บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไลเปส (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ผลผลิตเป็น โมโนกลีเซอรอล (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ตรงผิวร่วมระหว่างน้ำและน้ำมัน (Mitsuhashi *et al*., 1994; Vulfson, 1994; Pernas *et al*., 2000) ไลเปสไม่เพียงสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในสภาวะที่มีน้ำแต่ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ และเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา (Mitsuhashi *et al*., 1999) เนื่องจากสับสเตรทของไลเปสมักเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตัวกลางที่ประกอบไปด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Agino *et al*., 2000) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาของไลเปสในสภาวะที่มีน้ำเพียงเล็กน้อยเป็นปฏิกิริยาที่มีประโยชน์มากสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลของสารอินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นจำนวนมาก (Andree *et al*., 1980; Bjoking *et al*., 1991 อ้างโดย Mitsuhashi *et al*., 1999) ซึ่งแหล่งของไลเปสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นที่สนใจมากกว่าไลเปสจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากโดยใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ และมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (Macrae and Hammond, 1985) โดยได้มีการศึกษาการนำไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมายได้แก่ อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมน้ำมันและไขมัน อุตสาหกรรมนม อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (Mayordomo *et al*., 2000) และในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักผลิตจาก รา และยีสต์ (Tatara *et al*., 1985) แต่ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียนั้นได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเนื่องจากไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีความคงตัวที่สูงกว่าเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง

และในสภาวะที่รุนแรง (Sugihara *et al*., 1992 อ้างโดย Lotrakul and Dharmsthiti, 1997) โดยไลเปสหลายชนิดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง แต่ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงนอกจากจะมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่สูงแล้วยังมีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด (Schmidt-Dannert, 1996) ซึ่งอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักใช้อุณหภูมิที่สูงและตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการผลิต และเมื่อเร็วๆนี้ จุรีรัตน์ แซ่แต้ (2541) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* spp. และสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และพบว่า *Bacillus* sp. UN16a มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันได้ และยังเป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาวิจัยต่อไปโดยทำการทดลองโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a เข้าสู่ *E. coli* และศึกษาการทำบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ไลเปส

ไลเปส (EC 3.1.1.3 : glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่มักจะเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันที่ยาว ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำที่อยู่ในลักษณะอิมัลชั่น (emulsion) ที่ไม่ได้อยู่ในรูปโมโนเมอร์ (monomeric) (Robert, 1997) แต่ก็มีไลเปสบางชนิดซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ได้ เช่น ไลเปสจาก *Bacillus subtilis* (Jaeger *et al*., 1994) โดยไลเปสจะไฮโดรไลซ์โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกลีเซอรอล (glycerol) โดยไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Fogarty, 1983; Macrae, 1983) และจากการที่มีการค้นพบโครงสร้างสามมิติของไลเปสจึงพบว่า บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์จะมีสายโพลิเปปไทด์ (polypeptides) ที่ทำหน้าที่เป็นฝาปิดตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้ โดยสาย

โพลิเปปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่ และขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α-helical lid) โดยฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนซีรีน (serine) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากกรดอะมิโนซีรีนแล้วยังพบกรดอะมิโนอีก 2 ชนิด ได้แก่ ฮีสทิดีน (histidine) และกรดแอสพาติก (aspartic acid) ที่เป็นตัวช่วยการทำงานของกรดอะมิโนซีรีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Balcao *et al*., 1996)

2. แหล่งของไลเปส

แหล่งของไลเปสพบได้ทั้งใน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย (Jaeger *et al*., 1994) และไลเปสบางชนิดได้มีการนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ในทางปฏิบัติไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Onishi *et al*., 1994; Wong, 1995) โดยตัวอย่างไลเปสจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้มากในทางการค้า ได้แก่ ไลเปสจาก รา เช่น ไลเปสที่ผลิตโดย *Aspergillus* และ *Penicillium* ไลเปสจากยีสต์ เช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea* (Hatzinikolaou *et al*., 1999; Chen, 1996 อ้างโดย Gulati *et al*., 1999)

2.1 ไลเปสจากสัตว์

ไลเปสที่ได้จากสัตว์ พบได้ทั้งใน เนื้อเยื่อสัตว์ และอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้ หัวใจ ไต กล้ามเนื้อ และสมอง นอกจากนี้ยังพบไลเปสในน้ำนมสัตว์ (Wong, 1995) ไลเปสจากตับอ่อนมี 2 รูปแบบ คือ ไลเปส-เอ และ ไลเปส-บี โดยระบบไลเปสในตับอ่อนนอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 8,000 ดาลตัน มีหน้าที่ช่วยไลเปสในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (Shahani, 1975)

2.2 ไลเปสจากพืช

ไลเปสที่ได้จากพืช พบได้ทั้งใน เนื้อเยื่อพืช ผัก ผลไม้ และในเมล็ดพืชโดยไลเปสจากพืชที่พบส่วนใหญ่จะพบในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ๊ต (Kaur *et al*., 1993) รำข้าว

เมล็ดปาล์ม เมล็ดยางพารา ถั่วเหลือง (Wong, 1995) ข้าวสาลี และเมล็ดละหุ่ง เป็นต้น โดยไลเปสที่ได้จากเมล็ดละหุ่งได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Shahani, 1975)

2.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสที่ได้จากพืช และจากสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เติบโตได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่า พืช และสัตว์ การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยง และการเก็บเกี่ยว อีกทั้งความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้ก็สูงกว่า และไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Alcaligenes* sp. No. 679 (Kokusho *et al.,* 1982), *Bacillus* A30-1 (Wong *et al*., 1995), *Bacillus* sp. (Nawani *et al*., 1998), *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al*., 2000) และ *Cryptococcus* sp. S-2 (Kamini *et al*., 2000) จะผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง *Chromobacterium* sp. (Frost and Moss, 1987), *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 (Dharmsthiti *et al*., 1998), *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol *et al*., 1999) จะผลิตไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง *Rhizopus chinensis* (Yasuda *et al*., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino *et al*., 2000) และ *Aspergillus nidulans* (Mayordomo *et al*., 2000) จะผลิตไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด และ *Humicola lanuginosa* ผลิตไลเปสที่ทนความร้อน (Liu *et al*., 1973) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไลเปสได้หลายชนิดที่มีคุณสมบัติที่ แตกต่างกันด้วย เช่น *Bacillus thermocatenulatus* จะผลิตไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปส BTL-1 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 7.0-8.0 และไลเปส BTL-2 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.0-9.0 (Schmidt-Dannert *et al*., 1996) และจากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสได้ต่างชนิดกันจึงทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) สำหรับขนาดโมเลกุลของไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีขนาดต่างๆกัน เช่น ไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* จะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 16 kDa (Schmidt-Dannert *et al*., 1994) ไลเปสจาก *Aspergillus nidulans* มีขนาดโมเลกุลประมาณ 29 kDa (Mayordomo *et al*., 2000) และไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL027 ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 69 kDa (Dharmsthiti and Luchai, 1999) เป็นต้น ในบางกรณีพบว่าไลเปสจะมีขนาดใหญ่ซึ่งเนื่องมาจากการรวมกันของโมเลกุลของ

เอนไซม์ทำให้กลายเป็นโมเลกุลใหญ่ (Lesuisse *et al*., 1993) เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL027 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ พบว่า เอนไซม์จะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 kDa (Dharmsthiti and Luchai, 1999) ไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* จะมีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า จะมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 750 kDa (Schmidt-Dannert *et al*., 1994) โดยน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

microorganisms	Molecular weight (kDa)	References
Pseudomonas putida 3SK	45	Lee and Rhee, 1993
Pseudomonas aeruginosa MB5001	29	Chartrain *et al*., 1993
Pseudomonas fluorescens Strain 2D	42	Makhzoum *et al*., 1996
Aeromonas sobria LP004	97	Lotrakul and Dharmsthiti, 1997
Acinetobacter nov. sp. Strain KM109	62	Mitsuhashi *et al*., 1999
Bacillus sp. THL027	69	Dharmsthiti and Luchai, 1999
Bacillus thermocatenulatus DSM730	16	Schmidt-Dannert *et al*., 1994
Bacillus sp.	22	Sugihara *et al*., 1991
Aspergillus nidulans	29	Mayordomo *et al*., 2000
Rhizopus chinensis	28.4	Yasuda *et al*, 1999
Rhizopus oryzae	32	Hiol *et al*., 2000
Mucor hiemalis f. hiemalis	49	Hiol *et al*., 1999
Streptomyces rimosus	27.5	Abramic *et al*., 1999

3. ชนิดของไลเปสจากจุลินทรีย์

Macrae (1983) ได้แบ่งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ (รูปที่ 1)

กลุ่มที่หนึ่ง เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยเอนไซม์พวกนี้จะสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล และ กรดไขมัน แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารประกอบในระหว่างการเกิด ปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

กลุ่มที่สอง เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่โมเลกุลทั้งสองชนิดนี้จะไม่คงตัว ถ้าบ่มไว้เป็นเวลานานก็จะเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และ *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์

กลุ่มที่สาม เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

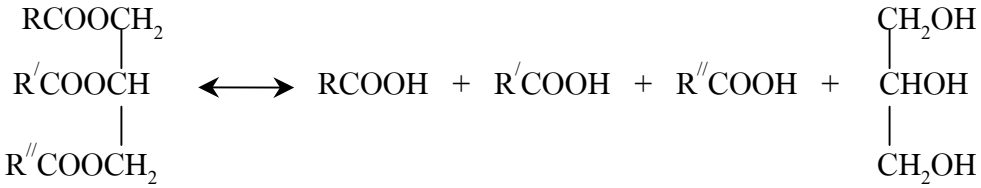
แต่ Yamane (1987) ได้แบ่งไลเปสออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือ กลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ และกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ โดยให้ความเห็นว่า คำว่าไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันนั้นมีความหมายกำกวม เพราะเมื่อกล่าวถึงความจำเพาะชนิดนี้จะกล่าวในรูปของ relative hydrolysis rate ของ single triglyceride กับจำนวนคาร์บอนในรูปกรดไขมัน นั่นคือ ไลเปสก็ยังสามารถไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์หลายชนิด แต่จะทำงานด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไลเปสไม่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันโดยแท้จริง เพราะฉะนั้นไลเปสจึงควรมีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้น แต่ก็ยังมีรายงานว่า ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกันโดยเด็ดขาด เพราะไลเปส กลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์นั้นก็จัดเป็นไลเปสในกลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ เพราะสามารถที่จะไฮโดรไลซ์โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้

ทุกตำแหน่ง แต่จะไฮโดรไลซ์ได้น้อยกว่าไลเปสที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

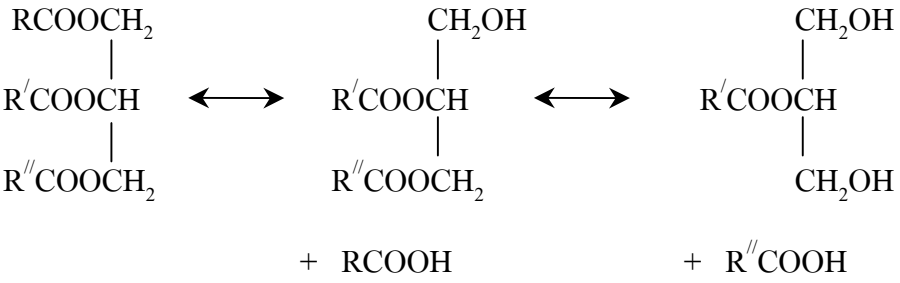
4. ความจำเพาะของไลเปส

จากการที่ Macrae (1983) ได้แบ่งความจำเพาะของไลเปสออกเป็น 3 กลุ่ม และจาก Yamane (1987) ได้แบ่งไลเปสตามความจำเพาะเป็น 2 กลุ่ม ต่อมาในปี 1997 ได้มีการแบ่งไลเปสจากสิ่งมีชีวิตออกเป็น 5 กลุ่ม (Villeneuve and Foglia, 1997) ดังตารางที่ 2

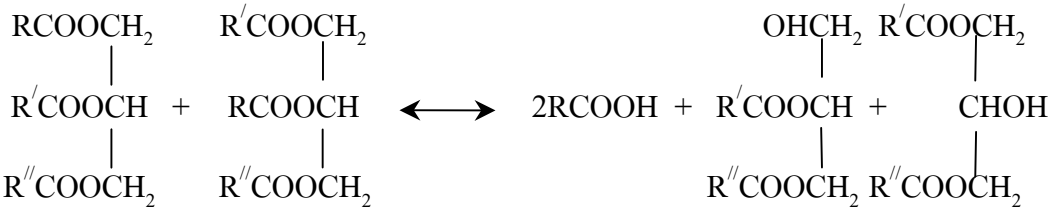
1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



รูปที่ 1 ชนิดของไลเปสตามแนวความคิดของ Macrae

ที่มา : Macrae (1983)

4.1 ไลเปสที่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Substrate specific lipase)

ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ตรงพันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้นที่เป็นทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และแม้แต่ฟอสโฟลิปิด โดยไลเปสในกลุ่มนี้พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งไลเปสโดยทั่วไปที่ได้จากสัตว์จะสามารถไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด แต่จะไฮโดรไลซ์ โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ต่ำสุด ส่วนไลเปสจากพืช และจุลินทรีย์สามารถไฮโดรไลซ์ ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงกว่าสับสเตรตชนิดอื่น แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสที่มีความจำเพาะกับโมโนเอซิลกลีเซอรอล และไดเอซิลกลีเซอรอลมากกว่าไตรเอซิล กลีเซอรอล เช่น ไลเปสจาก *Penicillium camembertii* (Macrae,1983) เป็นต้น

4.2 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (Positional or Regiospecific)

ไลเปสในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งภายนอกและตำแหน่งภายในของแกนกลางไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่น ไลเปสชนิด 1,3-regioselective จะไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง sn-1 และ sn-3 ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งไลเปสที่จัดเป็นชนิด 1,3-regioselective นั้นได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อนหมู ไลเปสจาก *Aspergillus niger, Rhizopus arrhizus และ Candida antarctica* (ตารางที่ 2)

4.3 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (Non specific lipase)

ไลเปสเหล่านี้มีอยู่มากมาย โดยไลเปสกลุ่มนี้จะสามารถไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ ทั้งหมดในไตรเอซิลกลีเซอรอล (ตารางที่ 2)

4.4 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid or acyl selective)

ไลเปสกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมัน โดยจะไฮโดรไลซ์กรดไขมัน เหล่านั้นโดยไม่คำนึงถึงตำแหน่งของเอสเทอร์บนไตรเอซิลกลีเซอรอล ตัวอย่างของไลเปสชนิดนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด cis-9-unsaturated fatty acid และไลเปสจาก *Botrytis cinerea* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

4.5 ไลเปสที่มีความจำเพาะ (Stereospecific)

ไลเปสชนิดนี้สามารถเลือกทำปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสระหว่างตำแหน่ง sn-1 หรือ sn-3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* และ *Pseudomonas*

fluorescens จะจำเพาะสำหรับ sn-1 ส่วนไลเปสจากกระเพาะกระต่าย และ *Fusarium solani* จะจำเพาะสำหรับ sn-3

5. การทำงานของไลเปส

Gandhi (1997) ได้แบ่งการทำงานของไลเปสเป็น 2 กลุ่ม คือ การย่อยสลายเอสเทอร์ และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ esterification, acidolysis, interesterification และ alcoholysis และสาม ปฏิกิริยาหลังนี้ได้มีการจัดไว้ในกลุ่มที่ชื่อว่า transesterification แต่ Yamane (1987) ได้จัดให้ปฏิกิริยา aminolysis อยู่ในกลุ่ม transesterification ด้วย (รูปที่ 2)

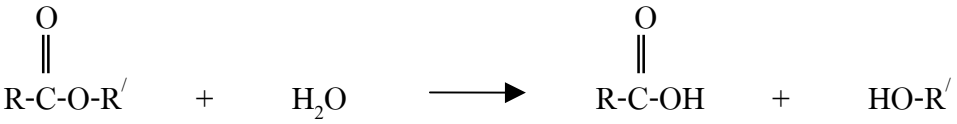
6. ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัว และกิจกรรมของไลเปส

ลักษณะการทำงาน และความคงตัวของไลเปสมีผลมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ต่างๆ ดังต่อไปนี้

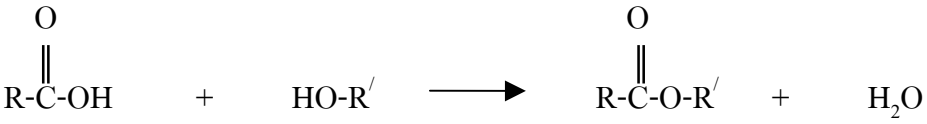
6.1 พีเอช

ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีทั้งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่างๆกัน เช่นไลเปสที่ได้ จาก *Aspergillus niger* (Omar and Jamil, 1991) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ไลเปส จาก *Aeromonas hydrophila* (Anguita *et al.,* 1993 อ้างโดย พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 2538) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง และไลเปสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* 168 (Lessuisse *et al.,* 1993) และ *P. aeruginosa* EF2 (Gilbert *et al.,* 1991) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนใหญ่ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนมักจะเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็น กลาง และค่อนไปทางด่าง (Sugihara *et al*., 1992) ส่วนความคงตัวต่อ พีเอชของไลเปส จากจุลินทรีย์นั้นพบว่า ส่วนใหญ่จะมีความคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้าง เช่น ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK มีความคงตัวได้ในช่วงพีเอช 4.0-10.0 (Lee and Rhee, 1993) ไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-11.0 (Kim *et al*., 1994) และไล เปสจาก *Mucor hiemalis f. hiemalis* มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-9.0 (Hiol *et al*., 1999) เป็นต้น โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน และความคงตัวของไลเปสจากจุลินทรีย์แสดง ไว้ดังตารางที่ 3

1. Hydrolysis



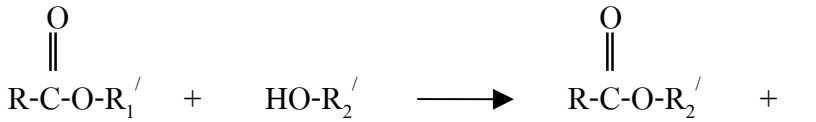
2. Synthesis



3. Transesterification

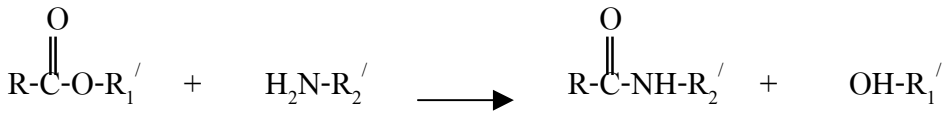
3.1 Acidolysis

3.2 Alcoholysis



3.3 Interesterification

3.4 Aminolysis



รูปที่ 2 การทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Yamane (1987)

6.2 อุณหภูมิ

ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทำงาน และความคงตัวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Aspergillus nidulans* จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 0-20 องศาเซลเซียส (Mayordomo *et al*., 2000) ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 มีกิจกรรมของไลเปสมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Iizumi *et al.,* 1990) ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Lee and Rhee, 1993) ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Chartrain *et al*., 1993) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 4

6.3 ตัวทำละลายอินทรีย์

นอกจากไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไขมัน และน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำ แต่ไลเปสยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ (Mitsuhashi *et al*., 1999) เพราะจะสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวรูปที่มีคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพตามที่ต้องการได้ โดยการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำนั้นจะมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักจะลดความยืดหยุ่นในโมเลกุลของเอนไซม์ และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ (Klibanov, 2001) ซึ่งตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของไลเปส เช่น methanol จะทำให้ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 (Chartrain *et al*., 1993), *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D (Makhzoum *et al*., 1996), *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol *et al*., 1999) และ *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al*., 2000) มีความคงตัวลดลง นอกจากตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไลเปสมีความคงตัวลดลง แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดก็สามารถเพิ่มความคงตัวของ

ตารางที่ 2 ไลเปสชนิดต่างๆตามความจำเพาะของเอนไซม์

Specificity	Lipase
Substrate specific	
Monoacylglycerols	Rat adipose tissue
Mono- and diacylglycerols	*Penicillium camembertii*
Triacylglycerols	*Penicillium* sp.
Regiospecific	
1,3-Regioselective	*Aspergillus niger*
	Rhizopus arrhizus
	Mucor miehei
Sn-2-Regioselective	*Candida antarctica*
Nonspecific	
	Penicillium expansum
	Aspergillus sp.
	Pseudomonas cepacia
Fatty acylspecific	
Short-chain fatty acid (FA)	*Penicillium roqueforti*
	Premature infant gastric
Cis-9 Unsaturated FA	*Geotrichum candidum*
Long-chain unsaturated FA	*Botrytis cinerea*
Stereospecific	
Sn-1 Stereospecific	*Humicola lanuginosa*
	Pseudomonas aeruginosa
Sn-3 Stereospecific	*Fusarium solani cutinase*
	Rabbit gastric

ที่มา : Villeneuve และ Foglia (1997)

ตารางที่ 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน และความคงตัวของไลเปสจากจุลินทรีย์

Bacteria	pH optimal	pH stability	References
Pseudomonas sp. KWI-56	5.5-7.0	-	Iizumi *et al.,* 1990
Pseudomonas fluorescens	8.0	7.0-11.5	Sztajer *et al.,* 1991
Pseudomonas aeruginosa	8.5	-	Gilbert *et al*., 1991
Pseudomonas putida 3SK	8.0-9.0	4.0-10.0	Lee and Rhee, 1993
Pseudomonas aeruginosa MB 5001	8.0	-	Chartrain *et al.,* 1993
Pseudomonas fluorescens Strain 2D	8.5	-	Makhzoum *et al*., 1996
Pseudomonas fragi CRDA 037	8.75 (exolipase)	-	Schuepp *et al*., 1997
	9.0 (endolipase)	-	
Vibrio sp. TA 43	8.0	-	วิภูมิ แก้วทอง 2539
Bacillus sp.	5.6-7.2	5.0-11.5	Sugihara *et al.,* 1991
Bacillus subtilis 168	10.0	9.5-12	Lesuisse *et al.,* 1993
Bacillus sp.	7.2	-	Handelsman and Shoham, 1994
Bacillus thermocatenulatus	8.0	4.0-11.0	Schmidt-Dannert, 1994
Bacillus sp. 398	8.5	-	Kim *et al*., 1994
Bacillus sp. A30-1 (ATCC 53841)	9.5	-	Wang *et al*., 1995
Bacillus sp. IHI-91	7.2	-	Becker *et al.,* 1997
Bacillus sp. RS-12	8.0	-	Sidhu *et al.,* 1998
Bacillus stearothermophilus L1	9.0-10.0	5.0-11.0	Kim *et al.,* 1998
Bacillus sp. THL027	7.0	-	Dharmsthiti and Luchai, 1999
Acinetobacter calcoaceticus LP009	7.0	5.0-7.0	Dharmsthiti *et al.,* 1998
Acinetobacter nov. sp. Strain KM109	8.0	6.0-8.0	Mitsuhashi *et al*., 1999
Streptomyces rimosus	9.0-10.0	4.0-10.0	Abramic *et al.,* 1999
Rhizopus chinensis	5.5	-	Yasuda *et al*., 1999
Rhizopus oryzae	7.5	4.5-7.5	Hiol *et al*., 2000
Aspergillus nidulans	6.5	-	Mayordomo *et al*., 2000

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสชอบอุณหภูมิสูง

Bacteria	Optimal Temperature (^{0}C)	References
Pseudomonas aeruginosa EF2	50	Gilbert *et al.,* 1991
Pseudomonas fluorescens	50-55	Sztajer *et al.,* 1991
Pseudomoas cepacia	55-60	Sugihara *et al.,* 1992
Pseudomoas aeruginosa MB 5001	55	Chartrain *et al.,* 1993
Bacillus sp.	60	Sugihara *et al*., 1991
Bacillus thermocatenulatus	60-70	Schmidt-Dannert, 1994
Bacillus sp.	70	Handelsman and Shoham, 1994
Bacillus sp. 398	65	Kim *et al*., 1994
Bacillus sp. A30-1(ATCC 53841)	60	Wong *et al*., 1995
Bacillus sp. IHI-91	60	Becker *et al.,* 1997
Bacillus stearothermophilus L1	60-65	Kim *et al.,* 1998
Bacillus sp. THL027	70	Dharmsthiti and Luchai, 1999
Acinetobacter calcoaceticus LP009	50	Dharmsthiti *et al.,* 1998
Streptomyces rimosus	50-60	Abramic *et al.,* 1999

ไลเปสได้ เช่น Isooctane จะช่วยเพิ่มความคงตัวของไลเปสจาก *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol *et al*., 1999), *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al*., 2000) แต่ก็พบว่า isooctane จะลดความคงของไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK (Lee and Rhee, 1993) ซึ่งผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆต่อความคงตัวของไลเปสแสดงดังตารางที่ 5

6.4 ไอออนของโลหะ และสารเคมี

ไอออนของโลหะบางชนิดอาจมีผลต่อการทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น Ca^{2+}, Na^{+} (Gilbert *et al.,* 1991), Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Sr^{2+}(Anguita *et al.,* 1993 อ้างโดย พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 2538) จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปส ส่วน

ใหญ่ Ca^{2+} มักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยไอออนของแคลเซี่ยมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นโดยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) และยังช่วยขจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (Wang *et al.*.,1988) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า Ca^{2+} ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Candida rugosa* (Khor *et al.,* 1986) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Ca^{2+} ไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, 1994) และยังพบว่า ไอออนของโลหะหนัก เช่น Fe^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Sn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} และ Cd^{2+} จะยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi *et al.,* 1990) โดยตัวอย่างของไอออนที่กระตุ้นและไอออนที่ยับยั้งการทำงานของไลเปสรวบรวมไว้ในตารางที่ 6 และนอกจากไอออนของโลหะแล้วสารเคมีบางชนิดก็มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสด้วย เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์*Acinetobacter calcoaceticus* LP009 โดยไลเปสที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย EDTA จะจัดเป็น metalloenzyme (Dharmsthiti *et al.,* 1998) แต่ก็มีรายงานว่า EDTA จะไม่มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi *et al.,* 1990) และ *Bacillus stearothermophilus* L1 (Kim *et al.,* 1998) และ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ซึ่งเป็น serine enzyme inhibitor จะยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus subtilis* เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 10 นาที (Lesuisse *et al.,* 1993) นอกจากนี้ยังยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Streptomyces rimosus* (Abramic, 1999) แต่ PMSF ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 (Dharmsthiti *et al.,* 1998)

7. การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ปัจจุบันการปรับปรุงสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตเป็นที่สนใจ เพราะสามารถเพิ่มผลผลิตทางด้านทรัพยากรธรรมชาติให้เพียงพอต่อประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ซึ่งข้อดีของการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย คือ ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นกว่าวิธีดั้งเดิม ได้ผลผลิตที่ถูกต้องตรงตามที่ต้องการ ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นทำได้หลายวิธี ได้แก่

ตารางที่ 5 ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของไลเปสจากจุลินทรีย์

microbial lipase	% concentration (v/v)	organic solvent	referances
Pseudomonas putida 3SK	-	dodecane[a], decane[a], isooctane[a], nonane[a], octane[a], cyclohexane[a], heptane[a], hexane[a]	Lee and Rhee, 1993
Pseudomonas aeruginosa	50	methanol[a] , ethanol[a], acetone[a]	Chartrain *et al*., 1993
Pseudomonas fluorescens strain 2D	25	methanol[a], ethanol[a], propanol[a], butanol[a], hexanol[a], glycerol[a], ethylene glycol[a], acetone[a], acetonitrile[a], pyridine[a]	Makhzoum *et al*., 1996
Mucor hiemalis f. hiemalis	5	methanol[a], ethanol[a], propanol[a], butanol[a], acetone[a], *n*-hexane[b], *n*-heptane[b], isooctane[c]	Hiol *et al*., 1999
Rhizopus oryzae	30	methanol[a], ethanol[a], propanol[a], butanol[a], butanol[a], hexanol[a], decanol[a], dodecanol[a], acetone[b], chloromethane[a], hexane[b], heptane[c], cyclohexane[c], isooctane[c]	Hiol *et al*., 2000

[a] ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลลดความคงตัวของไลเปส

[b] ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีผลต่อความคงตัวของไลเปส

[c] ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลเพิ่มความคงตัวของไลเปส

7.1 กระบวนการคอนจูเกชั่น (conjugation)

กระบวนการคอนจูเกชั่น เป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากแบคทีเรียผู้ให้ (donor) ไปยังแบคทีเรียผู้รับ (recipient) โดยแบคทีเรียผู้ให้จะมี F-plasmid

ซึ่งจะมีส่วนประกอบของยีนที่ใช้ในการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายเดี่ยว (*tra* gene) ซึ่งยีนนี้จะทำหน้าที่ในการสร้าง sex pili เพื่อใช้ในการยึดเซลล์ผู้รับเอาไว้ และเพื่อใช้ในการส่งดีเอ็นเอผ่านเข้าไปในเซลล์ผู้รับ ถ้าแบคทีเรียผู้ให้ถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ผู้รับ และดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้ให้เกิดการ recombination แทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ผู้รับ

ตารางที่ 6 ไอออนที่มีผลกระตุ้น และยับยั้งการทำงานของไลปสจากจุลินทรีย์

bacteria	inhibitor	activator	references
Pseudomonas sp. KWI-56	Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+} Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} Co^{2+}, Cd^{2+}	-	Iizumi *et al.,* 1990
Pseudomonas putida 3SK	Hg^{2+}, Al^{3+}, Co^{2+} Mg^{2+}, Mn^{2+}	Ca^{2+}, Cs^{2+}, Na^{+} K^{+}	Lee and Rhee, 1993
P. aeruginosa MB5001	Zn^{2+}	Ca^{2+}, Ba^{2+}	Chartrain *et al.,* 1993
P. fluorescens Strain 2D	Co^{2+}, Li^{+}, Zn^{2+} Cs^{+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} Hg^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+} Ba^{2+}, Cd^{2+}	Ca^{2+}	Makhzoum *et al*., 1996
Bacillus subtilis 168	Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}	Ca^{2+}	Lesuisse *et al.,* 1993
B. thermocatenulatus	Ag^{2+}, Mg^{2+}	-	Schmidt-Dannert, 1994
B. stearothermophilus L1	Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}	-	Kim *et al.,* 1998
Acinetobacter calcoaceticus LP009	Zn^{2+}	Fe^{3+}	Dharmsthiti *et al.,* 1998
Streptomyces rimosus	Cu^{2+}, Hg^{2+}	Ag^{2+}, Ca^{2+}	Abramic *et al.,* 1999
Mucor hiemalis f. hiemalis	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+} Mn^{2+}, Na^{+}	Fe^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}	Hiol *et al*., 1999
Bacillus sp. THL027	Fe^{3+}, Cu^{2+}, Co^{2+}	-	Dharmsthiti and Luchai, 1999
Rhizopus oryzae	Fe^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}	-	Hiol *et al*., 2000

จะเรียกเซลล์ผู้รับนี้ว่า Hfr cell (High frequency recombination) (O' Connell, 1984)

7.2 กระบวนการทรานส์ฟอร์เมชั่น (transformation)

กระบวนการทรานส์ฟอร์เมชั่น เป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอในลักษณะที่เป็นสายดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพ naked soluble form เข้าสู่เซลล์ผู้รับ (host cell) โดยที่เซลล์ผู้รับต้องอยู่ในสภาวะคอมพีเทนต์ (competent cell) โดยการทำให้เซลล์ผู้รับพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น การใช้สารละลาย $CaCl_2$ การใช้กระแสไฟฟ้า เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถเกิดการทรานส์ฟอเมชั่น ได้แก่ *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* (Porter, 1988)

7.3 กระบวนการทรานส์ดัคชั่น (transduction)

ทรานส์ดัคชั่น เป็นกระบวนการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยมีแบคเทอริโอฟาจก์ (bacteriophage) เป็นพาหะ โดยกระบวนการนี้แบ่งได้ 2 แบบ คือ

7.3.1 เจนเนอรอลไลซ์ทรานส์ดัคชั่น (generalized transduction)

กระบวนการนี้ ฟาจก์จะเอาดีเอ็นเอของมันเข้าไปแทรกในโครโมโซมของแบคทีเรียตรงตำแหน่งที่ไม่จำเพาะ โดยในการขนถ่ายยีนนั้น อนุภาคฟาจก์จะทำการบรรจุดีเอ็นเอของแบคทีเรียเข้าไปในเปลือกหุ้มโปรตีน (viral capsid) เมื่อเซลล์แตกฟาจก์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวให้ตัวแรกก็จะถ่ายโอนเข้าไปยังแบคทีเรียตัวรับตัวต่อไป และดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งตัวให้และตัวรับก็จะมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมได้เป็น ทรานส์ดัคแตนท์ (transductant) (O' Connell, 1984)

7.3.2 สเปเชียลไลซ์ทรานส์ดัคชั่น (specialized transduction)

กระบวนการนี้จะเป็นการที่ฟาจก์เอาดีเอ็นเอของมันเข้าไปแทรกกับโครโมโซมของแบคทีเรียที่ตำแหน่งจำเพาะ เช่น แกลโอเปอรอน (*gal* operon) (O' Connell, 1984) และเมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวก็จะเป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของฟาจก์ไปพร้อมๆกัน

7.4 กระบวนการทรานส์เฟคชั่น (transfection)

กระบวนการทรานส์เฟคชั่นมีกลไกคล้ายกับกระบวนการทรานส์ฟอเมชั่น โดยจะเป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอของฟาจก์ไปยังคอมพีเทนต์เซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้สามารถนำมาใช้ในการโคลนยีน แต่ประสิทธิภาพของกระบวนการนี้จะต่ำมาก (O' Connell, 1984)

7.5 การโคลนยีน (gene cloning)

ในปัจจุบันการโคลนยีนได้มีการพัฒนาอย่างมาก และได้มีการยอมรับการนำเอาดีเอ็นเอที่ได้จากพวกโปรคารีโอทและยูคารีโอทมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเพิ่มมากขึ้น โดยการโคลนยีนจะประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอน (Freifelder, 1987) ดังนี้

7.5.1 คัดเลือกดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการโคลน ซึ่งรวมถึงการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) มาตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่จำเพาะ และมีลำดับของโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม

7.5.2 นำส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ โดยใช้ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T_4 DNA ligase) เชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอที่ถูกตัดกับเวกเตอร์ โดยเวกเตอร์ที่ใช้อาจเป็นพลาสมิด แบคเทอริโอฟาจก์แลมดา (bacteriophage λ) หรือคอสมิด (cosmid) เป็น ดีเอ็นเอพาหะในการโคลนยีน

7.5.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์เข้าสู่โฮสเซลล์ (host cell) เช่น *E. coli* โดยการทรานส์ฟอเมชั่น ทรานส์เฟคชั่น หรือทรานส์ดัคชั่น

7.5.4 ทำการตรวจหาโคลนที่มียีนที่ต้องการ โดยอาจจะใช้คุณสมบัติในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotics) หรืออาจตรวจสอบโดยการเกิดวงใสรอบๆโคโลนี (clear zone) หรืออาจใช้คุณสมบัติของการผลิต บีตา-กาแลคโตไซด์เดส ย่อย x-gal เมื่อถูกชักนำโดย IPTG

8. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อศึกษาไลเปสที่ชอบอุณหภูมิสูง และการนำโคลนที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

Dartois และคณะ(1994) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสจาก *B. subtilis* โดยทำการ subclone บริเวณ open reading frame (ORF) ของยีน และทำการเชื่อมต่อเข้ากับ multicopy plasmid ที่มีโปรโมเตอร์ที่มีความแข็งแรงที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวกเพื่อใช้ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนยีนไลเปส ซึ่งพบว่า เมื่อทำการทรานส์ฟอร์มเข้าไปในโฮสเซลล์ (host cell) จะสามารถเพิ่มจำนวนยีนไลเปสได้มากกว่า 100 เท่า

Schmidt-Dannert และคณะ(1996) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีนที่ผลิตไลเปสทนร้อนใน *B. thermocatenulatus* โดยทำการย่อย genomic DNA แบบบางส่วน (partial

digestion) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI และนำชิ้นส่วนที่มีขนาด 2.0-6.0 kb เชื่อมต่อเข้ากับ pUC18 และ ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α และทำการคัดเลือกโคลนที่ผลิตไลเปสพบว่า จะมียีนขนาด 4.5 kb และเมื่อทำการ subclone พบว่าขนาดของยีนเหลือเพียง 2.2 kb ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า สามารถแปรรหัสให้เป็นกรดอะมิโนได้ 388 ตัว ซึ่งมีขนาด 43 kDa โดยที่บริเวณ serine active site ของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ซึ่ง conserved pentapeptide (Gly-X-Ser-X-Gly) นั้นจะมีการแทนที่ Glycine ตัวแรกด้วย Alanine (Ala-X-Ser-X-Gly) โดยไลเปสที่ได้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0-9.0 เมื่อใช้ tributyrin และน้ำมันมะกอก เป็นสับสเตรท และจะคงตัวที่ พีเอช 9.0-11.0

Sommer และคณะ(1997) ได้ทำการโคลนยีนไลเปส (*lipA*) ลงไปใน *E. coli* และ *Streptomyces cinnamomeus* เพื่อดูการแสดงออกของยีน พบว่า การแสดงออกของยีนใน *E. coli* และ *S. cinnamomeus* เหมือนกับการแสดงออกของยีนไลเปสใน *Streptomyces lividans* โดยไลเปสที่ได้จะสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบไปด้วยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 6 และ 18 อะตอม

Rua และคณะ(1998) ได้ทำการโคลนยีนที่ผลิตไลเปส (BTL2) จาก *Bacillus thermocatenulatus* และทรานส์ฟอร์มเข้าไปใน *E. coli* BL321 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน BTL2 โดยนำยีน BTL2 เชื่อมกับพลาสมิดที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน (expression vector) pCYTEXP1 ที่มี λpL promoter ซึ่งเป็น strong temperature-inducible promoter พบว่า หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 100 ลิตร จะมีการผลิตเอนไซม์ 54,000 ยูนิตต่อกรัมเซลล์เปียก ซึ่งมากกว่าการแสดงออกโดยใช้เวคเตอร์ pUC18 ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเพียง 600 ยูนิตต่อกรัมเซลล์เปียก และยังพบว่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการแสดงออกของ pCYTEXP1 จะมากกว่าที่ได้จากการใช้ pUC18 5 เท่า นอกจากนั้นยังพบว่า ไลเปสที่ได้จะมีการจับกลุ่มกันทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง จึงได้มีการใช้ sodium cholate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยเพิ่มกิจกรรมของไลเปส

Dharmsthiti และคณะ(1998) ได้ศึกษาการผลิตไลเปสจาก *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 ที่แยกได้จากนมดิบ โดยไลเปสที่ได้จะทำงานได้ดีที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานโดย EDTA ส่วน Fe^{3+} จะเป็นตัวกระตุ้นให้

เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น แต่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดขึ้นเพียง 1 นาทีเท่านั้นจึงได้มีการโคลนยีนไลเปสจาก *A. calcoaceticus* LP009 ลงไปใน *Aeromonas sobria* ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของไลเปสเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

Gerritse และคณะ(1998) ได้ศึกษาลักษณะของยีนที่ผลิตไลเปสชอบด่าง ซึ่งได้จาก *Pseudomonas alcaligenes* ที่ไม่สามารถใช้กลูโคส กรดซิตริก และน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาในขบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation process) ให้มีการปลดปล่อยของไลเปสชอบด่าง ในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนไลเปส (*lipA*) และ ยีนผู้ช่วย lipase helper gene (*lipB*) โดยการใช้พลาสมิดที่มี copy number สูง จะทำให้การแสดงออกของยีนไลเปสสูงกว่าการใช้พลาสมิดที่มี copy number ต่ำใน *Pseudomonas alcaligenes* Ps495 โดยการใช้พลาสมิดที่มี copy number สูง การแสดงออกของยีนไลเปสจะเพิ่มขึ้น 350 เท่า เมื่อเทียบกับ *Pseudomonas alcaligenes* M-1 และยังพบว่าการแสดงออกของยีนไลเปสจำเป็นต้องมี lipase helper gene (*lipB*) เพื่อช่วยให้มีการแสดงออกของยีนไลเปสที่สูงขึ้น

Kim และคณะ(1998) ได้ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่ผลิตไลเปสชอบอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 ที่ถูก transform ลงไปใน *E. coli* พบว่า มีจำนวนเบสที่เป็นส่วนประกอบของยีนโครงสร้าง (stractural gene) 1,254 bp ซึ่งสามารถแปรรหัส (translate) ได้เป็นกรดอะมิโนจำนวน 417 ตัว ซึ่งมีส่วนประกอบของ signal sequence 29 ตัว และโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเอนไซม์ 388 ตัว โดยมี Ala(Gly)-X-ser-X-Gly อยู่ตรงบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ และไลเปสที่ได้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส pH 9-10

Rua และคณะ(1998) ได้พัฒนาการผลิตไลเปสที่ชอบอุณหภูมิสูงให้มีปริมาณมากขึ้นใน *E. coli* โดยทำการ subcloned ยีนที่ผลิตไลเปสชอบอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus thermocatenulantus* (BTL2 gene) เชื่อมกับ pCYTEXP1 ที่มีโปรโมเตอร์ที่ได้จาก λ phage (P_l) โดยได้เวกเตอร์ลูกผสม (Recombinant vector) 3 แบบ ได้แก่ pT1-BTL2, pT1-preBTL2 และ pT1-OmpABTL2 โดยถ่ายฝากพาสมิด pT1-BTL2, pT1-preBTL2 ลงไปใน *E. coli* BL321 ส่วน pT1-OmpABTL2 ถูกถ่ายฝากลงไปใน *E. coli* BL321, *E. coli* DH5α และ *E. coli* JM105 พบว่า พาสมิด pT1-BTL2, pT1-preBTL2 และ pT1-OmpABTL2 ที่ถูก

ถ่ายฝากลงไปใน *E. coli* BL321 มีระดับของการแสดงออกของยีนเท่ากับ 7,000, 9,000 และ 30,000 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ โดยที่ pT1-OmpABTL2 ที่ถูกถ่ายฝากลงไปใน *E. coli* BL321 และ *E. coli* DH5α จะมีระดับการแสดงออกของยีนเท่ากัน ส่วน pT1-OmpABTL2 ที่ถูกถ่ายฝากลงไปใน *E. coli* JM105 พบว่าจะมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดเท่ากับ 660,000 ยูนิตต่อกรัมเซลล์

Quyen และคณะ(1999) ได้ทำการโคลนยีนไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* ลงไปใน *E. coli* ด้วยเวกเตอร์ลูกผสม pCYTEXP1 โดยควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย โปรโมเตอร์ที่มีความแข็งแรง และถูกชักนำให้เกิดการผลิตไลเปสด้วยอุณหภูมิสูงซึ่งได้จาก λ phage (P_{RL}) พบว่า จะได้ไลเปสที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 4,850 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และผลผลิตที่ได้เท่ากับ 314,000 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้ง

9. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme Purification)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน โดยในการทำให้บริสุทธิ์เป็นการแยกเอาสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ออกไป โดยวิธีการทำบริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

9.1 การตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation)

การตกตะกอนเป็นการแยกเอาโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน โดยสารที่จะใช้ในการตกตะกอนโปรตีนได้แก่

9.1.1 ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธานอล (ethanol) เมทธานอล (methanol) โพรพานอล (propanol) ไอโซโพรพานอล (*iso*-propanol) อีเทอร์ (ether) อะซีโตน (acetone) และ เฮกเซน (hexane) เป็นต้น

9.1.2 เกลือบางชนิด เช่น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) เกลือโซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate) เป็นต้น

9.1.3 สารอื่นๆ เช่น polyethylene glycol (PEG), เคซีน (casein) และ diatomaceous earth เป็นต้น (Scopes, 1978)

โดยในการตกตะกอนโปรตีนอาจใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรืออาจใช้หลายๆวิธีร่วมกันก็ได้ แต่โดยทั่วไปสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนคือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีคุณสมบัติที่ดีดังต่อไปนี้ (Scopes, 1978)

1. มีความสามารถในการละลายที่สูง (4 โมลาร์)
2. ใช้อุณหภูมิในการละลายต่ำ
3. เพิ่มการไม่ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน
4. ทำให้สารละลายที่ได้มีความหนืด และความหนาแน่นต่ำทำให้สามารถแยกสารที่ต้องการได้ง่าย

โดยเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆที่ใช้ในการตกตะกอนไลเปสแสดงดังตารางภาคผนวกที่ 7

9.2 การกำจัดเกลือ (Desalting)

เป็นการแยกอนุภาคเกลือออก ซึ่งสามารถทำโดยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) ซึ่งเป็นการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่โดยใช้ semipermeable membrane ได้แก่ cellophane bag หรือ cellulose-based dialysis tube (Araujo and D'Souza, 1986; Grabski and Jeffries, 1991 อ้างโดย สมรักษ์ พันธ์ผล, 2537) นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดเกลือโดยใช้การกรองผ่านเม็ดเจล (gel filtration) โดยเป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลโมเลกุลของสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเม็ดเจลจะถูกชะออกมาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กที่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนของเม็ดเจลได้ เนื่องจากอนุภาคของเกลือมีขนาดเล็กจึงทำให้ถูกชะออกมาในช่วงหลัง โดยตัวอย่างเม็ดเจลที่ใช้ในการกำจัดเกลือ ได้แก่ Sephadex G-25 , Sephadex G-50 , BioGel P-6DG และ BioGel P2 (Hurst *et al.,* 1977; Ricardo *et al.,* 1985; Matanguihan *et al.,* 1985; Huang *et al.,* 1991; Ito *et al.,* 1992 อ้างโดย สมรักษ์ พันธ์ผล, 2537)

9.3 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

วิธีการที่นิยมใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์วิธีหนึ่ง คือ การทำโครมาโตกราฟีโดยวิธีการแยกโดยวิธีนี้มีหลายแบบ เช่น adsorption chromatography, partition chromatography, affinity chromatography, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography ซึ่งในการแยกสารจากวิธีทั้งหมดนี้จะเกี่ยวข้องกับการแยกสารตามความแตกต่างของ ประจุ ขนาด รูปร่าง คุณสมบัติในการละลายและการดูดซับ และ

ตารางที่ 7 ช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนของไลเปส

แหล่งเอนไซม์	เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	เอกสารอ้างอิง
Pseudomonas fluorescens Strain 2D	80 %	Makhzoum *et al.,* 1996
Pseudomonas fragi CRDA 037		Schuepp *et al.,* 1997
Exolipase	20-40 %	
Endolipase	20-60 %	
Rhizopus oryzae	30 %	Hiol *et al.,* 2000
Candida rugosa	60 %	Pernas *et al.,* 2000

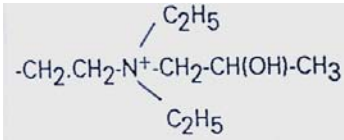
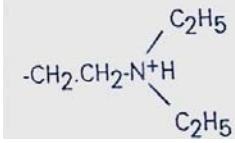
ความจำเพาะของโมเลกุลที่ต้องการแยก (Plummer, 1987) โดยการแยกด้วยวิธี ion exchange chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของประจุบนโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก โดยสารที่มีประจุต่างจากตัวค้ำจุนจะจับอยู่กับตัวค้ำจุน โดยตัวค้ำจุนจะมีรูพรุน และประจุ ซึ่งเรียกตัวค้ำจุนนี้ว่า ion exchange resin โดย เรซินที่ใช้มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด (ตารางที่ 8) ได้แก่ เรซินที่มีประจุบวกซึ่งจะให้โมเลกุลที่มีประจุลบมาจับ (anion exchange resin) และเรซินที่มีประจุลบซึ่งจะให้โมเลกุลที่มีประจุบวกมาจับ (cation exchange resin) และการทำงานของ anion exchanger แสดงในรูปที่ 3

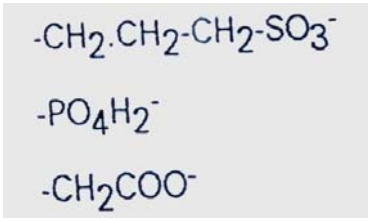
การทำไลเปสให้บริสุทธิ์สามารถใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายชนิดร่วมกัน โดยตัวอย่างการแยกไลเปสให้บริสุทธิ์จากจุลินทรีย์มีดังต่อไปนี้

Makhzoum และคณะ (1996) แยกไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescence* Strain 2D โดย hydrophobic interaction chromatography (HIC) พบว่า เอนไซม์ที่ได้ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 135,000 และ 42,000 ดาลตัน เมื่อทดสอบผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของไลเปส พบว่า PMSF จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ส่วน EDTA และ phenanthroline จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Hiol และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตไลเปสจาก *Mucor hiemalis f. hiemalis* ที่ได้จากผลปาล์มโดยใช้น้ำมันเรพซีดเป็นตัวกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ และตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 40-70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปทำ

ตารางที่ 8 Functional group ของ ion-exchanger

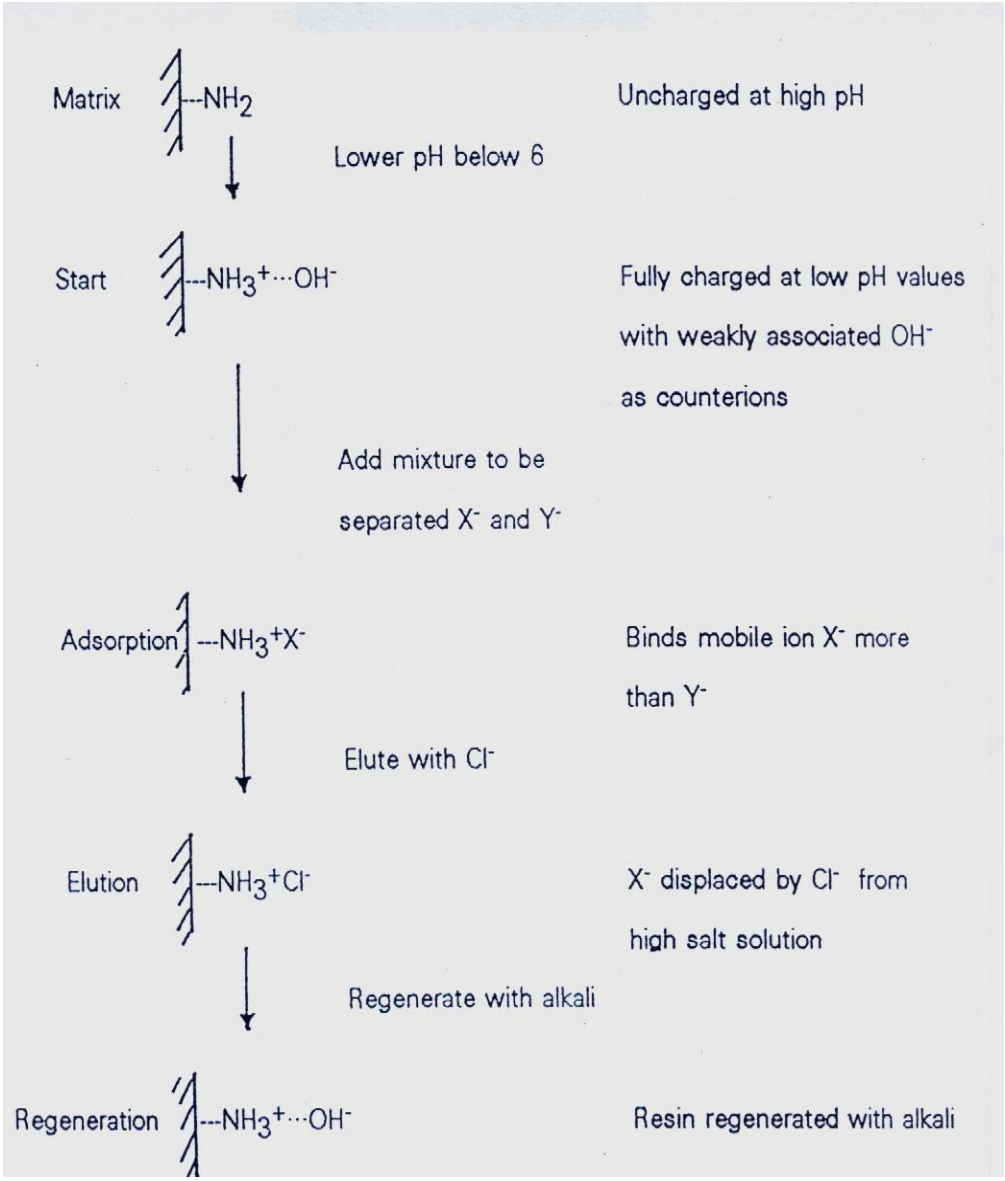
Anion exchangers	structure	type
Quaternary aminoethyl (QAE)		Strong
Diethylaminoethyl (DEAE)		Weak

