

รายงานการวิจัย

การแยกเอ็นไซม์ไลเปสจาก recombinant clone ให้บริสุทธิ์

Purification of lipase enzyme from the recombinant clone

ผู้ดำเนินการวิจัย

อาจารย์มัลย์ ทวีโชติภัทร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประจำปีงบประมาณ 2541

574.19253
ม492ร
ร.2

๒๕๔๑. ๑๗๕๓

๘ ๕๓๕

๕ ๒

รายงานการวิจัย

การแยกเอ็นไซม์ไลเปสจาก recombinant clone ให้บริสุทธิ์

Purification of lipase enzyme from the recombinant clone

ผู้ดำเนินการวิจัย

อาจารย์มัลย์ ทวีโชติภัทร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประจำปีงบประมาณ 2541

142709

10 ต.ค. 2543

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทนำ	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	8
อภิปรายผล	10
สรุปผล	11
บรรณานุกรม	12



กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทนักวิจัยหน้าใหม่แบบไม่กำหนดทิศทาง ตามโครงการวิจัยเงินรายได้ ปี 2541

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ ถนอมทรัพย์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นโคลนที่มียีนสร้างเอ็นไซม์ไลเปส ขอขอบคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา



บทคัดย่อ

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไป ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้มีการนำเอาเอนไซม์ไลเปสมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมชักฟอกและกำจัดขยะ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการเพิ่มคุณภาพของผงชักฟอก การกำจัดไขมันในน้ำเสียหรือน้ำที่ผ่านการปรุงอาหาร เนื่องจากไลเปสมีคุณสมบัติที่สามารถไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ และสามารถสร้างเอสเทอร์จากกรดไขมันและแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังสามารถ catalyse ขบวนการ transesterification หรือ interesterification ได้ การนำไลเปสมาประยุกต์ใช้ด้านต่าง ๆ จำเป็นต้องให้ได้ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์และคงมีปริมาณสูง ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงได้มุ่งศึกษาถึงการแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่ง เพื่อพัฒนาให้เป็นวิธีที่สะดวกเหมาะสม ขั้นตอนน้อยลง และได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยนำไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เป็น recombinant clone ซึ่งมียีนสร้างไลเปสผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตามลำดับคือ สกัดด้วย hexane เพื่อให้ได้ไลเปสแยกมาอยู่ในชั้น intermediate phase และบางส่วนใน aqueous phase จากนั้นนำไลเปสที่ได้ไปตกตะกอนด้วย methanol แล้วนำส่วนที่ได้จากการตกตะกอนไปแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่มี Q-sepharose fast flow เป็น gel matrix ผลการศึกษาพบว่าไลเปสที่ได้จากการสกัดด้วย hexane ที่อยู่ในชั้น intermediate phase มีความบริสุทธิ์สูงกว่าไลเปสที่ได้จากโคลนตอนเริ่มต้น 1.27 เท่า ไลเปสที่อยู่ในชั้น aqueous phase มีความบริสุทธิ์สูงกว่า 1.13 เท่า แต่เมื่อนำมาตกตะกอนด้วย methanol ความบริสุทธิ์ลดลง เนื่องจากการสูญเสียไลเปสและมีโปรตีนอื่นตกตะกอนมากและเมื่อนำไลเปสที่ได้จากการตกตะกอนดังกล่าวไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์สูงกว่าไลเปสที่ได้จากโคลนตอนเริ่มต้น 43.87 เท่า การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สรุปได้ว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก recombinant clone สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ในระดับหนึ่งโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายคือ hexane และตกตะกอนด้วย methanol และทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยนำไลเปสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในเบื้องต้นไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มี Q-sepharose fast flow บรรจุอยู่ ทำให้ได้ไลเปสที่บริสุทธิ์กว่าไลเปสที่ผลิตได้จากโคลนตอนเริ่มต้น

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่สามารถ hydrolyse เอสเทอร์ ของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ และในทางกลับกันสามารถสร้าง (synthesis) เอสเทอร์ จากกรดไขมันและแอลกอฮอล์ได้ นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถ catalyse ขบวนการ transesterification หรือ interesterification ทำให้เกิดการปรับปรุงเปลี่ยนแปลง ester ได้มากมาย จากคุณสมบัติพื้นฐานของไลเปสจึงมีการนำเอาไลเปสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง, อุตสาหกรรมชักฟอกและกำจัดขยะ (Fernandezgarcia *et al.*, 1994; Akoh, 1994; Maase and Tilberg, 1983) ซึ่งการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์ ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ เหล่านี้เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีข้อดีมากกว่าการใช้วิธีทางเคมี คือ ไม่ต้องใช้ความดันสูงหรือผ่านหลายขั้นตอนและไม่ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมตามมา ผลผลิตที่ได้สะอาด เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อสับสเตรท (Linfield *et al.*, 1984 และ Taylor *et al.*, 1986)

การนำไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การผลิต cheese จากนมโดยใช้ไลเปส ซึ่งจะให้สีและกลิ่นเฉพาะตัวตามชนิดของไลเปสที่ใช้ (Fernandezgarcia *et al.*, 1994; Stead, 1986; และ Arnold *et al.*, 1975) การนำไลเปสใช้ในการปรับปรุงการทำขนมปังจะให้ กลิ่น สี ความนุ่มและโครงสร้างของขนมปังที่ดีขึ้น (Sztajer and Zboinska, 1988) หรือการนำไลเปสไปใช้ในการผลิต biosurfactant ในอุตสาหกรรมการผลิตยา, เครื่องสำอาง หรือ oil recovery ซึ่งทำให้ขบวนการผลิตมีพิษน้อยลง ผลผลิตที่เกิดขึ้นน้อยลงได้ง่ายและราคาถูก นอกจากนี้ไลเปสที่ทนกรด ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการแพทย์กับผู้ป่วยที่พร่องไลเปส (pancreatic lipase insufficiency) (Newmark, 1988) ในอุตสาหกรรมชักฟอกสามารถนำไลเปสไปใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพของผงชักฟอก และลดการใช้สารเคมีในการผลิตและทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม โดยไลเปสให้ผลปฏิกิริยาสูงและคงทนในขบวนการผลิตประโยชน์อีกด้านหนึ่งคือการนำไลเปสมาใช้ในการกำจัดไขมันในน้ำเสีย หรือน้ำที่ผ่านการปรุงอาหารก่อนทิ้งลงสู่ลำน้ำสาธารณะ (Newmark, 1998)

จากคุณสมบัติของไลเปสที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมา ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากโคลน (recombinant clone) ที่มียีนสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* WRRL-B558 (Thanomsu *et al.*, 1996) ซึ่งขณะนี้นี้ยีนนี้ได้ถูก overexpress โดย subclone เข้าใน pTTQ 18 vector ซึ่งมี strong promotor และมี *E. coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าสามารถผลิตไลเปสได้สูงขึ้นกว่าเดิม 38 เท่า ในภาวะที่มี IPTG

inducer ร่วมด้วย ซึ่งการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์จากโคลนที่สร้างไลเปสสูง จะช่วยให้ผลของการแยกเอ็นไซม์หลังผ่านขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว มีแนวโน้มที่จะได้ปริมาณสูงขึ้นกว่าเซลล์ดั้งเดิมที่ผลิตเอ็นไซม์มาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกเอ็นไซม์ไลเปสที่ได้จาก recombinant clone ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
2. เพื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ไลเปสที่ได้ หลังจากแยกให้บริสุทธิ์แล้ว โดยดูจากค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ และปริมาณโปรตีน

ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการแยกเอ็นไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็น recombinant clone โดยมี *E. coli* JM 109 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อให้ได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์มากขึ้นโดยอาศัยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้ ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดประโยชน์ดังต่อไปนี้

1. ได้เอ็นไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ
2. เป็นพื้นฐานในการวิจัยในระดับ large scale

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาคูณสมบัติต่าง ๆ และการนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้จำเป็นต้องแยกไลเปสให้บริสุทธิ์ ไลเปสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นชนิด extracellular enzyme ต้องแยกเอนไซม์ออกจากเชื้อแบคทีเรียและโปรตีนอื่น ๆ ในเบื้องต้นก่อน โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Breuil *et al*; 1975 และ Lesuisse *et al*; 1993) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่มีผลทำให้ปริมาณของไลเปสลดลงมาก (Lesuisse, *et al*; 1993) การแยกไลเปสเบื้องต้นโดยการกรองแบบ ultrafiltration (Ingham *et al*; 1981 และ Kordel *et al*; 1991) เป็นวิธีที่สะดวก แต่ใช้เวลานานและมีราคาแพง เนื่องจากไลเปสมีคุณสมบัติมี hydrophobicity สูง จึงมีผู้นำ solvent มาใช้ในการแยกไลเปสในเบื้องต้น เช่น การตกตะกอนโดย acetone (Handelsman, *et al*; 1994) หรือการสกัดในตัวกลางที่เป็น hexane และ methanol (Schmidt *et al*; 1994) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและช่วยแยกไลเปสที่จำเพาะได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการแยกไลเปสในเบื้องต้นยังให้ความบริสุทธิ์ต่ำ จึงต้องอาศัยวิธีการแยกที่จำเพาะโดยการแยกผ่าน column chromatography ซึ่งมี gel matrix ที่ใช้เฉพาะสำหรับแยกไลเปสบรรจุอยู่ใน column ซึ่งจะให้ความบริสุทธิ์สูง จากการศึกษาวิจัยของ Breuil และคณะในปี 1975 โดยแยกไลเปสที่สร้างจาก *Acinetobacter* O₁₆ โดยใช้ column ที่มี gel matrix เป็น Sephadex G-25 และแยกซ้ำอีกโดยใช้ DEAE พบว่าสามารถแยกไลเปสให้บริสุทธิ์ได้ถึง 25 เท่า มี specific activity 368 U/mg แต่มีข้อเสียคือทำให้ activity ลดลง และเหลือปริมาณโปรตีนน้อยมาก

การแยกไลเปสโดยการผ่าน column หลาย ๆ ครั้ง และใช้ gel matrix ที่มีคุณสมบัติแยกสารที่มี hydrophobic สูงจะช่วยแยกไลเปสให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยการศึกษาของ Ingham และคณะในปี 1981 ได้แยกไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Propionibacterium acnes* ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน column ที่ใช้ Sephadex G-100 เป็น gel matrix ถึง 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าไลเปสมีความบริสุทธิ์ถึง 4,800 เท่า แต่ปริมาณโปรตีนลดลงมาก และให้ค่า specific activity เพียง 2.89 U/mg

ต่อมานักวิจัยได้พยายามพัฒนาวิธีการแยกไลเปสให้บริสุทธิ์มากขึ้นและให้มี activity สูง โดยใช้ gel matrix ในรูปของ Sepharose แบบต่าง ๆ คือ Q-Sepharose fast flow และ Octyl Sepharose CL-4B พบว่าได้ผลดี จากการทดลองของ Kordel และคณะในปี 1991 ซึ่งทำการแยกไลเปสที่สร้างจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. 21808 พบว่าสามารถแยกไลเปสได้ดีให้ความบริสุทธิ์ถึง 260 เท่า มีปริมาณโปรตีน 35% และ specific activity สูงถึง 3,310 U/mg

ในปี 1993 Lesuisse และคณะ ได้ทดลองใช้ Phenyl Sepharose และ hydroxyapatite เป็น gel matrix สามารถแยกไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 168 ให้ความ

บริสุทธิ์สูง มีปริมาณโปรตีน 13% และ specific activity 160 U/mg ส่วนการใช้ Phenyl Sepharose และ Superose ให้ปริมาณโปรตีน 15% แต่ specific activity ลดลง (Handelsman 1994)

การศึกษาวิจัยของ Schmidt-Dannert และคณะในปี 1994 โดยการแยกไลเปสที่สร้างจาก *Bacillus thermocaternulatus* โดยตกตะกอนใน solvent และผ่าน column ที่มี Q-Sepharose fast flow เป็น gel matrix เพียงครั้งเดียว พบว่าสามารถให้ความบริสุทธิ์ได้ดีประมาณ 67 เท่า ปริมาณโปรตีน 21% มี specific activity 29 U/mg

จากความสำคัญของไลเปสและการที่จะนำไลเปสไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ความคงทนต่ออุณหภูมิ ความทนต่อ pH ความจำเพาะต่อสับสเตรท และการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จำเป็นต้องใช้ไลเปสที่บริสุทธิ์มากที่สุด และยังคงมีคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจากรายงานการศึกษาวิจัยต่าง ๆ จะเป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการที่สะดวกและเหมาะสมที่จะแยกไลเปสให้บริสุทธิ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อ และผลิตเอ็นไซม์ไลเปส (Preparation of bacterial strain and lipase production)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* JM 109 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับ recombinant clone ที่มียีนสร้างเอ็นไซม์ไลเปส โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria-Bertani broth (Difco, U.S.A.) ที่มี ampicillin 50 ug/ml เพาะเลี้ยงในฟลาสค์ปริมาตร 400 ml จำนวน 2 ฟลาสค์ นำไปปั่นใน Shaker incubator (New Brunswick, U.S.A) ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรีย recombinant clone ที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge (Beckman, U.S.A) ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไปและปั่นล้างเซลล์แบคทีเรียอีก 2 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS) นำเชื้อแบคทีเรีย recombinant clone ที่ได้เติม PBS 20 ml แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Ultrasonicator (Bendelin, Germany) เมื่อเซลล์แตกจนหมดแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนลอย (supernatant) เพื่อนำไปแยกเอ็นไซม์ไลเปส ให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนต่อไป

2. การแยกเอ็นไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ (Purification of lipase)

2.1 แยกด้วยตัวทำละลาย

นำไลเปสมาแยกให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Schmidt - Dannert และคณะ (1994) ทำได้โดยนำเอาส่วนลอยที่สกัดจากโคลนที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาสกัดเอาเฉพาะไลเปส โดยเติม n-hexane (Merck, Germany) ปริมาตรเท่ากับส่วนลอยที่นำมาสกัดไลเปส เมื่อสกัดแล้วแยกเอาเฉพาะส่วน intermediate phase และ aqueous phase ซึ่งจะมีไลเปสอยู่สูง นำแต่ละส่วนมาหยดลงไปใน methanol (Merck, Germany) ซึ่งมีอุณหภูมิ -20°C เพื่อทำให้ตกตะกอนจากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน และนำมาละลายด้วยน้ำเพื่อไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.2 แยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำไลเปสที่ได้จากข้อ 2.1 มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยวิธี anion - exchange chromatography ที่มี Q - Sepharose fast flow (Pharmacia, Sweden) เป็น gel matrix ทำให้มี

ด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 6.5 นำไลเปสที่แยกได้ดังกล่าวข้างต้นมาใส่ลงในคอลัมน์
ล้างโปรตีนด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 6.5 ซึ่งเป็นสารละลาย A โปรตีนที่เกาะอยู่กับ gel ล้าง
ให้หลุดออกมาด้วย สารละลาย A ที่มี 0.3 M NaCl และสารละลาย A ที่มี 1 M NaCl ตามลำดับ
จนกระทั่งไม่มีโปรตีนที่เกาะอยู่กับ gel หลุดออกมา หลังจากนั้นเติมสารละลาย B ที่มี phosphate
buffer pH 6.5, 20% methanol (w/v) และ 1 M NaCl และสารละลาย C ที่มี phosphate buffer
pH 6.5, 30% methanol และ 1 M NaCl ตามลำดับเพื่อล้างไลเปสที่ถูก gel ดูดซับไว้หลุดออกมา ทำการ
เก็บ active fraction หลังจากเติมสารละลาย C โดยเก็บ fraction ทุก 3 นาที ปริมาตร 2 ml ด้วย
เครื่อง Fraction collector (Biorad, U.S.A) ทุก ๆ fraction นำไปหาปริมาณโปรตีน (protein
content) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (enzyme activity) ส่วน fraction ที่มีค่ากิจกรรมของ
ไลเปสสูงจะนำมารวมกัน

3. การหาปริมาณโปรตีน (Protein determination)

หาปริมาณโปรตีนของไลเปสหลังจากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน โดยใช้วิธี
Dye-binding ของ Bradford (1976) ซึ่งใช้ Coomassie protein assay reagent ที่มี 0.01% w/v
Coomassie brilliant blue G-250, 4.7% w/v และ 8.5% w/v phosphoric acid เป็นส่วนประกอบ
ใช้ bovine serum albumin (Sigma, U.S.A) ความเข้มข้น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 mg/ml
เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้โปรตีนมาตรฐาน และไลเปสที่ต้องการหา
ปริมาณโปรตีน ในปริมาตร 100 μ l และเติม protein reagent 1 ml ในแต่ละหลอดผสมให้เข้ากันแล้ว
นำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu,
Japan) นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

4. การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Assay for lipase activity)

หาค่ากิจกรรมของไลเปสตามวิธี Photometric assay ของ Kordel และคณะ (1991) โดยใช้
p-nitrophenylpalmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท ใช้ pNPP (Sigma, U.S.A.) 0.062 g ละลายใน
isopropanol 10 ml นำไป sonicate 6 นาที ได้เป็นสารละลาย A ส่วนสารละลาย B เตรียมโดยละลาย
0.1% (w/v) gum arabic (Sigma, U.S.A.) ใน 50 mM Tris - HCl pH 8.0 และมี 0.1% Triton
x - 100 ทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของไลเปสได้โดย ผสมสารละลาย A 100 μ l และสารละลาย B
800 μ l เข้าด้วยกัน หลังจากนั้นเติมไลเปสที่ต้องการหาค่ากิจกรรม 100 μ l ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปป้อนที่
37°C เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 410 nm คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยถ้า

optical density มีค่า 1.0 หมายถึง มี pNP 9.7 nmol ที่หลั่งมาจาก pNPP ต่อนาที และค่ากิจกรรมของไลเปส 1 หน่วย (U) มีค่าเท่ากับ pNP ที่หลั่งจาก pNPP ต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ของเอ็นซัยม์ หลังจากการหาค่าปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมของเอ็นซัยม์แล้วสามารถคำนวณค่าต่าง ๆ ได้โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Lipase activity} = \text{absorbance} \times 9.7 \text{ U}$$

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{lipase activity}}{\text{protein content}} \text{ U/mg}$$



ผลการวิจัย

จากการนำเอา recombinant clone ที่มี *E. coli* JM 109 เป็นเซลล์เจ้าบ้านมาทำการเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มี ampicillin 50 ug/ml เพื่อผลิตเอ็นไซม์ไลเปส โดยเอาเซลล์แบคทีเรีย recombinant clone มาทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้ไลเปสออกมาในส่วนลอยหลังจากปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงแรงสูง จากนั้นนำส่วนลอยมาทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ พบว่าไลเปสที่ได้จากโคลนดังกล่าว มีค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไลเปส 3.57 U ค่า specific activity มีค่า 0.15 U/mg ไลเปสจากโคลนที่อยู่ในส่วนลอยดังกล่าวเมื่อผ่านการสกัดด้วย n-hexane แล้วแยกเอาส่วนที่เป็น intermediate phase และ aqueous phase ซึ่งได้ปริมาตรลดน้อยลงแต่เป็นชั้นที่มีไลเปสอยู่ ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไลเปสในชั้น intermediate phase ซึ่งอยู่ระหว่างชั้น aqueous phase และชั้นของ hexane มีค่า 3.89 U ค่า specific activity ของเอ็นไซม์ไลเปสมีค่า 0.19 U/mg ส่วนไลเปสที่อยู่ในชั้น aqueous phase มีค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไลเปส 3.7 U ค่า specific activity ของเอ็นไซม์ไลเปสมีค่า 0.17 U/mg ซึ่งค่า specific activity ของเอ็นไซม์ไลเปส ที่อยู่ในชั้น intermediate phase สูงกว่าชั้น aqueous phase

เมื่อนำเอาเอ็นไซม์ไลเปสที่ได้จากชั้น intermediate phase และ aqueous phase มาตกตะกอนด้วย methanol แล้วนำตะกอนมาละลายด้วยน้ำ นำไลเปสที่ได้มาหาค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ในชั้น intermediate phase มีค่า 3.69 U และ specific activity มีค่า 0.11 U/mg ชั้น aqueous phase มีค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ 2.58 U มี specific activity 0.05 U/mg

เอ็นไซม์ไลเปสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย methanol เมื่อผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่มี Q-sepharose fast flow เป็น gel matrix เก็บ fraction ที่ได้หลังจากผ่านด้วยสารละลาย C ที่มี 30% methanol และ 1 M NaCl ได้ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ของ fraction ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไลเปสของ fraction ที่สูงสุดมีค่า 6.42 U และจากการรวม fraction ที่ 1 ถึง 12 มีค่า specific activity 6.58 U/mg ซึ่งมีค่า specific activity สูงกว่าไลเปสที่ได้จากโคลนตอนเริ่มต้น 43.87 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 2

Fraction	Specific activity (U/mg)
1	1.42
2	1.16
3	3.33
4	0.26
5	1.81
6	5.07
7	1.75
8	6.42
9	4.52
10	5.83
11	2.43
12	3.82

ตารางที่ 1 แสดงถึง specific activity ของเอ็นไซม์ไลเปสที่ได้จากการผ่านคอลัมโครมาโตกราฟี ตั้งแต่ fraction ที่ 1-12

ขั้นตอน	Protein (mg/ml)	Lipase activity (U)	Specific acitivity (U/mg)	Fold purification
Supernate from sonicated cell (clone)	23.4	3.57	0.15	1
Hexane extraction (aqueous phase)	22.2	3.7	0.17	1.13
Hexane extraction (intermediate phase)	20.4	3.89	0.19	1.27
Methanol precipitation (aqueous phase)	48.8	2.58	0.05	0.33
Methanol precipitation (intermediate phase)	35	3.69	0.11	0.73
Fraction 1-12	1	6.58	6.58	43.87

ตารางที่ 2 แสดงถึงค่าต่าง ๆ ของเอ็นไซม์ไลเปสที่ผ่านแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์

อภิปรายผล

จากการนำเอาไลเปสที่ผลิตได้จาก recombinant clone มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ นั้นพบว่า การสกัดไลเปสด้วยตัวทำละลาย hexane นั้น เอ็นไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะอยู่ในชั้น intermediate phase เนื่องจากไลเปสมีคุณสมบัติที่มีความเป็น hydrophobicity สูง ซึ่งจะทำให้ค่า specific activity สูงกว่าไลเปสที่อยู่ในชั้น aqueous phase และไลเปสที่ได้จากชั้น intermediate phase มีค่า specific activity สูงกว่าไลเปสจากโคลนดังกล่าว 1.27 เท่า และจากชั้น aqueous phase สูงกว่าไลเปสจากโคลน 1.13 เท่า เมื่อนำเอาไลเปสที่อยู่ในชั้น intermediate phase และ aqueous phase มาตกตะกอนด้วย methanol ซึ่งไลเปสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย methanol ในชั้น intermediate phase มีค่า specific activity 0.11 U/mg ชั้น aqueous phase มีค่า 0.05 U/mg ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเดิมซึ่งอาจเนื่องมาจากไลเปสตกตะกอนไม่หมด ขณะเดียวกันโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ไลเปสก็ตกตะกอนลงมามากซึ่งมากกว่าขั้นตอนอื่น แสดงให้เห็นว่า ขั้นตอนตกตะกอนด้วย methanol ทำให้สูญเสียไลเปสไปมาก ดังแสดงในตารางที่ 2

ไลเปสที่ได้จากการแยกสกัดในเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายดังกล่าวมีความบริสุทธิ์ต่ำ ดังนั้นจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคที่สามารถแยกไลเปสให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยนำไลเปสที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มี Q-sepharose fast flow เป็น gel matrix ซึ่งพบว่า specific activity ของไลเปสที่ได้จากการรวม fraction ที่มีค่าสูงคือ fraction ที่ 1-12 มีค่า 6.58 U/mg และค่าความบริสุทธิ์ของไลเปสสูงกว่าไลเปสจากโคลนตอนเริ่มต้น 43.87 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Schmidt - Dannert (1994) ที่แยกไลเปสจากเชื้อ *Bacillus thermocaternulatus* เมื่อผ่านคอลัมน์ที่มี Q-sepharose fast flow เป็น gel matrix ได้ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 67 เท่า มี specific activity 29 U/mg

การแยกไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยวิธีการต่าง ๆ ที่ได้มีผู้ทำการศึกษากันมานั้นจะได้ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันออกไป ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดในแต่ละด้าน ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการแยกเอ็นไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นวิธีที่พยายามลดขั้นตอนให้น้อยลง เพื่อลดการสูญเสียไลเปสในขั้นตอนต่าง ๆ และเพื่อพัฒนาให้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามควรจะศึกษาวิจัยต่อไปถึงวิธีการอื่น ๆ เพื่อเปรียบเทียบถึงค่าความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ และเพื่อให้ได้ปริมาณเอ็นไซม์มากที่สุด

สรุปผล

จากผลการวิจัยในครั้งนี้ได้ข้อสรุปว่า เอ็นไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก recombinant clone ซึ่งสร้างไลเปสสูงกว่าปกติ สามารถนำมาทำให้มีความบริสุทธิ์มากกว่าเดิม โดยอาศัยขั้นตอนต่าง ๆ คือ เมื่อนำมาสกัดด้วย hexane จะได้เอ็นไซม์ไลเปสที่อยู่ในชั้น intermediate phase มีค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าไลเปสที่ได้จากโคลนตอนเริ่มต้น 1.27 เท่า เอ็นไซม์ไลเปสที่อยู่ในชั้น aqueous phase มีค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าไลเปสที่ได้จากโคลนตอนเริ่มต้น 1.13 เท่า เมื่อนำเอาไลเปสที่อยู่ในชั้น intermediate phase และ aqueous phase มาตกตะกอนด้วย methanol มีความบริสุทธิ์ 0.73 เท่า และ 0.33 เท่าตามลำดับ และเมื่อนำเอ็นไซม์ไลเปสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย methanol ของ intermediate phase มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มี Q-sepharose fast flow เป็น gel matrix ได้ค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าไลเปสจากโคลนตอนเริ่มต้น 43.87 เท่า จะเห็นว่าเมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ แล้วจะได้ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงเป็นการแยกไลเปสอีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกเอ็นไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ขั้นตอนน้อยลง ซึ่งเทคนิคนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้แยกเอ็นไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ เพื่อจะได้นำเอ็นไซม์ไปศึกษาถึงคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ต่อไป และเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นอีกในอนาคต

บรรณานุกรม

- Akoh, C.C. 1994. Enzymatic synthesis of acetylate glucose fatty acid esters in organic solvents. JAOCS 71 : 319-323.
- Arnold, R.G., Shatani, K. M., Dwivedi, B. K. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci 58 : 1127-1143.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitivity method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. Anal biochem. 72 : 248-254.
- Breuil, C. and Kushner, D. 1975. Partial purification and characterization of the lipase of a facultatively psychrophilic bacterium (*Acinetobacter* O₁₆) Can.J. Microbiol. 21 : 434-441.
- Fernandezgarcia, E., Lopezsandino, R. and Alonso, L. 1994. Effect of food-gradeenzyme preparation from *Aspergillus oryzae* on free fatty acid in Manchego type cheese from ovine and bovine milk. Zeitschrift Furr Lebensmittel Untersuchung and Forchung. 199 : 262-264.
- Handelsman, T. and Shoham, Y. 1994. Production and Characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J. Gen. Appl. Microbiol. 40 : 435-443.
- Ingham, E., Holland, K.T., Gowland, G. and Cunliffe, W.J. 1981. Partial purification and characterization of lipase (EC3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. J. of Gen Microbiol. 124 : 393-401.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. and Schmid, R.D. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808 : Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. J. bacteriol. 173 : 4836-4841.
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168 an extremely basic pH-tolerant enzyme Eur. J. Biochem. 216 : 155-160.

- Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serota, S. and Sarauskas, R.A. 1984. A lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. J. Am. Oil Chem. Soc. 61 : 1067-1071.
- Maase, F.W. and Tilburg, R. 1983. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions, JAOCS. 60 : 1672-1675.
- Newmark, P. 1988. Celltech, Novo Industry : Two European companies market lipases. Bio/Technology 6 : 369.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatnulatus*. Biochim. Biophys. Acta. 1214 : 43-53.
- Stead, D. 1986. Microbial lipases ; Their characteristics role in food spoilage and industrial use. J. Dairy Res. 53 : 481-505.
- Sztajer, H. and Zboinska, E. 1988. Microbial lipases in biotechnology. Act. Biotech. 8 : 169-175.
- Taylor, F., Pamzor, C.C., Craig, J.C., Jr. and O'Brien, D.J. 1986. Continunous hydrolysis of tallo with immobilized lipase in a microporous membrane. Biotech. Bioeng. 28 : 1381-1322.
- Thanomsub, B.W. Boonchird, C., Meevootisom, V. 1996. Cloning and nucleotide sequencing of a lipase gene from *Bacillus subtilis* WRRL-B558. World J. Microbiol & Biotechnol. 12 : 619-623.