บทที่ 3

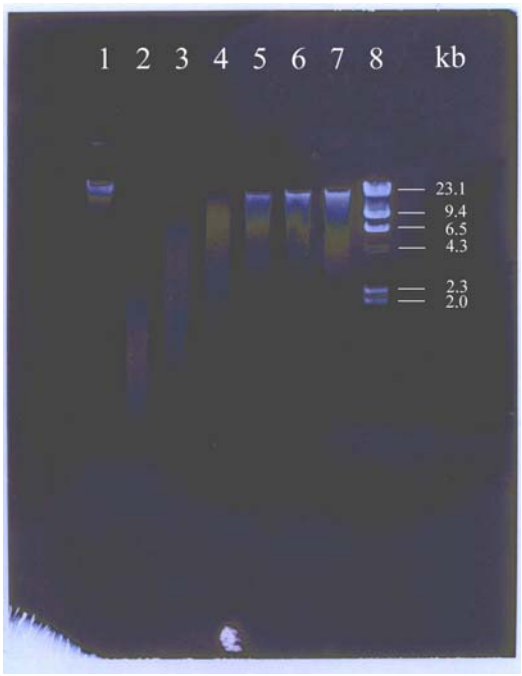
ผลการทดลอง

3.1 การโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

สกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. UN16a ที่เพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth ที่เติม yeast extract ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการย่อยเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI ทำการคัดเลือกโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่มีขนาด 2-6 กิโลเบส (kb) จาก lane ที่ 3 (รูปที่ 5) ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC18 ซึ่งมี *lacZ* และยีนที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลินเป็นตัวติดตาม (marker) ที่ผ่านการย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ดังรูปที่ 6 ด้วยเอนไซม์เชื่อมต่อดีเอ็นเอ (T_4 DNA ligase) นำส่วนผสมทั้งหมดที่ได้ไปถ่ายโอนเข้าไปใน *E. coli* JM109 โดยวิธีทรานสฟอร์เมชั่น จากนั้นนำ *E. coli* JM109 ทั้งหมดไป spread ลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani agar (LB agar) ที่มี tributyrin oil ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการ spread Isopropylthio-β-galactoside (IPTG) และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) บนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว และเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี พบว่า โคโลนีที่ได้ส่วนใหญ่มีสีฟ้า ส่วนโคโลนีที่มีสีขาวนั้นไม่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี และเมื่อนำโคโลนีสีขาวไปทำการสกัดพลาสมิด ผลปรากฏว่าไม่พบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่

3.2 การทดสอบ *Bacillus* sp. UN16a ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UN16a โดยการเขี่ยเชื้อ (streak plate method) ลงบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือก และผลิตไลเปส ที่มีส่วนผสมของน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีที่ได้มีลักษณะสีขาว กลม และปรากฏวงใส (clear zone) รอบโคโลนี ดังรูปที่ 7

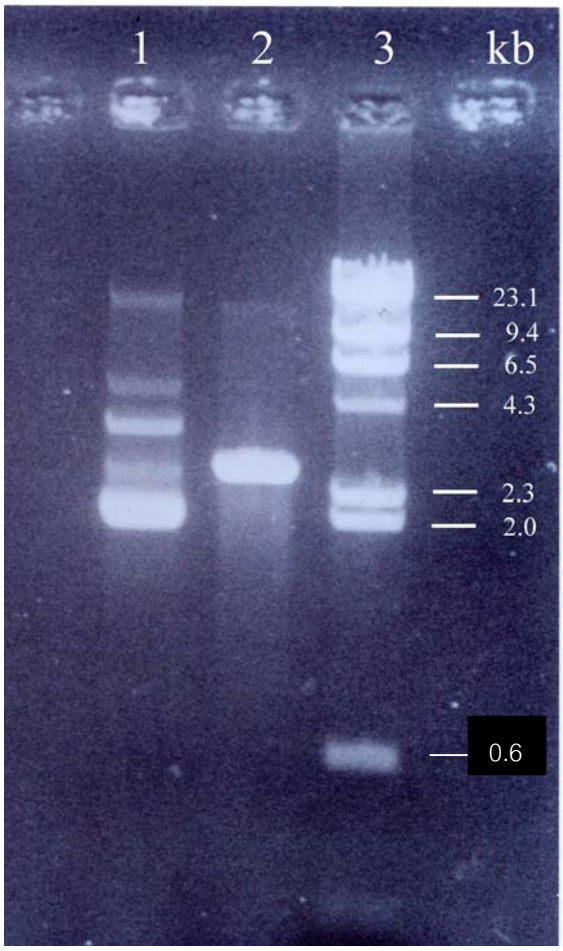


รูปที่ 5 Agarose gel electrophoresis ของโครโมโซมัลดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. UN16a ที่ถูกย่อยเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI

lane 1 : uncut โครโมโซม

lane 2-7 : โครโมโซมัลดีเอ็นเอที่ถูกย่อยเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI

lane 8 : λ DNA + *Hind* III



รูปที่ 6 Agarose gel electrophoresis ของ pUC18 ที่สกัดได้จาก *E. coli* JM109 และนำมาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI

lane 1 : Uncut pUC18

lane 2 : pUC18 + *Bam* HI

lane 3 : λ DNA + *Hind* III

ซึ่งแสดงว่า *Bacillus* sp. UN16a สามารถผลิตไลเปสออกสู่ภายนอกเซลล์มาย่อยน้ำมันปาล์มที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

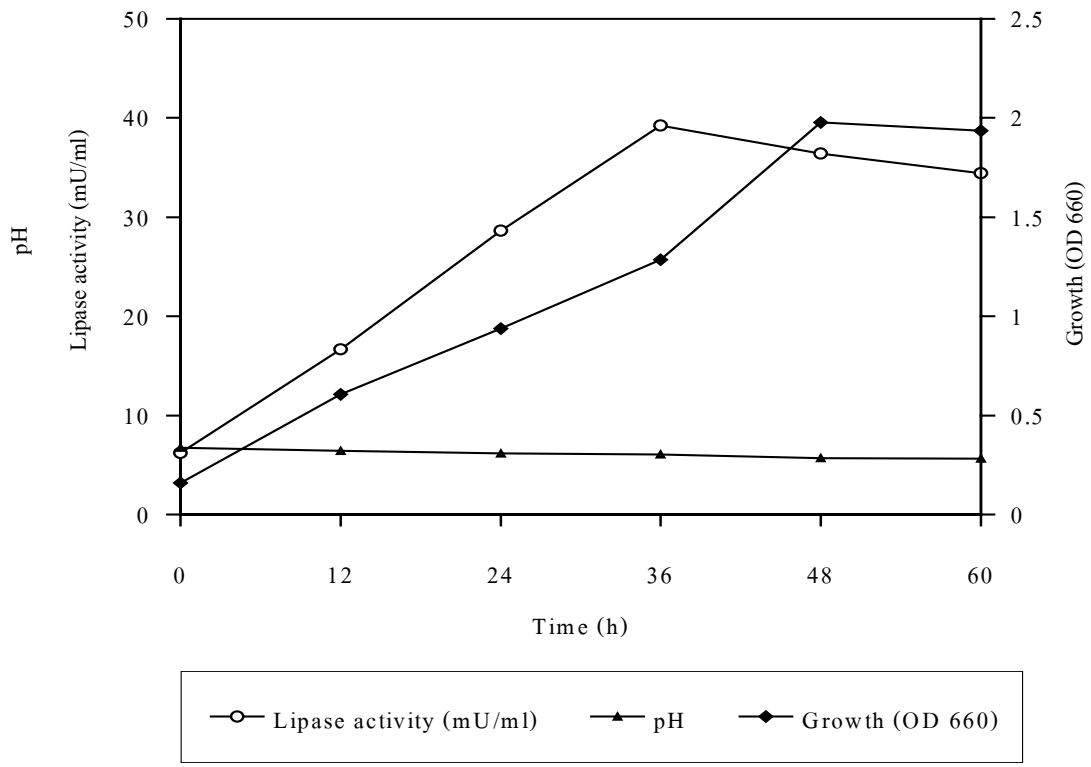
3.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

ตรวจสอบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในอาหารเหลวสำหรับคัดเลือกและผลิตไลเปสที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนผสม ดังรูปที่ 8 พบว่า *Bacillus* sp. UN16a จะมีการเจริญสูงสุด หลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการเจริญจะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 60 ส่วนกิจกรรมของไลเปสจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยจะมีค่ากิจกรรมของไลเปสสูงที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 39.29 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มค่อยๆลดลง

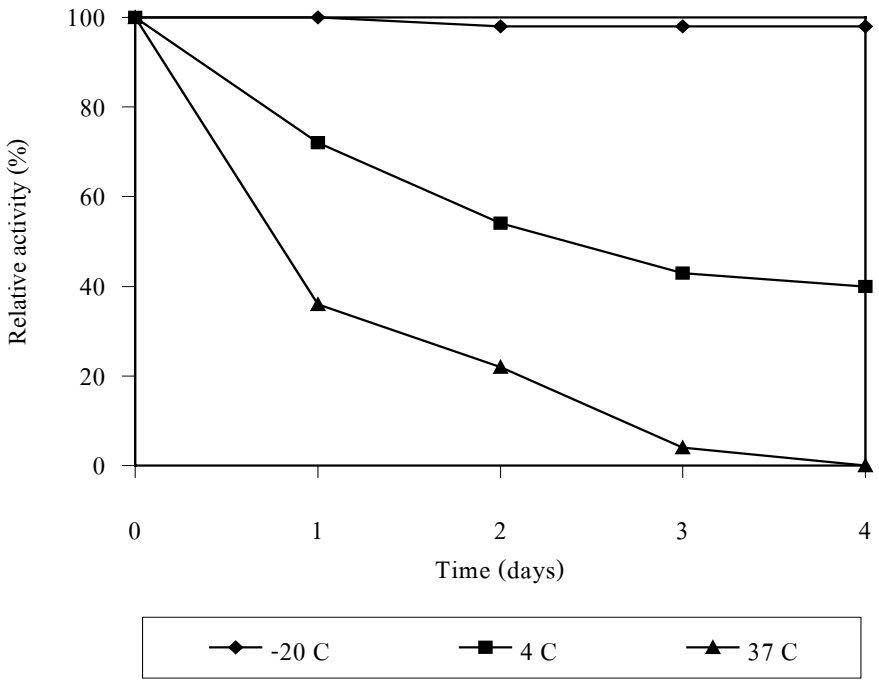
3.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

เมื่อนำอาหารเหลวที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกแล้วมาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของไลเปสที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 วัน ดังรูปที่ 9 พบว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของไลเปสในตัวอย่างอาหารเหลวที่เก็บในอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จะยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ลดลงเล็กน้อย จาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างอาหารเหลวที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างอาหารเหลวที่เก็บในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 โดยจะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 36 เปอร์เซ็นต์ และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของไลเปสจะมีค่าเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 4 วัน

รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. UN16a ที่เจริญบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกและผลิตไลเปสที่มีน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Lipase medium บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง



รูปที่ 9 ความคงตัวของเอนไซม์สกัด (crude enzyme extract) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a และเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิต่างๆกันเป็นระยะเวลา 4 วัน

3.5 การทำบริสุทธิ์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับแยกไลเปส

เมื่อนำอาหารเหลวที่ได้จากการถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. UN16a ลงไป และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที มาปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส และปริมาณโปรตีน ดังตารางที่ 10 พบว่า จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) เท่ากับ 39,330 มิลลิยูนิต โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total proteins) เท่ากับ 492 มิลลิกรัม และจะมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) เท่ากับ 79.9 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม

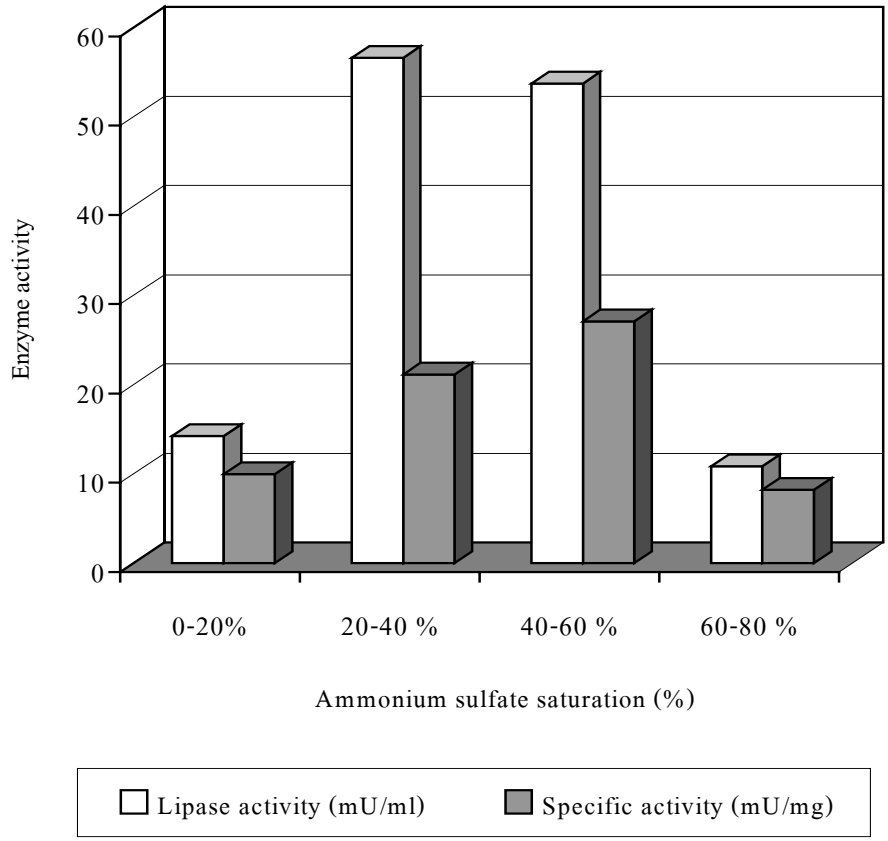
3.5.2 การตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อนำอาหารเหลวที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนเซลล์ออก และทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศมาตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วงความอิ่มตัวต่างๆ (รูปที่ 10) พบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้หลังจากผ่านการกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยการไดอะไลซิส (dialysis) สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในทุกช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอน โดยตะกอนโปรตีนที่ได้จากช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20-40 เปอร์เซ็นต์ และ 40-60 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 56.61 และ 53.72 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 21.16 และ 27.10 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนตะกอนที่ได้จากช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-20 เปอร์เซ็นต์ และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 14.21 และ 10.88 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 9.97 และ 8.24 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังรูปที่ 10 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ และ 40-60 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรม และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-20

ตารางที่ 10 การทำบริสุทธิ์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

Step	Total protein (mg)	Total activity (mg)	Specific activity (mU/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture broth	492	39,330	79.93	100	1.00
20-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$	41.8	2,373.6	56.78	6.03	0.71
DEAE-Sepharose CL-6B	19.25	1,139.6	59.20	2.89	0.74
Sephadex G-100	2.57	572.3	222.68	1.45	2.78

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 10 ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

เปอร์เซ็นต์ และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์จึงใช้ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-60 เปอร์เซ็นต์ในการตกตะกอน และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยวิธีไดอะไลซิส มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณโปรตีนประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.3 การทำบริสุทธิ์ไลเปสโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Sepharose CL-6B

นำเอาสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน โดยใช้เรซินชนิด DEAE-Sepharose CL-6B ที่บรรจุลงในคอลัมน์ ขนาด 1.0 x 10 เซนติเมตร และชะโปรตีนที่ไม่ได้จับกับเรซินด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ส่วนโปรตีนที่จับกับเรซินจะถูกชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (linear gradient elution) จาก 0 ถึง 1 โมลาร์ นำสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละหลอด ไปทำการตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยวิธีไดอะไลซิส (ภาพที่ 12) พบว่าสามารถแยกโปรตีนได้ 3 พีค คือ A, B และ C สารละลายไลเปสส่วนใหญ่ (พีค B) แยกออกมาจากโปรตีนชนิดอื่นได้โดยการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นประมาณ 0.5 โมลาร์ และจะไม่มีโปรตีนของเอนไซม์ถูกชะออกมาเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.85 โมลาร์ หลังจากนั้นนำสารละลายไลเปสเฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มารวมกันแล้วนำไปกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกโดยวิธีไดอะไลซิสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน พบว่า จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 1,139.6 มิลลิยูนิต โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 19.25 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 59.20 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนปริมาณสุทธิของเอนไซม์เท่ากับ 2.90 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) เท่ากับ 0.74 เท่า ดังตารางที่ 1

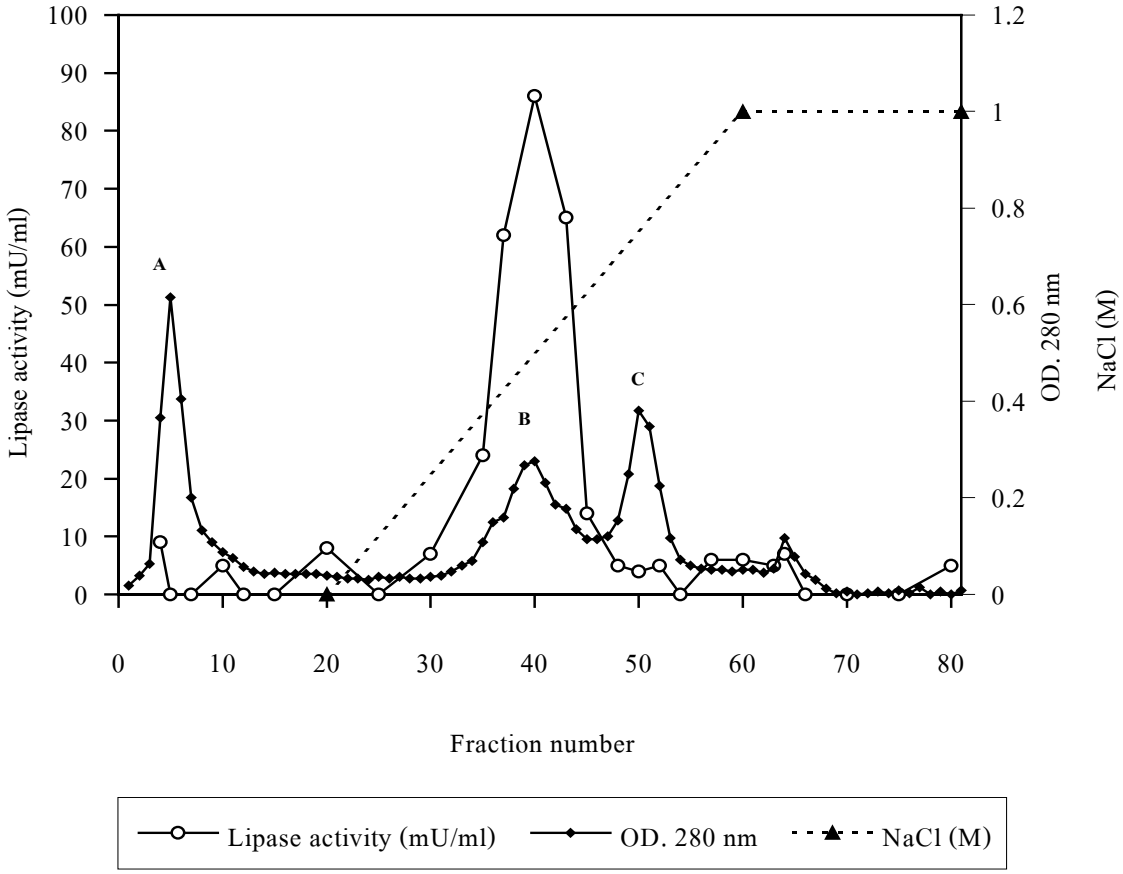
จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้นี้ไปทำให้เข้มข้นด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization)

3.5.4 การทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่นชนิด Sephadex G-100