Cation exchangers	structure	type
Sulphopropyl (SP)		Strong
Phospho (P)		Strong
Carboxymethyl (CM)		Weak

ที่มา : Plummer (1987)

ให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-75 chromatography, Q-Sepharose chromatography และ Sephacryl S-200 chromatography และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าไลเปสที่ได้มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 6,153 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49 กิโลดาลตัน เมื่อทดสอบถึงผลของสารลดแรงตึงผิว เช่น taurocholic acid, Triton X-100 และ Tween 20 พบว่า จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วน EDTA, PMSF, *p*-chloromercuribenzoic และ Benzamidine จะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

Abramic และคณะ (1999) ได้ทำแยกไลเปสจาก *Streptomyces rimosus* R6-554W ด้วยโคลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-cellulose, CM-cellulose, hydroxylapatite, Mono S (fast protein liquid chromatography) และ Sephadex G-75 ตามลำดับ เอนไซม์มีน้ำหนัก



รูปที่ 3 ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุของ anion exchanger

ที่มา : Plummer (1987)

โมเลกุล 27,500 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE เอนไซม์ที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับ triolein และ ρ-nitrophenyl ester โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีกับสับสเตรทที่มีหมู่เอซิลที่มีจำนวนคาร์บอน C_8-C_{12} เมื่อทดสอบถึงผลของสารเคมีโดยเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานอย่างไม่รุนแรงด้วย Dithiothreitol ส่วน PMSF จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยเมื่อเติมลงไประหว่างการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส

Dharmsthiti และ Luchai (1999) ได้ทำการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL027 โดยเพาะเลี้ยงใน MGRS ซึ่งประกอบไปด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของ Na_2HPO_4 7.3 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 3.2 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.2 $FeSO_4$ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $MgSO_4$ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ glucose 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ รำข้าว 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วแยกไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วย gel filtration chromatography โดยไลเปสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 69 กิโลดาลตัน และเมื่อทดสอบถึงผลของไอออนของโลหะหนักต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า Fe^{3+} จะลดการทำงานของเอนไซม์ลง 54 เปอร์เซ็นต์ Cu^{2+} และ Co^{2+} ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ แต่ EDTA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้จัดเป็น metalloenzyme และเอนไซม์มีความจำเพาะแบบ 1,3-position

Mitsuhashi และคณะ (1999) ได้ทำแยกไลเปสจาก *Acenetobacter* nov. sp. Strain KM109 โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Sepharose CL-6B, DEAE-Sephacel, Gel filtration HPLC และ Mono Q พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62,000 $\pm$ 1,000 ดาลตัน

Hiol และคณะ (2000) ได้ทำการแยกไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* ที่แยกได้จากผลปาล์ม โดยตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 30-75 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตะกอนที่ได้มาทำบริสุทธิ์ต่อโดย Sulphopropyl-Sepharose chromatography, Sephadex G-75 gel filtration และ Sulphopropyl-Sepharose chromatography ครั้งที่สอง ตามลำดับ แล้วนำไลเปสที่ได้ไปศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า ไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จะมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 8,800 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32 กิโลดาล

ตัน เมื่อทดสอบผลของสารเคมี และไอออนของโลหะหนักต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า Triton X-100, SDS และไอออนของโลหะหนัก เช่น Fe^{3+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} และ Fe^{2+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Kamini และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตไลเปสจาก *Cryptococcus* sp S-2 โดยพบว่า น้ำมันปลาซาร์ดีน น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันโอเลอีน จะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนำไลเปสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดย SP-5PW Cation exchanger chromatography และชะด้วย linear gradient ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ประกอบไปด้วย 0.5 M NaCl พบว่า ไลเปสที่ได้มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 864.98 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และเมื่อนำไปศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 กิโลดาลตัน

10. การนำไลเปสไปใช้ประโยชน์

ไลเปสที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ (ตารางที่ 9) โดยไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นที่สนใจมากที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติในการทำงานและความคงตัวที่แตกต่างกัน โดยประโยชน์ของไลเปสมีดังนี้

10.1 การย่อยสลายไขมัน

ไลเปสจะสามารถย่อยสลายไขมัน หรือ น้ำมันให้ได้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การนำกรดไขมันมาใช้ในการผลิตสบู่ โดยไลเปสที่ใช้สำหรับวัตถุประสงค์นี้ได้มาจาก *Candida rugosa* (Hoq *et al.,* 1985) และในปัจจุบันได้มีการสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลในทางอุตสาหกรรมมากขึ้นโดยได้มีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายไขมันจากสัตว์ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง (Garcia *et al.,* 1995)

10.2 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในกระบวนการผลิตเครื่องหนังจะมีขั้นตอนการเอาไขมันส่วนที่เหลือ และโปรตีนที่เสียรูปที่ติดอยู่บริเวณหนัง และขนออก ซึ่งการกำจัดไขมัน และโปรตีนออกจาก

หนังสัตว์โดยวิธีการทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ (Seitz, 1974) แต่ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสม ระหว่างไลเปสกับเอนไซม์โปรติเอส มาใช้ในการกำจัดไขมันและโปรตีนออกไปจากหนังสัตว์ (Posorskl, 1984; Figurin, 1990; Christner, 1991; Gandhi, 1997)

10.3 การบำบัดของเสีย

ได้มีการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดของเสียในขบวนการบำบัดแบบให้อากาศซึ่งในกระบวนการบำบัดของเสียแบบให้อากาศจะเกิดแผ่นคราบไขมันบริเวณผิวสัมผัสของๆเสียกับอากาศทำให้การถ่ายเทอากาศเป็นไปได้ไม่ดีซึ่งในอดีตได้ทำการแก้ไขปัญหานี้โดยการตักเอาคราบของไขมันออก แต่พบว่าการใช้ไลเปสนั้นจะให้ผลที่ดีกว่า โดยไลเปสที่ใช้ในการบำบัดของเสียนี้ได้จาก *Cadida rugosa* ซึ่งต่อมาได้มีการผลิตไลเปสจากเชื้อตัวนี้ในระดับอุตสาหกรรม โดยมีชื่อทางการค้าว่า Lipase-MY และได้ถูกนำไปใช้ในประเทศอเมริกา (Seitz, 1974; Gandhi, 1997) นอกจากนี้ยังอาจนำไลเปสมาใช้ในการควบคุมการย่อยสลายของเสียในขบวนการไร้อากาศได้ (Godfrey, 1983)

10.4 เป็นส่วนผสมของสารซักล้าง

ปัญหามลภาวะทางน้ำเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญมากโดยได้มีการพยายามที่จะลดการใช้สารทำความสะอาดที่มีสารเคมีที่ย่อยสลายได้ยากโดยธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการนำเอาความรู้ทางด้านเทคโนโลยีเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ โดยนำเอนไซม์มาเป็นส่วนผสมในสารซักล้างเพื่อลดปริมาณสารเคมีที่เป็นส่วนผสมให้ลดน้อยลงและอุตสาหกรรมสารซักล้างมากมายที่ได้นำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในการผลิตสารซักล้างที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ได้นำมาใช้เป็นส่วนผสมนั้นได้มาจาก *Chromobacterium viscosum* (Minoguchi, 1989; Gandhi, 1997) และ *Candida* (Nishioka, 1990)

10.5 การสร้างกลิ่นรสในอุตสาหกรรมนม และผลิตภัณฑ์จากนม

ได้มีการใช้ไลเปสเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์จากนมต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาการีน และนอกจากนี้ยังใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของนมซึ่งเป็นผลมาจากไขมัน โปรตีน และน้ำตาลแล็กโตสที่มีอยู่ในน้ำนม และนอกจากนี้แล้วยังได้นำไลเปสมาใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในการตกตะกอนนม และปรับปรุงกลิ่นรสของนม และยังได้มีการนำไลเปสมาใช้ในขบวนการผลิตครีมเทียมให้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้นและให้

ตารางที่ 9 การนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

Industry	Effect	Product
Dairy	Hydrolysis of milk fat	Flavour agents
	Cheese ripening	Cheese
	Modification of butter fat	Butter
Bakery	Flavour improvement and Shelf life prolongation	Bakery products
Beverage	Improved aroma	Beverages
Food dressing	Quality improvement	Mayonnaise, dressing and whipped toppings
Health food	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development and fat removal	Meat and fish products
Fat and oils	Transesterification	Cocoa butter,margarine
	Hydrolysis	Fatty acids, glycerol, mon- and diglycerides
Chemical	Enantioselectivity	Chiral building blocks and chemicals
	Synthesis	Chemicals
Pharmaceutical	Transesterification	Specialty lipids
	Hydrolysis	Digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifier, moisturizing agents
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper products
Cleaning	Hydrolysis	Removal of cleaning agents, e.g. surfactants

ที่มา : Godtfredsen, 1993

ความหวานต่ำ (Colburn, 1969; Gandhi, 1997) และยังนำไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตของหวาน เช่น ช็อคโกแล็ต โดยให้ไลเปสมาทำให้เกิดกลิ่นรสในนมช็อคโกแล็ต คาราเมล และท๊อฟฟี่ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น อุตสาหกรรมขนมอบ อุตสาหกรรมผลิตน้ำสลัด อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันข้าวโพด อุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอก อุตสาหกรรมขนมขบเคี้ยว และอุตสาหกรรมสบู่

10.6 อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์

มีการนำไลเปสมาใช้ในการบ่มเนื้อให้มีความนิ่มเพื่อลดระยะเวลาในการเกิดการเกร็งตัวของเนื้อสัตว์ ใช้ในอุตสาหกรรมผักดอง อุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง และยังได้มีการนำไลเปสมาทำการผลิตอาหารสุนัขที่มีปริมาณไขมันต่ำ นอกจากนี้ได้มีการนำไลเปสที่ได้จากตับอ่อนมาใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ต่างๆ (Gandhi, 1997)

10.7 อุตสาหกรรมเภสัชกรรม

เนื่องจากคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุชีวภาพซึ่งนอกจากนี้ยังรวมไปถึงไขมันต่างๆด้วย ซึ่งทั้งสามองค์ประกอบนี้จะมีผลต่อการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของร่างกาย การย่อยสลาย และการดูดซึมต่างๆ ซึ่งได้มีการพยายามในการหาสารซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งได้มีการใช้คุณสมบัติในการเกิด selective esterification ของไลเปสมาใช้ในการทำบริสุทธิ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid หรือ PUFA) ได้แก่ การทำบริสุทธิ์ Docosahecaenoic acid (DHA) และ Ecosapentaenoic acid (EPA) จากน้ำมันปลาทูน่า ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการของสมอง และระบบประสาทสำหรับการมองเห็นของทารกในครรภ์มารดา (Lawson and Hughes, 1988)

10.8 การประยุกต์ใช้ในทางอื่นๆ

ได้มีการใช้ประโยชน์จากไลเปสในการนำไปผลิตสารที่ใช้ในการกำจัดวัชพืชต่างๆ (Guit *et al.,* 1991) และยังมีการใช้ไลเปสจาก *Mucor miehei* ที่ถูกการตรึงในการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากกลีเซอรอล (Ergan *et al.,* 1990)

11. แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงกว่า 55 องศาเซสเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก็ยังสามารถเจริญได้ โดยแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงในการเจริญ เช่น *Thermus* sp. (กนกพร บุญเผื่อน, 2534), *B. stearothermophilus, B. thermocatenulatus, Clostridium* (VanDermark and Batzing, 1987) โดยส่วนมากจุลินทรีย์พวกโปรคารีโอต (procaryotes) ที่จะสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง แต่ก็มีพวกยูคาริโอต (eukaryotes) บางชนิดที่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส (Brock, 1986)

12. การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง

แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 4) ดังนี้

12.1 แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant หรือ thermoduric)

เป็นแบคทีเรียที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ทำให้อัตราการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, L. lactis, Bacillus cereus, B. licheniformis, B. subtilis, B. coagulans, B. polymyxa, Clostridium butyricum, C. sporogens* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. (Brock 1986; Ketchum, 1988) โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นพวกที่มีบทบาทสำคัญในการทำอาหารที่ผ่านการพาสเจอไรส์

12.2 แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง (moderate thermophile)

แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดจัดเป็น แฟคคัลเทตีฟเทอร์โมไฟล์ (facultative thermophiles) ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิสูง โดยจะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50-60 องศาเซลเซียส

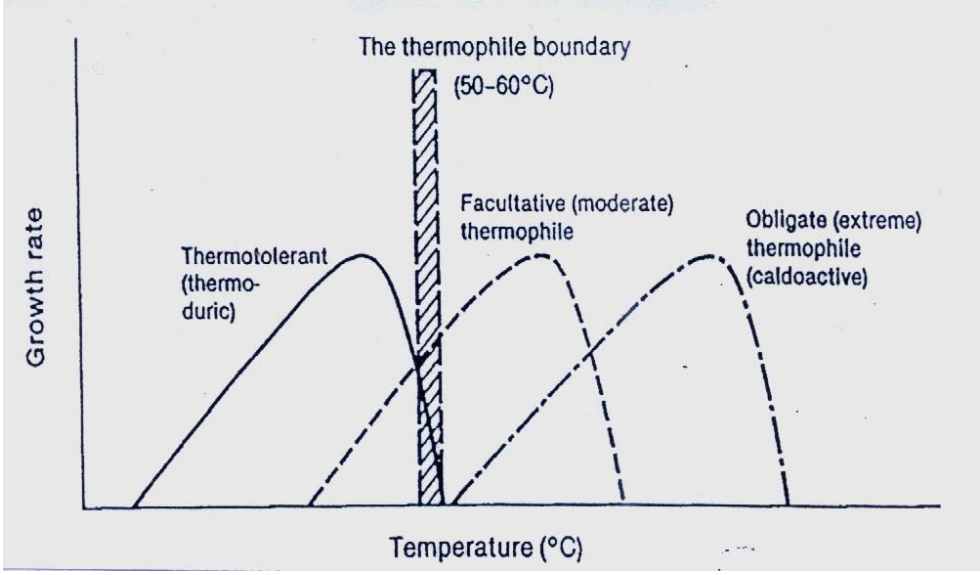
12.3 แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (obligate หรือ extreme thermophiles)

เป็นแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเท่านั้น โดยไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงยิ่งยวด (hyperthermophiles) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ใน

ช่วง 80-110 องศาเซลเซียส ซึ่ง Brock (1986) ได้รายงานว่า จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิน้ำเดือดล้วนเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่ม อาคีแบคทีเรีย (archaebacteria) ซึ่งการที่แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสามารถดำรงชีวิตในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้น เนื่องจากโครงสร้างของไขมันที่ผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย กรดไขมันประเภทอิ่มตัว (saturated fatty acid) กรดไขมันที่มีกิ่งก้านสาขา และกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่สูง โดยการขนส่งสารต่างๆผ่านเข้าออกเซลล์จะต้องให้ผนังเซลล์อยู่ในสภาวะกึ่งของเหลว (semifluid state) โดยสภาวะกึ่งของเหลวของผนังเซลล์นี้ขึ้นกับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม และคุณลักษณะทางเคมีของไลปิด ผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว และกรดไขมันที่มีกิ่งก้านสาขาในสัดส่วนที่สูงจะมีสภาวะเหลวที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น ดังนั้นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจึงสามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงอุณหภูมิสูงเท่านั้น และเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางธรรมชาติของโปรตีน และเอนไซม์พบว่า คุณสมบัติหลายข้อของโปรตีน และเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง เช่น น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบหน่วยย่อย (subunit composition) และผลของสารแอลโลสเตอริก (allosteric effector) ที่มาจับคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง แต่กลับมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง จึงควรเป็นผลมาจากลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็งแรง และยืดหยุ่นต่ำภายใต้ระดับอุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถทำงาน และเสถียรภาพภายใต้อุณหภูมิสูง (VanDermak and Batzing, 1987)

11. แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส

กนกพร บุญเผื่อน และคณะ(2534) ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ที่ผลิตไลเปส และได้ทำการศึกษาลักษณะ และสมบัติของไลเปสที่ได้จาก *Thermus* P1, *Thermus* F11 และ *Bacillus* T20 พบว่า ทั้งสามสายพันธุ์จะมีสภาวะในการเจริญใกล้เคียงกัน คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ pH 7.2-7.4 โดยไลเปสชอบอุณหภูมิสูงของ *Thermus* P1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 5.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH 5.6



รูปที่ 4 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง
ที่มา : Brock (1986)

Schmidt-Dannert และคณะ(1994) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง 15 สายพันธุ์ และพบว่า มีเพียง 5 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของไลเปส โดยใน 5 สายพันธุ์นี้มี *Bacillus thermocatenulatus* ผลิตไลเปสได้สูงที่สุด คือ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส

Kim และคณะ(1994) ได้คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากดินบริเวณน้ำพุร้อนในประเทศเกาหลี พบว่า *Bacillus* sp. strain 398 สามารถผลิตไลเปสได้มากที่สุด โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH 4-11 อีกทั้งเอนไซม์จะไม่เสียกิจกรรมเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Handelsman และ Shoham (1997) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างที่มีน้ำมันปนเปื้อนในประเทศอิสราเอล ได้แบคทีเรียที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ H1 สามารถผลิตไลเปสได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถจัดจำแนกเป็น *Bacillus* sp. โดยสามารถผลิตไลเปสได้ 0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็น

เวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยไลเปสที่ได้มีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วง pH 6.5-9.0

Dharmsthiti และ Luchai (1999) ได้ทำการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL027 โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำ ไลเปสที่ได้มาทำบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะของไลเปสที่ได้ พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60-75 องศาเซลเซียส

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a เข้าสู่ *Escherichia coli*
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a
3. การทำบริสุทธิ์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a
4. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสบริสุทธิ์