine, cyanohydrin acetate, pyrethroids, dicyclopentadiene	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hydantoins, Lamivudine(3TC), racemic 2-tetradecyloxirane-carboxylate	Tetraconazole	-
<i>Rhizopus delemere</i>	Arylglycerol derivatives	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	Palm oil mill waste
<i>Streptomyces</i> spp.	Penicillins	-	-

2.3.1 เป็นสารผสมในการผลิตภัณฑ์ซักล้าง

ไลเปสถูกนำมาใช้ในการเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ซักล้างเป็นจำนวนมาก ในปี 1995 ได้มีการสำรวจมูลค่าของเอนไซม์โดยประมาณเท่ากับ 30 ล้านดอลลาร์สหรัฐ เอนไซม์ไลเปสประมาณ 1000 ตัน สามารถนำไปผสมในผลิตภัณฑ์ซักล้างได้ประมาณ 13 พันล้าน ในปี ค.ศ. 1994 บริษัท Novo Nordisk ได้ผลิตไลเปสตัวแรกออกจำหน่าย คือ Lipolase™ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากรา *Thermomyces lanuginosus* และถูกนำมาแสดงออกใน *Aspergillus oryzae* ในปี 1995 ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ Lumafast™ จาก *Pseudomonas mendocina* และ Lipo max™ จาก *P. alcaligenes* ซึ่งเป็นของบริษัท Genencor International คุณสมบัติที่ต้องการของไลเปสที่จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซักล้างคือ 1) ครอบย่อยไขมันได้หลากหลายประเภท 2) สามารถทำงานได้ในสภาวะซักล้างซึ่งส่วนมากมีค่าความเป็นด่างสูงและอุณหภูมิร้อน (pH 10–11 and 30–60°C) 3) ทนต่อสารเคมีอื่นๆ ที่มีอยู่ในสารซักล้าง เช่น สารลดแรงตึงผิว (16).

2.3.2 เป็นส่วนผสมในอาหาร

ตำแหน่ง ความยาว และความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของไตรกลีเซอไรด์มีผลอย่างมากต่อคุณสมบัติของลิพิด รวมถึงรสและ กลิ่น เช่น เนยโกโก้ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด palmitic และ stearic และมีจุดหลอมเหลวประมาณที่ 37°C ทำให้สามารถละลายในปากได้ดี ในปี 1976 บริษัท Unilever ได้จดลิขสิทธิ์กระบวนการผลิตเนยโกโก้ โดยใช้วิธี ตรึง

เอ็นไซม์ ไลเปส (17) ซึ่งต่อมาได้นำมาผลิตเป็นการค้าโดยบริษัท Quest-Loders Croklaan ซึ่งเป็นการใช้ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ซึ่งทำหน้าที่ transesterification โดยการเปลี่ยน palmitic acid ด้วย stearic acid ทำให้ได้ stearic-oleic-stearic triglyceride นอกจากนี้ ไลเปสยังทำหน้าที่สำคัญในการผลิตสาร Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมที่เรียกว่า 'nutraceutical agents' (18) ส่วนมากประกอบด้วย essential fatty acids ที่มีความสำคัญในการเป็นส่วนประกอบของ membrane-lipid และ การสร้าง prostaglandin ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นส่วนช่วยเพิ่มปริมาณของ PUFAs จากสัตว์ และไขมันจากพืช เช่น menhaden, tuna และ borage oil เป็นต้น นอกจากนี้ Free PUFAs ไมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ นำไปใช้เป็นส่วนผสมในยาต่างๆ เช่น anticholesterolemics, anti-inflammatories, and thrombolytics เป็นต้น (19)

2.3.3 อุตสาหกรรมกระดาษ

ไลเปสถูกนำมาใช้ในการกำจัดส่วนไขมันของไม้ที่จะนำมาทำเป็นกระดาษ เช่น แวกซ์ (20) Nippon Paper Industries ในประเทศ ญี่ปุ่น ได้พัฒนากรรมวิธีในการนำ ไลเปส จากรา *C. rugosa* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสลายไขมันได้มากถึง 90%

2.3.4 การนำมาใช้ทางการแพทย์

เนื่องจากคุณสมบัติของไลเปสดีมากด้าน specific regioselective reactions ในสารละลายอินทรีย์ที่หลากหลายและการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้สารตั้งต้นที่หลากหลาย ดังนั้นไลเปสจึงถูกนำมาใช้เป็น biocatalyst ในทางการแพทย์ ได้มีการศึกษาวิจัยการทำงานของไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบที่มีความสำคัญทางเภสัชกรรม การผลิตยาต่างๆ เช่น nikkomycin-B ซึ่งเป็นกลุ่มของยาที่ไม่มีส่วนผสมของสเตอริรอยด์ ได้แก่ naproxen, ibuprofen, suprofen และ ketoprofen นอกจากนี้ไลเปสยังนำมาใช้ผลิตยาในกลุ่ม anti-viral agent เช่น lamivudine (ยาด้าน HIV) และการผลิต anti-tumour agents, alkaloids, antibiotics and vitamins (21)

2.3.5 ไบโอเซนเซอร์

Sensing lipids และ lipid-binding proteins เป็นเทคโนโลยีที่อยู่ระหว่างการพัฒนา (22) การหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในอุตสาหกรรมไขมันและน้ำมัน เทคโนโลยีการอาหาร และการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ (23) การใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการวิเคราะห์มีราคาแพงและใช้เวลาในการตรวจสอบนาน การพัฒนาวิธีใหม่ๆ เช่น ไลเปสไบโอเซนเซอร์ (24)

2.3.6 เครื่องสำอางและน้ำหอม

เนื่องจากไลเปสมีคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางและน้ำหอม ส่วนของ Monoacylglycerols and diacylglycerols ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาesterification ของ กลีเซอรอล โดยการทำงานของไลเปส Mixed-acid-type polyester และ acylglycerol ester fatty acids เป็นส่วนประกอบหลักของ lipase-mediated cosmetics(25)

2.3.7 ไลเปสในฐานะ Synthetase

ไลเปส สามารถทำหน้าที่เป็น synthetase ในการเร่งปฏิกิริยา 2 ประเภทคือ 1) ปฏิกิริยาของ prochiral substrates (6-8, 28-30) และ 2) kinetic resolution ของ racemates (7-9, 26-29) โดยปกติ prochiral หรือ chiral alcohols และ carboxylic-acid esters เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของไลเปส แต่ในปัจจุบันพบว่าไลเปสยังสามารถใช้สาร diols, α - and β -hydroxy acids, cyanohydrins, chlorohydrins, diesters, lactones, amines, diamines, amino-alcohols, และ α - and β -amino-acid derivatives ได้ (6-8, 28-31) ไลเปสที่ทำหน้าที่เป็น synthetase ได้แก่ ไลเปสจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* และ *Pseudomonas* อื่นๆ, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium viscosum*, *B. subtilis*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., and *Serratia marcescens*, รวมถึงรา เช่น *Candida antarctica* B และ *C. rugosa* เป็นต้น

ในปี 1994 มีบทความที่ศึกษาแบคทีเรียใหม่ๆมากมายเกี่ยวกับ lipolytic เอ็นไซม์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (45)เช่น การหา activity ของเอ็นไซม์เกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} อีออน , pH และอุณหภูมิ จากแบคทีเรีย *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* โดย *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (11, 12, 31, 32)

ในปี 1999 Jager และคณะ (33) ได้เปรียบเทียบและแยกประเภทของ 53 ลำดับเบสที่อนุรักษ์ของแบคทีเรียไลเปส และเอสเทอร์เรส พร้อมทั้งดูคุณสมบัติต่างๆของเอ็นไซม์ และโครงสร้าง 3 มิติ ของแบคทีเรียบางตัวในกลุ่มนี้ ซึ่งจากการทดลองนี้ได้จัดกลุ่มของเอ็นไซม์ไลเปส และเอสเทอร์เรส ดังตารางที่ 2 และยังหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Megalign (DNA STAR) โดยเปรียบเทียบกับสมาชิกในแต่ละแฟมิลีนั้น

ตารางที่ 2 กลุ่มของเอนไซม์ไลเปส

Family	Subfamily	เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส	Acession no.	Similarity (%)		คุณสมบัติ
				Family	Subfamily	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	D50587	100		True lipase
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumea*</i>	X70354	35	100	
		<i>Chromobacterium viscosum*</i>	Q05489	35	100	
		<i>Burkholderia cepacia*</i>	M58494	33	78	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	D11455	14	100	
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51	
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	100	
		<i>Bacillus purqilus</i>	A34992	13	80	
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100	
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29	Phospholipase
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	28	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	26	
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	U80063	14	50	
II (GDSL)		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		Secreted acyltransferase
		<i>Streptomyces scabies*</i>	M57297	36		Secreted esterase
		<i>Pseudomas aeruginosa</i>	AF005091	35		OM-bound esterase
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		OM-bound esterase
		<i>Photorhabdus luminescens</i>	X66379	28		Secreted esterase

III		<i>Streptomyces exfoliatus*</i>	M86351	100		Extracellular lipase
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		Extracellular lipase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		Extracellular esterase1
IV (HSL)		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Esterase
		<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		Lipase
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		Carboxylesterase
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Putative lipase
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		Carboxylesterase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		Extracellular esterase 2
V		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA- depolymerase
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Putative esterase
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Extracellular esterase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		Extracellular esterase 3
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Putative esterase
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Extracellular esterase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		Extracellular esterase 3
VI		<i>Synechocytis</i> sp.	D90904	100		Esterase
		<i>Spirulina paltensis</i>	S70419	50		Carboxylesterase
		<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	S79600	24		
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20		
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16		
VII		<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Carbamate hydrolase
		<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		<i>p</i> -Nitrobenzyl esterase
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Putative

						carboxylesterase
VIII		<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100		Stereoselective esterase
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		Cell-bound esterase
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	10		Esterase III

* รู้โครงสร้าง 3 มิติ

ในปี 2002 Jager และคณะ (34) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียไลเปสจำนวน 47 เชื้อ และได้จัดเข้าไปเพิ่มใน 7 แฟมิลี (family I- VII) ดังตารางที่ 3 โดยแฟมิลีที่ I มี 7 subfamily (subfamily I-1 – I-7 , ตารางที่ 3) มีเชือบาซิลลัสเข้าไปเพิ่มใน subfamily ที่ 1.4 และ subfamily ที่ 1.5 โดยดูจากความเหมือนกันของลำดับเบส ขนาดโปรตีน และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง

ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติหรือในสภาวะแวดล้อมที่กดดัน เช่น อุณหภูมิสูง หรือมีสารละลายปนเปื้อนอยู่แบคทีเรียก็สามารถผลิตไลเปสในปริมาณที่สูงและคงที่ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีศักยภาพในการสังเคราะห์เอ็นไซม์กว้าง และต้นทุนในการผลิตต่ำทำให้แบคทีเรียไลเปสเป็นทางเลือกเกี่ยวกับ Oleochemistry และ synthesis (35-37) ในปัจจุบันใช้ไลเปสใน Oleochemistry, ในผงซักฟอกในอุตสาหกรรมอาหาร, กระดาษ และ synthesis ใน 2-3 ปี ที่ผ่านมามีการศึกษาระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสโดยนำยีนที่ผลิตไลเปสมาโคลนและให้แสดงลักษณะในการผลิตไลเปสออกมา เช่น *C. rugosa*, *C. antarctica*, *Tidestromia lanuginosa*, *R. miehei*, *P. delemar*, *Geotrichum candidum*, *Burkholderia cepacia*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, *B. subtilis*, *B. thermocatenuatus* และ *B. glumae*.

(12)

ตารางที่ 3 จำแนกหมวดหมู่ แบคทีเรีย lipolytic เอ็นไซม์เพิ่มเติมของ family I (35)

Subfamily	เชื้อแบคทีเรียที่สร้างไลเปส	Accession no.	Similarity (%)	
			Family	Subfamily
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AF031226	95	
	<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
	<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
2	<i>Burkholderia glumea</i> *	X70354	35	100
	<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100
	<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78
	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	D11455	14	100
	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51
4	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)*	M74010	16	100
	<i>Bacillus subtilis</i> (LipB)	C69652	17	74
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785	15	100
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> P1	X95309	15	94

	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94
	<i>Geobacillus thermoleorans</i>	X02844	14	92
6	<i>Staphylococcus hyicus</i>	M12715	14	100
	<i>Staphylococcus aureus</i>	AF090142	15	45
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X02844	13	44
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	15	36
	<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	14	36
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100
	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50

* รู้โครงสร้าง 3 มิติ

2.4 โครงสร้าง 3 มิติของไลเปส

ในปี 1990 มีการหาโครงสร้าง 3 มิติของเชื้อราที่ผลิตไลเปส (*Rhizomucor miehei*) และจากไลเปสที่ผลิตได้จากตับอ่อนของคน(38, 39) ตั้งแต่นั้นมา มีการพบโครงสร้างของไลเปสมากกว่า 11 โครงสร้างจากแบคทีเรีย (40) เอ็นไซม์เหล่านี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 19-60 kDa มีลักษณะรูปแบบการพับแบบ α/β -hydrolase (41) แกนกลางของไลเปสจะประกอบไปด้วย β sheet ที่แตกต่างกัน 8 ชนิดด้วยกัน ($\beta 1-\beta 8$) และเชื่อมต่อกันด้วย 6 ชนิดของ α helices (A-F) โดยบริเวณ active site จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดด้วยกันคือ serine, aspartic หรือ glutamic และ histidine บริเวณ nucleophilic ของ serine มีตำแหน่งปลาย C ของ $\beta 5$ จะไม่มีการแปรผันต่อ pentapeptide GX SXG (ดังตารางที่ 4) รูปแบบของ β แล้วหมุนกลับเป็น α มีชื่อเรียกว่า Nucleophilic elbow สารตั้งต้นจะเริ่มจับกับส่วนของ nucleophilic โดยออกซิเจนของ serine ที่มีประจุลบจะไปจับกับคาร์บอนของหมู่ carbonyl โดยพันธะเอสเทอร์ และไฮโดรเจนจะไปจับกับไนโตรเจนอะตอมที่เหลือของโซ่หลัก เรียกว่า Oxyanion hole (ตารางที่ 4) และแอลกอฮอล์จะถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา โดยในตอนท้ายก็จะกลายเป็นกรดไขมันและได้

เอ็นไซม์กลับมาใหม่ ปฏิกริยา hydrolyses จะเกิดขึ้นกับส่วนที่พบนํ้าซึ่งปฏิกริยานี้ไม่สามารถอธิบายโดยสมการ Michaelis-Menten ได้ โดยปฏิกริยา catalytic จะเกิดขึ้นในระยะ homogenous โดยปกติแล้วสารตั้งต้น lipolytic จะอยู่ในรูปแบบ monomeric, micellar และเป็นส่วนผสมของของเหลว ซึ่งเป็นผลทำให้มีการศึกษาถึงเทคนิค monolayer กันอย่างกว้างขวาง (42) โดยการหยดน้ำมันลงไปบนน้ำแล้วทำการวิเคราะห์ลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและน้ำ โดยไลเปสจะให้น้ำมันและน้ำผสมกันเทียบกับเวลา (43) เรียกว่า interfacial activation ไลเปสจะมีคุณสมบัติเป็นเอสเทอร์เรส ซึ่งเอสเทอร์เรสจะเป็น carboxylesterases มาทำปฏิกริยากับสารตั้งต้นทำให้สารตั้งต้นละลายน้ำการดูโครงสร้าง 3 มิติของไลเปสจะอธิบายการเกิด interfacial activation ได้ โดยบริเวณ active site ของไลเปสจะปกคลุมอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำมัน เรียกว่า lid หรือ flap ซึ่งจะทำให้เอ็นไซม์สามารถที่จะรวมกับน้ำมันได้ ในเวลาเดียวกันส่วนที่ไม่ชอบน้ำก็สามารถกลับมาจับกับไลเปสได้อีก เมื่อไม่นานมานี้พบว่าบริเวณ active site ของไลเปสไม่มีส่วนสัมพันธ์กับ interfacial activation ไลเปสจาก *P. aeruginosa*, *B. glumae*, *C. antarctica* B และไลเปสที่พบในตับอ่อนของสัตว์ฟันแทะไม่สามารถเกิด interfacial activation แต่มี amphiphilic lid คลุม active site จากการสังเกตนี้สรุปได้ว่า lid และ interfacial activation ไม่เหมาะสมในการแยกประเภทของเอ็นไซม์ไลเปส (44)

ตารางที่ 4 ลำดับของกรดอะมิโนที่จับบริเวณ OXYANION HOLE และ ACTIVE SITE ของไลเปสที่พบในแบคทีเรียชนิดต่างๆ (45)

แบคทีเรีย	Accession no.	Oxyanion region	Active site
กลุ่มที่ 1			
<i>Staphylococcus aureus</i>	A24545	PVVFVHG	GHSMGG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_375790	PIVLVHG	GHSMGG
<i>Staphylococcus epidermis</i>	A47705	PIILVHG	GHSMGG
<i>Staphylococcus epidermis</i>	AAC67547	PVVFVHG	GHSMGG
<i>Staphylococcus hyicus</i>	A24075	PFVFVHG	GHSMGG
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AAF21294	PVVLVHG	GHSMGG
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	B69470	PVVFVHG	GHSMGT
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NP_110161	NFIFLHG	GHSMGG
<i>Mycoplasma mycoides</i>	AAA95966	NIIFCHG	GHSMGG
<i>Mycoplasma genitalium</i>	A64238	TVVFAHG	GHSMGG
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	NP_077851	SIVFIHG	GHSLGA

<i>Mus musculus</i>	NP_035974	LIFVSHG	GHSMGG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010343	PIVFCHG	AHSMGG
<i>Bacillus pumilus</i>	CAA02196	PVVMVHG	AHSMGG
<i>Bacillus subtilis</i>	NP_388152	PVVMVHG	AHSMGG
<i>Bacillus licheniformis</i>	CAB95850	PVVMVHG	AHSMGG
<i>Geobacillus</i> sp. TP10A	AAF63229	PIVLLHG	AHSQGG
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	CAA64621	PIVLLHG	AHSQGG
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	AAL28099	PIVLLHG	AHSQGG
<i>Burkholderia glumae</i>	A48952	PVILVHG	GHSQGG
<i>Burkholderia cepacia</i>	P22088	PIILVHG	GHSQGG
<i>Pseudomonas luteola</i>	AAC05510	PIILVHG	GHSQGG
<i>Pseudomonas fragi</i>	S02005	PILLVHG	GHSQGA
<i>Proteus vulgaris</i>	AAB01071	PIVLVHG	GHSQGP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_253500	PIVLSHG	GHSQGG
<i>Bos taurus</i>	JC4017	VVFLQHG	GHSQGT
<i>Homo sapiens</i>	NP_004181	VVFLQHG	GHSQGT
<i>Vibrio cholerae</i>	NP_232620	PIVLVHG	GHSHGG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_251552	PIVLAHG	GHSHGG
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	S61927	PIVLSHG	GHSHGS
กลุ่มที่ 2			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q99156	VFWWIHG	GESAGS
<i>Moraxella</i> sp.	A39556	AMLFFHG	GDSAGG
<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AAG47649	LLVFFHG	GDSAGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NP_215915	VVYYHG	GDSAGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NP_217486	LLVfyHG	GDSAGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NP_215916	VVLYFHG	GDSAGG
<i>Rattus norvegicus</i>	LIRTH	LVWHIHG	GDSAGG
<i>Clostridium perfringens</i>	BAA81642	ILMWIHG	GDSAGA

กลุ่มที่ 3			
<i>Serratia marcescens</i>	AAA81002	IGISFRG	GHSLGG
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	AAF87594	IGVSFRG	GHSLGG
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	O59952	IVLSFRG	GHSLGG
<i>Fusarium heterosporum</i>	JX0343	IVSVRG	GHSLGG
<i>Rhizopus niveus</i>	BAA31548	IYLVFRG	GHSLGG
<i>Rhizomucor miehei</i>	A34959	IYIVFRG	GHSLGG
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAA12912	IVVAFRG	GHSLGA
<i>Penicillium camemberti</i>	S32403	VVLAFRG	GHSLGA
Miscellaneous			
<i>Moraxella</i> sp.	S14276	PLLLIHG	GNSMGG
<i>Psychrobacter immobilis</i>	S57275	PLLLIHG	GNSMGG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012782	VWYLHHG	GFSQGS
<i>Homo sapiens</i>	A28997	LVMIIHG	GYSLGA
<i>Mycoplasma mycoides</i>	JC4110	NIIYIHG	GKSMGG
<i>Propionibacterium acnes</i>	CAA67627	PVILIPG	GHSQGG
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	3402116	AVVISPG	GHSMGG
<i>Streptomyces albus</i>	AAA53485	AVVWTPG	GHSMGG
<i>Moraxella</i> sp.	P19833	AIAVVPG	GWSMGG
<i>Candida antarctica</i>	S47165	PILLVPG	TWSQGG
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	AAB71210	PVVLVNG	GHSQGG
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AAC67392	PLIMIMG	GWSMGG
<i>Candida rugosa</i>	JN0553	VMLWIFG	GESAGS
<i>Galactomyces geotrichum</i>	PN0493	VMVWIYG	GESAGA

2.5 แฟมิลีของ *Bacillus* ที่ผลิตไลเปส

Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนไขมันโดยวิธี lipolytic ในปัจจุบันได้นำเอา *B. subtilis* (46), *B. pumilus* , *B. licheniformis* (47), *B. megaterium* (48), *B. thermocatenulatus* (49), *B. thermoleovorans* (50), และ *B. stearothermophilus* (51) มาทำ

ให้บริสุทธิ์แล้วมาทำโคลนนิ่ง พบว่า *B. subtilis* มีการปล่อยไลเปส LipA (50) และ LipB (52) ออกมาซึ่งสารนี้มีประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ แบคทีเรียไลเปสและเอสเทอเรสสามารถจับกลุ่มได้ 8 แฟมิลีด้วยกันโดยดูจากลำดับเบสที่อนุรักษ์และคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น *B. subtilis* มีน้ำหนักโมเลกุล 19 kDa สามารถให้ LipA และ LipB จัดอยู่ใน subfamily ที่ 1.4 ของแบคทีเรียไลเปส (EC 3.1.1.3) โดยจะเหมือน *B. pumilus* (53) และ *B. licheniformis* (34) 75% และเหมือน *B. megaterium* 98% ซึ่งทั้งหมดจะอยู่ในสับแฟมิลีเดียวกัน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* ของไลเปส (88)

<i>Bacillus</i> isolate	M _r (kDa)	pI	pH ที่เหมาะสม	การคงตัวของ อุณหภูมิ	อ้างอิง
Subfamily I.4					
<i>B. licheniformis</i> ^b	19.2	9.46	10-11.5	<25%	(47)
<i>B. subtilis</i>	19.3	9.25	10	<25%	(54)
<i>B. pumilus</i>	19.3	9.43	9.5-10	<25%	(56)
Subfamily I.5					
<i>B. thermocatenulatus</i>	43.2	6.37	8.5	>90%	(54)
<i>B. thermoleovorans</i>	43.1	6.19	7.5	>90%	(55)