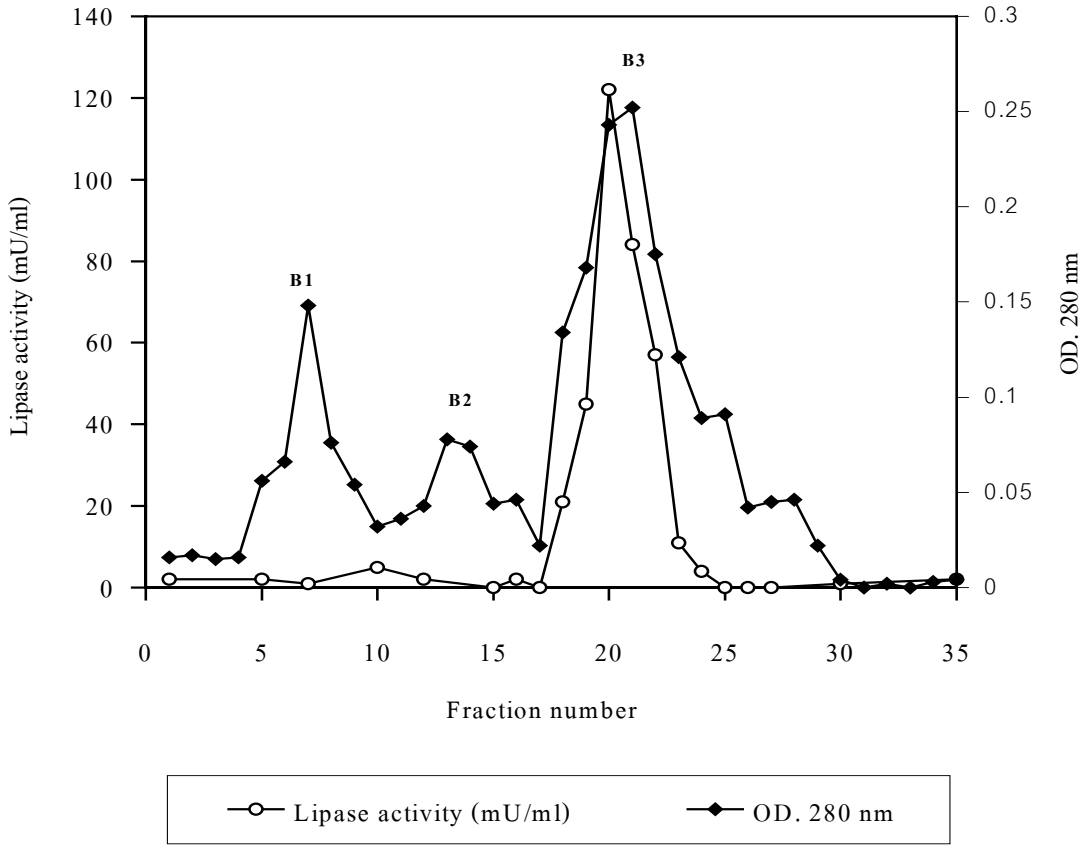
นำไลเปสที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์นี้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่นโดยใช้เรซินชนิด Sephadex G-100 ที่บรรจุลงนคอลัมน์ขนาด 1.0 x 45 เซนติเมตร และชะโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายเอนไซม์จนไม่มีโปรตีนถูกชะอออกมาจากคอลัมน์ นำสารละลายเอนไซม์ที่เก็บได้ในแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ 3 พีค คือ B1, B2 และ B3 ดังรูปที่ 12 โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมของไลเปสในพีค B3 ทำการรวมสารละลายเอนไซม์ในพีค B3 นำไปวิเคราะห์กิจกรรม และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ โดยจะมีค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ เท่ากับ 572.3 มิลลิยูนิต และ 2.57 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งสามารถคำนวณหากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ได้เท่ากับ 222.68 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 1.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เท่ากับ 2.79 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 10

3.5.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

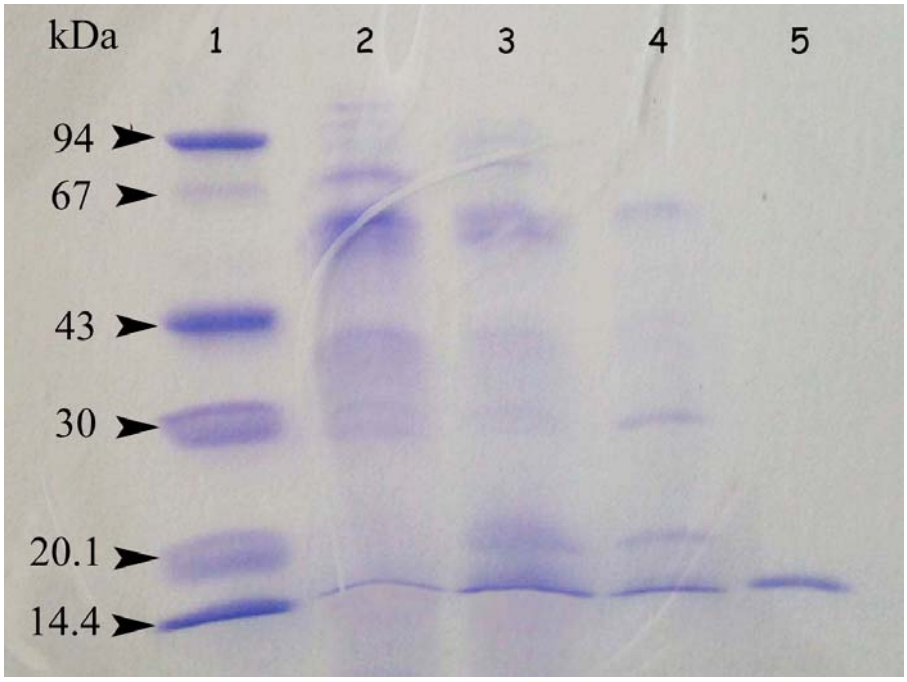
เมื่อนำตัวอย่างไลเปสที่ผ่านขั้นตอนต่างๆของการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (รูปที่ 13) พบว่า มีแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากในตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศและตัวอย่างที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 20-60 เปอร์เซ็นต์ และแถบโปรตีนส่วนใหญ่หลังจากที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



รูปที่ 11 การทำบริสุทธิ์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a โดยใช้คอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-Sepharose CL-6B ชะโปรตีนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ตามด้วยการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอด



รูปที่ 12 การทำบริสุทธิ์ไลเปส พีค B ด้วยคอลัมน์แบบเจลฟิวเตชั่นชนิด Sephadex G-100 ชะโปรตีนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 อัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตรต่อหลอด



รูปที่ 13 แถบโปรตีนของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a โดยวิธี SDS-PAGE

lane 1 : โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด

lane 2 : สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการระเหยแบบสุญญากาศ (ปริมาณโปรตีน 25 ไมโครกรัม)

lane 3 : สารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

lane 4 : สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอน DEAE-Sepharose CL-6B (ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม)

lane 5 : สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอน Sephadex G-100 (ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม)

จะจางหายไปมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Sepharose CL-6B และพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่น ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 17,000 ดาลตัน (รูปที่ 14) โดยเปรียบเทียบกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ของเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Rf ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลสบี (Phosphorylase b , M_r 94,000), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, M_r 67,000), โอวัลบูมิน (Ovalbumin, M_r 43,000 ดาลตัน), คาร์โบนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase, M_r 30,000), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor, M_r 20,100) และแอลฟาแลคทัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,400) กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด

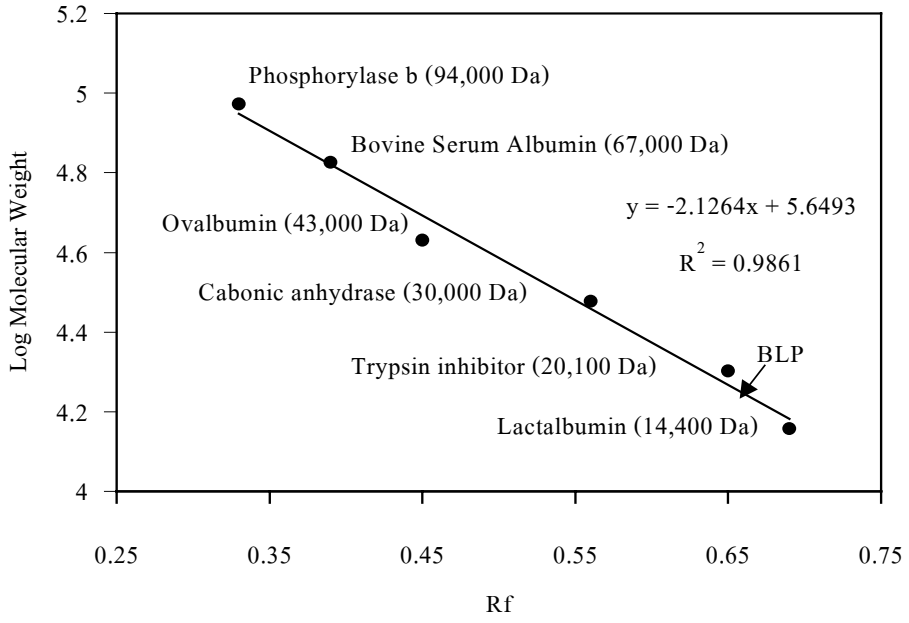
3.5.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

