บทที่ 4

วิจารณ์

4.1 การโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

จากการโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a ถ่ายโอนลงใน *E. coli* JM 109 โดยวิธีทรานส์ฟอเมชั่นโดยใช้ pUC18 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และตรวจสอบ recombinant clone โดยการ spread plate ลงบนอาหาร LB agar ที่มี แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ tributyrin oil ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนผสม แต่ไม่สามารถตรวจพบ recombinant clone ที่มียีนไลเปสได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sau*3AI ทำการตัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. UN16a เพียงบางส่วนนั้นอาจจะตัดชิ้นส่วนของยีนไลเปสทำให้ recombinant clone อาจได้รับยีนที่ไม่สมบูรณ์จึงทำให้ไม่สามารถเกิดการแสดงออกของยีนไลเปสได้ หรืออาจเนื่องจากยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a สามารถผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่การเพาะเลี้ยง recombinant clone นั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส นอกจากนี้อาจเป็นเพราะไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a นี้เป็น extracellular enzyme เมื่อโคลนเข้าสู่ *E. coli* JM109 แล้วเอนไซม์อาจจะติดอยู่ที่ชั้น periplasmic space และเมื่อเซลล์แตกจึงปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ และในการทำการทดลองครั้งนี้ยังพบปัญหาในระหว่างการทดลองคือ การเกิด satellite phenomenon ของ recombinant clone บนอาหารแข็งที่มีการเติม แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กล่าวคือ เมื่อบ่มเชื้อเกิน 2 วัน จะเกิดโคโลนีเล็กๆรอบๆโคลนที่ดื้อยา ทำให้ยากแก่การเห็นวงใสรอบๆโคโลนีที่สามารถย่อย tributyrin oil ได้ และจากการทดลองครั้งนี้จึงควรเปลี่ยนวิธีการโคลนโดยการใช้วิธี cosmid cloning ซึ่งวิธีการนี้สามารถโคลนยีนขนาดใหญ่ถึง 45 กิโลเบส และสามารถสืบหาโคลนที่ต้องการง่ายขึ้นเนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการโคลนมีขนาดใหญ่ทำให้มีโอกาสที่จะพบโคลนที่มียีนที่ต้องการได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามชุด cosmid cloning kit ยังคงมีราคาแพง

4.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไลเปส พบว่าการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. Un16a จะผลิตไลเปสเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโต และจะผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในช่วงปลาย exponential phase ซึ่งรูปแบบการผลิตไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a จัดเป็นการผลิตเอนไซม์ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth-associate) (Lee and Rhee, 1993) เช่นเดียวกับการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK (Lee and Rhee, 1993), *Pseudomonas fragi* CRDA037 (Schuepp *et al*., 1997) และ *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al*., 2000) เป็นต้น

4.3 การทำบริสุทธิ์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a

จากการทำบริสุทธิ์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a โดยการนำสารละลายส่วนใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นไปทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้หลักการ salting out โดยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำทำให้เกิดการแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำทำให้โมเลกุลของโปรตีนแยกตัวตกตะกอนออกมา จากการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ในทุกช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตดังนั้นจึงใช้ช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีกิจกรรมของไลเปสสูงกว่า และยังมีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนน้อยกว่า ในช่วง 0-20 และ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป แต่ก็ทำให้มีการสูญเสียเอนไซม์ ซึ่งทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกับที่ Schuepp และคณะ(1997) ศึกษาช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* CRDA037 และจากการทำบริสุทธิ์ไลเปสโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน พบว่า ไลเปสสามารถจับกับเรซินชนิด DEAE-Sepharose CL-6B ในสภาวะที่พีเอชเป็นด่าง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a มีประจุสุทธิเป็นลบที่พีเอช 8.0 จากการทำบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B นั้นเมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ พบว่า ยังมีโปรตีนชนิดอื่นๆร่วมอยู่ด้วยจึงได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ต่อไปด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดเจล

ฟิวเตชั่นโดยใช้เรซินชนิด Sephadex G-100 และนำสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ พบว่า มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวโดยมีน้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดาลตัน และเมื่อศึกษาความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลในสภาพธรรมชาติโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า ยังคงมีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว เช่นเดียวกับเมื่อศึกษาความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ แสดงว่าไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a มีเพียงหนึ่งหน่วย (monomeric form)

