| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การโคลนยีน การทำบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. UN16a |
| ผู้เขียน | นายเอกรัตน์ เชี่ยงฉิน |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| ปีการศึกษา | 2544 |

**บทคัดย่อ**


การโคลนยีนไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. UN16a เข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยใช้พลาสมิด pUC18 ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชั่น ผลปรากฏว่า ไม่สามารถตรวจหาโคลนที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a พบว่า แบคทีเรียนี้ผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 39.33 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสโดยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความอิ่มตัว 20-60 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B และ Sephadex G-100 ตามลำดับ พบว่า ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.78 เท่า และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 79.93 เป็น 222.68 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์บน SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีโปรตีนเพียงแถบเดียว และมีน้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดาลตัน และไลเปสบริสุทธิ์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 โดยเอนไซม์มีความคงตัวมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในช่วงพีเอชระหว่าง 7-9 และเอนไซม์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีความคงตัวมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังคงมีกิจกรรมในสารละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์มีความคงตัวมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อละลายใน Isooctane, Hexane และ Benzene แต่สารละลาย Methanol และ Chloroform สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อเติมไอออนชนิดต่างๆลงในสารละลายเอนไซม์ไลเปส พบว่า $Ca^{2+}$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 116

เปอร์เซ็นต์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม $Fe^{3+}$ ส่วน EDTA และ 2-mercaptoethanol ยังคงทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ PMSF และ SDS สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า 40 เปอร์เซ้นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Gene Cloning, Purification and Properties of Lipase from Thermophilic *Bacillus* sp. UN16a |
| Author | Mr. Akarat Siengchin |
| Major Program | Biotechnology |
| Academic Year | 2001 |


Abstract

Lipase gene was cloned from thermophilic *Bacillus* sp. UN16a into *E. coli* JM109 using pUC18 by transformation but no lipase producing recombinant clones were detected. The *Bacillus* sp. UN16a produced maximum lipase after cultivation for 36 hrs with enzyme activity of 39.33 mU/ml. The crude enzyme was stable at –20 $^{0}$C for 4 days with remaining activity of 97.7%. The enzyme was purified by 20-60% ammonium sulfate precipitation, Ion exchange chromatography using DEAE-Sepharose CL-6B and gel filtration of Sephadex G-100, respectively. The enzyme was purified upto 2.78 folds and the specific enzyme activity was increased from 79.93 to 222.68 mU/mg. The purified enzyme possessed a single band on SDS-PAGE with the estimated molecular weight of 17 kDa. The purified lipase exhibited maximum activity at pH 8.0 and the optimum temperature was 60 $^{0}$C. In addition, it was stable more than 90% in the pH range of 7.0-9.0 and the purified enzyme was stable upto 65 $^{0}$C for 60 minutes with relative activity more than 80%. The purified enzyme was also stable in various organic solvents with more than 50% activity in the presence of isooctane, hexane and benzene but the enzyme was completely inhibited in methanol and chloroform. The purified enzyme was slightly induced by $Ca^{2+}$ but it was mostly inhibited by $Fe^{3+}$. In addition, the enzyme added with EDTA or 2-mercaptoethanol was still shown relative activity of more than 80% whereas PMSF and SDS inhibited enzyme activity of more than 40 and 60% respectively.