เมื่อนำตัวอย่างไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่นมาตรวจสอบความบริสุทธ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (รูปที่ 15) พบว่า มีโปรตีนที่ติดสีคูแมสซีบลูเพียงแถบเดียว ซึ่งเมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) กับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้เสียสภาพธรรมชาติ (native) (รูปที่ 16) พบว่า จะมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17,000 ดาลตัน

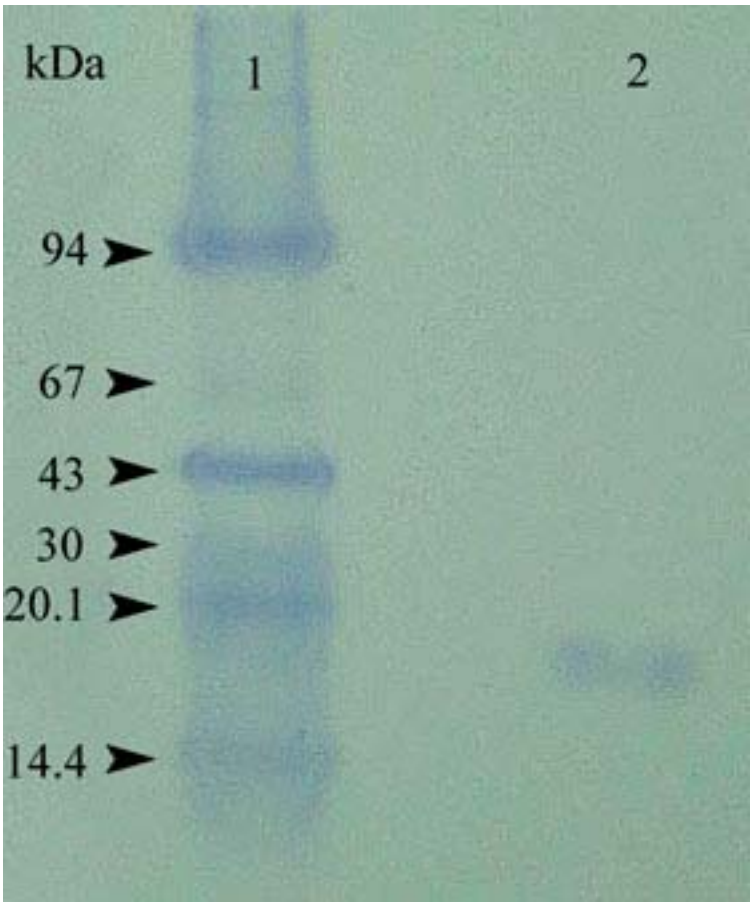
3.6 การศึกษาคุณสมบัติของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

3.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

นำสารละลายไลเปสที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยา (รูปที่ 17) พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น



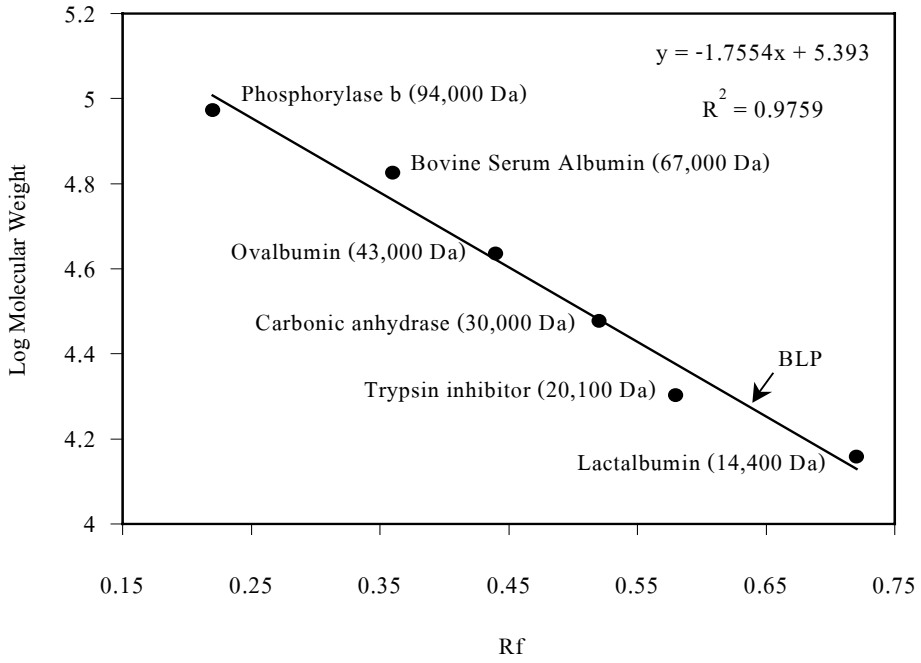
รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ใน 12 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE



รูปที่ 15 แถบโปรตีนบริสุทธิ์ของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a โดยวิธี Native-PAGE

lane 1 : โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด

lane 2 : สารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านขั้นตอน Sephadex G-100 (ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม)



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ใน 10-15 เปอร์เซ็นต์ Native-PAGE

จาก 35 องศาเซลเซียส จนถึง 60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส และเมื่ออุณหภูมิในในการทำปฏิกิริยาสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์

3.6.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

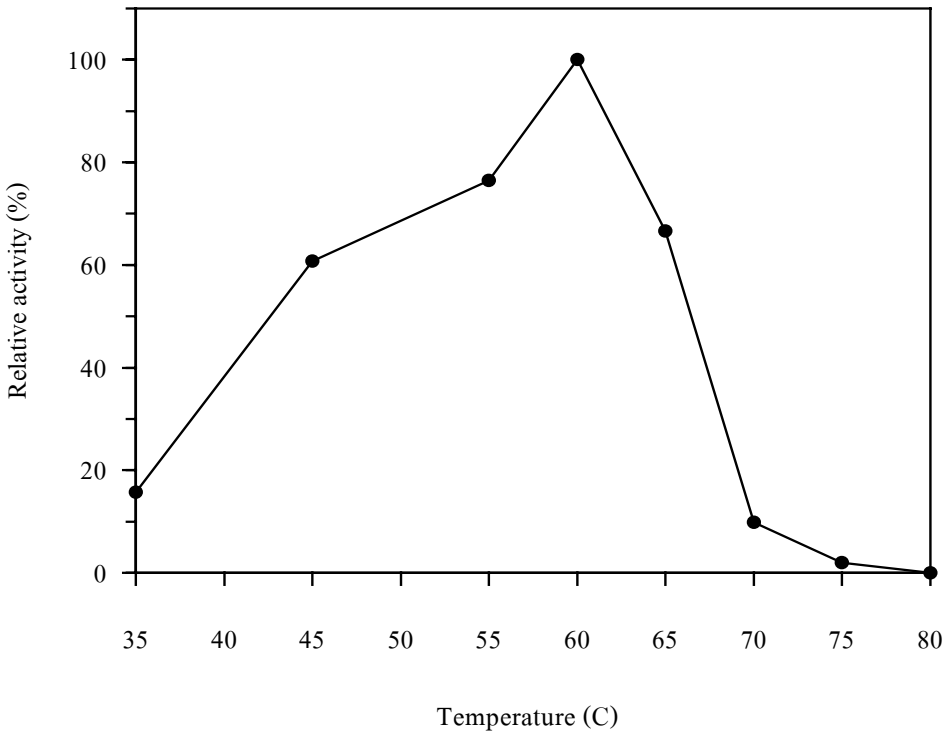
นำสารละลายไลเปสที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 เป็นเวลา 15 นาที (รูปที่ 18) พบว่า ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของไลเปสสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อพีเอชในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ในช่วง 7.0-10.0 ที่พีเอช 8.0 ไลเปสสามารถมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และค่ากิจกรรมของไลเปสจะเท่ากับศูนย์เมื่อพีเอชในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เท่ากับ 4.0

3.6.3 ความคงตัวที่พีเอชต่างๆของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

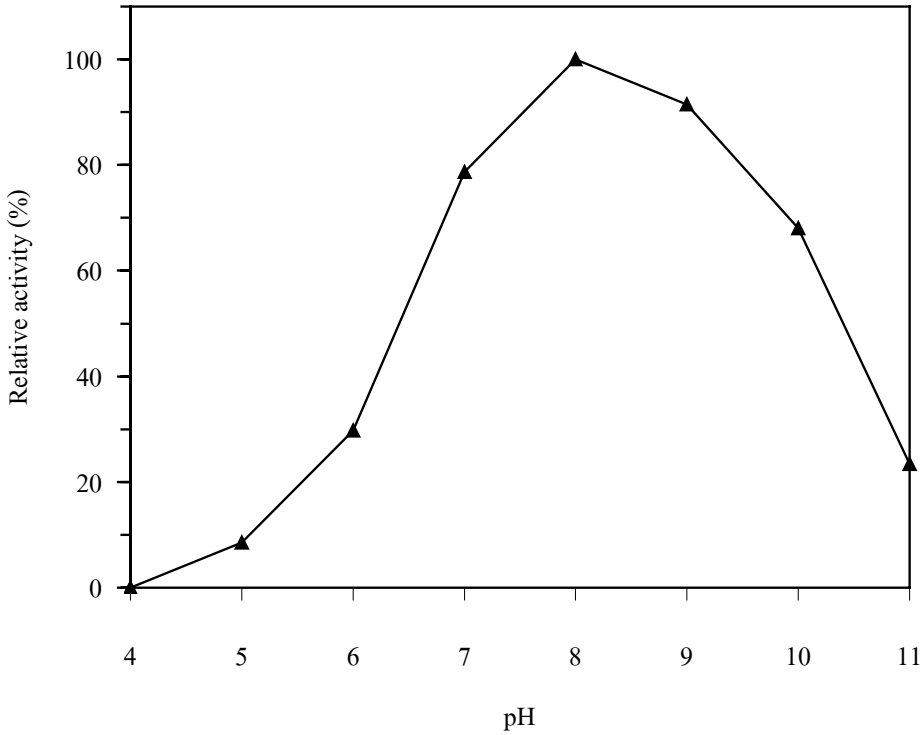
นำสารละลายไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อความคงตัวของไลเปสโดยเก็บสารละลายเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆได้แก่ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 19) พบว่า ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพีเอชในการศึกษาอยู่ในช่วง 6.0-10.0 และเอนไซม์จะมีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และเอนไซม์นี้มีความคงตัวลดลงเมื่อพีเอชเป็นกรดหรือเป็นด่างมากขึ้น

3.6.4 ความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

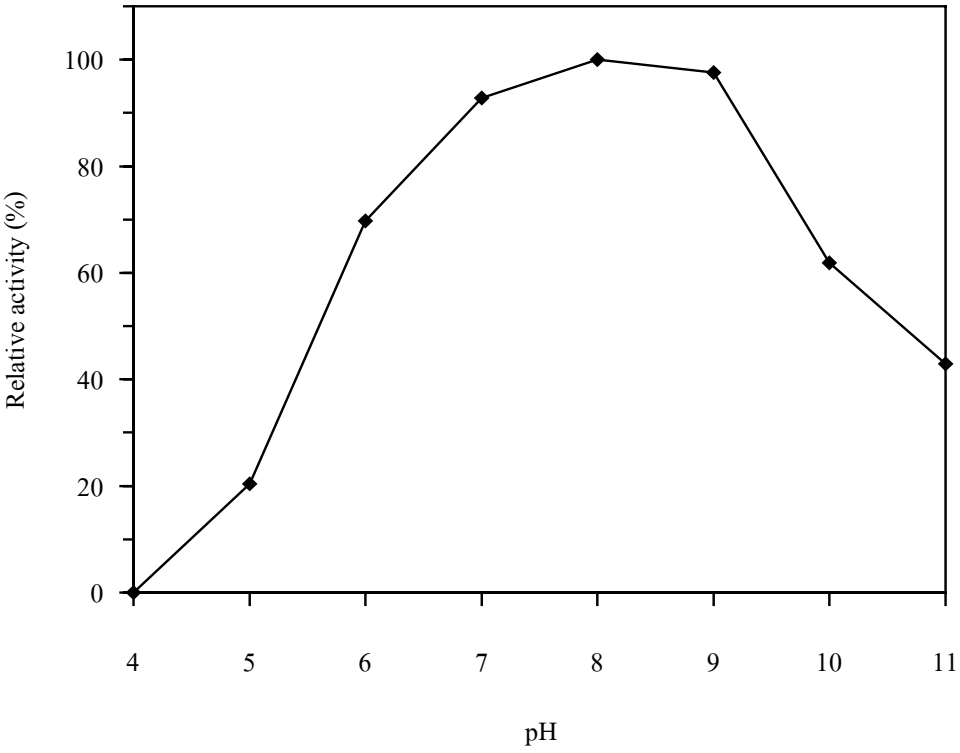
นำสารละลายไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ได้แก่ 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 เป็นเวลา 60 นาที แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 20) พบว่า เอนไซม์จะมีความคงตัวได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนั้นเอนไซม์



รูปที่ 17 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a



รูปที่ 18 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a



รูปที่ 19 ความคงตัวของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a ที่พีเอชต่างๆ

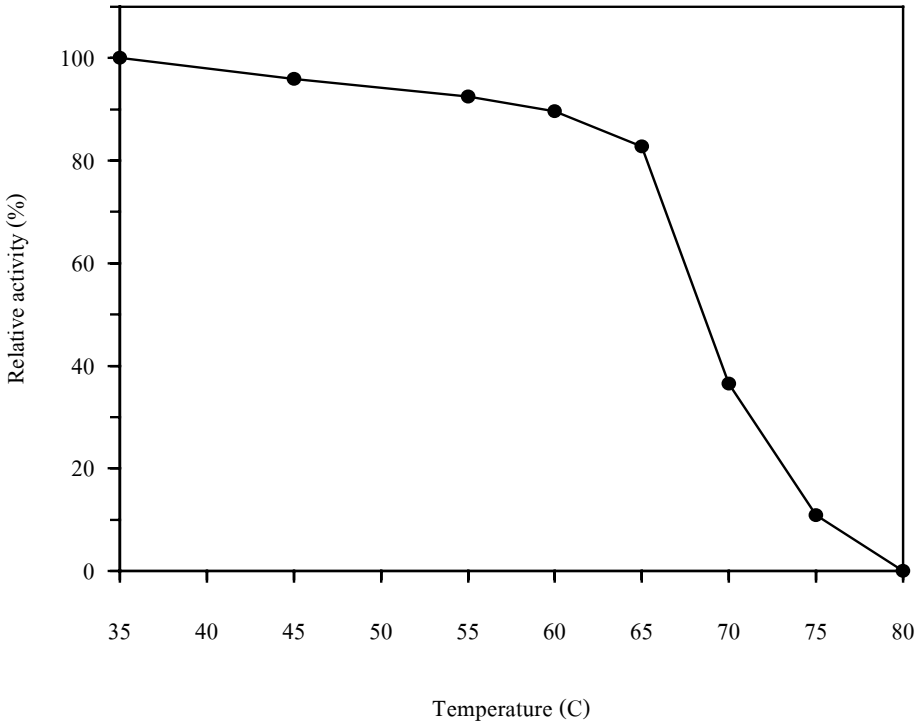
จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 70 และ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์

3.6.5 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

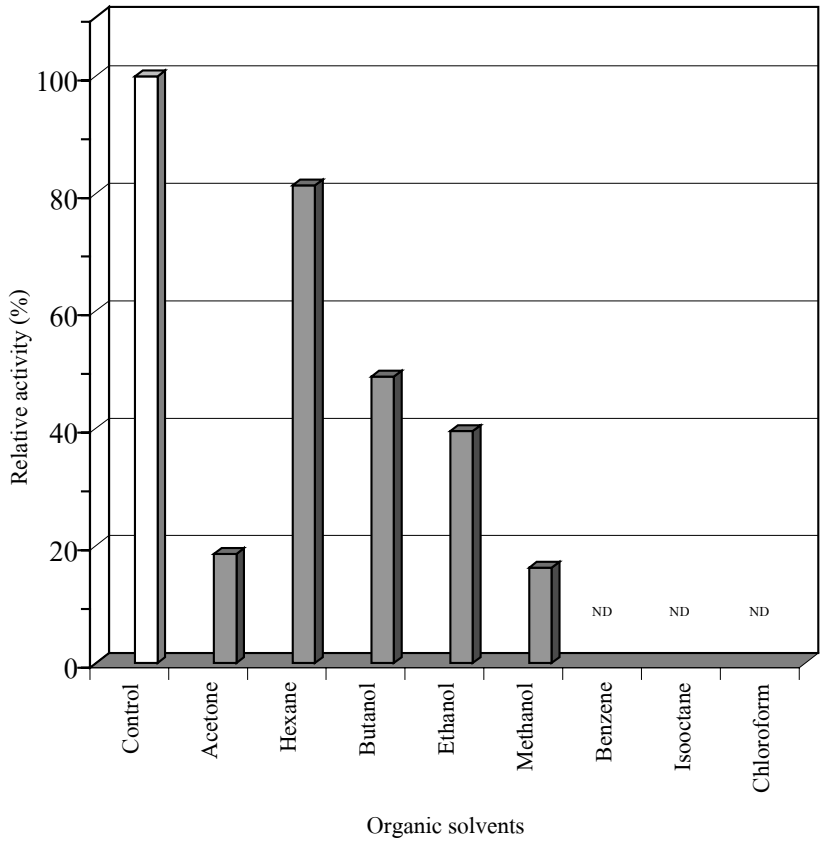
จากการนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ acetone, hexane, butanol, ethanol, methanol, benzene, isooctane และ chloroform ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 21) พบว่า ไลเปสจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในการทำปฏิกิริยา โดยไลเปสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติม hexane ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งมีค่ามากกว่าในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีการเติม butanol, ethanol, acetone และ methanol ตามลำดับ โดยในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีการเติม benzene, isooctane และ chloroform นั้นไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ได้ เนื่องจากเกิดความขุ่นขึ้นเมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์สามชนิดหลังนี้ลงในสารละลายเอนไซม์ และสับสเตรท

3.6.6 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

จากการทดสอบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความคงตัวของไลเปสที่ผ่านการบริสุทธ์ในขั้นตอนสุดท้าย โดยบ่มสารละลายเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆเช่นเดียวกับที่ใช้ทดสอบในข้อ 3.6.5 โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ในสัดส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (รูปที่ 22) พบว่า สารละลายเอนไซม์มีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆลดลง แต่สารละลายเอนไซม์มีความคงตัวต่อ isooctane ได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่



รูปที่ 20 ความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆของไลเปสบริสุทธ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a



หมายเหตุ ND : No determination because of the reaction mixture was turbid after addition of solvent

รูปที่ 21 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆต่อกิจกรรมของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

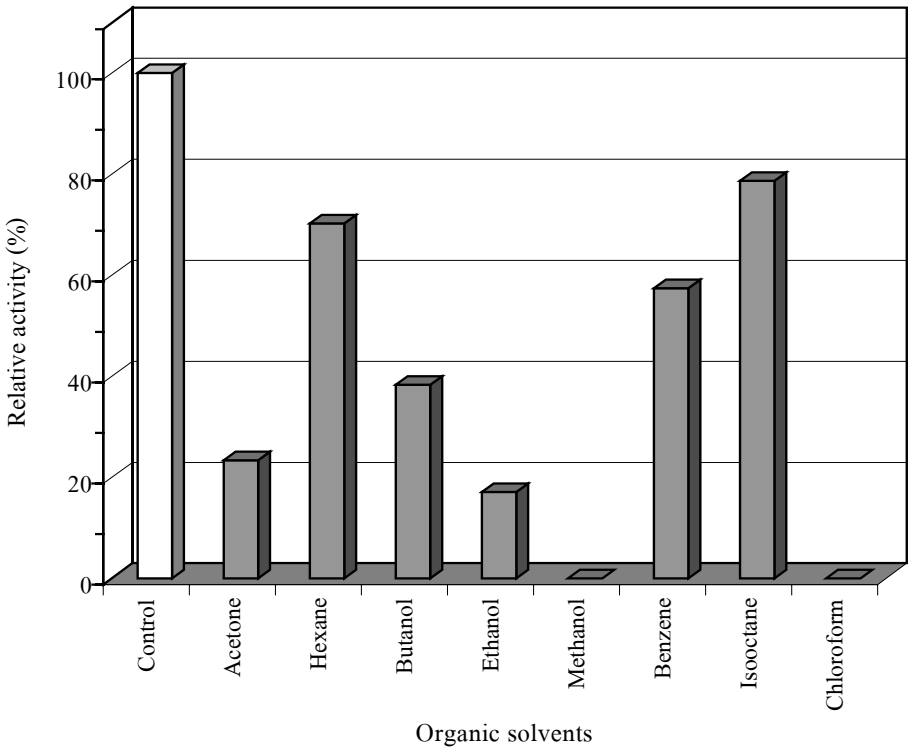
ที่เป็นแอลกอฮอล์นั้น สารละลายเอนไซม์จะมีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนที่ยาว เช่น butanol ได้ดีกว่า ethanol ซึ่งมีสายโซ่คาร์บอนที่สั้นกว่า และไม่สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทดสอบกับ methanol และ chloroform

3.6.7 ผลของไอออนของโลหะชนิดต่างๆต่อการทำงานของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

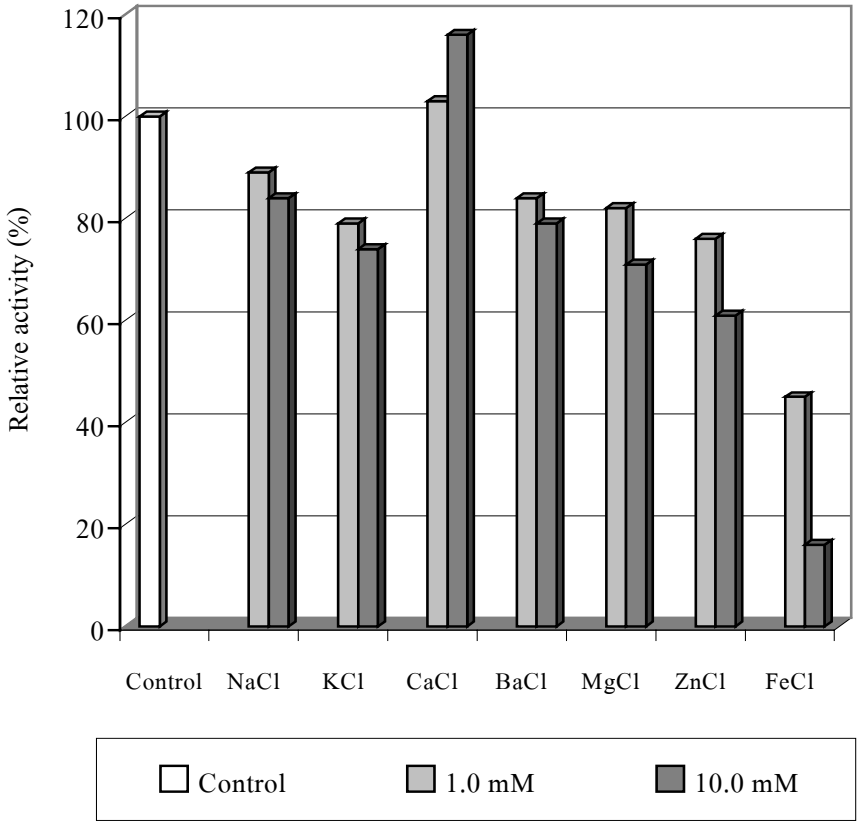
จากการทดสอบผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยมีการเติมไอออนของโลหะหนักชนิดต่างๆในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 23) พบว่า ไอออนทุกตัวที่นำมาทดสอบยกเว้น Ca^{2+} สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โดย Fe^{3+} ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด โดยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอออนตัวอื่น เช่น Na^{+}, K^{+}, Ba^{2+}, Mg^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่าง 61-89 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยังคงทำให้เอนไซม์ทำงานปกติเท่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ไอออน แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} เป็น 10 มิลลิโมลาร์ ไอออนนี้จะทำหน้าที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ได้ถึง 116 เปอร์เซ็นต์

3.6.8 ผลของสารเคมีชนิดอื่นต่อการทำงานของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

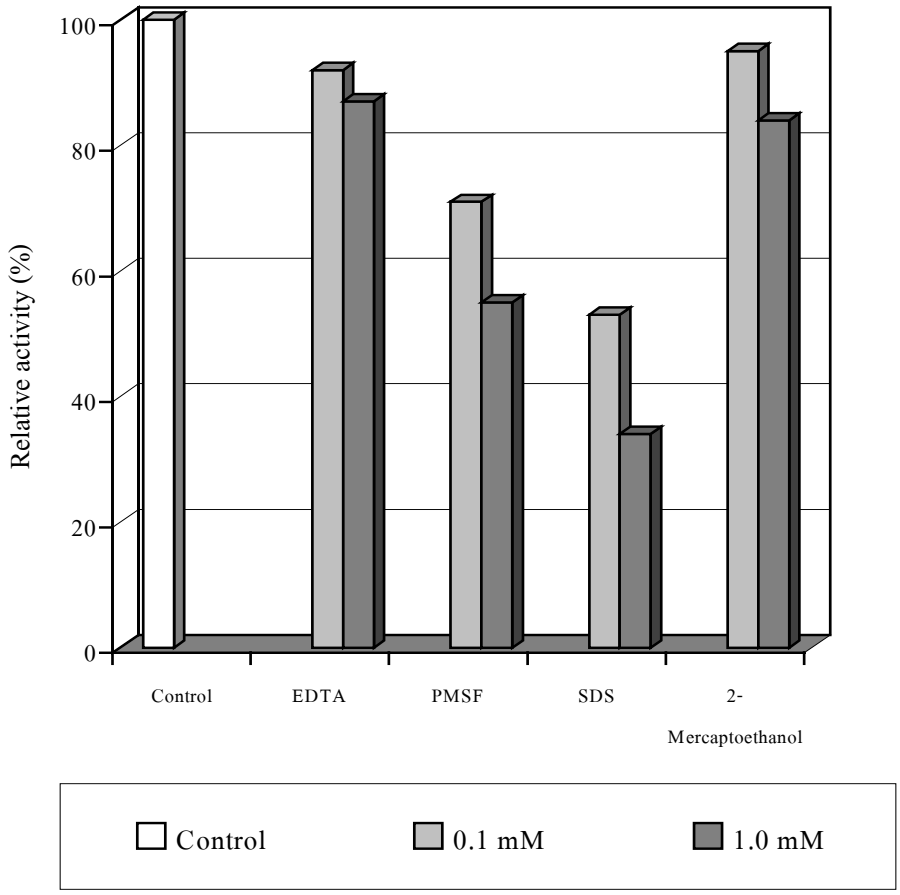
จากการทดสอบผลของสารเคมีชนิดอื่น ต่อการทำงานของไลเปส โดยมีการเติมสารดังกล่าวลงไปในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ (รูปที่ 24) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA, PMSF และ 2-mercaptoethanol ลดการทำงานของเอนไซม์ลง 8, 29 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ SDS ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มข้นของสารเป็น 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า EDTA และ 2-mercaptoethanol ลดการทำงานของเอนไซม์ลง 13 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ส่วน PMSF และ SDS ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่า 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 22 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆต่อความคงตัวของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์



รูปที่ 23 ผลของไอออนของโลหะชนิดต่างๆต่อกิจกรรมของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a



รูปที่ 24 ผลของสารเคมีชนิดต่างๆต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a