อย่างไรก็ตามโมเลกุลของไลเปสนี้มีขนาดใกล้เคียงกับไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus thermocatenulatus* ซึ่งเป็นไลเปสขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 16 กิโลดาลตัน (Schmidt-Dannert, 1994) แต่มีขนาดต่างกับไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. อื่นที่ได้รายงานมาแล้ว คือ *Bacillus* sp. THL027 ที่มีไลเปสขนาด 69 กิโลดาลตัน (Dharmsthiti and Luchai, 1999) และ *Bacillus* sp. ที่มีไลเปสขนาด 22 กิโลดาลตัน (Sugihara *et al*., 1991) ส่วนขนาดของไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นมีขนาดแตกต่างกัน ดังนี้ ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK มีขนาด 45 กิโลดาลตัน (Lee and Rhee, 1993), ไลเปสจาก *Mucor hiemalis f. hiemalis* มีขนาด 49 กิโลดาลตัน (Hiol *et al*., 1999), ไลเปสจาก *Rhizopus chinensis* มีขนาด 28.4 กิโลดาลตัน (Yasuda *et al*., 1999), ไลเปสจาก *Aspergillus nidulas* มีขนาด 29 กิโลดาลตัน (Mayordomo *et al*., 2000), ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* มีขนาด 32 กิโลดาลตัน (Hiol *et al*., 2000) และ ไลเปสจาก *Acinetobacter* nov. sp. KM109 มีขนาด 62 กิโลดาลตัน (Mitsuhashi *et al*., 1999) และจากน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. UN16a ดังกล่าวสามารถประมาณได้ว่า ยีนที่สังเคราะห์ไลเปสนี้มีขนาดประมาณ 465 เบส (bp) ซึ่งจัดเป็นยีนขนาดเล็ก และจากการทำบริสุทธิ์ไลเปสนี้พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.78 เท่า โดยมีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 1.45 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเสียสภาพธรรมชาติ สูญเสียเอนไซม์จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหรืออาจถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งขั้นตอนต่างๆที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

4.4 การศึกษาคุณสมบัติของไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนเจลฟิวเตชั่น

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานและความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a พบว่า ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับไลเปสที่ผลิตจาก *Pseudomoas cepacia* (Sugihara *et al.,* 1992), *Bacillus* sp. (Sugihara *et al*., 1991), *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, 1994), *Bacillus* sp. A30-1(ATCC 53841) (Wong *et al*., 1995), *Bacillus* sp. IHI-91 (Becker *et al.,* 1997), *Bacillus stearothermophilus* L1 (Kim *et al.,* 1998) และ *Streptomyces rimosus* (Abramic *et al.,* 1999) โดยเอนไซม์มีความคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 35-65 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับไลเปสทนร้อนที่ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* (Sztajer *et al*., 1991), *Pseudomonas cepacia* (Sugihara *et al*., 1992), *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, 1994), *Bacillus* sp. IHI-91 (Becker *et al*., 1997), *Bacillus stearothermophilus* L1 (Kim *et al*., 1998), *Bacillus* sp. THL027 (Dharmsthiti and Luchai, 1999), *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 (Dharmsthiti *et al*., 1998) and *Streptomyces rimosus* (Abramic *et al*., 1999) ซึ่งการที่ไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a สามารถทนอุณหภูมิสูงอาจเนื่องมาจากการจับกันภายในโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) (Lee and Rhee, 1993) และไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8.0 ซึ่งเหมือนกับไลเปสที่ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* (Sztajer *et al.,* 1991), *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001 (Chartrain *et al.,* 1993), *Vibrio* sp. TA 43 (วิภูมิ แก้วทอง, 2539), *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, 1994), *Bacillus* sp. RS-12 (Sidhu *et al.,* 1998) และ *Acinetobacter* nov. sp. Strain KM109 (Mitsuhashi *et al*., 1999) และเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอชที่เป็นกรดเล็กน้อยจนถึงพีเอชเป็นด่าง (pH 6.0-9.0) ซึ่งเหมือนกับไลเปสชอบอุณหภูมิสูงจาก *Pseudomonas fluorescens* (Sztajer *et al*., 1991), *Pseudomonas putida* 3SK (Lee and Rhee, 1993), *Aeromonas sobria* LP004 (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997), *Bacillus* sp. (Sugihara *et al*., 1991) และ *Bacillus* sp. THL027 (Dharmsthiti and Luchai, 1999)

จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงาน และความคงตัวของไลเปส พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการทำงาน และทำให้ความคงตัวของ

ไลเปสลดลง เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดความยืดหยุ่นของโมเลกุลของเอนไซม์ (Klibanov, 2001) และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ (Nelson and Cox, 2000) โดยเฉพาะตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วทำให้ความคงตัวของเอนไซม์ลดลง ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (Kuntz and Kaumann, 1974; Rupley and Careri, 1991 อ้างโดย Klibanov, 2001) โดยไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ที่มีขั้วสูง ซึ่งผลที่ได้นี้เหมือนกับไลเปสที่ได้จาก *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol, *et al*., 1999) และ *Pseudomonas putida* 3SK (Lee and Rhee, 1993) นอกจากนี้ Makhzoum และคณะ(1996) ได้ทำการทดสอบผลของตัวทำละลายอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆต่อความคงตัวของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าความคงตัวของเอนไซม์ลดลง (Chartrain *et al*., 1993)

จากการศึกษาผลของไอออนของโลหะชนิดต่างๆต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a พบว่า ไอออนของ Ca^{2+} ซึ่งเป็นไอออนในกลุ่มไดวาเลนท์แคทไอออนจะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไอออนเพิ่มขึ้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Ca^{2+} เป็นไอออนชนิดเดียวที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ โดยไอออน Ca^{2+} จะไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระทำให้กรดไขมันอิสระตกตะกอนลงมาในรูปสบู่แคลเซียม (calcium soap) ทำให้กรดไขมันอิสระไม่ไปยับยั้งการทำงานของไลเปส (Macrae, 1983) นอกจากไอออนของ Ca^{2+} สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แล้วไอออนของ Ca^{2+} ยังสามารถยับยั้งการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ ไลเปสจากรา เช่น *Aspergillus oryzae* (Ohnishi *et al*., 1994) ส่วนไอออนชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบโดยเฉพาะ Fe^{3+} นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของไลเปส ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Makhzoum และคณะ(1996), (Schuepp *et al*., 1997) นอกจากนี้ไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปมักถูกยับยั้งการทำงานด้วยไอออนของโลหะอีกหลายชนิด ได้แก่ ไอออนของ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} , Ba^{2+} และ Hg^{2+} (Makhzoum *et al*., 1996; Hiol *et al*., 2000; Chartrain *et al*., 1993; Hiol *et al*., 1999; Lee and Rhee, 1993) ซึ่งการที่ไอออนของโลหะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารโลหะนั้นแตกตัวเป็นไอออนไปรวม

กับหมู่ sulfhydryl (-SH) ที่กรดอะมิโนซีสเทอีนในสายโพลีเพปไทด์ของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Henis, 1987)

จากการศึกษาผลของสารเคมีที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA ซึ่งเป็น chelating agent จาก 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็น 1 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp.UN16a ไม่ได้จัดเป็น metalloenzyme และจากการทดสอบไลเปสด้วย 2-mercaptoethanol พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ไม่ได้มีส่วนสำคัญเกี่ยวกับหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่อาจมีส่วนสำคัญเกี่ยวกับการบิดตัวของโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรท (Jaeger *et al*., 1994) แต่ก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าพันธะไดซัลไฟด์ไม่ได้อยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ เพราะในการที่จะบอกได้ว่ามีพันธะไดซัลไฟด์ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้หรือไม่นั้นจะต้องมีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ด้วย ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้เหมือนกับผลการทดลองที่ได้จากไลเปสจาก *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* และ *Staphylococcus marcescens* Sr41 (Tyski *et al*., 1983; Sugiura and Isobe, 1974; Matsumae and Shibatani, 1994 อ้างโดย Dharmsthiti and Lotrakul, 1997) และจากการทดสอบไลเปสด้วย PMSF พบว่า จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่นเดียวกับในไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* strain 2D (Makhzoum *et al*., 1996) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a จะมีกรดอะมิโนเซอรีนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่ง Balcao และคณะ (1996) พบว่ามีกรดอะมิโนที่มีส่วนสำคัญที่อยู่ตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเปสได้แก่ กรดอะมิโนเซอรีน (serine residue) กรดอะมิโนฮีสทิดีน (histidine residue) และกรดอะมิโนแอสพาติก (aspartic acid residue) ส่วน SDS ซึ่งเป็นสาร surfactant ชนิดแอนไอออนิก (anionic detergent) มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสเนื่องจาก SDS สามารถจับกับกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์มีประจุสุทธิเป็นลบ และเกิดการคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาว (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537) ทำให้โปรตีนเสียสูญสภาพธรรมชาติในการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว