



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส  
ประสิทธิภาพสูง

(Cloning and characterization of lipase-encoding gene from  
high-efficiency lipase producing *Bacillus* sp.)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พิชรพันธ์ อมรรัตนพันธ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 176819  
สัญญาเลขที่ 32/2558

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส  
ประสิทธิภาพสูง  
(Cloning and characterization of lipase-encoding gene from  
high-efficiency lipase producing *Bacillus* sp.)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม พ.ศ. 2560

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 32/2558

## Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 32/2558).

หัวข้อโครงการวิจัย การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส  
ประสิทธิภาพสูง  
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. BLCD 003 และศึกษาการแสดงออกของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสและศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant lipase พบว่า *Bacillus* sp. BLCD 003 มียีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสขนาด 648 คู่เบส ซึ่งสร้างโปรตีน (215 amino acid residues) ที่มีลำดับกรดอะมิโน Ala-X-Ser-X-Gly ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบได้ในเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. เมื่อแทรกยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. BLCD003 เข้าไปในเวกเตอร์ pET-26b(+) และศึกษาการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* BL21(DE3) พบว่า Recombinant lipase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและที่ค่า pH เท่ากับ 6.0 และสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์เอาไว้ได้ไม่ต่ำกว่า 66% ที่อุณหภูมิและค่า pH อื่น ๆ ที่ทดสอบ

คำสำคัญ: ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปส, เอนไซม์ไลเปส, *Bacillus* sp.



**Research project** Cloning and characterization of lipase-encoding gene from high-efficiency lipase producing *Bacillus* sp.  
**Research project leader** Patcharanan Amornrattanapan, PHD

### ABSTRACT

This research aimed to clone and sequence a lipase-encoding gene from *Bacillus* sp. BLCD 003, detected lipase-encoding gene expression and characterized recombinant lipase. The results indicated that *Bacillus* sp. BLCD 003 harbored a 648 bp lipase gene that encoded a protein with 215 amino acid residues which contained conserved motif, Ala-X-Ser-X-Gly, commonly found in *Bacillus* species. Lipase-encoding gene from *Bacillus* sp. BLCD 003 that was inserted in pET-26b(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) encoded recombinant lipase that had a molecular weight of 23 kDa. Recombinant lipase showed highest activity at 37°C and at pH 6.0 and it could retain at least 66% of its activity at other temperatures and pH tested.

**Keywords:** Lipase-encoding gene, Lipase, *Bacillus* spp.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง.....	ข
สารบัญภาพ.....	ค
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	3
รายละเอียดเกี่ยวกับ <i>Bacillus</i> sp.....	3
รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส.....	6
รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	11
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	13
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	30
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	39
รายงานสรุปการเงิน.....	41
บรรณานุกรม.....	42
ภาคผนวก.....	49
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
ภาคผนวก ข สารเคมีและบัฟเฟอร์.....	52
ภาคผนวก ค แผนที่เวกเตอร์.....	59
ภาคผนวก ง DNA ladder และ Preotein ladder .....	62
ประวัตินักวิจัย.....	63

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank .....	35
2	ลำดับกรดอะมิโนของไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank .....	36

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเซลล์และเอนโดสปอร์ของ <i>Bacillus</i> spp.....	3
2	การเร่งปฏิกิริยาประเภทต่างๆของเอนไซม์ไลเปส .....	7
3	จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลท BLCD003 บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% .....	30
4	จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลท BLCD003 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% .....	31
5	ผลจากการเพิ่มจำนวนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลท BLCD003 ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (A) LIPCD_F1 และ LIPCD_R1 และ (B) LIPCD_F2 และ LIPCD_R2 .....	31
6	Recombinant plasmids จากโคลนของ transformants บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% .....	32
7	ผลจากการเพิ่มจำนวน Recombinant DNA (pJet1.2-lip) จากโคลนของ transformants ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ pJET 1.2 forward primer และ pJET 1.2 reverse primer บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% .....	33
8	ผลจากการเพิ่มจำนวนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลท BLCD003 ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LIPCD_F และ LIPCD_R บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% .....	34
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ <i>Bacillus</i> sp. BLCD003 .....	34
10	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการ Translate ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปส .....	35
11	Recombinant protein จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE .....	37
12	กิจกรรมสัมพัทธ์ของ Recombinant lipase ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน .....	38
13	กิจกรรมสัมพัทธ์ของ Recombinant lipase ที่ค่า pH แตกต่างกัน .....	38
14	แผนที่เวกเตอร์ pJet1.2 และลำดับเบสบริเวณ MCS .....	59
15	เวกเตอร์ pUC19 และลำดับเบสบริเวณ MCS .....	60
16	แผนที่เวกเตอร์ pET-26b(+) และลำดับเบสบริเวณ MCS และ Expression site ....	61
17	ดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ของ VC 100bp Plus DNA ladder .....	62
18	โปรตีนขนาดต่าง ๆ ของ Chromatein prestained protein ladder .....	62

## บทที่ 1 บทนำ

ไลเปส หรือ Triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ ไม่ว่าจะเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Lee et al., 1999; Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001; Kambourova, Kirilova, Mandeva & Derekova, 2003) หรือทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างเอสเทอร์ และการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา (Mitsuhashi et al., 1999) เอนไซม์ไลเปสมีศักยภาพสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตไบโอดีเซล การผลิตผงซักฟอก การผลิตกระดาษ การปรับแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร และการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ชนิดใหม่ เป็นต้น (Schmid, 1987; Yamane, 1987; Bjorkling, Godtfredsen, Kirk, 1991; Bornscheuer, 1995) และในการผลิตทางอุตสาหกรรมเหล่านี้ต้องการเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะและสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตที่ต้องการสูง (Kristjansson, Stetter, 1992; Herbert, 1992)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญมาจากจุลินทรีย์ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะจากบริเวณที่มีไขมันปนเปื้อน เอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์เพราะจุลินทรีย์เจริญได้เร็วและเลี้ยงง่าย นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมและสามารถปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (สุรอรธ ศุภจัตุรัส, วีระสิทธิ์ กัลยาภฤต, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธุ์, 2550) แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยมีหลายสกุลที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* และ *Bacillus thermoleovorans* เป็นต้น (จิรารรรถ มลาไวย, สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2555) แบคทีเรียสกุล *Bacillus sp.* ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่รวมไปถึงเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) และปริมาณของเอนไซม์ที่แบคทีเรีย *Bacillus sp.* ผลิตได้นั้นขึ้นอยู่กับสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Hasan et al., 2006a) เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sp.* จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียใน subfamilies I.4 และ I.5 (Arpigny & Jaeger, 1999)

มีรายงานการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไลเปสใน *Bacillus spp.* หลายสปีชีส์ เช่น *Bacillus pumilus* SG2 (Sangeetha et al., 2014) *Bacillus pumilus* strain F3 (Heravi et al., 2009) *Bacillus subtilis* FS1403 (Shi et al., 2010) *B. subtilis* 168 (Dartois et al., 1992) และยีนจากหลายสปีชีส์ดังกล่าวเข้ารหัสการสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกรดอะมิโนบริเวณ catalytic site เป็น Ala-X-Ser-X-Gly เช่นเดียวกัน ซึ่งบริเวณดังกล่าวจัดเป็นบริเวณอนุรักษ์

เนื่องจากข้อมูลระดับยีนและโปรตีนมีความสำคัญสำหรับการพัฒนาการนำยีนเข้ารหัสเอนไซม์และเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและจำแนกยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sp.* ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยว่ามีความสามารถในการย่อยสลายลิพิดได้ ตลอดจนการศึกษาการแสดงออกของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sp.* ใน *Escherichia coli* และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่แสดงออก ผลจากการศึกษานี้ทำให้

ทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสและคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่อาจจะแตกต่างออกไปจากข้อมูลจากงานวิจัยอื่นๆ และข้อมูลในระดับปริญญาตรีจะเป็นข้อมูลที่สามารนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus* sp. หรือเพิ่มการแสดงออกของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นหรือผลิตได้ในปริมาณมากขึ้นเพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหรือการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ นอกจากนี้ ผลที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ จะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จริงในกระบวนการทางอุตสาหกรรมต่อไป

### ความมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus* sp.
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. และศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant lipase

### ความสำคัญของการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. และทำให้ทราบคุณสมบัติของ Recombinant lipase ซึ่งอาจมีคุณสมบัติที่จำเพาะ ซึ่งทั้งสองส่วนเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาการดัดแปลงพันธุกรรมของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสหรือใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอื่น ๆ เพื่อพัฒนาการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ประโยชน์ต่อไป

### สมมติฐานของการศึกษา

*Bacillus* sp. มียีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ถูกควบคุมให้แสดงออก แสดงกิจกรรมที่แตกต่างกันในสภาวะที่มีอุณหภูมิและค่า pH แตกต่างกัน

### ขอบเขตของการศึกษา

*Bacillus* sp. ถูกนำมาตรวจสอบยืนยันการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร Production medium ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ จากนั้นทำการโคลนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. เพื่อหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สมบูรณ์ จากนั้นจึงทำการโคลนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. โดยใช้ protein expression vector เป็นพาหะในการพายีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant lipase โดยใช้วิธี SDS-PAGE และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิและค่า pH แตกต่างกันด้วยวิธีไตเตรท โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท

### สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทที่ 2

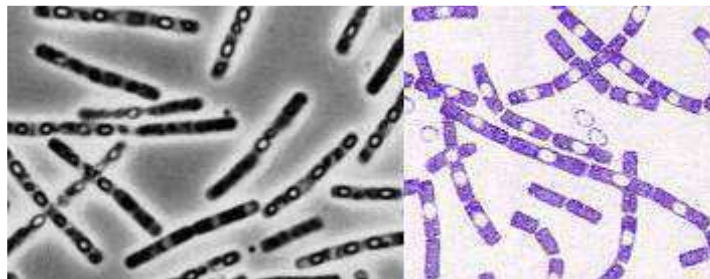
### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา แบ่งออกเป็น 3 หัวข้อ ดังนี้

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.
2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส
3. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.

*Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (Rod shaped) อาจเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-2.5x1.2-10 ไมโครเมตร (Rosovitz, Voskuil, & Chamblis, 1998) หรือ 0.3-2.2x0.7-1.2 ไมโครเมตร (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ต้องการออกซิเจนในการหายใจ บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Endospore forming) เพื่อความอยู่รอด โดย 1 เซลล์ มี 1 สปอร์ (ภาพที่15) ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เจริญได้ในอาหารหลายชนิด เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปกติ และค่า pH เป็นกลาง (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550)



ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์และเอนโดสปอร์ของ *Bacillus* spp.

(ที่มา : Granum, 2008, P. 23)

#### 1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยากว้าง ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเลี้ยง อายุโคโลนี และจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงมีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ดังนั้นจึงยากในการแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ (Rosovitz *et al.*, 1998) เซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) และผนังเซลล์ เซลล์ของ *Bacillus* spp. ไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเปปทิโดไกลแคนหลายชั้น พอลิเมอร์ที่มีประจุลบ (Anionic polymers) จะทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์เป็นชั้นของ paracrystalline cell wall surface layers (S layers) ประกอบด้วยโปรตีน หรือ

ไกลโคโปรตีน ชื่อ *Bacillus* spp. หลายชนิดสร้างแคปซูลที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate capsules) (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagella และการใช้แฟลกเจลลาเป็นแอนติเจนมีประโยชน์ในการตรวจจำแนก *B. cereus*, *B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* (Turnbull, Krame, & Melling, 1990)

### 1.2 ถิ่นที่อยู่อาศัยของ *Bacillus* spp.

แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่น พืช เศษซากพืช หรือแม้แต่ในอาหาร นม และธัญญาหาร (Claus & Berkeley, 1986) *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. pumilus* พบในน้ำทะเลที่สะอาด (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550) *B. psychrophilus* และ *B. insolitus* พบในอาหารแช่แข็ง *B. acidocaldarius* เจริญเฉพาะในน้ำพุร้อนที่เป็นกรดและดินรอบ ๆ บริเวณนั้นเท่านั้น (Priest, 1993) *B. coagulans* และ *B. stearothermophilus* พบในอาหารที่ต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่น น้ำตาล จากบีต (Beet sugar) และอาหารกระป๋อง เป็นต้น (Priest, 1993) *Bacillus* spp. หลายชนิดสามารถเจริญได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น *B. pasteurii* พบในสภาพแวดล้อมที่มียูเรียสูง แหล่งที่พบโดยทั่วไป คือ อ่างถ่ายปัสสาวะและดินในเขตเมือง (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550) สายพันธุ์ที่มีความทนต่ออุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูง และพีเอชต่ำ และพีเอชสูงจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตเอนไซม์ทางการค้า *Bacillus* มีเมตาบอลิซึมที่หลากหลายและยังมีรายงานเกี่ยวกับการก่อโรคน้อยมาก จึงทำให้นิยมนำ *Bacillus* มาใช้ในภาคอุตสาหกรรม (Harwood, 1989) *Bacillus* spp. ทุกชนิดเจริญได้ดีในที่ ๆ มีออกซิเจน บางชนิดจำเป็นต้องมีออกซิเจนจึงจะสามารถเจริญได้ เช่น *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. megaterium* และ *B. sphaericus* ส่วน *B. cereus*, *B. athracis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* และ *B. coagulans* บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนและสามารถดิวิซ์ในเตรทได้ (Turnbull et al., 1990) *Bacillus* spp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย แต่ *B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9-10 ขณะที่ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ขณะที่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. brevis* และ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550)