เชื้อ *Bacillus* ที่เป็น Alkaliphilic และ Thermophilic สามารถผลิตเอ็นไซม์ lipolytic ได้ เพราะฉะนั้นไลเปสที่ได้จาก *B. subtilis* (57) และ *B. pumilus* (53) เป็นที่สนใจเพราะสามารถผลิตเอ็นไซม์ได้ดีที่ pH สูง (pH มากกว่า 9.5) ส่วน *B. thermocatenulatus* (53), *B. thermoleovorans* (54), และ *B. stearothermophilus* (55) จะผลิตเอ็นไซม์ได้ดีที่ pH ประมาณ 7-9.5 ยีนที่กำหนดรหัสเอ็นไซม์ไลเปสตรงบริเวณ active serine จะมีกรดอะมิโนที่เป็น Gly-X-Ser-X-Gly

ได้มีการสนใจในแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสเพิ่มขึ้น เนื่องจากการผลิตเอ็นไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียจะคงที่มากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรืออยู่ได้สภาวะที่กดดัน *Bacillus* sp. ที่ทนร้อนสามารถผลิตไลเปสโดยวิธี lipolytic ได้คงที่ภายใต้สภาวะที่กดดัน เพราะฉะนั้นจึงพยายามหา *Bacillus* sp. ทนร้อนใหม่ๆมาหา lipolytic โดยเราจะโคลนนิ่งและแสดงออกเอ็นไซม์ไลเปสออกมาเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรม

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทนร้อนจากตัวอย่างน้ำพุร้อน

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนจังหวัดระนอง และจังหวัดเชียงใหม่ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium อุณหภูมิ 45°C นาน 14 ชั่วโมง แล้วมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต่อจากนั้นนำไปย้อมแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทาง morphology โดยวิธีย้อมแกรมมีดังนี้

เกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ และปล่อยให้แห้งในอากาศ



ตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยไปลนกับเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง



หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง



หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol's iodine) บนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง



ล้างสีออก (decolorize) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด



หยดสีซาฟรานิน (safranin) บนรอยเกลี่ยประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง



ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วถ่ายรูป

ผลการย้อมสีพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

3.2 ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อในการผลิตเอ็นไซม์ไลเปส

3.2.1 ทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ไลเปสของเชื้อตัวอย่างโดยวิธี point inoculation

เท Tributyrin agar ลงใน steriled plate รอจนอาหารแข็งตัวดีใช้ needle เขี่ยเชื้อตัวอย่างจาก stock culture แล้วนำมาแตะกึ่งกลาง plate นำไปบ่มที่ 45°C และตรวจสอบการสร้างเอ็นไซม์ไลเปสโดยการเกิด clear zone รอบโคโลนีของเชื้อที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

3.2.2 หา activity ของเอ็นไซม์ไลเปส

3.2.2.1 การเตรียม crude enzyme

เขี่ยเชื้อตัวอย่างที่มีการผลิตเอ็นไซม์ไลเปสสูงสุดมาใส่ในอาหารเหลว inoculum medium และบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว production medium บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 10°C ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเอ็นไซม์

3.2.2.2 ทดสอบความคงตัวและความเหมาะสมของเอ็นไซม์ในการทอนสารละลายที่เป็นกรด-เบส

นำ crude enzyme มา 1 ml ใส่ใน substrate solution 9 ml (substrate solution ประกอบด้วย solution A คือ *p*-nitrophenyl laurate (pNPL) (SIGMA)(0.4 g pNPP ละลายใน 12 ml isopropanol) และ solution B (0.4 g tritonX-100; 0.1 g gum arabic; 90 ml potassium phosphate buffer pH 7) มาผสมกันในอัตราส่วน 1:30 (v/v)) ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 60°C นาน 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มนาน 5 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm นำ crude enzyme มาทำการทดลองดังข้างต้นซ้ำอีก แต่เปลี่ยนค่า pH ของ solution B ให้มีช่วง pH ระหว่าง 7-12 จากนั้นทำการทดลองต่อโดยทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ในการทนต่อสารละลายที่เป็นกรด-เบสโดยนำ crude enzyme มาใส่ใน substrate solution ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 7-12 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ 60°C แล้วถึงทำการหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทำการทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ที่เหลืออยู่โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

3.2.2.3 ทดสอบความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในอุณหภูมิต่างๆ

นำ crude enzyme มาทำปฏิกิริยากับ substrate solution pH 7 ที่อุณหภูมิต่าง กันตั้งแต่ 30 – 80 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 410 nm

3.2.2.4 ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ

ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 2.2.3 แต่เพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 30 นาที แล้วทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 410 nm

3.2.2.5 ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergents

โดยนำ crude enzyme มาทำปฏิกิริยากับ substrate solution pH 7 โดยเติมสาร ละลายของ metal chlorides, ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT) (Sigma) และ β -mercaptoethanol (Pharmacia Biotech) ต่างๆ ลงไป บ่มที่ 60°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm โดยเทียบกับหลอดที่ ไม่ได้ใส่ metal ions, inhibitors และ detergents ลงไป

3.2.2.6 ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยซีสเตรต

นำ crude enzyme มาทดสอบความสามารถในการย่อยซีสเตรต โดยเปลี่ยน ซีสเตรตใน solution A เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน *p*-nitrophenyl ที่มีความยาวคาร์บอนแตกต่างกันคือ butyric acid (C_4), caprylic acid (C_8), capric acid (C_{10}), lauric acid (C_{12}), myristic acid (C_{14}), palmitic acid (C_{16}), stearic acid (C_{18}) มาบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

3.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสสูงสุดโดยวิธีทางชีวเคมี และการหาลำดับเบส

3.3.1 จำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ API 50CHB kit

การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียสามารถที่จะจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้โดยใช้ API 50CHB kit (BioMerieux, Lyon, France) โดยนำเชื้อที่คัดแยกแล้วมาเจริญบนจาน TSA บ่ม ที่ 45°C นาน 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาละลายใน 0.85% ของน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อใน หลอดหมายเลข 2 ของ McFarland แล้วนำ 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อดังกล่าวมาละลายใน 10 มิลลิลิตร ของ API 50CHB medium แล้วนำมาบ่มที่ 48 ชั่วโมง 45°C แล้วอ่านค่าในเวลา 24

ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาประมวลผลโดยใช้ซอฟต์แวร์ APILAB 2.1 (BioMerieux, Lyon, France)

3.3.2 **ทำการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย**

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้สูงสุดมาเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจาก hypervariable region (HV region) ของ 16S rRNA จากเชื้อ *Bacillus* 69 ชนิด Primers ที่ได้คือ

primer 1 (forward) 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC TAA TAC ATG CAA GTC GAG CG -3'.

primer 2 (reverse) 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'.

ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction

ส่วนผสม PCR reaction	ปริมาตร(µl)
Sterile distilled water	15.2
10X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	1.5
DNTPs (10 mM)	0.5
Primer 1 (20 µM)	2
Primer 2 (20 µM)	2
DNA template	1
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0.3
รวม	25

● นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที

● นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

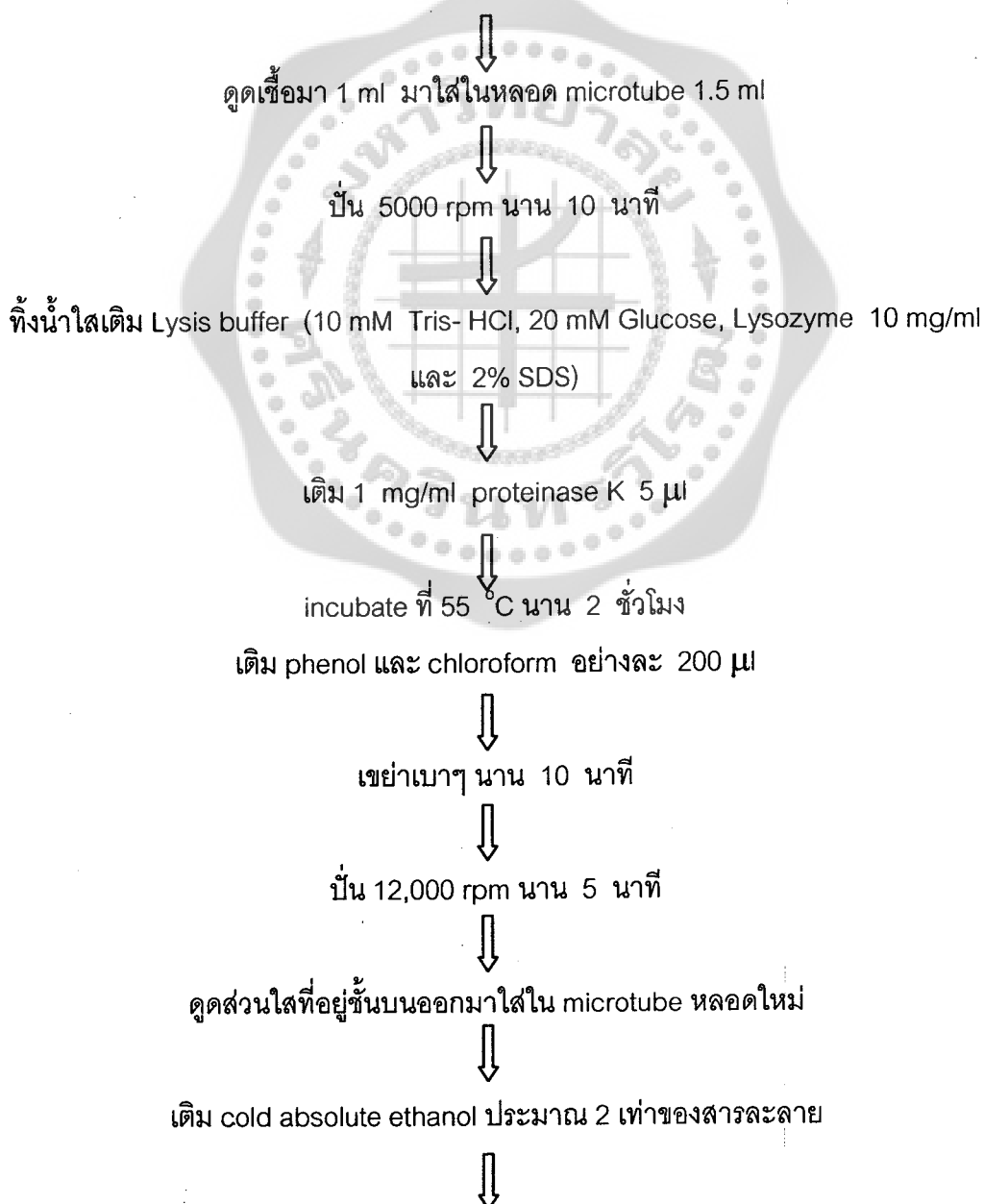
Denaturing step	95°C	1	นาที
Annealing step	55°C	1	นาที
Extension step	72°C	1	นาที

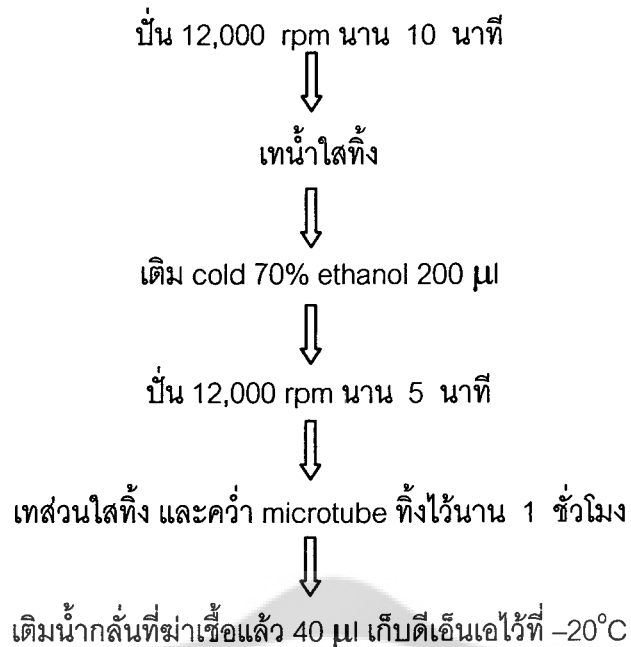
ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาเก็บไว้ที่ -20°C

- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel eletrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกผลด้วยเป็นภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล
- นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยัง สวทช. เพื่อหาลำดับเบส
- นำลำดับเบสมา Blast ด้วยโปรแกรมจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> โดยเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่ได้มาจาก GenBank accession number และดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0

3.4 เลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดมาสกัดเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลือกไว้นำมาเลี้ยงใน LB medium ที่ 50°C นาน 12-14 ชั่วโมง





3.5 ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไลเปส

3.5.1 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์นี้ออกแบบมาจากไลเปสยีนของบาซิลลัสสปีชีส์ต่างๆ

ไพรเมอร์ที่ได้คือ Primer 3 (forward) 5' CAC CAT GCT GCT TGT TGT GTC CGT A 3'

Primer 4 (reverse) 5' TTT CCC GCT GGC GGT CAG CCC 3'

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction

ส่วนผสม PCR reaction	ปริมาตร(μ l)
Sterile distilled water	15.2
10X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl_2	1.5
DNTPs (10 mM)	0.5
Primer 3 (20 μ M)	2
Primer 4 (20 μ M)	2
DNA template	1
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ μ l)	0.3
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที

- นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturing step 95°C 1 นาที

Annealing step 54°C 1 นาที

Extension step 72°C 1 นาที

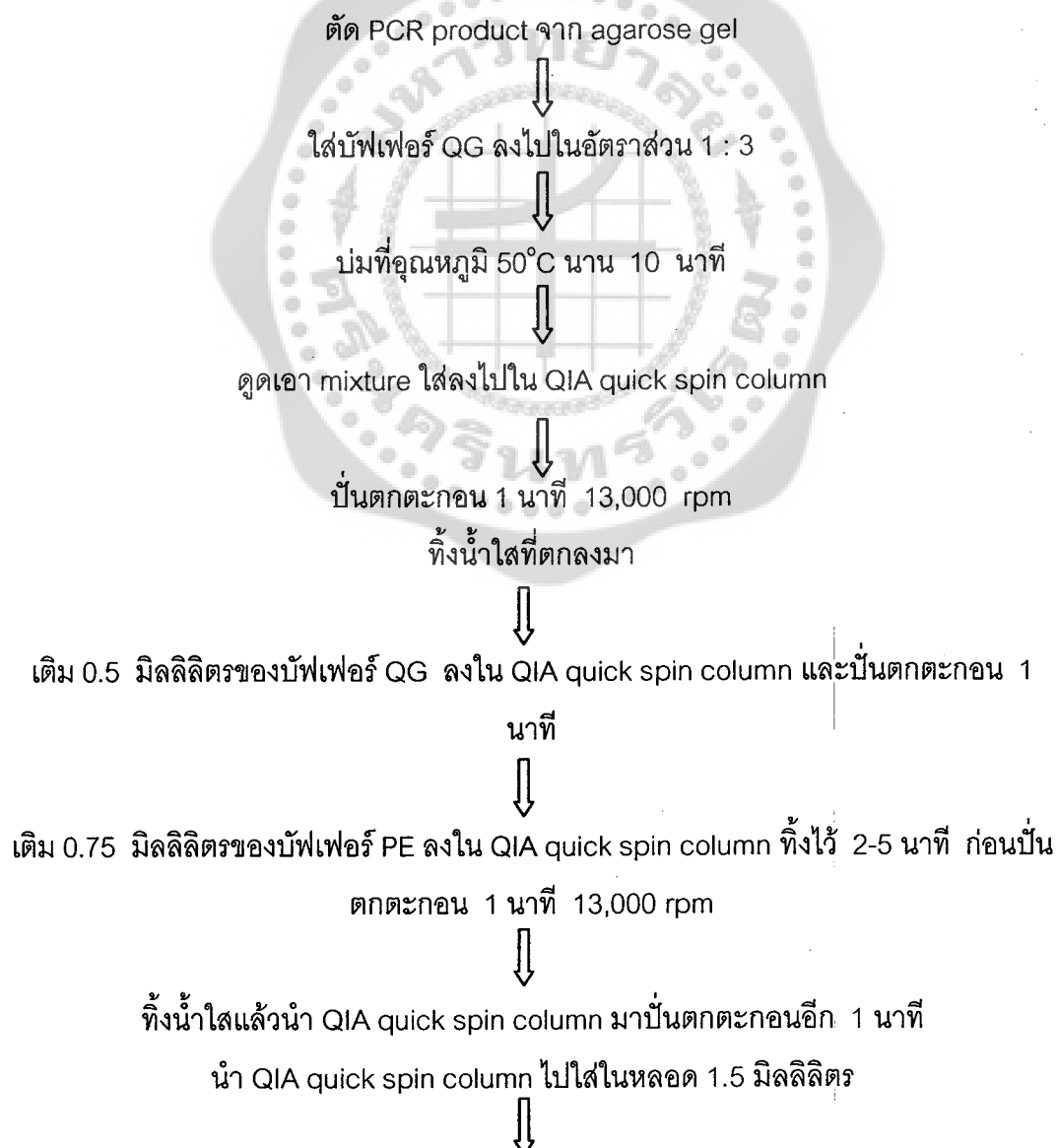
ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาเก็บไว้ที่ -20°C

- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel eletrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน

- บันทึกผลด้วยเป็นภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพจากเจล

3.6 การทำให้ PCR product บริสุทธิ์

ในการทดลองนี้ใช้ Gel Extraction Kit ของ QIAGEN มีวิธีการทำดังนี้



ชะเอาดีเอ็นเอออกโดยการเติม 50 ml ของบัฟเฟอร์ EB ที่ไว้ 1 นาที แล้วปั่นตกตะกอน
13,000 rpm นาน 1 นาที

↓
เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

ต่อจากนั้นนำ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วนำมาหาลำดับเบส ที่ สวทช. เพื่อยืนยันว่าเป็น
ยีนของไลเปสจริง แล้วนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ Blast ด้วยโปรแกรมจาก
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> แล้วนำนิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์ไลเปส *Bacillus* sp. RN2
เทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งได้มาจาก GenBank accession number โดยใช้
โปรแกรม Clustal W นำเอาลำดับเบสที่ได้มาทำการวิเคราะห์การตัดด้วย restriction enzyme
วิเคราะห์ความเป็น hydrophobicity/ hydrophilicity ดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ
(phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.65 เปรียบเทียบ homology ของยีนไล
เปส RN2 เทียบกับบาซิลลัสชนิดต่างๆ ต่อจากนั้นนำลำดับเบสที่ได้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน แล้ว
นำมาเปรียบเทียบลำดับเบสของกรดอะมิโนกับยีนไลเปสของจุลินทรีย์อื่นๆ

3.7 การทำโคลนนิ่ง

นำชิ้นของ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วของยีนไลเปสมาสอดใส่ใน pET 100/D TOPO[®]
vector (Champion[™] pET Directional TOPO[®] expression kit (Invitrogen)) โดยใช้วิธีไลเกชัน
ด้วยเอ็นไซม์ไลเกส หลังจากนั้นก็ transformed โดยวิธี heat shock เข้าสู่ *E. coli* One Shot[®]
TOP10 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 14 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีการ
สอดใส่ชิ้นส่วนของยีนไลเปสด้วยวิธี PCR แล้วนำมาตรวจดูชิ้นส่วนโดยเทคนิค agarose gel
electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน

3.8 ทดสอบการแสดงออกของยีนไลเปส (Over expression of recombinant DNA)

นำโคโลนีที่คัดเลือกไว้มาทดสอบการแสดงออกของยีนไลเปส โดยนำโคโลนีที่ได้จากข้อ
3.7 มาสกัดพลาสมิด แล้วนำมา transformed เข้าไปในเซลล์ของ BL 21 star[™] (DE3) one shot[®]
ด้วยวิธี heat shock จากนั้นนำเชื้อ Lip-SBRN2 นี้มาเลี้ยงไว้ในสารละลาย LB medium ที่ 37 °C
นาน 12 ชั่วโมง แล้วเติม IPTG (1mM) เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างเอ็นไซม์ ต่อจากนั้นนำเชื้อที่
ได้มาใส่ใน microcentrifuge 1.5 ml ประมาณ 1 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนทั้งน้ำใส ล้างตะกอน
ด้วย phosphate buffered saline เติม lysis buffer ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำ

สารละลายที่ต้มแล้วนำมาแยกใน 12.5% SDS-PAGE gel electrophoresis โดยเตรียม separating gel และ stacking gel ดังนี้

ตารางที่ 8 การเตรียม Separating gel

Separating gel	
Polyacrylamide gel	12.5%
Acrylamide solution	8.3 ml
0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS pH 6.8	5 ml
Deionized water	6.6 ml
10% (w/v) ammonium persulfate (freshly prepared)	100 µl
TEMED (Tetraethylmethyldiamine)	10 µl
Total volume	20.00 ml

ตารางที่ 9 การเตรียม Stacking gel

Stacking gel	
Polyacrylamide gel	4.5%
Acrylamide solution	1.8 ml
0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS pH 6.8	3 ml
Deionized water	7.0 ml
10% (w/v) ammonium persulfate (freshly prepared)	150 µl
TEMED (Tetraethylmethyldiamine)	15 µl
Total volume	12.00 ml

จากนั้นนำโปรตีนของยีนไลเปตมาโลดอาคิลลาไมด์เจล แล้วรันเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำแผ่นอาคิลลาไมด์เจลที่ได้มาย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 นาน 30 นาที แล้วมาล้างสีออกด้วย methanol และ acetic acid แล้วถ่ายรูปเจลไว้

3.9 ศึกษาการเจริญของเชื้อ Lip-SBRN2 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำเชื้อแบคทีเรีย Lip-SBRN2 มาเลี้ยงใน LB และปั่นบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน LB broth ที่มี 1mM IPTG, 50 ug/ml ampicillin และ 1% กลูโคสและนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 rpm. เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นปั่นแยกเซลล์โดยใช้ refrigerated centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนน้ำใส (crude extract) มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ lipase (ดังข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2) เขียนกราฟแสดงการเจริญและการผลิตเอนไซม์ lipase ที่เวลาต่างๆ เลือกเวลาที่เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เพื่อใช้เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต่อไป

3.10 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ lipase ของเชื้อ Lip-SBRN2

นำแบคทีเรีย Lip-SBRN2 มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่แปรผันต่อชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ lipase ในระดับขวดเขย่า

3.11 ศึกษาสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ lipase

นำแบคทีเรีย Lip-SBRN2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ lipase ของเชื้อในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อดังนี้คือ อุณหภูมิ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการให้อากาศ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ lipase ของเชื้อ ในระดับขวดเขย่า

3.12 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ (Enzyme purification)

3.12.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity Chromatography (Ni-NTA column)

(58)

โดยนำเชื้อ Lip-SBRN2 ที่เติม IPTG แล้วมาปั่นตกตะกอนที่ 6000 rpm 10 นาที แล้วนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 8; 300 mM NaCl) แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงแล้วปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาใส่ในคอลัมน์ Ni-NTA spin (QIAGEN) ล้าง 4 ครั้งด้วย washing buffer (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) แล้วทำการชะโปรตีนออกมาด้วย elution buffer (50 mM

(NH₄)₂ HPO₄ pH 8, 250 mM imidazole) แล้วนำมาแยกใน 12.5% SDS-PAGE gel electrophoresis

3.12.2 ทำการตกตะกอนเอ็นไซม์โดยใช้ Ammonium sulfate

นำสารละลายที่ได้มาจาก 3.12.1 มาปั่นตกตะกอน 6,000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใสมาเติม ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) ที่มีความเข้มข้น 20% แล้วปั่นตกตะกอน 6,000 rpm นาน 20 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาเติม ammonium sulfate ที่มีความเข้มข้น 80% ที่ 4°C แล้วปั่นตกตะกอน 10,000 rpm นาน 15 นาที แล้วล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 20 mM potassium phosphate บัฟเฟอร์ (pH 7.5) แล้ว dialyzed ด้วย potassium phosphate บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่ 4°C จากนั้นนำมาหา activity ของเอ็นไซม์โดยเปรียบเทียบกับระหว่างเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์และยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์

3.13 การทดสอบคุณสมบัติต่างๆของเอ็นไซม์ไลเปส

3.13.1 ทดสอบความคงตัวและความเหมาะสมของเอ็นไซม์ในการทนสารละลายที่เป็นกรด-เบส

โดยนำเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับ substrate solution โดยใช้ ใน *p*-nitrophenyl ester (*p*NP- ester) เป็นสับสเตรต และให้สับสเตรตละลายใน 50 mMของบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ดังตารางที่ 10 จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยา แล้วทำการทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วทำการทดลองเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนระยะเวลาที่บ่มให้เป็น 4 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ แล้วทำการทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

ตารางที่ 10 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบกรด-เบส

ช่วงของ pH	บัฟเฟอร์
7-8.5	Potassium phosphate buffer (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄)
9-10.5	Tris-HCl
11-12	Glycine/NaOH

3.13.2 ทดสอบความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในอุณหภูมิต่างๆ

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาทดสอบกับสับสเตรต (pNP-ester) ที่ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) ณ อุณหภูมิต่างๆ กัน คืออยู่ในช่วง 30-80°C บ่มนาน 15 นาที แล้วนำมาหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

3.13.3 ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ

โดยทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.13.2 แต่เปลี่ยนระยะเวลาในการบ่มให้นานขึ้นเป็น 2 เท่า คือ 30 นาที แล้วนำมาหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

3.13.4 ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergent

ทำการทดสอบโดยนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับ substrate solution แต่เติมสารละลาย metal ions เช่น $ZnCl_2$, $MgCl_2$, KCl, and $CaCl_2$, diaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol และ 1% of SDS ลงไปด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วนำมาเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่ metal ions, inhibitors และ detergent ลงไป

3.13.5 ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรต

3.13.5.1 การใช้สับสเตรตที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสับสเตรตใน substrate solution ซึ่งประกอบด้วย solution A คือ สารอนุพันธ์ของกรดไขมัน *p*-nitrophenyl ที่มีความยาวคาร์บอนแตกต่างกัน เช่น *p*-NP butyrate (C4), *p*-NP caprylate (C8), *p*-NP caprate (C10), *p*-NP laurate (C12), *p*-NP myristate (C14), *p*-NP palmitate (C16), *p*-NP stearate (C18) และ solution B คือ potassium phosphate บัฟเฟอร์ pH 7 นำมาทดสอบโดยการเติม substrate solution 3 ml เติมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

3.13.5.2 การใช้สับสเตรตที่เป็นไตรเอซิลกลีเซอไรด์

นำเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (เราใช้ไตรเอซิลกลีเซอไรด์ที่มีความยาวของสายคาร์บอนตั้งแต่ C4 - C18 เช่น triglycerides, tributyrin (C4), tricaproin (C6), tricaprylin (C8), tricaprins (C10), trilaurin (C12), tripalmitin (C16), tristearin (C18)) ซึ่งไตรเอซิลกลีเซอไรด์ละลายอยู่ใน reaction buffer (1mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM NaCl and 0.1 mM CaCl_2 และ 1% Triton X 100) ในอัตราส่วน 1: 30 ทำการทดลองโดยนำเอ็นไซม์บริสุทธิ์มา 100 μl ใส่ลงในไตรเอซิลกลีเซอไรด์ 30 ml บ่มที่ 37°C นาน 10 นาที แล้วทำการไตเตรตด้วย 0.1 mM ของ NaOH แล้วทำการบันทึกผลปริมาณของ NaOH

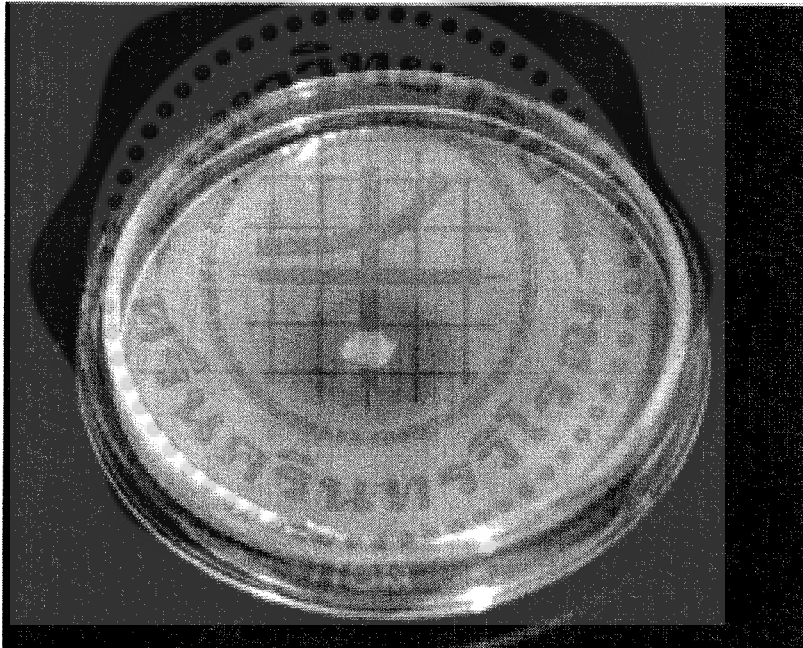


บทที่ 4

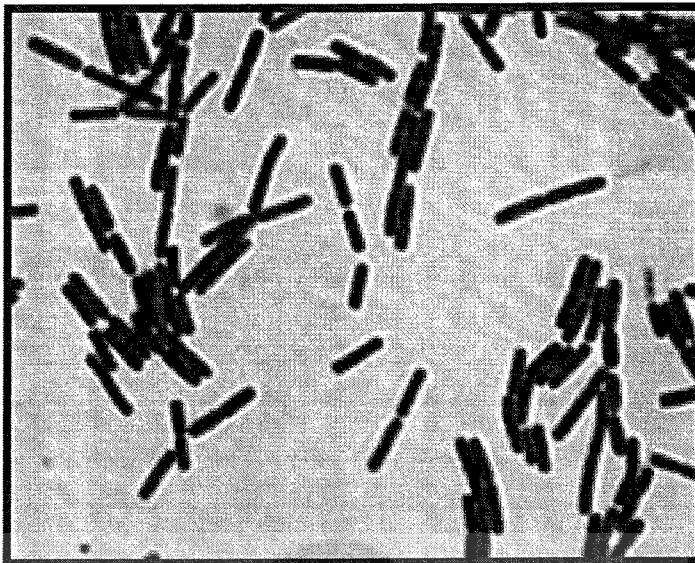
ผลการทดลอง

4.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน

นำตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนที่จังหวัดระนอง และจังหวัดเชียงใหม่มาแยกเชื้อได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 9 เชื้อ โดยเป็นแบคทีเรียจากจังหวัดระนอง 4 เชื้อ และจากจังหวัดเชียงใหม่ 5 เชื้อ แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูการสร้าง clear zone พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อ RN2 จากจังหวัดระนองสามารถสร้าง clear zone ได้ใหญ่ที่สุด (ดังรูปภาพที่ 2) แล้วเมื่อนำเชื้อ RN2 มาย้อมแกรมพบว่า RN2 ที่ได้เป็นจุลินทรีย์ที่เป็น aerobic, แกรม +, รูปร่างเป็นรูปท่อน, มีเอ็นโดสปอร์ และเจริญเติบโตที่ 45°C (ดังรูปที่ 3)



รูปที่ 2 แสดง Clear zone ที่ได้จาก *Bacillus* sp. RN2 บนฐาน tributyrin



รูปที่ 3 แสดงรูป *Bacillus* sp. RN2

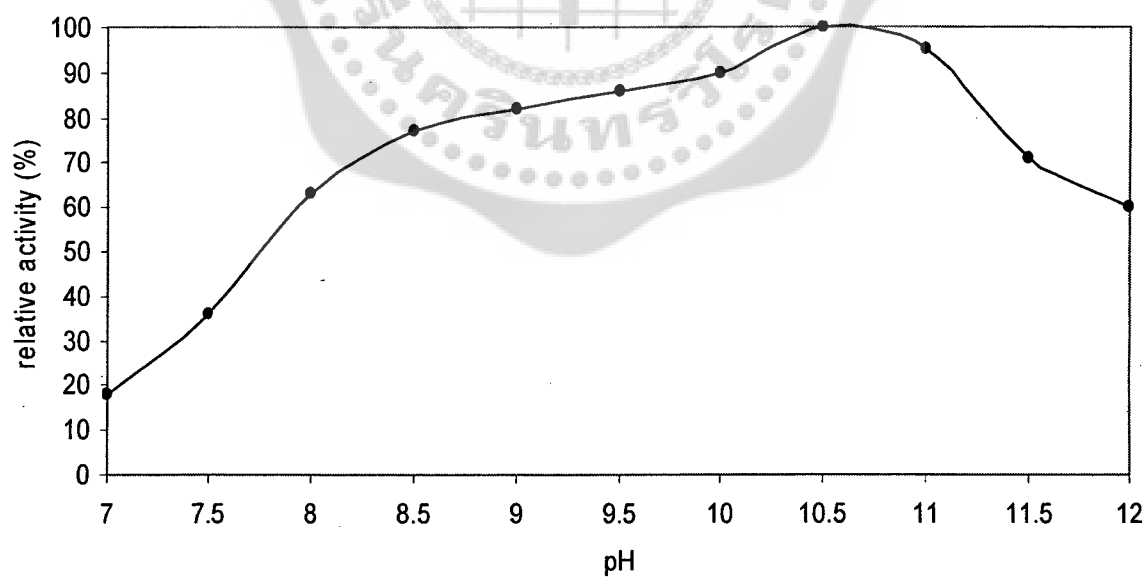
4.2 ผลการทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus* sp. RN2

4.2.1 ผลการทดสอบความเหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ในการทนสารละลายที่เป็นกรด-เบส

นำ crude enzyme มาทดสอบความเหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ใน pH ต่างๆกัน พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ค่า pH ในช่วง 10-11 (ดังตารางที่ 11 รูปที่ 4) และเมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถทนค่า pH ในช่วง 7-8.5 ได้ดี แต่ที่ค่า pH สูงขึ้นการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ และถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ที่ค่า pH ช่วง 10.5-12 (ดังตารางที่ 12 รูปที่ 5)

ตารางที่ 11 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปส *Bacillus* sp. RN2 ที่ค่า pH ต่างๆ

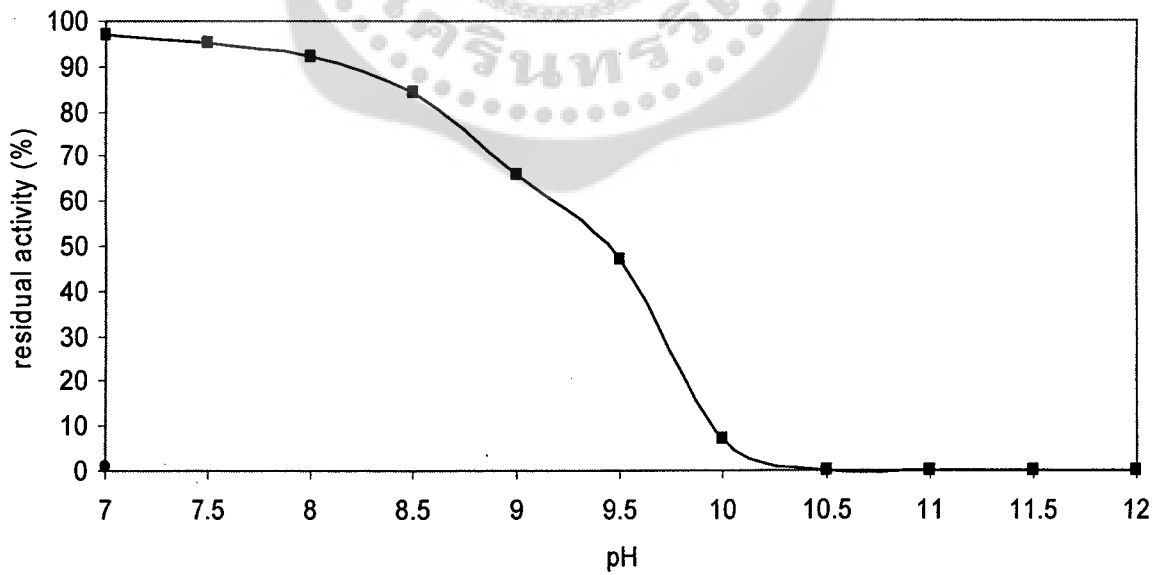
pH	Activity	
	Enzyme activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
7	0.37	18
7.5	0.74	36
8	1.29	63
8.5	1.58	77
9	1.66	82
9.5	1.75	86
10	1.84	90
10.5	2.03	100
11	1.94	95
11.5	1.46	71
12	1.22	60



รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในสารละลายที่เป็นกรด-เบส

ตารางที่ 12 แสดงความคงทนของเอนไซม์ไลเปส *Bacillus* sp. RN2 ที่ pH ต่างๆ

pH	Stability	
	Enzyme activity (U/mg protein)	Residual activity (%)
7	0.36	97
7.5	0.71	95
8	1.19	92
8.5	1.33	84
9	1.11	66
9.5	0.83	47
10	0.14	7
10.5	0	0
11	0	0
11.5	0	0
12	0	0



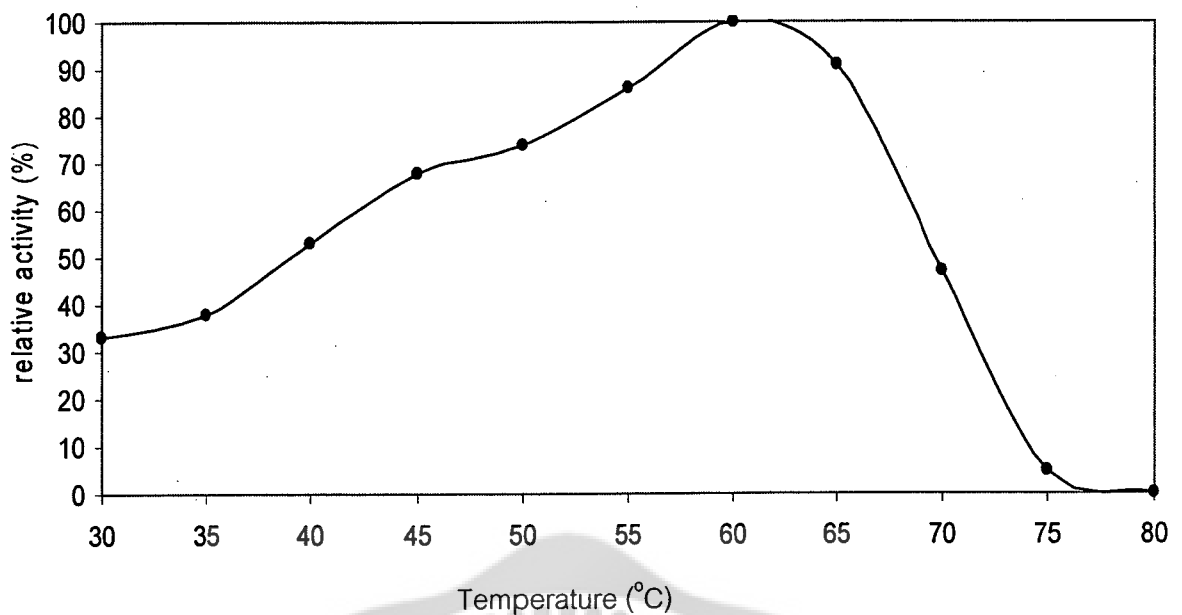
รูปที่ 5 แสดงการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในสารละลายที่เป็นกรด-เบส

4.2.2 ผลการทดสอบความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในอุณหภูมิ
ต่าง ๆ

เมื่อนำ crude enzyme มาทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกันตั้งแต่ 30-80°C พบว่าเอนไซม์ไล
เปสมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิช่วง 50-65 °C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดใ
การทำปฏิกิริยากับซับสเตรตคือ 60 °C (ดังตารางที่ 13, รูปที่ 6)

ตารางที่ 13 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปส *Bacillus* sp. RN2 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน

Temperature (°C)	Activity	
	Enzyme activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
30	0.36	33
35	0.40	38
40	0.46	43
45	0.73	68
50	0.79	74
55	0.92	86
60	1.06	100
65	0.97	91
70	0.51	47
75	0.06	5
80	0	0



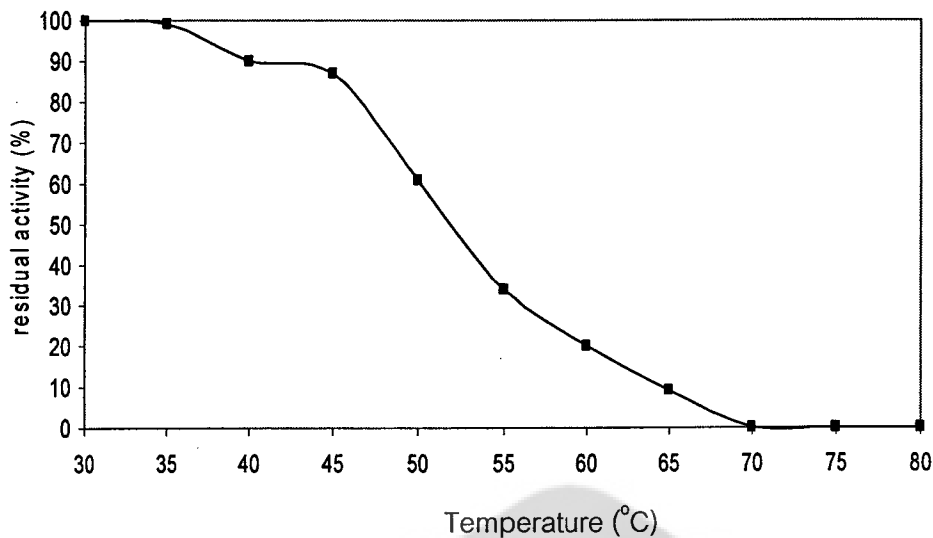
รูปที่ 6 แสดงการทดสอบความเหมาะสมของเอ็นไซม์ไลเปสในอุณหภูมิต่างๆ

4.2.3 ผลการทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ไลเปสในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำ crude enzyme มาทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ไลเปสในการทนต่ออุณหภูมิ ตั้งแต่ 30-80°C พบว่าเอ็นไซม์ไลเปสมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30-45 °C และ จะค่อยลดลงเรื่อยๆ จนไม่สามารถทำงานได้อีกเมื่ออุณหภูมิ 70 °C (ดังตารางที่ 14, รูปที่ 7)

ตารางที่ 14 แสดงความคงตัวในการทำงานของเอ็นไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. RN2 ที่ อุณหภูมิต่างๆกัน

Temperature	Stability	
	Enzyme activity (U/mg protein)	Residual activity (%)
30	0.63	100
35	0.62	99
40	0.57	90
45	0.55	87
50	0.39	61
55	0.22	34
60	0.13	20
65	0.06	9
70	0	0
75	0	0
80	0	0



รูปที่ 7 แสดงการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไคเนสในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ

4.2.4 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไคเนสในการทนต่อ metal ions, inhibitors ผลและ detergents

เมื่อนำ crude enzyme มาทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไคเนสในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergents พบว่า Ca^{2+} , K^+ และ Zn มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้, Mg^{2+} , Na^+ , NH^+ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไคเนส ส่วน metal ions เช่น Ag^+ และ Ni^{2+} ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง และ SDS, DTT ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด (ดังตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในการทนต่อ metal ions, inhibitors และ detergents ของ *Bacillus* sp. RN2

Agents	Residual activity (%)
none	100
NaCl	95
KCl	106
CaCl ₂	107
MgCl ₂	92
NH ₄ Cl	97
AgCl	80
NiCl ₂	69
ZnCl ₂	102
SDS	58
β -mercaptoethanol	74
DTT	68
EDTA	90

4.2.5 ผลการทดสอบความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยยับเสรด

นำ crude enzyme มาทดสอบความสามารถในการย่อยยับเสรดที่มีสายคาร์บอนแตกต่างกันพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการย่อยยับเสรดที่มีความยาวของสายคาร์บอนขนาดกลางคือ C12 (pNP-laurate) มากที่สุด (ดังตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความสามารถของเอ็นไซม์ไลเปสในการย่อยไขมัน

Substrates	Enzyme activity (U/mg protein)
pNP-butyrate (C4)	0.73
pNP-caprylate (C8)	1.46
pNP-caprate (C10)	1.24
pNP-laurate (C12)	1.82
pNP-myristate (C14)	1.07
pNP-palmitate (C16)	0.98
pNP-stearate (C18)	0.64

4.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวเคมี และการหาลำดับเบส

4.3.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ API 50CHB kit

เรานำเชื้อ *Bacillus* sp. RN2 มาทดสอบ API 50CHB kit ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 17 และเมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ซอฟต์แวร์ APILAB 2.1 พบว่า *Bacillus* sp. RN2 ใกล้เคียงกับเชื้อ *B. licheniformis*

ตารางที่ 17 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการนำเชื้อ *Bacillus* sp. RN2 มาทดสอบ API 50 CHB kit

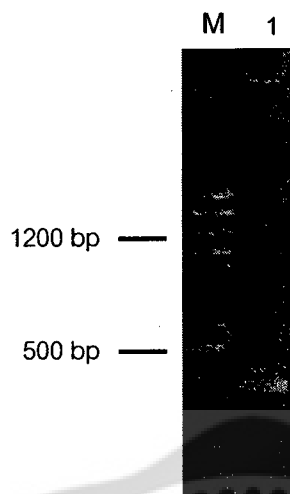
Characteristics	RN2	Characteristics	RN2
Glycerol	+	Esculin	+
Erythritol	-	Salicin	+
D-Arabinose	-	Cellobiose	+
L-Arebinose	+	Melibiose	+
Ribose	+	Sucrose	+
D-Xylose	+	Trehalose	ND
L-Xylose	-	Inulin	-
Adonitol	-	Melezitose	-
β-methyl-D-Xyloside	-	Raffinose	-
Galactose	ND	Starch	-

Glucose	+	Glycogen	-
Fructose	+	Xylitol	-
Mannose	+	Gentiobiose	-
Sorbose	-	D-Turanose	-
Rhamnose	-	D-Lyxose	-
Dulcitol	-	D-Tagatose	+
Inositol	+	D-Fucose	-
Manitol	+	L-Fucose	ND
Sorbitol	+	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-Manoside	-	L-Arabitol	-
α -Methyl-D-Gluoside	ND	Gluconate	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	2-keto-Gluconate	-
Amygdalin	+	5-keto-Gluconate	-
Arbutin	+	Lactose	-
Maltose	+	Type of <i>Bacillus</i> sp. <i>B. licheniformis</i>	

ND = not detected

4.3.2 การเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบส

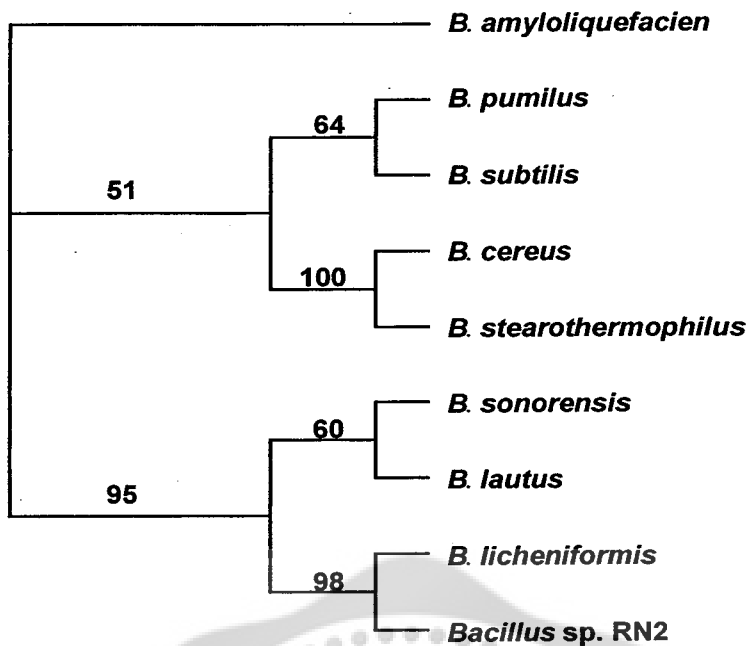
นำ *Bacillus* sp. RN2 มาเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ในส่วนของ hypervariable region ของ 16S rRNA ได้ PCR product มีขนาดประมาณ 320 bp (ดังรูปที่ 8) แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสที่ สวทช. แล้วนำลำดับเบสที่ได้มา blast ด้วยโปรแกรมจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> พบว่าลำดับเบสที่ได้เหมือนกับ *B. licheniformis* accession No. AY 336076.1 96% และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาทำ phylogenetic tree โดยใช้ PAUP 4.0 พบว่า *Bacillus* sp. RN2 ใกล้ชิดกับ *B. licheniformis* โดยมีค่า bootstrap 98% ดังรูปที่ 9



รูปที่ 8 แสดงผลของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ HYPERVARIABLE REGION จาก 16S rDNA ของ *BACILLUS* SP. RN2 ได้ PCR product ประมาณ 320 bp

แถว M = 100 bp marker

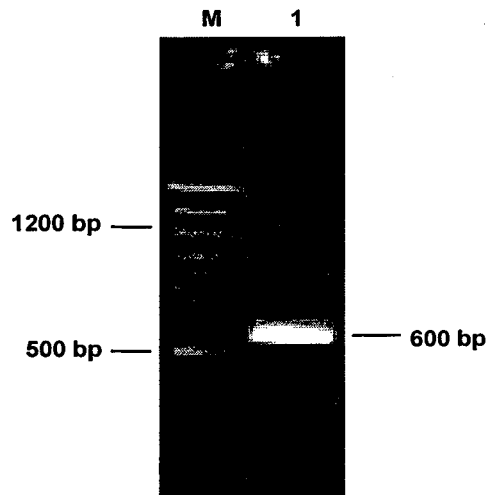
แถวที่ 1 = PCR product ที่ได้



รูปที่ 9 แสดง Phylogenetic tree ของ *Bacillus* sp. RN2 บน HV region ของ 16S rDNA โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0

4.4 ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไลเปส

นำ *Bacillus* sp. RN2 มาเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ในส่วนของยีนไลเปสได้ PCR product มีขนาดประมาณ 600 bp (ดังรูปที่ 10) แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งไปหาลำดับเบสที่สวทช. พบว่ายีนไลเปสของ *Bacillus* sp. RN2 (*Lip-SBRN2*) ประกอบไปด้วย 576 นิวคลีโอไทด์ นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ด้วยโปรแกรม Clustal W ดังรูปที่ 11 แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาทำ phylogenetic tree โดยใช้ Phylyp version 3.65 (ดังรูปที่ 12) พบว่ายีน *Lip-SBRN2* ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* (CP0002) โดยมีค่า bootstrap 844% ต่อจากนั้นหา % homology ระหว่างยีน *Lip-SBRN2* กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ดังตารางที่ 18) พบว่า % homology ของยีน *Lip-SBRN2* เหมือนกับ *B. licheniformis* (CP0002) 100% ต่อจากนั้นนำนิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (ดังรูปที่ 13) ได้กรดอะมิโน 192 ตัว แล้วเทียบลำดับกรดอะมิโนกับไลเปสของจุลินทรีย์อื่นๆ (ดังรูปที่ 14) ด้วยโปรแกรม Clustal W



รูปที่ 10 แสดง PCR product ของยีน *Lip-SBRN2* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง PCR และ แยกดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้าพบว่ายีน *Lip-SBRN2* ที่ได้มีขนาด ประมาณ 600 bp

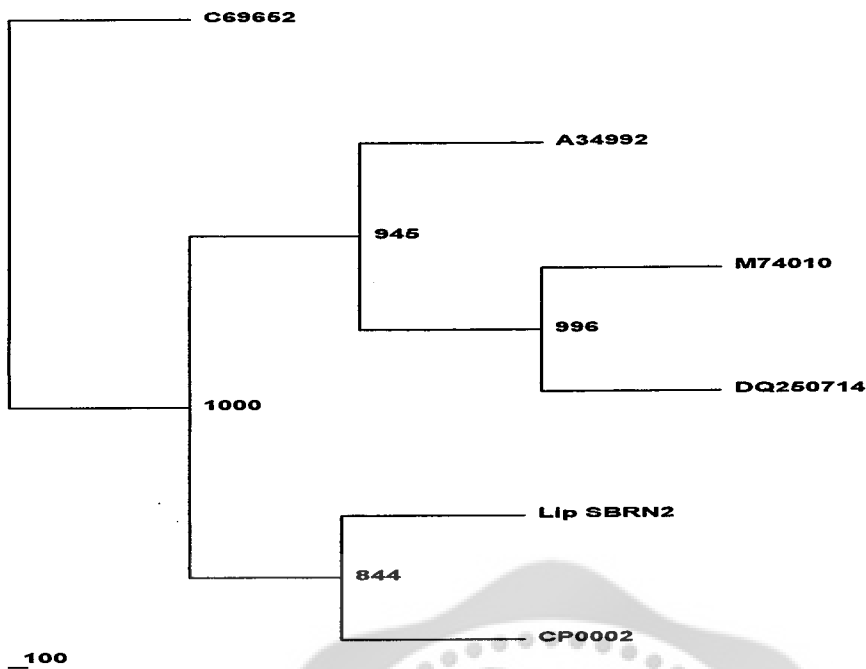
แถว M = 100 bp MARKER

แถวที่ 1 = PCR product ที่ได้

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Lip-SBRN2	CGGCATCGGCGGAGCCGATTATAACTTCATCGGCATTAAATCGTATTTACAATCTCAAGG	60
CP0002	CGGCATCGGCGGAGCCGATTATAACTTCATCGGCATTAAATCGTATTTACAATCTCAAGG	60
M74010	CGGTATTGGAGGGGCATCATTTCAATTTTGGGGGAATTAAGAGCTATCTCGTATCTCAGGG	60
DQ250714	CGGTATTGGAGGGGCATCATTTCAATTTTGGGGGAATCAAAGCTATCTCGTATCTCACGG	60
A34992	CGGCATTGGCGGTGCCCTCTTATAACTTTTTTCTATTAAAAGTTATTTGGCCACACAAGG	60
C69652	CCATGTTACCACTGCGCAAC-TGATCCGATGTGGGCCAAGTGAAGGCACCGTTCCACAAA	59
	* * * * *	
Lip-SBRN2	CTGGACAAGCAGTGAGCTTTACGCCATCAACTTTATCGATAAAACGGGAAATAATATAAA	120
CP0002	CTGGACAAGCAGTGAGCTTTACGCCATCAACTTTATCGATAAAACGGGAAATAATATAAA	120
M74010	CTGGTCGCGGGACAAGCTGTATGCAGTTGATTTTGGGACAAGACAGGCACAAATTATAA	120
DQ250714	CTGGTCGCGGGACAAGCTGTATGCAGTTGATTTTGGGACAAGACAGGCACAAATTATAA	120
A34992	CTGGGATCGAAACCAATTTATATGCTATTGATTTTCATAGACAAAACAGGAAATAACCGCAA	120
C69652	AAATTCATTCACACAACTTTGTGCAG--AAGTTTGCTCAAAAGCAAAATTTGTTTCACAA	117
	* * * * *	
Lip-SBRN2	CAATGCTCCGAGATTATCCGAATACATCAAGCGTGTGCTGAATCAAACAGGAGCATCAAA	180
CP0002	CAATGCTCCGAGATTATCCGAATACATCAAGCGTGTGCTGAATCAAACAGGAGCATCAAA	180
M74010	CAATGGACCGGTATTATCACGATTTGTGCAAAAGGTTTGTAGATGAAACGGGTGCGAAAAA	180
DQ250714	CAATGGACCGGTATTATCACGATTTGTGCAAAAGGTTTGTAGATGAAACGGGTGCGAAAAA	180
A34992	CAATGGTCCGCGTCTATCGAGATTTCGTCAAAGATGTGTTAGACAAAACGGGTGCCAAAAA	180
C69652	GTATGCACTGAACCTACAAGACCACAC---AGGCAGGCTCAACCAACTGTACCCATGAG	174
	*** * *	
Lip-SBRN2	AGTCGATATTGTGCGCCACAGCATGGGCGGGGCCAATACGCTCTATTATATTAATAATCT	240
CP0002	AGTCGATATTGTGCGCCACAGCATGGGCGGGGCCAATACGCTCTATTATATTAATAATCT	240
M74010	AGTGGATATTGTGCGCTCACAGCATGGGGGGCGCGAACACACTTTACTACATAAAAAATCT	240
DQ250714	AGTGGATATTGTGCGCTCACAGCATGGGGGGCGCGAACACACTTTACTACATAAAAAATCT	240
A34992	AGTAGATATTGTGCTCATAGTATGGGCGGAGCGAACACGCTATACTATATCAAGAATCT	240
C69652	AGCTG-CGCTGAGGCTTCCAAACAGCGAACAAAGTCAGGAGCACCTTCTTCGATCAATG	233
	** * * * *	
Lip-SBRN2	GGATGGTGCGGATAAAAGTCGGACATGTCGTCACCCTTGGGGGCGCTAATCGTCTCGTTAC	300
CP0002	GGATGGTGCGGATAAAAGTCGGACATGTCGTCACCCTTGGGGGCGCTAATCGTCTCGTTAC	300
M74010	GGACGGCGGAAATAAAAGTTGCAAACGTCGTCGACGGTTGGCGGCGCGAACCGTTTGACGAC	300
DQ250714	GGACGGCGGAAATAAAAGTTGCAAACGTCGTCGACGGTTGGCGGCGCGAACCGTTTGACGAC	300
A34992	AGATGGCGGCGATAAAATTGAGAACGTTGTCACAATTGGTGGAGCAAACGGACTCGTTTC	300
C69652	GAAAAGTACAGAGGGATGACTTCAAATTGGAACCACTGGACGATTTCACGGGAGAAC-C	292
	* * * * *	
Lip-SBRN2	AAACACGGCGCC-----TCAGAATGACAAAATCTCATACACTTCGATTTACAG	348
CP0002	AAACACGGCGCC-----TCAGAATGACAAAATCTCATACACTTCGATTTACAG	348
M74010	AGGCAAGGCGCTTCCGGGAACAGATCCAAATCAAAAGATTTTATACACATCCATTTACAG	360
DQ250714	AGGCAAGGCGCTTCCGGGAACAGATCCAAATCAAAAGATTTTATACACATCCATTTACAG	360
A34992	AAGCAGAGCATTACCAGGCACAGATCCAAATCAAAAAATTTCTTTACACATCCGCTCTATAG	360
C69652	GACTATGACAATT-----AATTGGGGCTCAACGGCTTATGTACAGTGAT----AA	339
	* * * * *	
Lip-SBRN2	CACAAGCGACTATATCGTCTTAAACAGCCTCTCCAAAC	386
CP0002	CACAAGCGACTATATCGTCTTAAACAGCCTCTCCAAAC	386
M74010	CAGTGCCGATATGATTGTCATGAATTACTTATCAAGAT	398
DQ250714	CAGTGCCGATATGATTGTCATGAATTATTTATCAAGAT	398
A34992	CTCAGCAGATCTTATTGTCGTC AACAGCCTCTCTCGTT	398
C69652	TCTCAATGAC-GCATCGGCAGAAGATGCGTTTGCAAGG	376
	** * * *	

รูปที่ 11 แสดงการ alignment นิวคลีโอไทด์ของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 กับบาซิลลัสชนิดอื่นๆ เช่น *B. licheniformis* (CP0002) *B. subtilis* (C69652, M74010, DQ250714) และ *B. pumilus* (A34992) โดยใช้โปรแกรม Clustal W (1.82)



รูปที่ 12 แสดง Phylogenetic tree ของยีน *Lip-SBRN2* กับบาซิลลัสชนิดต่างๆ ได้แก่ *B. licheniformis* (CP0002) *B. subtilis* (C69652, M74010, DQ250714) และ *B. pumilus* (A34992) โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.65 โดยการทำให้ bootstrap 1000 ครั้ง (โปรแกรม Seqboot)

ตารางที่ 18 แสดง % homology ระหว่างยีน *Lip-SBRN2* กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรียเมื่อเทียบกับยีน <i>Lip-SBRN2</i>	% homology
<i>B. Lichenniformis</i> (CP0002)	100
<i>B. Subtilis</i> (M74010)	62.8
<i>B. Pumilus</i> (A34992)	64.8

Genetic Code : Universal

```

10      20      30      40      50      60
ATGCTGTCTGTTGTGTCCGTATTTTCGTTCCGGCCTTCAGCAGCTTCCGCCGCTTCCCAC
M L S V V S V F S F R P S A A S A A S H

70      80      90      100     110     120
AATCCGGTCGTCATGGTCCACGGCATCGGCGGAGCCGATTATAACTTCATCGGCATTAAA
N P V V M V H G I G G A D Y N F I G I K

130     140     150     160     170     180
TCGTATTTACAATCTCAAGGCTGGACAAGCAGTGAGCTTTACGCCATCAACTTTATCGAT
S Y L Q S Q G W T S S E L Y A I N F I D

190     200     210     220     230     240
AAAACGGGAAATAATATAAACAATGCTCCGAGATTATCCGAATACATCAAGCGTGTGCTG
K T G N N I N N A P R L S E Y I K R V L

250     260     270     280     290     300
AATCAAACAGGAGCATCAAAAGTCGATATTGTCGCCCACAGCATGGGCGGGGCCAATACG
N Q T G A S K V D I V A H S M G G A N T

310     320     330     340     350     360
CTCTATTATATATAAAATCTGGATGGTGCGGATAAAGTCGGACATGTCTGTCACCCTTGGG
L Y Y I K N L D G A D K V G H V V T L G

370     380     390     400     410     420
GGCGCTAATCGTCTCGTTACAAACACGGCGCCTCAGAATGACAAAATCTCATACACTTCG
G A N R L V T N T A P Q N D K I S Y T S

430     440     450     460     470     480
ATTTACAGCACAAAGCGACTATATCGTCTTAAACAGCCTCTCCAAACTTGATGGTGCAAAC
I Y S T S D Y I V L N S L S K L D G A N

490     500     510     520     530     540
AATGTGCAAATCTCAGGCGTAAGCCATGTCTGGTCTTTTGTTCAGCAGCAAAGTAAATGCC
N V Q I S G V S H V G L L F S S K V N A

550     560     570     580
TTGATTAAAGACGGGCTGACCGCCAGCGGGAAATAA
L I K D G L T A S G K *
```

รูปที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *Lip-SBRN2* ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงกรดอะมิโนที่เป็น SIGNAL PEPTIDE, กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบแสดงถึง CONSERVED PENTAPEPTIDE ของยีนไลเปส. และกรดอะมิโนที่เป็น CATALYTIC TRIAD ของไลเปสใน SUBFAMILY I.4 ซึ่งได้แก่ SER77, ASP129 และ HIS152

Lip -SBRN2 -----MLSVSVSFSFRPASAASAASHNPVVMVHGIGGADYNFIGIKSYL 43
B. licheniformis ----MRRHSFLSILLICMLSVSVSFSFRPASAASAASHNPVVMVHGIGGADYNFIGIKSYL 56
B. subtilis --MKFVKRRRIIALVTILMSVTSLSFALQP-SAKAAEHNPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYL 57
B. pumilus MKVILFKKRSLQLVALALVIGSMAFIQPKEVKAAEHNPVVMVHGIGGASNFASIKSYL 60
* : * : : * . . * . * . * . * . * . * . * . *

Lip -SBRN2 QSQGWTSSELYAINFIDKTGNINNAPRLSEYIKRVLNQTGASKVDIVAHSMGGANTLTY 103
B. licheniformis QSQGWTSSELYAINFIDKTGNINNAPRLSEYIKRVLNQTGASKVDIVAHSMGGANTLTY 116
B. subtilis VSQGWSRDKLYAVDFWDDKTGTNTYNNGPVLSRFVQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLTY 117
B. pumilus VGQGWDRNQLYAIIDFKTGNNRNNGPRLSRFVKDVLDKTGAKKVDIVAHSMGGANTLTY 120
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Lip -SBRN2 IKNLDGADKVGHVVTLGGANRLVNTAPQ----NDKISYTSIYSTSDYIVLNSLSKLDGA 159
B. licheniformis IKNLDGADKVGHVVTLGGANRLVNTAPQ----NDKISYTSIYSTSDYIVLNSLSKLDGA 172
B. subtilis IKNLDGGNKVANVVTLGGANRLTGTGKALPGTDPNQKILYTSYSSADLIVMNYLSRLDGA 177
B. pumilus IKNLDGGDKIENVVTIGGANGLVSSRALPGTDPNQKILYTSYSSADLIVVNSLSRLIGA 180
* * * * * : . : : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * *

Lip -SBRN2 NNQISGVSHVGLLFSSKVNALIKDGLTASGK--- 191
B. licheniformis NNQISGVSHVGLLFSSKVNALIKDGLTASGK--- 204
B. subtilis RNQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNTN 212
B. pumilus KNVLINGVGHIGLLTSSQVKYIKEGLNGGGQNTN 215
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

นำข้อมูลของกรดอะมิโน 192 ตัว มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Signal P เราสามารถทำนายมวลโมเลกุลของเอ็นไซม์ Lip -SBRN2 ได้ประมาณ 20,282 ดาลตัน, ค่า PI เท่ากับ 9.05 และพบว่ายีนไลเปสมีกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งของ signal peptide อยู่ 17 ตัว อยู่ทีบริเวณปลาย N นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีนไลเปสคือ Ala-X1-Ser-X2-Gly โดยมีลำดับของกรดอะมิโนเป็นอาละนีน, ฮีสติดีน, เซอรีน, เมไทโอนีน และไกลซีน ส่วนกรดอะมิโนเซอรีนที่ตำแหน่ง 77, กลูตาเมตที่ตำแหน่ง 129 และฮีสติดีนที่ตำแหน่ง 152 น่าจะเป็นตำแหน่งที่มีบทบาทลำดับในการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์กับสับสเตรต (รูปที่ 13) จากนั้นนำลำดับเบสของยีนไลเปสมาทำการตัดด้วย restriction enzyme ด้วยโปรแกรม GENETYX (ดังรูปที่ 15) จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนยีน Lip -SBRN2 มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติ hydrophilicity/hydrophobicity ด้วยโปรแกรม GENETYX (Kyte & Doolittle) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ของโปรแกรมสรุปได้ว่ายีน Lip -SBRN2 มีคุณสมบัติเป็น amphipathic คือมีทั้งบริเวณที่เป็น hydrophilic และ hydrophobic (รูปที่ 16) โดยเส้นกราฟที่อยู่เหนือแกนแสดงบริเวณที่เป็น hydrophilic และเส้นกราฟที่อยู่ใต้แกนแสดงบริเวณที่เป็น hydrophobic

10 20 30 40 50 60
 ATGCTGTCTGTTGTGTCCTGATTTTCGTTCGGCCTTCAGCAGCTTCGCGCCTTCCCAC
 / / /
 MspI AluI
 HpaII
 HaeIII

70 80 90 100 110 120
 AATCCGGTCGTCATGGTCCACGGCATCGGCGGAGCCGATTATAACTTCATCGGCATTAAA
 / /
 MspI Eco47I
 HpaII Cfr13I
 Sau96I

130 140 150 160 170 180
 TCGTATTTACAATCTCAAGGCTGGACAAGCAGTGAGCTTTACGCCATCAACTTTATCGAT
 /
 AluI BanIII
 TaqI

190 200 210 220 230 240
 AAAACGGGAAATAATATAAACAATGCTCCGAGATTATCCGAATACATCAAGCGTGTGCTG
 /
 HinfI

250 260 270 280 290 300
 AATCAAACAGGAGCATCAAAAGTCGATATTGTGCGCCACAGCATGGGCGGGCCAATACG
 / / /
 MnlI TaqI Sau96I
 Cfr13I
 HaeIII

310 320 330 340 350 360
 CTCTATTATATTAATAATCTGGATGGTGCGGATAAAGTCGGACATGTCGTCACCCTTGGG
 /
 StyI

370 380 390 400 410 420
 GGCCTAATCGTCTCGTTACAAACACGGCGCCTCAGAATGACAAAATCTCATACTTCG
 // / / / / /
 HaeII BanI DdeI
 HhaI EheI
 HinII
 NarI
 HaeII
 HhaI TaqI

430 440 450 460 470 480
 ATTTACAGCACAAGCGACTATATCGTCTTAAACAGCCTCTCCAAACTTGATGGTGCAAAC

490 500 510 520 530 540
 AATGTGCAAATCTCAGGCGTAAGCCATGTCGGTCTTTTGTTCAGCAGCAAAGTAAATGCC
 /
 DdeI
 MnlI

550 560 570 580
 TTGATTAAAGACGGGCTGACCGCCAGCGGGAAATAA

Res. Ezm. : Recog. Seq.

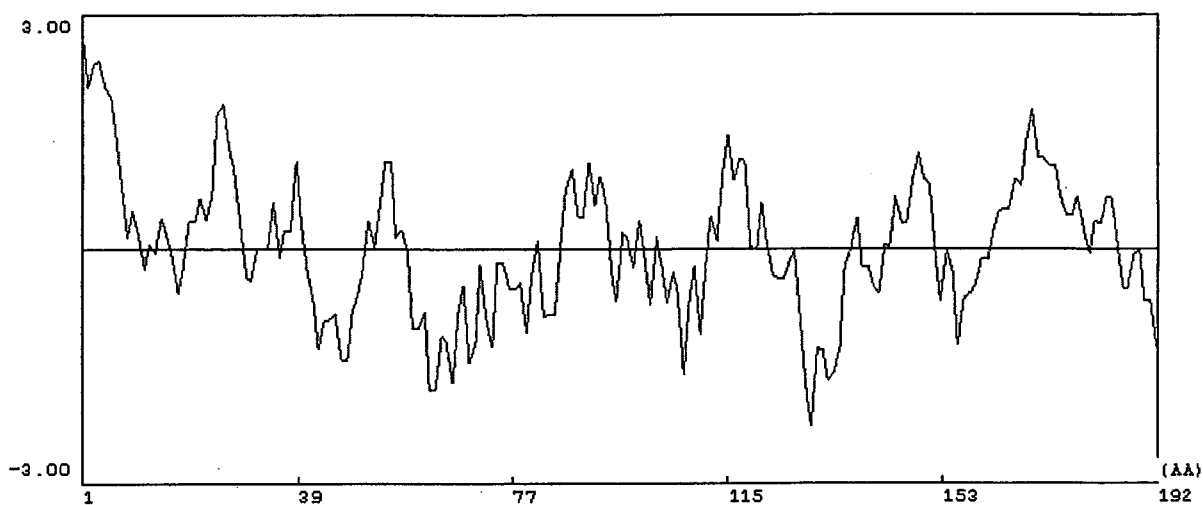
Count: Sequence Pos.

AluI	: AGCT	(2):	42	155
BanI	: GGYRCC	(1):	387	
BanIII	: ATCGAT	(1):	175	
Cfr13I	: GGNCC	(2):	75	290
DdeI	: CTNAG	(2):	392	492
Eco47I	: GGWCC	(1):	75	
EheI	: GGCGCC	(1):	387	
HaeII	: RGC GCY	(2):	361	387
HaeIII	: GGCC	(2):	32	291
HhaI	: GCGC	(2):	362	388
Hin1I	: GRCGYC	(1):	387	
HinfI	: GANTC	(1):	240	
HpaII	: CCGG	(2):	30	64
MnlI	: CCTG/CAGG	(2):	248	494
MspI	: CCGG	(2):	30	64
NarI	: GCGGCC	(1):	387	
Sau96I	: GGNCC	(2):	75	290
StyI	: CCWWGG	(1):	354	
TaqI	: TCGA	(3):	176	263
418				

Selected Enzymes With No Recognized Positions

AatI	AatII	AccI	AflII	Alw44I	ApaI	AseI	AvaI
BamHI	BanII	BbrPI	BclI	BfrI	BglI	BglIII	Bpu1102I
Bsh1236I	BsiWI	BsmI	BssHII	BstEII	BstXI	Cfr10I	Cfr9I
Csp45I	CspI	DpnI	DraI	DraIII	Eam1104I	Eco105I	Eco52I
Eco81I	EcoO109I	EcoRI	EcoRII	EcoRV	EcoT22I	FspI	Eco47III
HincII	HindIII	HpaI	KpnI	MboII	MluI	MroI	MscI
MunI	MvaI	NaeI	NciI	NcoI	NdeI	NheI	NotI
NruI	NspV	PacI	PpuMI	PstI	PvuI	PvuII	RsaI
SacI	SacII	Sali	SanDI	Sau3AI	ScaI	ScrFI	SfiI
SmaI	SpeI	SphI	SrfI	SspI	TspEI	XbaI	XhoI
XhoII	XmnI						

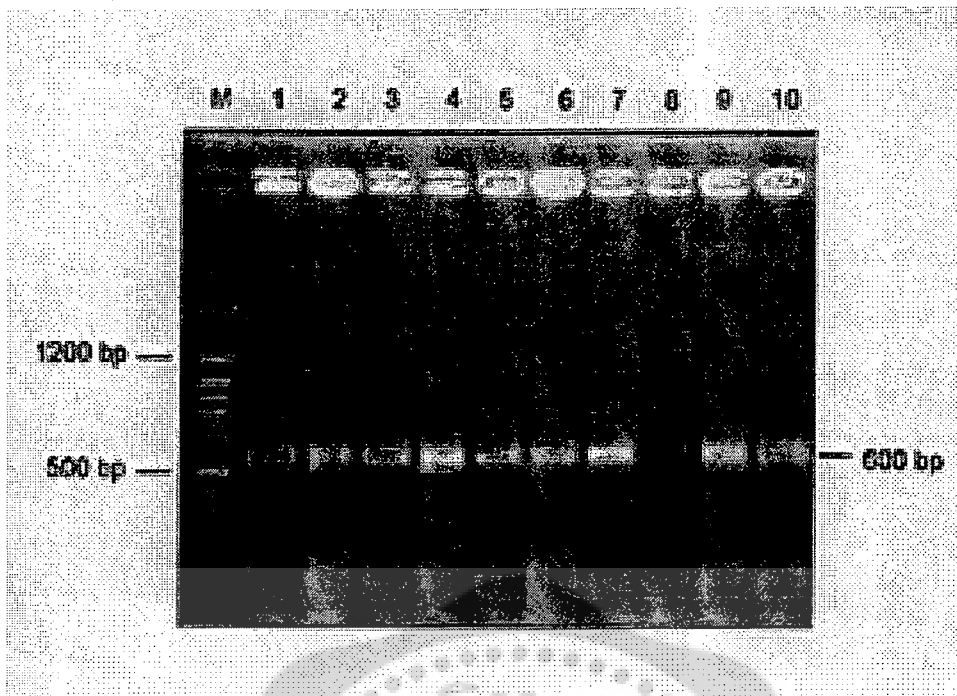
รูปที่ 15 แสดงแผนที่จำลองการตัดลำดับเบสของยีน *Lip -SBRN2* ที่ตัดด้วย restriction enzyme ต่างๆ



รูปที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติ hydrophilicity / hydrophobicity ของยีน *Lip-SBRN2*

4.5 การทำโคลนนิ่ง

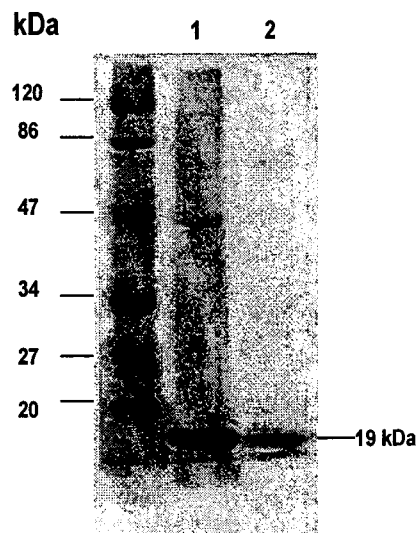
ได้นำชิ้นส่วน PCR product ของยีน *Lip-SBRN2* มาโคลนนิ่งโดยใช้ Champion™ pET Directional TOPO® expression kit (Invitrogen) แล้วนำโคโลนีที่ได้มาทำ PCR แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose eletrophoresis ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 แสดงผลของ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 600 bp โดยทำการเพิ่มขยายมาจากโคลน 10 โคลน ของ *Lip-SBRN2*

4.6 การแสดงออกของยีนไลเปส

เลือกโคโลนีที่ได้จากข้อ 4.5 มาสกัดพลาสติกแล้วมา transformed อีกครั้งหนึ่งในเซลล์ของ *E. coli* BL21(DE3) แล้วเหนี่ยวนำการสร้างเอ็นไซม์ด้วยสาร IPTG แล้วนำมาใส่ในสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ แล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วมาแยกดูโปรตีน ใน 12.5% SDS-PAGE นำมาย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าแถบของโปรตีน *Lip-SBRN2* มีค่าประมาณ 19 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน (ดังรูปที่ 18)



รูปที่ 18 แสดงผลจาก acrylamide gel ของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ที่ได้จากการแยกโดย
กระแสไฟฟ้าใน 12.5% SDS-PAGE

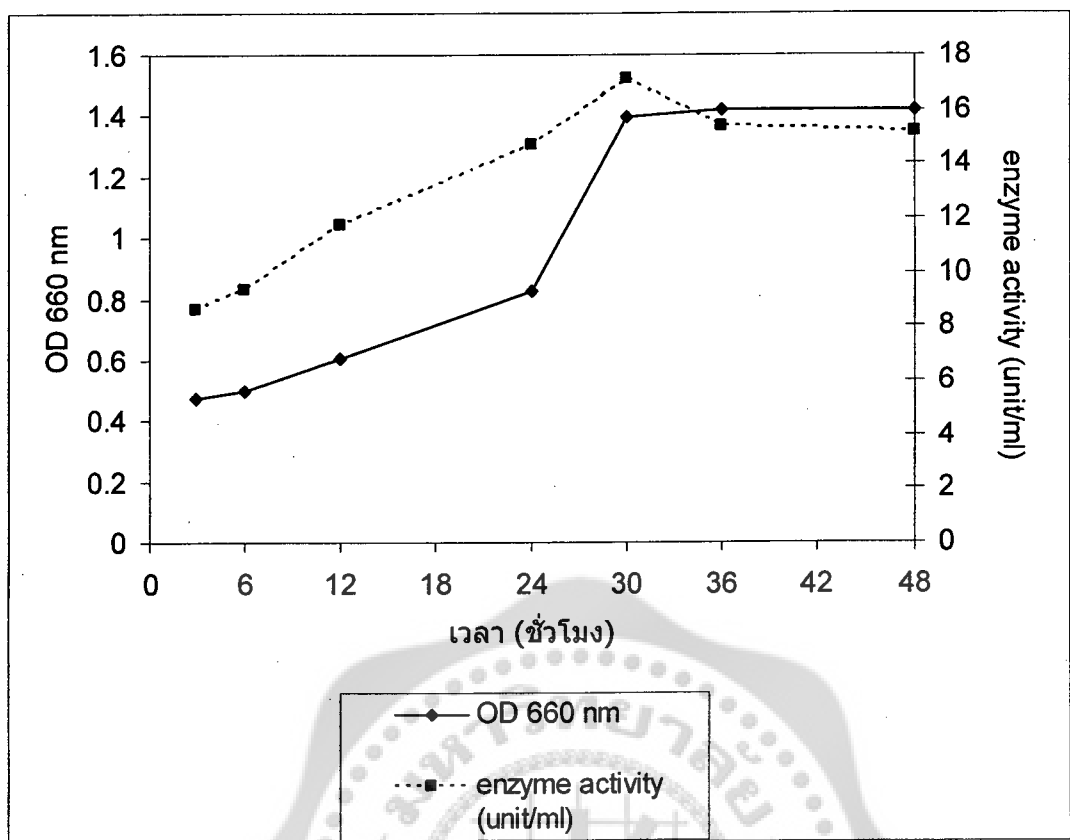
แถว M = โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 = CRUDE Lip-SBRN2

แถวที่ 2 = เอนไซม์ Lip-SBRN2 จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ NI-
NTA COLUMN

4.7 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ Lip-SBRN2 และการผลิตเอนไซม์ไลเปส

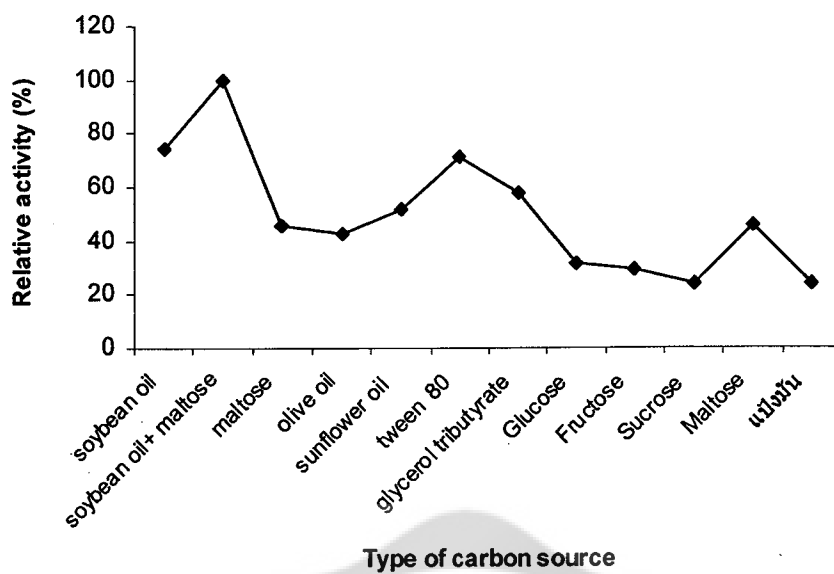
จากการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ใน LB ที่เติม 1mM IPTG, 50 ug/ml ampicillin และ 1% กลูโคสและนำไปปั่นบนเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 rpm. วัดการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Lip-SBRN2 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง ดังรูปที่ 19



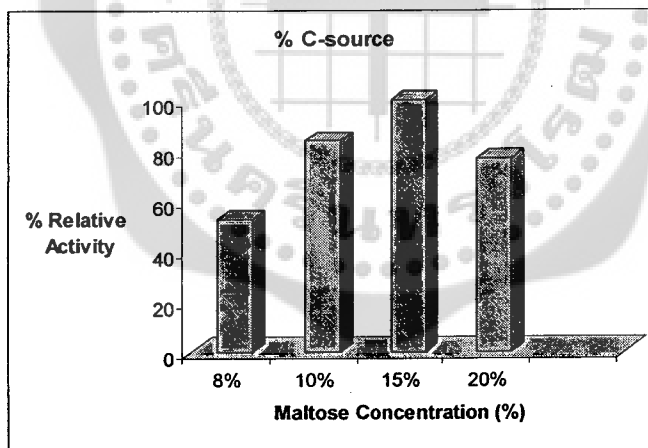
รูปที่ 19 การเจริญของ Lip-SBRN2 ที่ผลิตไลเปสและแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

4.8 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

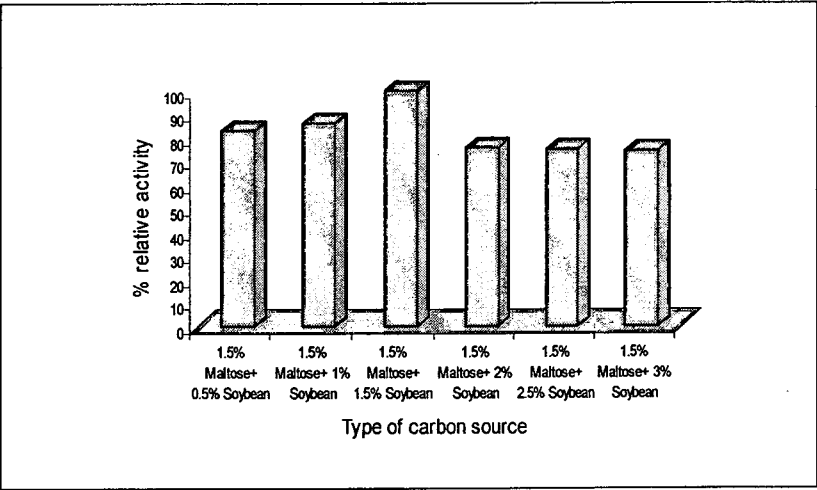
จากการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน LB ที่แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันต่างๆ เช่น น้ำมันมะกอก(olive oil) น้ำมันถั่วเหลือง(soy bean oil) น้ำมันดอกทานตะวัน(sun flower oil) tween80 glycerol tributyrate และน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส มอลโทส ฟรุคโทส และซูโครส และมอลโทสที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง และวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใส พบว่าน้ำตาลมอลโทสที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยปริมาณที่เหมาะสมคือน้ำตาลมอลโทส 15 g/l ที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 1.5 % ดังรูปที่ 20 - 22



รูปที่ 20 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน



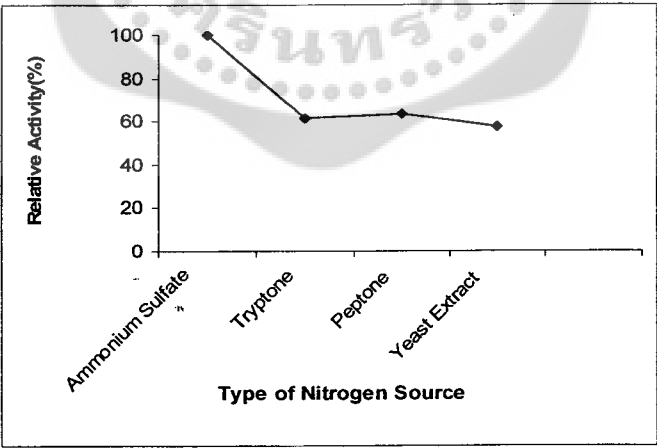
รูปที่ 21 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณมอลโทส



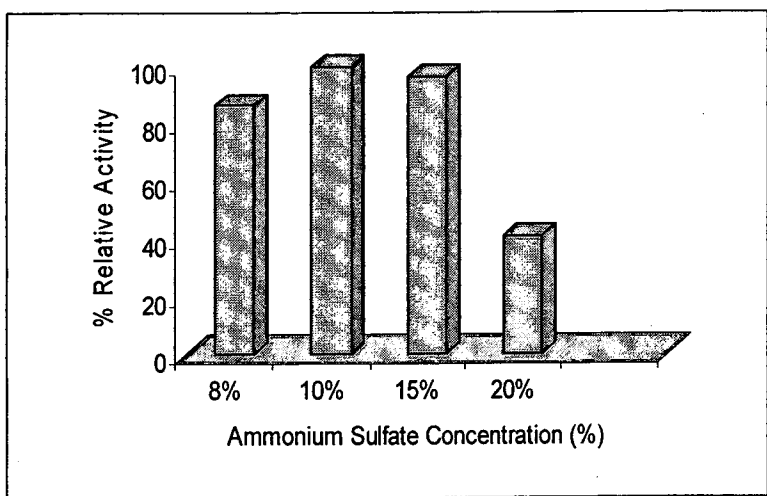
รูปที่ 22 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันตามปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง

4.9 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน LB ที่มีมอลโทส 15 กรัม/ลิตรและน้ำมันถั่วเหลือง 1.5% และแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ tryptone peptone yeast extract และแอมโมเนียมซัลเฟต และวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำใส พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยปริมาณที่เหมาะสมคือ 10 mg./ml. ดังรูปที่ 23 และ 24



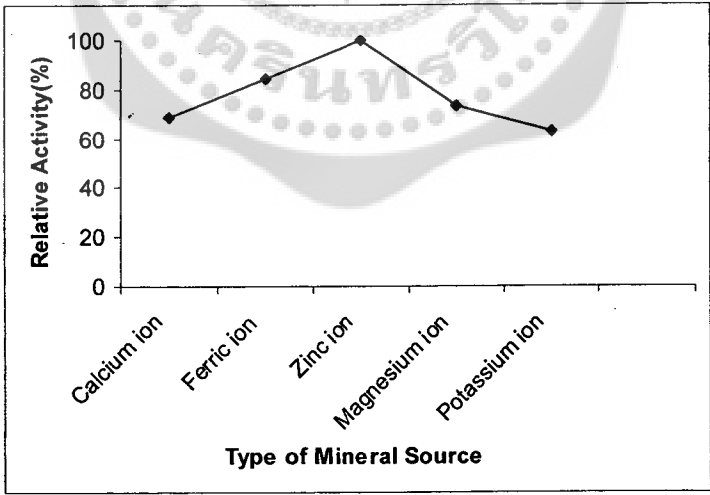
รูปที่ 23 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน



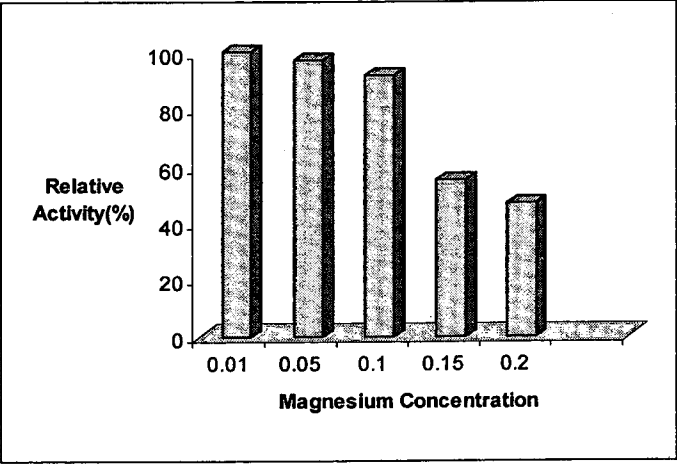
รูปที่ 24 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสจาก Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

4.10 การแปรผันชนิดและปริมาณเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

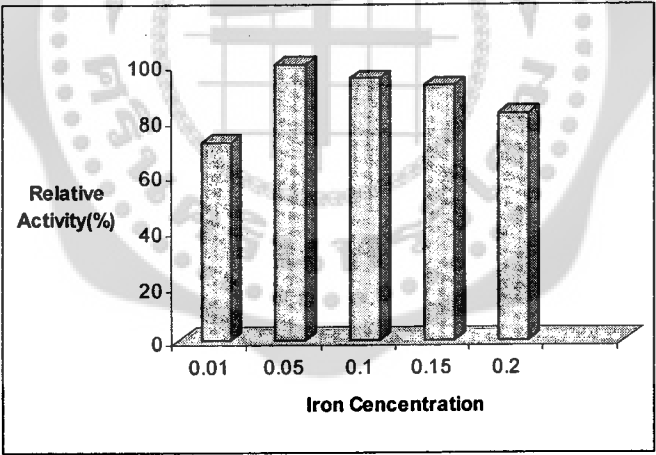
จากการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในLB ที่แปรผันชนิดและปริมาณเกลือแร่ต่างๆ และวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์จากส่วนน้ำไล พบว่า เกลือแร่ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้แก่ 10%NaCl, .15%ZnCl₂, 0.01% MgSO₄.7H₂O,0.05% FeSO₄ และ 0.05% CaCl₂ ดังรูปที่ 25 - 29



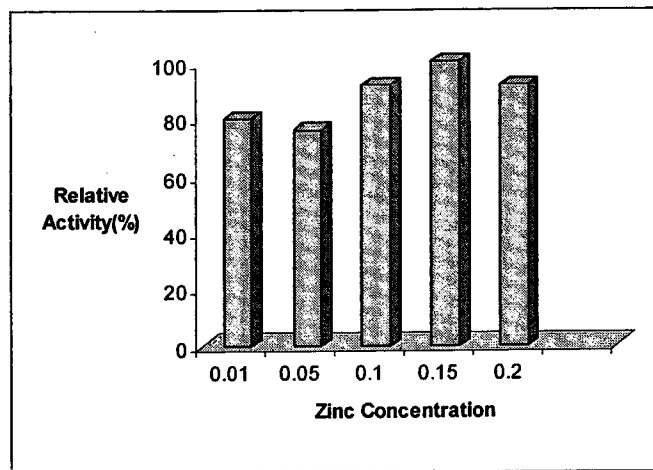
รูปที่ 25 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันชนิดของเกลือแร่



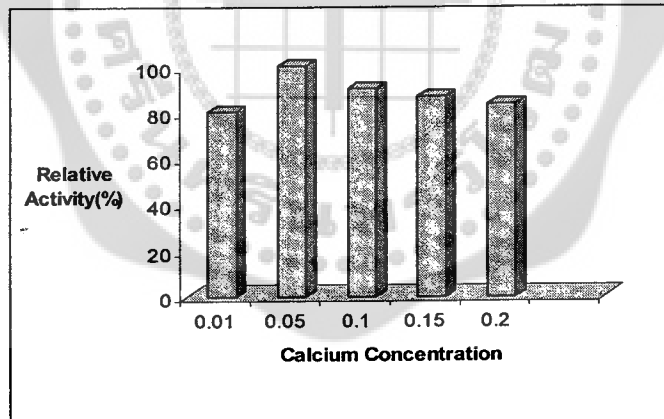
รูปที่ 26 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต



รูปที่ 27 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณของเฟอร์ริกคลอไรด์



รูปที่ 28 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณของสังกะสีคลอไรด์

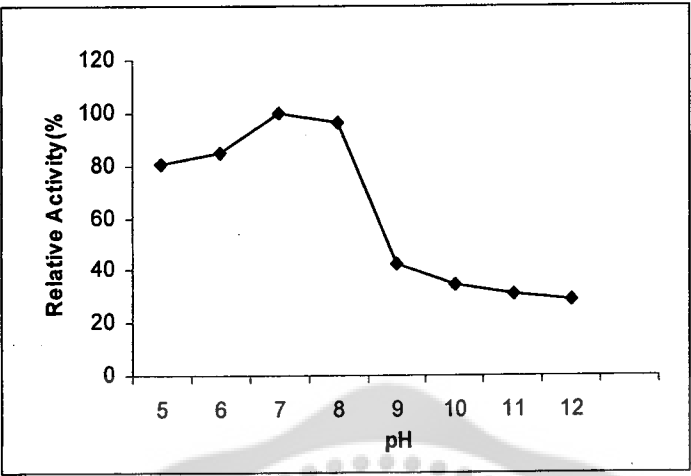


รูปที่ 29 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนต

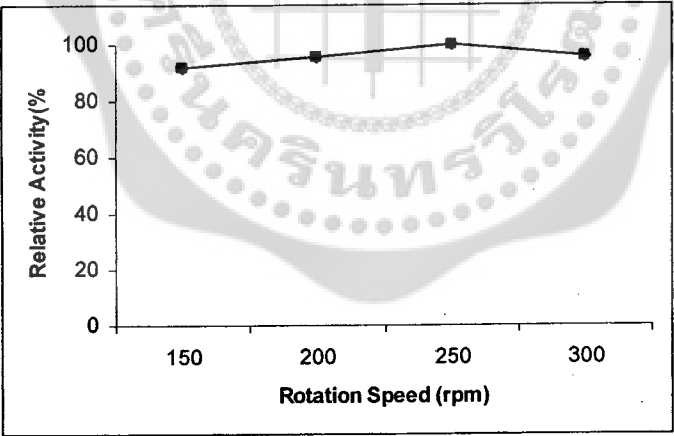
4.11 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูง

จากการเลี้ยงเชื้อ Lip-SBRN2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.8 -4.10 และแปรผันสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ดังนี้ pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ(ตั้งแต่ pH5-12) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ(37°C - 60°C) และการให้อากาศ (ที่ความเร็วรอบตั้งแต่ 150-300 rpm.) พบว่าสามารถผลิต

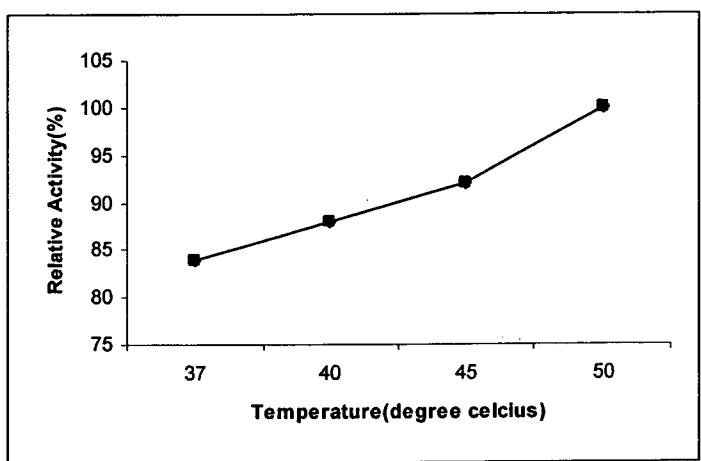
เอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 50°C ให้อากาศด้วยการ
เขย่าที่ความเร็ว 250-300 รอบ/นาที ดังรูปที่ 30 - 32



รูปที่ 30 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 31 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันความเร็วรอบในการให้
อากาศ



รูปที่ 32 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไลเปสของ Lip-SBRN2 ในอาหารที่แปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

4.12 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์ไลเปสจากข้อ 4.6 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการทำข้อ 3.8 หน้า 25 แล้วทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ระหว่าง crude enzyme กับ recombinant lipase (Lip -SBRN2) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมดมีค่า 1,100 ยูนิตจากการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 50 มิลลิลิตร พบการกระจายตัวของเอนไซม์ภายนอกเซลล์ต่อเอนไซม์ภายในเซลล์เป็นอัตราส่วน 3: 1 โดยเอนไซม์ที่เซลล์ *E.coli* ผลิตออกมานอกเซลล์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *Bacillus sp.* RN2 มีค่า 0.7 ยูนิต/มิลลิลิตร พบว่าการสร้างเอนไซม์สูงขึ้นจากเชื้อดั้งเดิมถึง 20 เท่า ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus sp.* RN2 และแบบ Recombinant lipase (Lip-SBRN2)

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาตร (ml)	Total activity (U)	Enzyme activity (Units/ml)
Native lipase	50	35.3	0.7
Recombinant lipase (Lip-SBRN2)	50	842	17

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 74 เท่า ได้ผลผลิต 51 % และได้ค่า specific activity เท่ากับ 118 U mg^{-1} และเมื่อตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้ Ammonium sulfate พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่าได้ผลผลิตเท่ากับ 40 % และได้ค่า specific activity เท่ากับ 3.7 U mg^{-1} (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 PURIFICATION OF A ENZYME Lip-SBRN2(RECOMBINANT *BACILLUS* SP. RN2 LIPASE)

Step	Volum e (ml)	Total activity (U)	Total		Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification factor(fold)	Recover y yield (%)
			activity/ ml (U/ml))	Total protein (mg			
Intracellular Enzyme							
Crude extract	5	281	56.2	174	1.6	1	100
Ni-NTA column	2	144	72	1.3	118	74	51
Extracellular Enzyme							
Crude supernatant	50	842	16.84	257	1.6	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	10	341	34.1	93	3.7	2.3	40

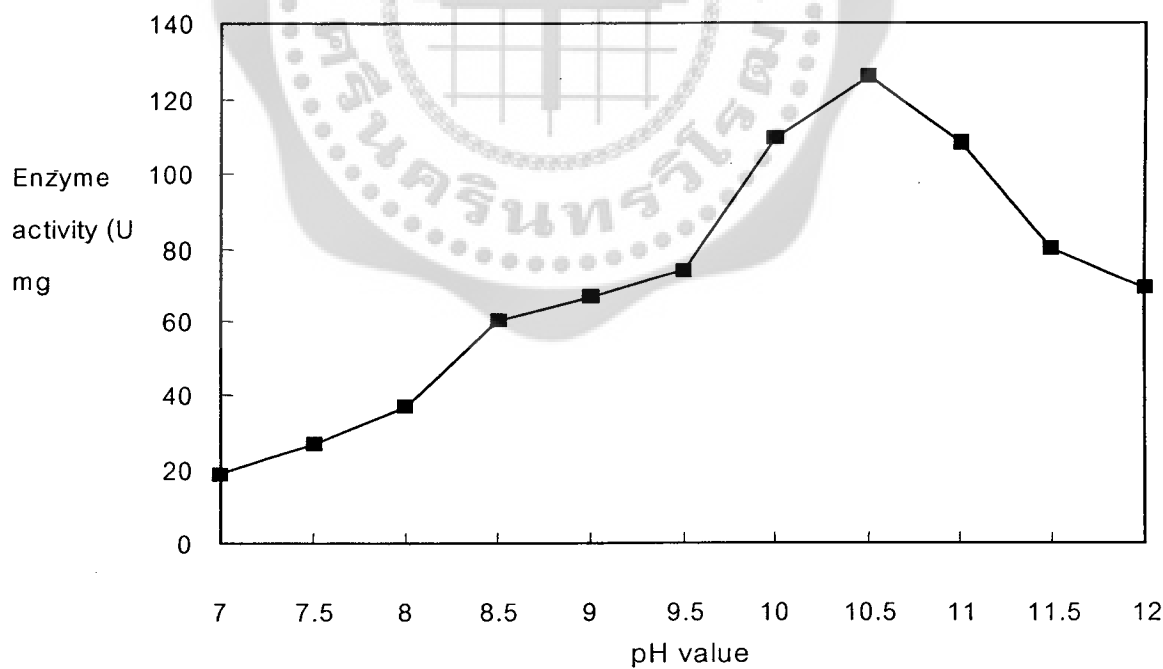
4.13 ผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ไลเปสจาก Lip-SBRN2

4.13.1 ผลการทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอนไซม์ในสารละลายที่เป็นกรด-เบส

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาทำการทดสอบใน substrate solution ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 7.0-12.0 และ solution B ซึ่งประกอบด้วยสารอนุพันธ์ของกรดไขมัน *p*-nitrophenyl laurate (C12) ติดตามผลการทดลองได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ Lip-SBRN2 ความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ค่า pH ช่วง 10-11 โดยค่าที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ค่า pH 10.5 (ดังตารางที่ 21, รูปที่ 33)

ตารางที่ 21 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ใน pH ต่างๆกัน

pH	Enzyme activity (U mg-1)	Relative activity (%)
7	17	16
7.5	27	21
8	37	29
8.5	60	48
9	67	53
9.5	74	59
10	109	85
10.5	129	100
11	108	86
11.5	80	64
12	69	55



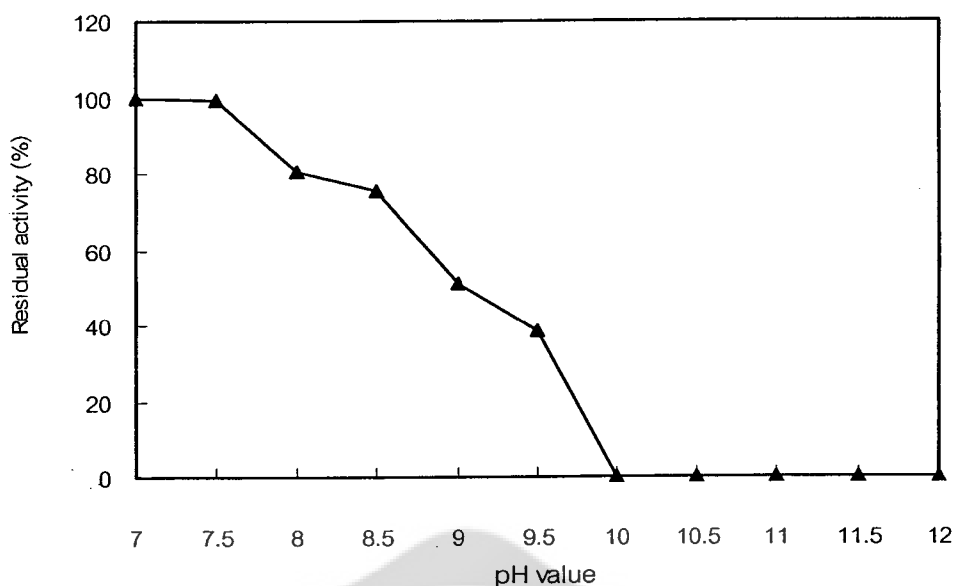
รูปที่ 33 การทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในสารละลายที่เป็นกรด-เบส

4.13.2 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนสารละลายที่เป็นกรด- เบส

ทำการทดสอบโดยนำเอนไซม์มาบ่มใน substrate solution ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 7.0-12.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และหยุดปฏิกิริยา ต่อจากนั้นทำการทดสอบหาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ Lip-SBRN2 มีความสามารถทนค่า pH ช่วง 7-9 ได้ดี แต่ที่ค่า pH สูงขึ้นความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับและถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ที่ค่า pH ช่วง 10-12 (ตารางที่ 22 รูปที่ 34)

ตารางที่ 22 แสดงความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ใน pH ต่างๆ

pH	Enzyme activity (U mg-1)	Residual activity (%)
7	80	100
7.5	75	99
8	65	81
8.5	56	70
9	42	51
9.5	31	38
10	0	0
10.5	0	0
11	0	0
11.5	0	0
12	0	0



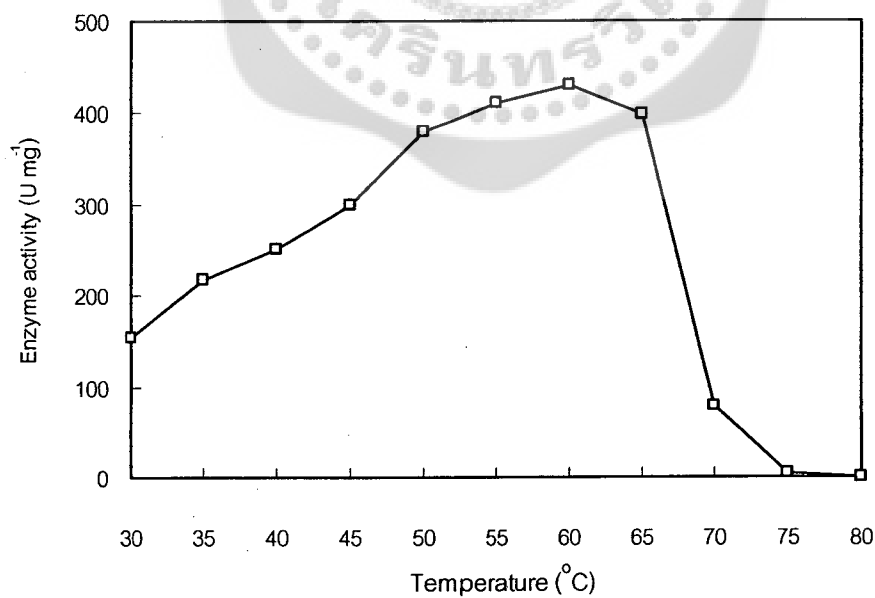
รูปที่ 34 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนสารละลายที่เป็นกรด-เบส

4.13.3 ผลการทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอ็นไซม์ Lip-SBRN2 ในอุณหภูมิต่างๆ

นำเอ็นไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาทำการทดสอบเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่างกัน (30°C - 80°C) เมื่อติดตามดูได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอ็นไซม์ไลเปสมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิช่วง 55°C - 65°C โดยค่าที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่อุณหภูมิ 60°C (ดังตารางที่ 23 รูปที่ 35)

ตารางที่ 23 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในอุณหภูมิต่างๆ

Temperature (°C)	Enzyme activity (U mg ⁻¹)	Relative activity (%)
30	40	36
35	57	51
40	65	58
45	78	69
50	99	23
55	107	96
60	112	100
65	104	93
70	20	18
75	1	0.8
80	0	0



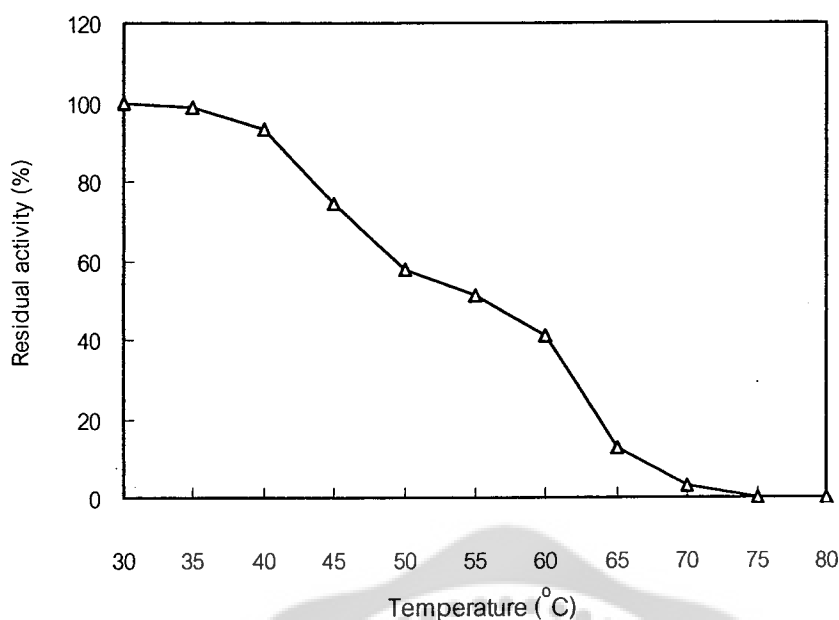
รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบความเหมาะสมการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในอุณหภูมิต่างๆ

4.13.4 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่ออุณหภูมิ
ต่างๆ

ทำการทดสอบโดยนำเอนไซม์มาบ่มใน potassium phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ
ช่วง 30 °C-80 °C เป็นเวลา 30 นาที และทำการทดสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่
เหลือด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์
Lip-SBRN2 มีความสามารถทนอุณหภูมิ ช่วง 30 °C - 55 °C โดยค่าการทำงานของเอนไซม์
คงเหลือเท่ากับ 50% ที่อุณหภูมิ 55 °C และลดลงเท่ากับ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C (ตารางที่
24 รูปที่ 36)

ตารางที่ 24 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ที่อุณหภูมิต่างๆ

Temperature (°C)	Enzyme activity (U mg ⁻¹)	Residual activity (%)
30	97	100
35	96	99
40	91	93
45	73	75
50	56	58
55	52	51
60	40	41
65	14	13
70	3	3
75	0	0
80	0	0



รูปที่ 36 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ

4.13.5 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่อ metal ions, inhibitors and detergents

ทำการทดสอบโดยนำเอนไซม์ Lip-SBRN2 มาบ่มใน potassium phosphate buffer pH 7.0 โดยเติมสารละลายของ metal ions, inhibitors and detergents ต่างๆ 100 μ l บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และทำการทดสอบหาแอกติวิตีที่เหลือด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่า metal ions ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ LIP-SBRN2 ในขณะที่ heavy metal ions เช่น Ni^{2+} and Ag^+ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย และมีไอออนบางตัว เช่น NH_4^+ , Ca^{2+} และ Zn^{2+} มีผลต่อการเพิ่มของแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ และเมื่อทำการบ่ม ethyline diaminetetraacetic acid (EDTA), β -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT) and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 25)

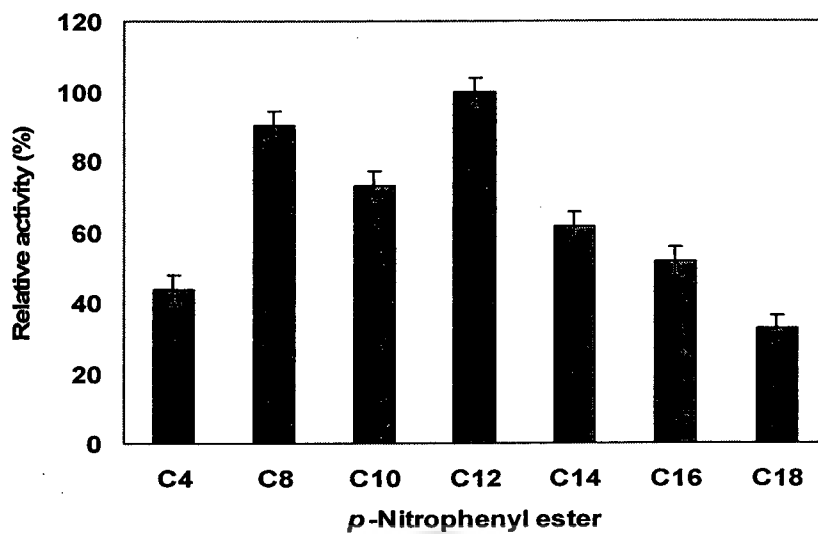
ตารางที่ 25 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการทนต่อ metal ions, inhibitors and detergents

Reagent	Enzyme activity (U mg ⁻¹)	Relative activity(%)
Control	97	100
NaCl	89	94
MgCl	84	89
KCl	86	91
AgCl	84	88
NH ₄ Cl	99	104
CaCl ₂	104	110
NiCl ₂	89	94
ZnCl ₂	125	132
EDTA	86	91
SDS	77	82
β-Mercaptoethanol	80	86
DTT	78	83

4.13.6 การทดสอบความสามารถของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการย่อยสับเสรด

4.13.6.1 การใช้สับเสรดที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมัน

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสับเสรดใน substrate solution โดย solution B ซึ่งประกอบด้วยสารอนุพันธ์ของกรดไขมัน *p*-nitrophenyl ที่ความยาวคาร์บอนแตกต่างกัน (C4-C18) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ Lip-SBRN2 มีความสามารถในการย่อยสับเสรดที่มีความยาวของสายคาร์บอนขนาดกลางคือ C8-C12 ได้ดีที่สุด โดยที่ความยาวสายคาร์บอนสูง (C14-C16) ความสามารถของเอนไซม์จะลดลง (ดังรูปที่ 37)

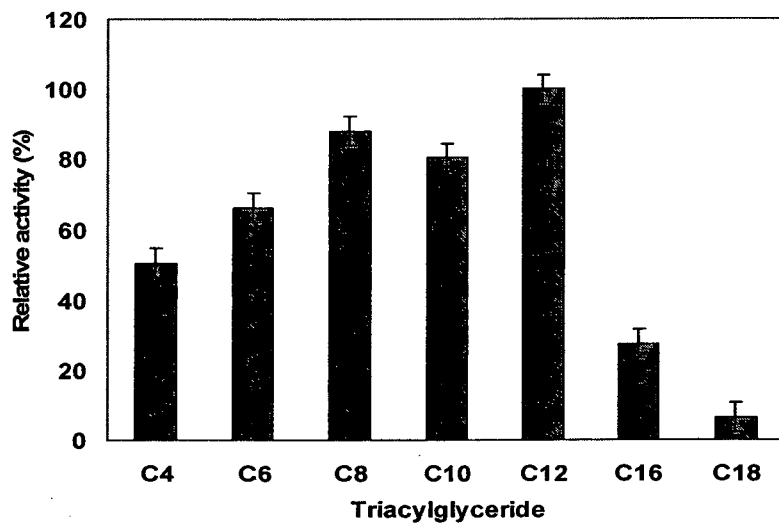


รูปที่ 37 ผลการทดสอบความสามารถของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการย่อยซับสเตรตโดยใช้ซับสเตรตที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันโดยใช้สารดังต่อไปนี้

- C4 (*p*-NP BUTYRATE)
- C8 (*p*-NP CAPRYLATE)
- C10 (*p*-NP CAPRATE)
- C12 (*p*-NP LAURATE)
- C14 (*p*-NP MYRISTATE)
- C16 (*p*-NP PALMITATE)
- C18 (*p*-NP STEARATE)

4.13.6.2 การใช้ซับสเตรตที่เป็นไตรเอซิลกลีเซอไรด์

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ Lip-SBRN2 มีความสามารถในการย่อยไตรเอซิลกลีเซอไรด์ที่มีความยาวของสายคาร์บอนขนาดกลางคือ C8-C12 โดยที่ความยาวสายคาร์บอนของไตรเอซิลกลีเซอไรด์สูงๆ (C14-C16) ความสามารถของเอนไซม์จะลดลงซึ่งผลการทดลองที่ได้จะสอดคล้องกับวิธีแรก (ดังรูปที่ 38)



รูปที่ 38 การทดสอบความสามารถของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ในการย่อยไขมันโดยการ
ใช้ไขมันที่เป็นไตรเอซิลกลีเซอไรด์โดยใช้สารดังต่อไปนี้

C4 (TRIBUTYRIN)

C6 (TRICAPROIN)

C8 (TRICAPRYIN)

C10 (TRICAPRIN)

C12 (TRILAURIN)

C16 (TRIPALMITIN)

C18 (TRISTEARIN)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองได้นำตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนที่จังหวัดระนองและจังหวัด เชียงใหม่ มาแยกเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ชื่อ RN2 มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ RN2 มาย้อมแกรมพบว่า RN2 ที่ได้เป็นจุลินทรีย์ที่เป็น aerobic, แกรม + , รูปร่างเป็นท่อน, มีเอ็นโดสปอร์ และเมื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมีโดย API 50CHB kit พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ RN2 ใกล้เคียงกับเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับการทำ phylogenetic tree ในส่วนของ hypervariable region ของ 16S rRNA โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ RN2 ใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* โดยมีค่า bootstrap 98% เมื่อนำเอา *Bacillus* sp. RN2 มาสกัดดีเอ็นเอแล้วมาทำพีซีอาร์ในส่วนของยีนไลเปส แล้วนำมาหาลำดับเบสพบว่ายีน *Lip-SBRN2* มี nucleotide homology 100%, 64.8%, 62.8% เมื่อเทียบกับยีนไลเปสของ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ตามลำดับ แล้วนำนิวคลีโอไทด์มาเทียบเป็นกรดอะมิโนแล้วนำกรดอะมิโนนั้นมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Signal P พบว่ามีกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งของ signal peptide อยู่ 17 ตัวที่บริเวณปลาย N และพบตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีนไลเปส RN2 เป็นอะลานีน, ฮิสติดีน, เซอรีน, เมไทโอนีน และไกลซีน มีมวลโมเลกุลประมาณ 19 kDa และเมื่อนำยีนไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์ RN2 มาโคลนแล้วเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Lip-SBRN2* พบว่าเอนไซม์ *Lip-SBRN2* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *Bacillus* sp. RN2 มีค่าเท่ากับ 0.7 ยูนิต/มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะเห็นได้ว่าถ้านำเอายีน *Lip-SBRN2* มาแสดงออกพบว่าการสร้างเอนไซม์สูงขึ้นจากเดิมถึง 20 เท่า และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Lip-SBRN2* พบว่า สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Lip-SBRN2* ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ มอลโทส 15 mg./ml. น้ำมันถั่วเหลือง 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต 10 mg./ml. 10%NaCl, 15%ZnCl₂, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.05% FeSO₄ และ 0.05% CaCl₂ pH 7 จากสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้ พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้จะเป็นน้ำตาลมอลโทสที่มีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ซึ่งจะเห็นว่าให้ผลดีกว่าการใช้น้ำมันหรือน้ำตาลอย่างเดียวการผลิตเอนไซม์ และมีการเติมเกลือแร่บางชนิด ซึ่งจำเป็นต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ เช่น MgSO₄ และ CaCO₃ เพื่อช่วยให้มี heat stability และเมื่อนำเอายีน *Lip-SBRN2* มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity chromatography พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 74 เท่า ได้ผลผลิต 51% และได้ค่า specific activity เท่ากับ 118 U/mg⁻¹ จากการใช้ *p*-nitrophenyl laurate เป็นสับสเตรต และเมื่อนำเอาเอนไซม์ *Lip-SBRN2* มาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ พบว่าเอนไซม์ *Lip-SBRN2* มีความเหมาะสมในการทำ

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 °C ค่า pH ที่ 10.5 ซึ่งถ้าเรานำเอาเอนไซม์ Lip -SBRN2 มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสใน subfamily I-5 และ subfamily I-4 จะพบว่าเอนไซม์ Lip -SBRN2 มีค่าใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ใน subfamily I-4 (ดังตารางที่ 26) และจากการทดลองนี้สรุปได้ว่าคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ซึ่งเป็น recombinant enzyme ที่แสดงออกเหมือนกันกับเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. RN2 เพียงแต่การผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 20 เท่า

ตารางที่ 26 คุณสมบัติของเอนไซม์ Lip-SBRN2 ทางชีวเคมีเทียบกับเอนไซม์ไลเปส subfamily I-5 และ subfamily I-4

<i>Bacillus</i> isolates	M(kDa)	pI ^a	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Temperature stability	Substrate specificity
Crude lipase <i>Bacillus</i> sp. RN2	18.5	9.05	10.5	60	50%	C8-C12
Recombinant lipase <i>Bacillus</i> sp. RN2	18.5	9.05	10.5	60	50%	C8-C12
Subfamily I.4						
<i>B. licheniformis</i>	19.2	9.46	10-11.5	55	25%	C6
<i>B. subtilis</i>	19.3	9.25	10	ND	25%	C8
<i>B. pumilus</i>	19.2	9.43	8.5	40	25%	ND
Subfamily I.5						
<i>B. thermocatenulatus</i>	43.2	6.37	8.5	55-65	90%	C8
<i>B. thermoleovarans</i>	43.1	6.19	7.5	75	90%	ND
<i>B. stearothermophilus</i>	43.2	6.15	9-10	60-65	90%	C8

เอกสารอ้างอิง

1. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol 1998;16(9):396-403.
2. Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angew Chem Int Ed Engl 1998;37:1603-33.
3. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol 1998;16(9):396-403.
4. Jaeger K, Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra B, et al. Bacterial lipases for biotechnological applications. J Mol Catalysis B: Enzymatic 1997;3:3-12.
5. Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Jr., Amundson CH. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme Microb Technol 1992;14(6):426-46.
6. Dandik L, Arioglu G, Aksoy H. The enzymatic hydrolysis of used frying oil by native lipase. Appl Biochem and Biotechnol 1993;42:119-26.
7. Rubin B, Dennis E. Methods in Enzymology: Lipases, Part A: Biotechnology: Academic Press; 1997.
8. Rubin B, Dennis E. Methods in Enzymology: Lipases, Part B: Enzyme Characterization and Utilization: Academic Press; 1997.
9. Kazlauskas R, Bornscheuer U. Biotechnology and Biotransformations with Lipases: Weinheim; 1998.
10. Woolley P, Petersen S. Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application: Cambridge University Press; 1994.
11. Gilbert EJ. Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning. Enzyme Microb Technol 1993;15(8):634-45.
12. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 1994;15(1):29-63.
13. Cano RJ, Colome JS. Temperature range for microbial growth. St. Paul: West Publishing Company; 1986.

14. Gilfillan WN. Thermophilic Anaerobic Sludge Digestion Characteristics Using Mesophilic Inoculum: University of Queensland; 1998.
15. Davis BD, Dulbecco R, Eisen H.N., Ginsberg H.S. The genus *Bacillus*. Singapore: The Benjamin / Cummings Company, Inc; 1990.
16. Pelczar j, M.J., Reid RD, Chan ECS. The aerobic spore-forming bacteria. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd; 1997.
17. Malcata F. Nato ASI Ser., Ser. E: Engineering of/with Lipases: Kluwer; 1996.¶
18. Coleman M, Macrae A, inventors. UK Patent No.1 577 933. 1980.
19. Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications. Trends Biotechnol 1997;15(10):401-9.
20. Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications. Trends Biotechnol 1997;15(11):470-8.
21. Akita H. [The use of microbial and enzymatic function in organic synthesis. Total synthesis of the aglycone of venturicidins A and B]. Yakugaku Zasshi 1990;110(11):789-806.
22. Jones BC, Silverton JV, Simons C, Megati S, Nishimura H, Maeda Y, et al. Synthesis, absolute configuration, and enantioselectivity of antiretroviral effect of (R)-(-)- and (S)-(+)-cytallene. Lipase-catalyzed enantioselective acylations of (+/-)-N4-acylcytallenes. J Med Chem 1995;38(8):1397-405.
23. Graffner-Nordberg M, Sjodin K, Tunek A, Hallberg A. Synthesis and enzymatic hydrolysis of esters, constituting simple models of soft drugs. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1998;46(4):591-601.
24. Pouderoyen Gv, Eggert T, Jaeger K-E, Dijkstra BW. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal / hydrolase fold enzyme. J Mol Biol 2001;309:215-26.¶
25. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem 1999;29 (Pt 2):119-31.
26. Matsumura F. Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes. Am J Clin Nutr 1995;61(3 Suppl):695S-701S.

27. Zha D, Wilensek S, Hermes M, Jaeger KE, Reetz MT. Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem Commun* 2001;2664-5.
38. Drauz K, Waldmann H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; 1995.
29. Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3rd edn ed: Springer; 1997.
30. Okahata Y, Mori T. Lipid-coated Enzymes as Efficient Catalysts in Organic media. *Trends Biotechnol* 1997;15:50-4.
31. Okahata Y, Fujimoto Y, Ijro K. A lipid-coated lipase as an enantioselective ester synthesis catalyst in homogeneous organic solvents. *J. Org. Chem.* 1995;60:2244-50.
32. Svendsen A, Borch K, Barfoed M, Nielsen TB, Gormsen E, Patkar SA. Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim Biophys Acta* 1995;1259(1):9-17.
33. Gotz F, Verheij HM, Rosenstein R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids* 1998;93(1-2):15-25.
34. Arpigny J, Jaeger K-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 1999;343:177-83.
35. Jaeger KE, Eggert T. Lipase for biotechnology. *Protein technologies and commercial enzymes* 2002;13:390-7.
36. Kazlauskas RJ, Weber HK. Improving hydrolases for organic synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2(1):121-6.
37. Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 1998;37:1603-33.
38. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 1990;343(6260):767-70.
39. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 1990;343(6260):771-4.
40. Cygler M, Schrag JD. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol* 1997;284:3-27.

41. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 1992;5(3):197-211.
42. Ransac S, Gargouri Y, Marguet F, Buono G, Beglinger C, Hildebrand P, et al. Covalent inactivation of lipases. *Methods Enzymol* 1997;286:190-231.
43. Labourdenne S, Cagna A, Delorme B, Esposito G, Verger R, Riviere C. Oil-drop tensiometer: applications for studying the kinetics of lipase action. *Methods Enzymol* 1997;286:306-26.
44. Verger R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 1997;15:32-38.
45. Bell PJ, Sunna A, Gibbs MD, Curach NC, Nevalainen H, Bergquist PL. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology* 2002;148(Pt 8):2283-91.
46. Dartois V, A B, K S, C C. Cloning, nucleotide sequence and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim Biophys Acta* 1992;1131:253-60.
47. Nthangeni MB, Patterson H, van Tonder A, Vergeer WP, Litthauer D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb Technol* 2001;28(7-8):705-12.
48. Ruiz C, Blanco A, Pastor FJ, Diaz P. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters* 2002;217:263-7.
49. Schmidt-Dannert C, Rua ML, Atomi H and Schmid RD. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:105-14.
50. Lee D, Koh Y, Kim K, Kim B, Choi H, Kim D, et al. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett* 1999;179:393-400.
51. Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(1):66-71.

52. Eggert T, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Jaeger KE. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem* 2000;267(21):6459-69.
53. Kim HK, Choi HJ, Kim MH, Sohn CB, Oh TK. Expression and characterization of Ca^{+2} -independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim Biophys Acta* 2002;1583(2):205-12.
54. Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* 1993;216(1):155-60.
55. Moller B, Vetter R, Wilke D, Foullois B, inventors; Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and *Bacilli* which produce the lipase. 1991.
56. Rua ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmid RD. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J Biotechnol* 1997;56(2):89-102.
57. Simons JW, van Kampen MD, Riel S, Gotz F, Egmond MR, Verheij HM. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*--comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *Eur J Biochem* 1998;253(3):675-83.
58. QIAGEN Inc. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Fifth edition; 2003.

ภาคผนวก

1. Tributyrin agar

Tributyrin agar	20	g.
Glycerin tributyrate	10	ml.
น้ำกลั่น	1000	ml.

วิธีเตรียม

- 1) ชั่ง Tributyrin agar 20 g.
- 2) เติม Glycerin tributyrate
- 3) เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 4) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกดูดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด เพื่อใช้ทำ Slant เก็บ Stock culture ต่อไป อีกส่วนหนึ่งบรรจุลงในขวดอาหาร
- 5) นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าเครื่อง autoclave เพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที
- 6) เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือตู้เย็น

2. Inoculum medium

olive oil	0.5	ml.
Peptone	0.3%	
Yeast extract	0.2%	
NaCl	0.05%	

2. Production medium

Olive oil	0.75	ml.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2%	
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%	
Yeast extract	0.02%	
CaCO_3	0.025g.	

CURRICULUM VITAE

Name : KOSUM CHANSIRI รหัสประจำตัว 38-20-0336

Date of Birth : 23 August 1961

Place of Birth : Bangkok, Thailand

Marital status : Single

Institutional Affiliation : Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Srinakharinwirot University,
Sukhumvit 23, Bangkok 10110,
Thailand.

Education : B.Sc. (Chemistry) 1983
Kasetsart University, Bangkok
M.Sc. (Biochemistry) 1985
Mahidol University, Bangkok
Ph.D. (Biochemistry and Molecular Genetics) 1994
University of New South Wales, Australia

Position Held :

1986-1995	Lecturer
1995-1999	Assistant Professor
1999-present	Associate Professor
1994-2003	Chairman, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.
2004-2005	Deputy Dean of Research Affairs Faculty of Medicine,

Srinakharinwirot University

Membership:

1. The Science Society of Thailand
2. Federation of Asian and Oceanian Biochemistry and Molecular Biologist
(FAOBMB)

3. Thai Society for Biotechnology (TSB)
4. Geographical Association of Thailand (GAT)
5. Remote Sensing and GIS Association of Thailand (RESGA)

Research Grants:

1. Comparative studies of cervical mucal proteins in fertile and infertile women. 1988 - 1989. Granted by national Research Council Of Thailand (NRCT). (Principal investigator)
2. Studies of Dihydrofolate reductase - Thymidylate synthetase (DHFR-TS) as a potential drug target in Babesiosis. 1994-1995. Granted by Srinakharinwirot University. (Co-investigator)
3. Characterization of Dihydrofolate reductase-Thymidylate synthetase in *Theilria* spp. found in Thailand. 1996-1998. Granted by National Research Council of Thailand. (Principal investigator)
4. Survey of hemoparasites in human and animals in Pakpree district, Nakhon nayok province. 1999. Granted by Srinakharinwirot University. (Principal investigator)
5. Cloning and expression of gene encoding for enzymes involved in fatty acid metabolism as drug target for treatment of *Plasmodium falciparum*. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2001. (Principal investigator)
6. Development of diagnostic kit for detection and discrimination of *Brugia* sp. Using PCR based methods. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2001. (Principal investigator)
7. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Granted by Thailand Tropical Diseases Research Program, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NSTDA). Project Number ID 00-1-HEL/MAL-10-004, December 2000 – May 2002. (Principal investigator)
8. Molecular epidemiological studies of Dengue virus in Thailand. Granted by Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health for year 2000-2001. (Co-investigator)
9. Epidemiological studies of periodontopathic bacteria in Thai people. Granted by Srinakharinwirot Research supplement budget of Fiscal Year 2002. (Co-investigator)

10. Identification and diagnosis of *Leptospira* in human and animal. Granted by Srinakharinwirot Research supplement budget of Fiscal Year 2002. (Co-investigator)
11. Identification and diagnosis of *Mycobacterium*. Granted by Srinakharinwirot Research supplement budget of Fiscal Year 2002. (Co-investigator)
12. Culture of chondrocytes. Granted by Srinakharinwirot Research supplement budget of Fiscal Year 2002-2004. (Co-investigator)
13. Filariasis: Molecular biological studies and drug treatment. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2003. (Principal investigator) 1,247,700 Baht.
14. Filariasis: Molecular biological studies and drug treatment. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2004. (Principal investigator) 1,244,400 Baht.
15. GIS study of most common infectious diseases in Savannakhet, PDR. Laos. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2004. (Principal investigator) 100,000 Baht.
16. Development of biosensor technology for medical, agricultural and environmental analysis. Granted by Ministry of University Affairs, Fiscal Year 2004. (Principal investigator) 3,500,000 Baht.
17. The production and value adding of biocatalysts and biomolecules from thermotolerant microorganisms. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2005. (Principal investigator) 1,100,000 Baht.
18. Development of biosensors for detection of infectious diseases and DNA fingerprint. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2006. (Principal investigator) 600,000 Baht.
19. Control and eradication of Filariasis. Granted by Srinakharinwirot Research budget of Fiscal Year 2006. (Principal investigator) 2,500,000 Baht

Fellowships and Academic Activities

1. Participant in the Asian Molecular Biology Organization (AMBO) Training Course on Gene Cloning and DNA Sequencing from 17-24 July 1988 at Kabansaan University, Malaysia.
2. Visitation fellow under sponsorship of the Japanese Supporting Program for Scientists (JSPS) from 1-30 April 1989 at Osaka University, Japan.
3. Ph.D. awardee under sponsorship of the Australian International Development Assiatant Bureau (AIDAB) from 18 July 1989-27 December 1993 at University of New South Wales, Sydney, Australia.
4. Visiting fellow under sponsorship of Thai Government from 7 February-30 April 1996 at Hokkaido University, Japan.
5. Postdoctoral fellow under sponsorship of Science and Technology Agency (STA) fellowship from December 1, 1996- February 28, 1997 at National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan.
6. Visiting fellow under sponsorship of International Livestocks Research Institute (ILRI) for 2 weeks (15-29 August 1997), Nairobi, Kenya.
7. Research presentation for the Parasitology Meeting during 14-19 September 1997. Supported by European Union (EU) at Xiaan City, People Republic of China.
8. Research presentation for Tick and Tick-borne diseases during September 12-16, 2000 at Shanghi, People Republic of China. Sponsored by European Union (EU).
9. Research fellow under sponsorship of JSPS-NRCT in Microbial resources from October 14- November 28, 2000 at Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.
10. Research fellow under sponsorship of JSPS-NRCT in Microbial resources from October 14- November 27, 2001 at Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.
11. Research fellow under sponsorship of JSPS-NRCT in Microbial resources from October 15- November 30, 2003 at Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.
12. Research fellow under sponsorship of JSPS-NRCT in Microbial resources from March 1- 30, 2004 at Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

13. Trainee in environmental biosensor under sponsorship of Ministry of University Affairs from March 11-21, 2005 at Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST), Ishigawa, Kanazawa, Japan.
14. Trainee in medical biosensor under sponsorship of Ministry of University Affairs April 1-10, 2005 at Cranfield University, Silsoe, UK.
15. Trainee in medical biosensor under sponsorship of Ministry of University Affairs April 1-10, 2005 at Geongsang University, Korea.
16. Research fellow under sponsorship of JSPS-NRCT in Microbial resources from October 1-10, 2005 at Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

Research Experiences:

Biochemistry and Molecular biology

1. Protein analysis of components in cervical mucus during menstrual cycle.
2. Diagnosis of infectious microorganisms in human and animals using PCR based methods.
3. Molecular studies of gene encoding for enzymes involved in nucleotide and fatty acid metabolism as drug targets for treatment and control parasites.
4. Molecular studies of gene encoding for lipases from thermotolerant *Bacillus* sp.
5. Use of bioactive substances extracted from medicinal plants as the anti-malarial drugs.
6. Molecular phylogenetic analysis and its applications.
7. Filariasis: Molecular biological studies and drug treatment
8. The production and value adding of biocatalysts, biosurfactants and antibiotics from thermotolerant microorganisms.
9. Development of biosensor technology for medical, agricultural and environmental diagnosis.

Presentations:

1. Chansiri, K., Charoennan, P. and Boonsaeng, V. 1984, Comparative studies of cervical mucal protiens during menstrual cycle, 10th Conference of Science and Technology of Thailand, Chiangmai, Thailand, B-11.
2. Chansiri, K., Charoennan, P. and Boonsaeng, V. 1995, Effect of Human seminal protease on human cervical mucal proteins, 11th Conference of Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, B-18.
3. Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P., Boonsaeng, V. and Panyim, S. 1986. A simple technique for detection of *Plasmodium falciparum* DNA. 5th Genetic Gengineering Conference, Shogkhla, Thailand.
4. Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P., Boonsaeng, V. and Panyim, S. 1986. The use of DNA probe for the detection of *Plasmodium falciparum*. 2nd Malaria Research Conference, Pattaya, Thailand.
5. Chansiri, K., Boonsaeng, V., Wilairat, P. and Panyim, S. 1988. Simple detection of *Plasmodium falciparum* using a cloned DNA probe. 7th FAOB Congress, malaysia.
6. Chansiri, K., 1988, DNA-DNA Hybridization. In. DNA Probe for diagnosis and detection of disease carrier. (Ed: Tungpradubkul, S), Center for Molecular genetic-Genetic Engineering.
7. Chansiri, K., Dawes, I. W., Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1992. Isolation of the gene coding for carbamoyl phosphate synthetase from *Babesia bovis* using the technique of polymerase chain reaction Parasitology Conference, Lorne, Victoria, Australia.
8. Chansiri, K., Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1994. Structural organization of the gene encoding carbamoyl phosphate synthetase II (CPSII) from *Babesia bovis*. 11th FAOBMB Sympasium, Bangkok, Thailand.
9. Chansiri, K., Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1994. Structural organization of the gene encoding carbamoyl phosphate synthetase II (CPSII) from *Babesia bovis*. In: Advance in Biochemistry and Molecular Biology, Proceeding of the 11th FAOBMB Symposium (IUBMB Symposium no 239) on Biopolymers and Bioproducts, 15-18 november 1994, Bangkok, Thailand.
10. Chansiri, K. Petchpoo, W., Uthaisang W., Onuma, M. and Sarataphan, N. 1996, Studies of gene encoding for thymidylate synthetase in *Theileria* found in

- Thailand. 22nd Congress in Science and Technology of Thailand, 16-18 October, p.404.
11. Sarataphan, N., Petchpoo, W., Uthaisang, W., Onuma, M. and Chansiri, K. 1996. Identification of bovine *Theileria* parasite found in Thailand by PCR amplification of the gene encoding for the surface protein. 22nd Congress on Science and Technology of Thailand, 16-18 October, p.405.
 12. Chansiri, K., Tananyutthawongse, C., Seangsombat, K., Sukhumsirichart, W., Uthaisang, W. and Sarataphan, N. 1998. Detection of bovine hemoparasites DNAs using multiplex polymerase chain reaction. VM012PRE (CD-ROM). Annual Conference of Kasetsart University 36th, 3-5 Feb.
 13. Sarataphan, N., Nilwarangkoon, S., Tananyutthawongse, C., Mungmuang, T., Onuma, M. and Chansiri, K. 1998. Allelic analysis of immunodominant major piroplasm surface protein genes of *Theileria* parasite in Thai cattle. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. B54.
 14. Sarataphan, N., Kerdmanee, C., Chansiri, K., Tan-ariya, P., Nokdhes, C. and Chansiri, G. 1998. The efficacy of medicinal plants as anti-parasitic drugs against *Theileria* sp. in in vitro culture of infected bovine erythrocytes. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. B 23.
 15. Chansiri, K., Nilwarangkoon, S., Sarataphan, N., Bhantana, S. and Thanomsap, B. 1998. Application of PCR for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* in Myanmar workers and mosquitoes. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. C23.
 16. Thanomsap, B., Sarataphan, N., Bhantana, S. and Chansiri, K. 1998. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP techniques. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. C22.
 17. Chansiri, K., Bhantana, S., Thanomsap and B. Sarataphan, N. 1999. PCR-RFLP Detection of *Brugia malayi* in feline blood specimens and mosquitoes. 17th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAVVP). Copenhagen, Denmark, 15-19 August, 1999.
 18. Tananyutthawongse, C., Sukhumsirichart, W., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Discrimination of filarial *Brugia* sp. based on the comparison of *HhaI* repeat, SL1 exon and GP29 PCR-RFLP profile. Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists 14th Symposium (FAOBMB) Dunedin, New Zealand, November 27- December 3, 1999.

19. Phantana, S., Chansiri, K and Sarataphan, N. Microfilarial effect of ivermectin on *Brugia malayi* in cats. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.
20. Sarataphan, N., Phantana, S., and Chansiri, K. Susceptibility of *Mansonia indiana* (Diptera: Culicidae) to nocturnally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.
21. Kovit Nittichai, Tananyutthawongese, C., Pojana-aree, K., Sarataphan, N. and Chansiri, K. DNA fingerprinting for paternity test in cattle. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.
22. Sukhumsirichart, W., Tananyutthawongese, C., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Discrimination of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* using PCR-RFLP. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.
23. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. Sonkhla.
24. Sarataphan, N., Phantana, S. and Chansiri, K. Infection of *Mansonia indiana* (Diptera: Culicidae) with nocternally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand. Annual Conference of Ministry of Public Health. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. Sonkhla.
25. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
26. Thanomsup, B., Chansiri, K., Sarataphan, N and Phantana, S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
27. Phantana, S., Chansiri, K. and Sarataphan, N. Microfilaricidal effect of ivermectin on *Brugia malayi* in cats. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
28. Sarataphan, N., Phantana, S. and Chansiri, K. Infection of *Mansonia indiana* (Diptera: Culicidae) with nocternally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand.

- Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
29. Sukhumsirichart, W., Tananyuthawongese, C., Phantana, S. Sarataphan, N. and Chansiri, K. Differentiation of microfilariae of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* using PCR-RFLP. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
 30. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.
 31. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W. and Sarataphan, N. Molecular phylogenetic studies of *Theileria* type Thung Song based on thymidylate synthetase gene. Symposium on Tick and Tick-borne diseases, September 12-16, 2000. Shanghai, People Republic of China.
 32. Phantana, S., Tejangkura, T., Khuchareontaworn, S., Chansiri, K. and Sarataphan, N. Heart failure in cat due to infection of *Dirifilaria immitis*. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October, p. 319.
 33. Tejangkura, T., Sukhumsirichart, W., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Determination of human *Brugia malayi* in cat reservoir. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2000, p.320.
 34. Pakpitchareon, A., Ketudat, P., Khawsak, P. and Chansiri, K. Molecular phylogenetic studies of lung flukes using internal transcribed spacer 2 sequence. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2000, p. 446.
 35. Sarataphan, N., Khuchareontaworn, S., Chompoochan, T. and Chansiri, K. DNA fingerprints of *Trypanosoma evansi* isolates of domestic animals. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2000, p. 471.
 36. Chansiri, K., Potivejkul, K, Santiwatanakul. S., Matsui, K. and Kajiwara, T. Survey of thermotolerant microorganisms for the production of lipases and related enzymes from hot spring water resources in Thailand. 2nd Joint Seminar on Microbial Resources and Their Applications. Organized by Kasetsart University and Yamaguchi University under the support of JSPS-NRCT. November 22-24, 2000. p.135.

37. Chansiri, K., Phantana, S., Sarataphan, N. and Sukhumsirichart, W. Multiplex PCR detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples. 1st Asian Conference on Medical Sciences, University Sains Malaysia, Kelantan, Malaysia, 18-21 May 2001.
38. Arda Pakpitchareon, Paisarn Khawsak, Achariya Rangsiruji, Punsin Ketudat and Kosum Chansiri. Molecular study of *Paragonimus heterotremus* based on 18S small subunit of nuclear rDNA. 27th Congress on Science and Technology of Thailand, Lee Gardens Plaza Hotel, Hatyai, Songkhla, Thailand, 16-18 October 2001, p. 435.
39. Sintawee Khuchareontawon, Wasana Sukhumsirichart, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in Animals and vector. 27th Congress on Science and Technology of Thailand, Lee Gardens Plaza Hotel, Hatyai, Songkhla, Thailand, 16-18 October 2001, p. 521.
40. Paweena Uppanan, Khajeenart Phothivejkul, Somchai Santiwatanakul, Kenji Matsui, Tadahiko Kajiwara and Kosum Chansiri. Studies of the gene encoding for lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. 27th Congress on Science and Technology of Thailand, Lee Gardens Plaza Hotel, Hatyai, Songkhla, Thailand, 16-18 October 2001, p. 524.
41. Sirichai Phantana, Paisarn Kwoasak and Kosum Chansiri. Rapid subtyping of dengue virus serotype 1 by RT-PCR. (poster presentation) Annual Symposium on Communicable Disease Control. Chaingmai Phoo Khum Hotel, Chaingmai, Thailand, 2-4 September 2002.
42. Sirichai Phantana, Paisarn Kwoasak and Kosum Chansiri. Serotyping of dengue virus using RT-multiplex PCR (Oral presentation). Annual Symposium on Communicable Disease Control. Chaingmai Phoo Khum Hotel, Chaingmai, Thailand, 2-4 September 2002.
43. Arda Pakpitchareon, Achariya Rangsiruji, Punsin Ketudat, Paisarn Khawsak, Pornpimon Kanjanavas, Sintawee Khuchareontaworn and Kosum Chansiri. Molecular phylogenetic studies of *Paragonimus heterotremus* using the internal transcribed spacer region of nuclear rDNA. 13th Congress on Genetics and sustainable Development, Genetics Association of Thailand, Naresuan University Pitsanulok, Thailand, 4-6 June 2003, p. 308.
44. Paisarn Khawsak, Arda Pakpitchareon, Pornpimon Kanjanavas, Sintawee Khuchareontaworn, Sirichai Phantana and Kosum Chansiri. RT-PCR and a single

- tube multiplex nested PCR for differentiation of dengue virus serotypes. 13th Congress on Genetics and sustainable Development, Genetics Association of Thailand, Naresuan University Pitsanulok, Thailand, 4-6 June 2003, p. 342.
45. Karuna Manoban, Kanokrat Namsrinuan, Khajeenat Photiwetkul , Kenji Mutsui, Tadahiko Kajiwaru and Kosum Chansiri. Molecular identification of thermotolerant *Bacillus* sp. using nucleotide sequences of hypervariable region 16S rDNA. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SB-273P, p.88.
 46. Kanokrat Namsrinuan, Khajeenat Photiwetkul, Tadahiko Kajiwaru, Kenji Mutsui and Kosum Chansiri. Molecular cloning of lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SB-274P, p.88.
 47. Sintawee Khuchareontaworn, Wasana Sukhumsirichart, Nareerat Visethakul, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. Molecular phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* based on nucleotide sequence of genes 18S rRNA and internal transcribed spacers. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SB-275P, p 89.
 48. Wasana Sukhumsirichart, Kosum Chansiri, Anchalee Petchuensakul ,Tatsuji Sakamoto, and Haruhiko Kawasaki. Purification and characterization of pectin lyase from thermotolerant *Bacillus* sp. isolated from hot spring in Thailand. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SB-276P, p 89.
 49. Anchalee Petchuensakul, Patcharin Saengjaruk, Kosum Chansiri and Wasana Sukhumsirichart. Identification of Leptospire using Rep-PCR. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SB-277P, p 89.
 50. Pornpimon Kanjanavas, Arda Pakpitchareon, Pisarn Khawsak, Peerapan Tanariya and Kosum Chansiri. Detection of *Wuchereria bancrofti* in patients' blood samples using semi-nested PCR. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SG-46P, p 243.
 51. Arda Pakpitchareon, Paisarn Khawsak, Pornpimon Kanjanavas ,Sintawee Khuchareontaworn, Somchai Santiwatanakul, Kosum Chansiri and Wasana Sukhumsirichart. Differentiation of *Mycobacterium* strains using RAPD-PCR

- techniques. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SG-47P, p 243.
52. Paisarn Khawsak, Arda Pakpitchareon, Pornpimon Kanjanavas, Sintawee Khuchareontaworn, Sirichai Phantana, and Kosum Chansiri. RT-PCR and single-tube multiplex nested PCR for differentiation of Dengue virus serotypes. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean University, 20-22 October 2003, SG-48P, p 243.
53. . Sintawee Khuchareontaworn, Achariya Rangsiruji, Nareerat Visethakul and Kosum Chansiri. Molecular phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* based on small subunit ribosomal DNA and internal transcribed spacers. The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on "Genomics and Health in the 21st Century" 22-26 November 2004, Bangkok, Thailand, p.109.
54. Montri Yasawong, Arda Pakpitchareon, Somchai Santiwatanakul, Pornpimon Kanjanavas and Kosum Chansiri. Genetic diversity of Multidrug-resistance Mycobacterium tuberculosis based on nucleotide sequences of hypervariable region of 16S rDNA. The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on "Genomics and Health in the 21st Century" 22-26 November 2004, Bangkok, Thailand, p.120.
55. Pornpimon Kanjanavas, Karuna Manoban, Arda Pakpitchareon, Khajeenat Photiwetkul, Kenji Mutsui, Tadahiko Kajiwaru, and Kosum Chansiri. Cloning and sequencing of a novel extracellular β -mannanase from thermotolerant *Bacillus* sp. THCM3. The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on "Genomics and Health in the 21st Century" 22-26 November 2004, Bangkok, Thailand, p.220.
56. Arda Pakpitchareon, Karuna Manoban, Montri Yasawong, Paisarn Khawsak, Pornpimon Kanjanavas and Kosum Chansiri. Studies of a bacterial diversity in the hot spring of Thailand based on hypervariable region of 16S rDNA gene. The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on "Genomics and Health in the 21st Century" 22-26 November 2004, Bangkok, Thailand, p.233.
57. Wasana Sukhumsirichart, Tatsuji Sakamoto, Kosum Chansiri, Haruhiko Kawasaki. Purification and Characterization of pectate lyase and pectin lyase

- from thermotolerant *Bacillus* sp. Isolated from hot spring in Thailand. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of thermotolerant Microbial Resources and their Application. 7-10 November 2004. Kyushu University, Fukuoka, Japan. P41c, p82.
58. Kosum Chansiri, Kanokrat Namsrinuan, Karuna Manoban, Pornpimon Kanjanavas, Arda Pakpitcharoen, Somchai Santiwatanakul, Kenji Mutsui, Tadahiko Kajiware, and Khajeenat Photiwetkul. Cloning, Sequencing, Expression and Characterization of a Noval Extracellular Lipase from Thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Delopment of thermotolerant Microbial Resources and their Application. 7-10 November 2004. Kyushu University, Fukuoka, Japan. P68a, p103.
 59. Pornpimon Kanjanavas, Karuna Manoban, Arda Pakpitcharoen, Khajeenat Photiwetkul, Kenji Mutsui, Tadahiko Kajiware and Kosum Chansiri. Cloning and Sequencing of a Novel Extracellular β -mannanase from thermotolerant *Bacillus* sp. Isolate THCM3.1. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Delopment of thermotolerant Microbial Resources and their Application. 7-10 November 2004. Kyushu University, Fukuoka, Japan. P76a, p109.
 60. Wasana Sukhumsirichart. Tasuiji Sakamoto, Kosum Chansiri and Haruhiko Kawasaki. Purification and characterization of pectate lyase and pectin lyase from thermotolerant *Bacillus* sp. Isolated from hot spring in Thailand. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Delopment of thermotolerant Microbial Resources and their Application. 7-10 November 2004. Kyushu University, Fukuoka, Japan..
 61. Karuna Manoban, Kanokrat Namsinuan, Khajeenat Photiwetkul, Kenji Mutsui, Tadahiko Kajiware and Kosum Chansiri. Over-expression of the gene encoding for lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2 from Ranong hot spring. 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October 2004, Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani. BO125, p73.
 62. Pornpimon Kanjanavas, Karuna Manoban, Arda Papitchareon, Kajeenart Photivej kul, Kenji Matsui, Tadahiko Kajiware and Kosum Chansiri. Cloning and expression of the gene encoding for beta-mannnanase from thermotolerant

Bacillus sp. THCM3.1. 6th RGJ-Ph.D. Congress VI. April 23-30, 2005. Chomtien Palm Beach Resort, Pattaya, Chonburi. S3-P52, page 275.

63. Piyapa Kiatsomchai, Pornpimon Kanjanavas, Arda Pakpitchareon, Phaisan Khawsak and Kosum Chansiri. Cloning and characterization of the gene encoding for Copper/Zinc superoxide dismutase from lymphatic filaria. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006. Kyoto, Japan

Publications

1. Boonsaeng, V., Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P. and Panyim, S. 1989. Detection of *Plasmodium falciparum* using a cloned DNA probe, a simple procedure suitable for field application. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 20, 519-522.
2. Chansiri, K. 1994. The biochemical markers for ovulation and infertility in women. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 49-56.
3. Chansiri, K. 1994. The effect of seminal plasma proteases to cervical mucal proteins. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 57-61.
4. Chansiri, K. 1994. The infrastructure of disulfides bonds cervical mucus. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 1-5.
5. Chansiri, K. and Bagnara, A. S. 1995. The structural gene for carbamoyl phosphate synthetase from the protozoan parasite *Babesia bovis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 74: 239-243.
6. Bagnara, A. S. and Chansiri, K. 1996. Sequence upstream and downstream from the glutamine-dependent carbamoyl phosphate synthetase-encoding gene from the protozoan *Babesia bovis*. **Gene**. 172(1): 173-4.
7. Sarataphan, N., Uthaisang, W., Petchpoo, W., Watanapokhasin, Y., Tananyutthawongese, Onuma, M. and Chansiri, K. 1997. Antigenic differences between Thai *Theileria* species and other benign *Theileria* species based on gene encoding immunodominant piroplasm surface proteins. **Journal of Protozoology Research**. 7: 36-42.
8. Watanapokasin, Y., Tananyutthawongese, C., Uthaisang, W., Chansiri, K., Boonmatit, C., and Sarataphan, N. 1998. Intra-species differentiation of *Trypanosoma evansi* with arbitrary primers-polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**. 78: 259-264.

9. Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio, T., Fujisaki, K., Panchadcharam, C., Watanopokasin, Y., Uthaisang, W., Tananyuttawongese, C. and Sarataphan, N. 1998. Inter-species differentiation of benign *Theilerias* by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Veterinary Parasitology**. 79:143-149.
10. Kakuda, T., Shiki, M., Kubota, S., Sugimoto, C., Brown, W. C., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Onuma, M. 1998. Molecular characterization and phylogeny of benign *Theileria* species isolated from cattle in Thailand, China and USA based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes. **International Journal of Parasitology**. 28: 1261-9.
11. Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1998. The biological basis of bovine Theileriosis. **Journal of Tropical and Medical Parasitology**. 21: 1-10.
12. Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio, T., Terada, Y., Fujisaki, K., Philippe, H. and Sarataphan, N. 1999. Molecular Phylogenetic studies on *Theileria* Parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Veterinary Parasitology** 83: 99-105.
13. Sarataphan, N., Kerdmanee, C., Chansiri, K., Tan-ariya, P., Nokdhes, C. and Chansiri, G. 1999. The efficacy of medicinal plants as anti-parasitic drugs against *Theileria* sp. in *in vitro* culture of infected bovine erythrocytes. **Silapakorn Pharmacy Journal**. 18 (1): 39-50.
14. Tananythawongese, C., Saengsombat, K., Sukhumsirichart, W., Uthaisang, W., Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1999. Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. **Science Asia** 25:85-90.
15. Sarataphan, N., Nilwarangkoon, S., Tanayutthawongese, C., Onuma, M. and Chansiri, K. 1999. Genetic diversity of major piroplasm surface protein genes and their allelic variant of *Theileria* parasites in Thai cattle. **Journal of Veterinary Medicine and Sciences** 61: 991-994.
16. Lertlit, P., Choopayak, C., Udomsangpetch, R., Chansiri, K. and Mungkornkarn, C. 1999. The mitochondrial cytochrome oxidase subunit III gene and protein sequence analysis in chloroquin-resistant *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biochemical and Molecular Biology Biophysics**. 3: 161-170.
17. Sukhumsirichart, W., Khuchareontaworn, S., Sarataphan, N., Viseshakul, N. and Chansiri, K. 2000. Application of PCR-based assay for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in different animals and vectors. **Journal of Tropical and Medical Parasitology** 23: 1-6.

18. Thanomsab, B., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Phantana, S. 2000. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. **Molecular and Cellular Probes** 14: 41-46.
19. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Tananyutthawongese, C., Sarataphan, N. and Phantana, S. 2001. Multiplex PCR detection of *Wuchereria bancrofti* and *Plasmodium falciparum* in crude blood specimens. **Molecular and Cellular Probes** 15:201-207.
20. Sarataphan, N., Phantana, S., and Chansiri, K. 2002. Susceptibility of *Mansonia indiana* (Diptera: *Culicidae*) to nocturnally subperiodic *Brugia malayi*. **Journal of Medical Entomology**. 39(1): 215-217.
21. Chansiri, K., and Sarataphan, N. 2002. Molecular phylogenetic studies of *Theileria* sp. (Thung Song) based on thymidylate synthetase gene. **Parasitology Research** 88(13 Suppl 1):S33-35
22. Chansiri, K., Tejangkura, T., Sarataphan, N., Phantana, S. and Sukhumsirichart, W., 2002. PCR-based method for identification of zoonotic *Brugia malayi* microfilaria in domestic cat. **Molecular and Cellular Probes**. 16:129-135.
23. Phantana, S., Sarataphan, N., Chansiri, G. and Chansiri, K. 2002. Microfilaricidal effect of ivermectin on zoonotic *Brugia malayi* naturally infected cats. **Journal of Tropical and Medical Parasitology** 25: 11-16.
24. Chansiri, K. and Phantana, S. 2002. A polymerase chain reaction for the survey of bancroftian filariasis. **Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Hygiene** 33 (3):504-508.
25. Chansiri, K., Kuchareontaworn, S. and Sarataphan, N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. **Molecular and Cellular Probes**. 16:173-177.
26. Sarataphan N, Kakuda T, Chansiri K, Onuma M. 2003. Survey of benign *Theileria* parasites of cattle and buffaloes in Thailand using allele-specific polymerase chain reaction of major piroplasm surface protein gene. **Journal of Veterinary Medicine and Sciences** 65(1):133-5.
27. Phantana, S., Kwoasak, P. and Chansiri, K. 2003. Determination of dengue virus serotypes in Thailand using PCR based method. **Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Hygiene** 34(4): 781-785.

28. Kanjanavas, P., Tan-ariya, P., Khawsak, P., Khuchareontaworn, S., Phantana, S., and Chansiri, K. 2004. Detection of *Wuchereria bancrofti*. **Encyclopedia of Diagnostic genomic & Proteomics.**
29. Kanjanavas, P., Tan-ariya, P., Khawsak, P., Pakpitcharoen A., Phantana, S., and Chansiri, K. 2005. Detection of lymphatic *Wuchereria bancrofti* in carriers and long-term storage blood samples using semi-nested PCR. **Molecular and Cellular Probes** 19:169-172.
30. Chansiri, G, Phantana, S., Sarataphan, N., Chansiri, K. 2005. The efficacy of a single-oral-dose administration of ivermectin and diethylcarbamazine on treatment of feline *Brugia malayi*. . **Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Hygiene.** 36(5):1105-1109.
31. Khuchareontaworn, A., Viseshakul, N. and Chansiri, K. 2005. Molecular phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* based on nucleotide sequences of 18S rRNA, 5.8S rRNA and internal transcribed spacer regions. **Veterinary Parasitology** (Submitted)
32. Kiatsomchai, P., Kanjanavas, P., Pakpitcharoen, A., Khawsak, P and Chansiri, K. 2006. Copper/Zinc superoxide dismutase: a potential drug target as an anti-lymphatic filaria.