### 1.3 การใช้ประโยชน์จาก *Bacillus* spp. ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

*Bacillus* spp. มีความสำคัญเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ถูกเลือกนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ จำนวนมาก ทั้งนี้เป็นเพราะ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถหลั่งสารประกอบต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียสกุลนี้มีเพียงไม่กี่สปีชีส์ที่เป็นเชื้อก่อโรค ส่วนใหญ่มีความปลอดภัยต่อการใช้งาน

แบคทีเรียจำพวกนี้สร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวกคาร์โบไฮเดรส โปรติเอส (พรพรรณ อุสุวรรณ, 2550) และไลเปส (Ghori, Iqbal, & Hameed, 2011) ออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ได้หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยสลายเซลล์ลูลอส แป้ง กลูแคน เพคติน โปรตีน และไขมันต่าง ๆ ได้



อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. มีสมบัติในการทนความร้อนได้ดีกว่าผลิตจากเชื้อรา เอนไซม์โปรติเอส (Protease) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่ทำหน้าที่ในการตัดพันธะเปปไทด์ ไลเปส (Lipase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย น้ำมันและไขมัน ได้ผลิตภัณฑืเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล เป็นต้น ทั้งนี้ปริมาณของเอนไซม์ที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตได้นั้นขึ้นกับปัจจัยหลายปัจจัย เช่น แหล่งคาร์บอน (C) และไนโตรเจน (N) ที่แตกต่างกัน

ความน่าสนใจในแบคทีเรียสกุลนี้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอีกอย่างหนึ่ง คือ ความหลากหลายในทางชีวเคมีที่ทำให้สามารถปรับตัวอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง และสภาพความเป็นด่างได้ดี มีหลายชนิดสามารถเจริญแม้ในอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส หรือมีอุณหภูมิต่ำสุดที่ยังเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เป็นต้น คุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิสูงนี้เป็นการต้องการอย่างมากในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียพวกนี้จะทนทานได้ดีต่ออุณหภูมิสูง ทำให้ทนทานต่อระดับอุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมและมีอายุการใช้งานที่นาน ทั้งยังทนทานต่อสารที่มักทำลายโปรตีนได้เช่น สารซักล้างและตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น เอนไซม์จาก thermophilic bacilli ที่มีการผลิตทางการค้าแล้วเช่น neutral protease หรือเทอร์โมไลซิน, ไลเปส และพุลูลานเนส อีกทั้งเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) ชนิดกลูโคสไอโซเมอเรส จาก *B. coagulans* ซึ่งผลิตในรูปแบบการตรึงโดย Novo Nordisk เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมจากน้ำตาลฟรุกโตส และด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมได้มีการใช้ thermophilic bacilli เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตสารชีวภัณฑ์ต่างๆ ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนจากสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถดำเนินการผลิตภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้โดยไม่ต้องมีระบบอุณหภูมิที่ยุ่งยาก กระบวนการผลิตที่อุณหภูมิสูงยังช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ด้วย ช่วยให้กระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพดีขึ้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2539) สำหรับ alkalophilic bacilli ที่ทนทานต่อ pH สูงหรือความเป็นด่างได้นั้น มีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่ใช้ในผงซักฟอกหรือน้ำยาทำความสะอาดต่างๆ เอนไซม์โปรติเอสที่นำมาใช้ในผงหรือน้ำยาทำความสะอาดชนิดแรกๆ คือ subtilisin Carlsberg ซึ่งเป็น serine protease จาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติทนต่อ pH และอุณหภูมิสูง อีกทั้งยังทนต่อ oxidizing และ chelating agents ได้ดีด้วย ต่อมา มีการปรับปรุงพัฒนาด้านคุณสมบัติที่ดีต่างๆ เพิ่มขึ้น ทำให้ได้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ มากมาย เช่น Esperase, Maxatase และ Savinase ของ Novo Nordisk เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีความทนทานต่อสภาพรุนแรงในกระบวนการฟอกหนังได้ดี เอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้ในผงหรือน้ำยาทำความสะอาดต่างๆ ยังมีอีก เช่น  $\alpha$ -amylase และไลเปสซึ่งช่วยกำจัดคราบสกปรกและเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในน้ำยาปรับผ้าให้ดูใหม่เสมอโดยเอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายเศษด้ายในเนื้อผ้าที่อาจขาดเป็นขุยออกทำให้ผ้าดูใหม่ได้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2539) เอนไซม์จาก bacilli ที่เข้ามามีความสำคัญอย่างมากในทางเทคโนโลยีชีวภาพอีกชนิดหนึ่งคือ cyclodextrin glucanotransferase (CGT) ได้จาก *B. marcescens* สามารถย่อยแป้งได้พร้อมกับการสร้าง 6-, 7- และ 8-membered cyclic 1,4-  $\alpha$ -linked oligosaccharides ได้ ซึ่งโครงสร้างนี้จะมีช่องว่างตรงกลางที่มีสภาพไม่มีขั้ว ดังนั้น เมื่อเติมสารใดๆ ที่มีคุณสมบัติชอบน้ำลงในสารละลายของ

ไซโคลเดกซ์ทรินในน้ำ สารนั้นจะถูกดึงเข้าไปในช่องว่างตรงกลางโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้มีประโยชน์อย่างมากต่องานอุตสาหกรรมการผลิตยาและสารต่างๆ เป็นอย่างมาก นอกจากนี้แล้ว จากแบคทีเรียในกลุ่มของ *B. subtilis* มีความปลอดภัยต่อการใช้สูง ทั้งยังสามารถหลังสารที่ผลิตขึ้นออกสู่นอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีการนำแบคทีเรียนี้ไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนที่ใช้ในการผลิตสารต่างๆ เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ผู้ผลิตสารนั้นๆ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2539)

## 2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolases; EC 3.1.1.3) จัดเป็นเอนไซม์ประเภทคาร์บอกซิลิกเอสเทอเรส ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายและการสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลสายยาวได้ โดยสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายๆ ประเภท เช่น แบคทีเรีย ฟังไจ อาเคียร์ และ ยูคารีเอเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสัตว์และพืช (Esakkiraj, Rajkumarbharathi, Palavesam, & Immanuel, 2010) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่หลากหลาย สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ และยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์อย่างกว้างขวาง (Gupta *et al.*, 2004)

### 2.1 คุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

การสลายสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำของไลเปสเกิดจากการที่เอนไซม์เข้าไปจับที่บริเวณผิวร่วมระหว่างสารตั้งต้นและน้ำ ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นอัตราของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับเวลาที่เอนไซม์เข้าไป Adsorp อยู่ตรงบริเวณผิวร่วมและขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น เมื่อเอนไซม์ไลเปสทำงานในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งสารตั้งต้นสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายเหล่านั้นได้ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็จะเป็นไปตามรูปแบบปกติของจลนศาสตร์เอนไซม์ (Martinelle & Hult, 1995)

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาทั้งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ในห้องปฏิบัติการ หรือการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่

(1) ไฮโดรไลซิส เป็นปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปสลายพันธะเอสเทอร์ทำให้สารโมเลกุลใหญ่ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ แตกตัวเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง ได้แก่ กรดไขมันและกลีเซอรอล (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, ม.ป.ป.<sup>1)</sup>)

(2) เอสเทอริฟิเคชัน คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกและแอลกอฮอล์ แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์

(3) ทรานเอสเทอริฟิเคชันด้วยอะซิโตนไฮดรอกไซด์ เป็นปฏิกิริยาที่เปลี่ยนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ไปเป็นเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือ โมโนแอลคิลเอสเทอร์ (Mono-alkyl ester) และกลีเซอรอล โดยการทำปฏิกิริยากับกรด

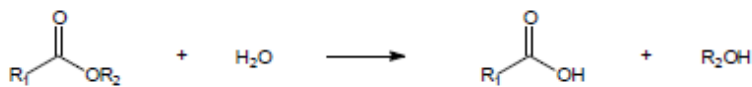
(4) ทรานเอสเทอริฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ไฮดรอกไซด์ คือ ปฏิกิริยาเปลี่ยนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือ โมโนแอลคิลเอสเทอร์ (Mono-alkyl ester) และกลีเซอรอล โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์โมเลกุลขนาดเล็ก (ขวลิต งามจรัสศรีวิชัย, 2551)

(5) อินเทอร์เอสเทอร์ิฟิเคชัน คือ ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ดัดแปลงโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในน้ำมันหรือไขมัน โดยการเปลี่ยนแปลงชนิด หรือตำแหน่งของกรดไขมัน (Fatty acid) ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เพื่อเปลี่ยนแปลงสมบัติ เช่น จุดหลอมเหลว (Melting point) (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิริยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

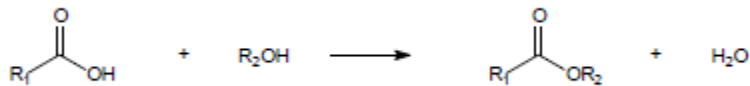
(6) อะมิโนไลซิส คือ ปฏิกิริยาเคมีที่ไตรกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียหรือเอมีนแล้วแตกตัวเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง (Wikipedia, 2009)

การเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปส แสดงผลดังภาพที่

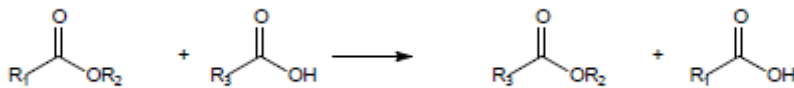
### (1) ไฮโดรไลซิส



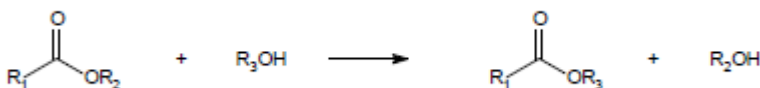
### (2) เอสเทอร์ิฟิเคชัน



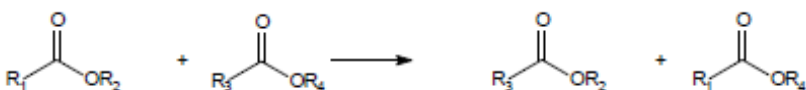
### (3) ทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันด้วยอะซิโตนไลซิส



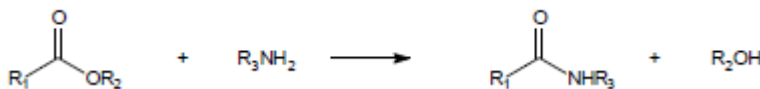
### (4) ทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ไลซิส



### (5) อินเทอร์เอสเทอร์ิฟิเคชัน



### (6) อะมิโนไลซิส



ภาพที่ 2 การเร่งปฏิกิริยาประเภทต่างๆของเอนไซม์ไลเปส  
(ที่มา: Zarevucka, 2012, p. 459)

## 2.2 ผู้ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสถูกผลิตได้จาก 3 แหล่งหลักๆ ดังนี้

### 2.2.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของสัตว์ เช่น หัวใจ ไต สมอ ก้ามเนื้อ เซรั่ม แต่ที่สำคัญ คือ ตับอ่อน (Pancreatic lipase) โดยเอนไซม์จากตับอ่อนเป็นเอนไซม์ที่พบชนิดแรกที่ทำหน้าที่เร่งการสลายโมเลกุลไขมันในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (สุรอรธ ศุภจัทรัส, วีระสิทธิ์ กัลยาณุต, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และศุภพงษ์ ภูวพัฒน์-พันธุ์, 2550 อ้างอิงใน กรองกาญจน์ เบี้ยวจันทร์, 2556) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแมลง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงานได้ดีที่พีเอชปานกลาง ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารทดแทนของ Pregastic lipase ที่ถูกใช้เป็นยารักษาภาวะน้ำหนักเกิน (Obesity) และการทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่างๆ (Metabolic disorder) ในมนุษย์ (Roberto, Arreguin, & Gonz, 2000 อ้างอิงใน กรองกาญจน์ เบี้ยวจันทร์, 2556)

### 2.2.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อต่างๆของพืช แต่ถูกพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงในเมล็ดพืชเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ โดยปกติแล้วเมล็ดพืชมีไตรเอซิลกลีเซอรอลอยู่ในปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับต้นพืชที่จะงอกออกมาใหม่ เมื่อไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ถูกสะสมไว้ (ไม่ละลายน้ำ) ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลที่ละลายน้ำ ซึ่งจะถูกขนส่งไปยังเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยเอนไซม์ไลเปสอาจจะเป็นตัวควบคุมช่วงระหว่างการงอกของเมล็ดและถูกพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงระหว่างการงอก กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสถูกรายงานว่าพบในน้ำมันที่สกัดจากพืชหลายๆ ชนิด ยกตัวอย่างเช่น เมล็ดละหุ่ง เมล็ดปาล์ม เมล็ดโกลีเฟร่า เมล็ดทานตะวัน และถั่วลิสง (Pahoja & Sethar, 2002)

### 2.2.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่นั้นเป็นเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งออกมา นอกเซลล์ โดยถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์แล้วถูกปล่อยออกนอกเซลล์ (Zarevucka, 2012) จุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าพืชและสัตว์ในด้านการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากสามารถเจริญได้รวดเร็ว และสามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้ง่าย (Hasan, Shah, & Hameed, 2006) โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ออกเป็นกลุ่มหลักๆ ได้ดังนี้

#### 2.2.3.1 เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์

นักวิจัยหลายท่านยกให้เชื้อราและยีสต์เป็นผู้ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณค่า เนื่องจากมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง ความเสถียรต่อค่าพีเอช ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น และการมีกิจกรรมในตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์มีประโยชน์มากกว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เนื่องจากความจริงที่ว่า เทคโนโลยีในปัจจุบันนี้ นิยมใช้การบ่มแบบรวดเร็วและวิธีการสกัดที่ใช้ต้นทุนต่ำ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการคัดเลือกเชื้อราและยีสต์เพื่อใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Lazar, 1992) ผู้ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้สำหรับการค้า ได้แก่ *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus* (Ghosh, Saxena, Gupta, Yadav, &

Davidson, 1996), *Candida cylindracea*, *Himucola lanuginose*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicas*, *R. niveus* และ *R. oryzae* (Godfredson, 1990)

### 2.2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลายด้าน เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสลายหรือสังเคราะห์สารได้อย่างหลากหลาย เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียเป็นไกลโคโปรตีน แต่ก็มีเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่หลั่งออกนอกเซลล์บางชนิดเป็นไลโปโปรตีน โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียถูกรายงานว่า เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในเซลล์ได้ตลอดเวลา (Constitutive enzyme) และไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น และพบเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูง เนื่องด้วยคุณสมบัติในข้างต้นเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียจึงถูกนำไปใช้ในงานเกี่ยวกับการผลิตสารซักล้าง การผลิตส่วนผสมของอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ การผลิตน้ำมันหอมระเหย การผลิตยาฆ่าแมลงและการสังเคราะห์ยา เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Achromobacter* ได้ถูกโคลนและนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส (Pogaku, Suresh, Srinivas, & Reddy, 2010)

## 2.3 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (เอกรัตน์ เขียงฉิน, 2545)

จากการที่ Macrae (1983) ได้แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 3 กลุ่ม และ Yamane (1987) ได้แบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะเป็น 2 กลุ่ม ต่อมาในปี 1997 ได้มีการแบ่งเอนไซม์ไลเปสจากสิ่งมีชีวิตออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

### (1) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Substrate specific lipase)

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ตรงพันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้นที่เป็นทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และแม้แต่ฟอสโฟลิปิด โดยเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้พบได้ในทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสัตว์สามารถไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด แต่จะไฮโดรไลซ์โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ต่ำสุด ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากพืชและจุลินทรีย์สามารถไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับ

โมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลได้มากกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium camembertii* (Macrae, 1983) เป็นต้น

### (2) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (Positional or Regiospecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้จะมีมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งภายนอกและตำแหน่งภายในของแกนกลางไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่น เอนไซม์ไลเปสชนิด 1,3-regioselective จะไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง sp-1 และ sp-3 ได้ผลิตกรดไขมันที่หายเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่จัดเป็นชนิด 1,3-regioselective ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* และ *Candida antarctica*

### (3) เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (Nonspecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสชนิดนี้มีอยู่มากมาย โดยไลเปสกลุ่มนี้จะสามารถไฮโดรไลซ์

เอสเทอร์ทั้งหมดในไตรเอซิลกลีเซอรอล

(4) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid or acyl selective lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน โดยจะไฮโดรไลซ์กรดไขมันเหล่านั้น โดยไม่คำนึงถึงตำแหน่งของเอสเทอร์บนไตรกลีเซอรอล ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด cis-9 unsaturated fatty acid และเอนไซม์ไลเปสจาก *Botrytis cinerea* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

(5) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะ (Stereospecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสชนิดนี้สามารถไฮโดรไลซ์ระหว่างตำแหน่ง sn-1 และ sn-3 ของไตรกลีเซอรอล โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* และ *Pseudomonas fluorescens* จะจำเพาะกับ sn-1 ส่วนเอนไซม์ไลเปสจาก *Fusarium solani* จะจำเพาะสำหรับ sn-3

## 2.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มที่สำคัญของเอนไซม์ที่มีมูลค่าในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเนื่องจากมีคุณสมบัติหลากหลายที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้และมีความสะดวกในแง่ของการผลิต คุณสมบัติของเอนไซม์และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียมีความหลากหลาย ซึ่งทำให้เป็นที่น่าดึงดูดมากสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ (Ray, 2012) ซึ่งอุตสาหกรรมที่มีการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้นั้น ถูกรวบรวมไว้โดย Verma, Thakur and Bhatt (2012) มีดังนี้

### (1) อุตสาหกรรมอาหาร

การประยุกต์ใช้งานในด้านของวิทยาศาสตร์การอาหารบางประเภทได้มีการใช้เอนไซม์เพื่อผลิตหรือสร้างอาหารมีคุณภาพที่ดีขึ้น เอนไซม์ไลเปสถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การพัฒนารสชาติของชีส และเทคโนโลยีการผลิตชีสที่ถูกปรับปรุงด้วยเอนไซม์ (Enzyme modified chesse หรือ EMC) เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสถูกใช้ภายนอกห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตรสชาติและปรับปรุงโครงสร้างของอาหาร ด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันหรือทรานเอสเทอริฟิเคชัน เพื่อต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางอาหารเพิ่มมากขึ้นหรือเพื่อให้คุ้มค่าต่อต้นทุนการผลิต

### (2) อุตสาหกรรมการซักล้างทำความสะอาด

การใช้เอนไซม์ในสารซักล้างพบได้ทั่วไปในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งเกินครึ่งของสารซักล้างทั้งหมดพบว่ามีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ โดยอุตสาหกรรมการซักล้างเป็นอุตสาหกรรมต้นๆที่มีการใช้เอนไซม์ทั้งในเรื่องของปริมาณและคุณภาพ การใช้เอนไซม์ในสารซักล้างนั้นช่วยทำให้สารซักล้างมีความสามารถในการขจัดคราบฝังลึกและช่วยให้สารซักล้างมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม โดยในปัจจุบันนี้สารซักล้างทำความสะอาดผ้ามีเอนไซม์รวม (Cocktails) ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส เป็นส่วนประกอบ

### (3) การจัดการสิ่งแวดล้อม

เนื่องด้วยการพัฒนาอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้มลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมมีความรุนแรงอันตรายมากขึ้น สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมของดิน เอนไซม์ไลเปสที่ทำงานที่อุณหภูมิต่ำได้มีความสำคัญในแง่ของการบำบัดน้ำเสีย การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำที่ปนเปื้อนไขมัน หรือการสังเคราะห์สารประกอบภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ

#### (4) อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

พิทช์ (Pitch) หรือส่วนประกอบของไม้ที่ไม่ชอบน้ำ เป็นสารจำพวกไตรกลีเซอไรด์และไขมัน ก่อปัญหาร้ายแรงต่อการผลิตเยื่อและกระดาษ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาช่วยกำจัดพิทช์ออกจากเยื่อที่จะถูกทำไปผลิตเป็นกระดาษต่อไป ซึ่งการกำจัดพิทช์ด้วยเอนไซม์ไลเปสถูกใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษขนาดใหญ่ต่อเนื่องกันมาตั้งแต่ช่วงต้นคริสต์ศักราชที่ 1990

#### (5) อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเครื่องหอม

เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญต่อการประยุกต์ใช้งานในด้านของเครื่องสำอางและเครื่องหอม เพราะ เอนไซม์ไลเปสแสดงกิจกรรมในสารลดแรงตึงผิวและในการผลิตน้ำมันหอมระเหย เรตินอยด์ (วิตามิน A และอนุพันธ์) มีความสำคัญทางการค้าในด้านของเครื่องสำอางและยาเป็นอย่างมาก เช่น เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ซึ่งอนุพันธ์เรตินอยด์ที่ละลายน้ำนั้นถูกเตรียมได้จากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกต้อง

#### (6) อุตสาหกรรมการแพทย์

เอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกได้จากไข่ของผีเสื้อกลางคืน (*Galleria mellonella*) ถูกพบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) H37Rv การศึกษาเบื้องต้นนี้อาจถูกพิจารณาได้ว่าเป็นการคัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทางดำนอื่นเพื่อนำไปสู่การค้นพบแหล่งของยาชนิดใหม่

### 3. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

มีรายงานการศึกษายืนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไลเปสใน *Bacillus* spp. หลายสปีชีส์ เช่น ยีน *lip* จาก *B. subtilis* 168 ซึ่งสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ catalytic site เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (Dartois *et al.*, 1992)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. stearothermophilus* L1 มีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ซึ่งสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงและในสภาวะที่เป็นด่าง และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ catalytic site เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (Kim *et al.*, 1998)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermocatenulatus* สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิสูงและในสภาวะที่เป็นด่างไม่ต่ำกว่า pH 8.0 (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. sphaericus* 205y สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 7.0 ถึง 8.0 (Sulong *et al.*, 2006)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermoleovorans* ID-1 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส (Cho *et al.*, 2000)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. stearothermophilus* P1 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 8.5 (Sinchaikul *et al.*, 2001)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *B. pumilus* B26 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 8.5 (Kim *et al.*, 2002)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 ที่แสดงออกใน *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 8.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีครึ่งชีวิตเท่ากับ 2, 1 และ 0.5 ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ  $K^+$  และ  $Fe^{3+}$  ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ (Kanmani, Kumaresan & Aravind, 2015)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. L2 มีขนาด 1251 คู่เบส และถอดรหัสไปเป็นโปรตีนที่มี 417 amino acid residues เมื่อศึกษา Recombinant lipase พบว่ามีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 178 เท่าเมื่อเทียบกับ Crude native lipase และ recombinant lipase มีขนาด 43.2 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 9.0 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสถูกยับยั้งได้โดย EDTA, PMSF, pepstatin-A, 2-mercaptoethanol และ dithiothreitol (Shariff *et al.*, 2011)

ยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus Subtilis* Strain I4 มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็น Signal sequence ขนาด 31 residues และมีส่วนที่เป็น Mature protein ขนาด 181 residues เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มีขนาด 19.33 กิโลดาลตัน จัดอยู่ใน lipase family1.4 และมีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 7.0 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Xie *et al.*, 2013)



### บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์

##### 1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

Strain	Genotype
<i>Bacillus</i> sp. BLCD 003 (Amornrattanapan and Ruangrit, 2012)	-
<i>Escherichia coli</i> strain JM109 (Fermentas)	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk -, mk +), relA1, supE44, D(lac-proAB), [F', traD36, proAB, laqlq ZDM15]
<i>Escherichia coli</i> strain Top10 (Invitrogen)	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
<i>Escherichia coli</i> strain BL21(DE3) (Invitrogen)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)

##### 2. เครื่องมือ

- 2.1 เครื่องเขย่า (Shaker) (Green SShaker II, PNP)
- 2.2 เครื่อง Centrifuge (Sartorius, ประเทศเยอรมนี)
- 2.3 เครื่อง Spin down (Fotodyne incorporation)
- 2.4 เครื่อง Thermal cycler (T Gradient, Biometra<sup>®</sup>, ประเทศเยอรมนี)
- 2.5 Gel electrophoresis apparatus (Minisub<sup>TM</sup> DNA cell, Biorad, ประเทศอิตาลี)
- 2.6 เครื่อง Vortex (vortex genie-2, Scientific industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2.7 เครื่อง Microplate reader (Spectro star<sup>nano</sup>, BMG labtech, ประเทศเยอรมนี)
- 2.8 Power supplies (Enduro<sup>TM</sup> Labnet international Inc.)

##### 3. วัสดุอุปกรณ์

- 3.1 หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2 หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
- 3.3 Petri dish
- 3.4 Autopipett ขนาด P10, P20, P200, P1000
- 3.5 ขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1000 มิลลิลิตร
- 3.6 Pipett ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร
- 3.7 Glass bead ขนาด 425-600 ไมโครเมตร (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.8 Quartz cuvette

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 Typtic soy broth (TSB)
- 4.2 Typtic soy agar (TSA)
- 4.3 Luria-Bertani broth (LB broth)
- 4.4 Luria-Bertani agar (LB agar)
- 4.5 LB- ampicillin agar plate
- 4.6 S.O.C. medium

#### 5. สารเคมี

- 5.1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 5.2 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Ajax finechem Pty Ltd, ประเทศออสเตรเลีย)
- 5.3 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Amresco<sup>®</sup>, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 5.4 Tris base (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 5.5 Agarose (Amresco<sup>®</sup>, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 5.6 Hydrochloric acid (HCl) (QRèC<sup>™</sup>, ประเทศนิวซีแลนด์)
- 5.7 Sodium chloride (NaCl) (Loba chemie PVT, ประเทศอินเดีย)
- 5.8 Sodium hydroxide (NaOH) (VWR prolabo<sup>®</sup>)
- 5.9 Glacial acetic acid (QRèC<sup>™</sup>, ประเทศนิวซีแลนด์)
- 5.10 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) (Research organic, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

#### 6. ชุด kits สำเร็จรูปและเวกเตอร์

- 6.1 PureLink<sup>™</sup> Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 6.2 Plasmid DNA Extraction kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 6.3 PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 6.4 PureLink<sup>™</sup> Quick Gel Extraction kit (Invitrogen, ประเทศเยอรมนี)
- 6.5 CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific)
- 6.6 pET-26b(+) vector (Merck Millipore)

#### 7. สารอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง

- 7.1 Ethidium bromide
- 7.2 6x Gel loading buffer
- 7.3 TE buffer pH 8.0
- 7.4 1x TAE buffer
- 7.5 VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 7.6 Chromatein prestained protein ladder (Vivantis)

7.6 Lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA)

### 8. โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)
LIPCD_F1	5' - TGT ACT AGC CAA AAC GGG CG - 3'	20
LIPCD_R1	5' - TGC CGG GTA CCA TTA CAA CC - 3'	20
LIPCD_F2	5' - AGG GAT GGG ATC AAA ACC AGC - 3'	21
LIPCD_R2	5' - GCT TTG GCT TCT TTC GGC TG - 3'	20
LIPCD_F	5' - CGC <u>GGA TCC</u> ATG AAA GTG ATT CGA T - 3'	25
LIPCD_R	5' - ACC <u>AAG CTI</u> TTA ATT CGT ATT CTG TCC - 3'	27
pJET 1.2 Forward sequencing primer	5' - CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC - 3'	23
pJET 1.2 Reverse sequencing primer	5' - AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG - 3'	24
M13F-20	5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'	17
M13R-pUC	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'	17
T7 promoter primer	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3'	19
T7 terminator primer	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'	19

## วิธีการทดลอง

### 1. การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว (พัชรนันท์ อมรัตน์พันธ์, 2557)

2.1 นำโคโลนีเดี่ยวของ Stock เชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาซัดแยกเชื้อลงบนอาหาร Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2 นำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งที่ได้มาแขวนลอยใน 100 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

2.3 นำหัวเชื้อที่เตรียมดังแสดงในข้อ 3.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4 บ่มบนเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.5 ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในข้อ 3

### 2. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Winkler & Stuckmann, 1979)

#### 2.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

2.1.1 ปิเปตสารละลาย p-nitrophenyl palmitate (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน n-heptane) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plate

2.1.2 ปิเปตเอนไซม์ 20 ไมโครลิตรลงในหลุมที่มี p-nitrophenyl palmitate

2.1.3 ปิเปตเอทานอล (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 12 ไมโครลิตรลงในหลุมเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.1.4 ปิเปตส่วนใส 100 ไมโครลิตรลงในหลุมใหม่

2.1.5 ปิเปต NaOH ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม

2.1.6 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

หมายเหตุ: ใช้สารละลาย p-nitrophenyl palmitate เป็น Blank และใช้อาหาร Production Medium ทำปฏิกิริยาในชุดควบคุม

#### 2.2 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อย 4-nitrophenol 1.0 ไมโครโมล จาก 4-nitrophenyl palmitate ในเวลา 1 นาที

#### กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง} - \text{ชุดควบคุม} - \text{ค่าความขุ่นจากกราฟมาตรฐาน 4-nitrophenol}) (\text{ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times \text{ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย (มิลลิลิตร)}}{\text{เวลา (นาที)} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)} \times \text{มวลโมลกุลของ 4-nitrophenol (139.11 กรัมต่อโมล)}}$$

### 3. การเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

3.1 เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BLCD 003 ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2 นำไปปั่นแบบเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

### 4. การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

4.1 เตรียม Lysozyme digestion buffer (25 mM Tris-Cl, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme)

4.2 เตรียม waterbath ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส

4.3 ตกตะกอนเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนใส และใส่ Lysozyme digestion buffer ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.4 ใส่ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ใส่ Genomic lysis ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.5 ใส่เอทานอล 96-100% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นานประมาณ 5 วินาที ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และย้ายใส่ลงใน Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.6 ทิ้งหลอดเก็บและย้าย Column ใส่ในหลอดเก็บหลอดใหม่ และใส่ wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งหลอดเก็บและย้าย Column ใส่ในหลอดเก็บหลอดใหม่

4.7 ใส่ wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้าย Column ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่

4.8 ใส่ Genomic elution buffer ปริมาตร 25-200 ไมโครลิตร ลงใน column ที่ทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 1.5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 5. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

5.1 เตรียม Reaction Mixture สำหรับการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII* และ *NcoI* ดังแสดงในตาราง

Component	Volume (µl)	Final concentration
Nuclease free water	12	
10x buffer	2	1x
gDNA (0.5-1 µg/µl)	5	0.025-0.05 µg/µl
Restriction enzyme (10 U/µl)	1	0.5 U/µl
<b>Total</b>	<b>20</b>	

- 5.2 ผสมเบาๆ และ spin down 2-3 วินาที
- 5.3 ป่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน waterbath เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 5.4 แบ่งดีเอ็นเอ 5  $\mu$ l ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

## 6. การทำ Self-circularization ของดีเอ็นเอ

### 6.1 เตรียม Reaction Mixture ดังแสดงในตาราง

Component	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
Nuclease free water	Up to 50	
10x T4 DNA Ligase buffer	5	1x
Linear DNA	จากการคำนวณ*	10-50 ng
T4 DNA Ligase (200 U/ $\mu$ l)	1.25	5 U/ $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50</b>	

\*คำนวณปริมาตรของ linear DNA จากความเข้มข้นเริ่มต้นของ linear DNA ในหน่วย ng

- 6.2 ผสมโดยใช้วิธีเบาๆ และ spindown 2-3 วินาที จากนั้นนำไปป่มโดย
- ถ้าดีเอ็นเอมีปลายแบบ Sticky-ends นำไปป่มที่อุณหภูมิประมาณ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
  - ถ้าดีเอ็นเอมีปลายแบบ Blunt-ends นำไปป่มที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 6.3 แบ่งดีเอ็นเอ 5  $\mu$ l ไปทำ agarose gel electrophoresis และส่วนที่เหลือนำไปใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR

## 7. การดำเนินปฏิกิริยา PCR

- 7.1 เตรียม Reaction Mixture สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F1, LIPCD\_R1 และ LIPCD\_F2, LIPCD\_R2 และ LIPCD\_F, LIPCD\_R ดังแสดงในตาราง

Components	ความเข้มข้น สุดท้าย	Volume ( $\mu$ l)	No template control	No primer control
sterile D.I.		11.25	16.25	16.25
10x buffer	1x	2.5	2.5	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	2.5	2.5	2.5
10 mM dNTP	0.2 mM	0.5	0.5	0.5
Taq 5 U/ $\mu$ l	0.15 U/ $\mu$ l	0.75	0.75	0.75
primer forward (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M	1.25	1.25	-
primer reverse (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M	1.25	1.25	-
DNA Template		5	-	5
<b>Total</b>		25	25	25

7.2 ดำเนินปฏิกิริยา PCR สำหรับคู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F1, LIPCD\_R1 และ LIPCD\_F2, LIPCD\_R2 ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Step	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	10 นาที	1
Denaturation	95	1 นาที	30
Annealing	55	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

ดำเนินปฏิกิริยา PCR สำหรับคู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F และ LIPCD\_R ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Step	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	4 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	30
Annealing	52	30 วินาที	
Extension	72	50 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	1

7.3 ตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR บน Agarose gel ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x TAE buffer โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ VC 100 bp DNA ladder (DNA marker) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี Spectrophotometry

## 8. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Sambrook & Russell, 2001)

8.1 เท Agarose ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมละลายแล้วใส่ถาด เสียบหัวแล้วตั้งทิ้ง นานอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้สารละลายอะกาโรสแข็งตัว

8.2 ใส่ถาดที่มี Agarose gel ลงใน Gel electrophoresis apparatus เท 1x TAE buffer ให้ท่วม Agarose gel

8.3 ปิเปตดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ 6x Gel loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปิเปตทั้งหมดลงในหลุมของเจล และปิเปต VC 100 bp plus DNA ladder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจลหลุมแรก

8.4 ให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

8.5 ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอใต้แสงยูวีและถ่ายภาพ

## 9. การโคลนดีเอ็นเอ

### 9.1 การโคลนโดยใช้ CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific)

9.1.1 นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมีปลายแบบ sticky end มาใช้ในการโคลนยีน

9.1.2 เตรียม reaction mixture ดังแสดงในตาราง เพื่อเปลี่ยนดีเอ็นเอที่มีปลายแบบ sticky end ให้เป็นปลายแบบ blunt end (เตรียมปฏิกิริยาบนน้ำแข็ง)

Component	Volume ( $\mu$ l)
2x reaction buffer	10
Sticky end DNA fragment (จากข้อ 3)	1 (0.15 pmol ends)**
Water	To 17
DNA blunting enzyme	1
<b>Total</b>	<b>18</b>

หมายเหตุ \*\*วิธีคำนวณดีเอ็นเอในหน่วย pmol

- เมื่อวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอแล้ว นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ
- นำผลที่ได้ ในหน่วย ng มาเปลี่ยนเป็นหน่วย pmol โดยคูณกับ  $10^{-3}$  เช่น  
คำนวณความเข้มข้นได้ 80 ng นำมาคูณ  $10^{-3} = 0.08$  pmol

9.1.3 Vortex และ spin down 3-5 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และแช่หลอดปฏิกิริยาบนน้ำแข็ง



9.1.5 นำ DNA ที่เป็น blunt ends แล้วมาต่อกับ vector pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo scientific)

9.1.6 นำ blunt end ที่ได้จากข้อ 7.4 มาเติม pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/μl) ปริมาตร 1 μl (0.05 pmol ends)

9.1.7 เติม T4 DNA ligase ปริมาตร 1 μl Vortex และ spin down 3-5 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

**หมายเหตุ** ใช้ปฏิกิริยา ligation นี้ในการทำ transformation โดยตรง (สามารถเก็บปฏิกิริยา ligation ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำการ transformation ในวันถัดไป โดยละลายบนน้ำแข็ง และผสมอย่างระมัดระวังก่อนการ transformation)

9.1.8 DNATransformation (Invitrogen)

- เตรียม water bath ที่ 42 องศาเซลเซียส

- นำ S.O.C medium ออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (รอจนกระทั่งอาหารมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง)

- อุ้บ LB medium + ampicillin (100 μg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- นำ competent cells จาก -80 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง ประมาณไม่เกิน 5 นาที

- นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ vector เรียบร้อยแล้วปริมาตร 2 μl มาใส่ในหลอดที่บรรจุ competent cell ที่ละลายแล้ว บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที

- Heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ย้ายมาวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที (ห้ามเขย่า)

- ใส่ S.O.C medium ปริมาตร 250 μl นำไปเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- นำ S.O.C medium ที่ผสมกับ competent cell ที่เขย่าเสร็จแล้วมา spread ลงบนอาหาร LB agar + ampicillin (100 μg/ml) โดยใช้ 1 หลอดปฏิกิริยาต่อ 1 จานอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

## 9.2 การโคลนโดยใช้ pUC19 vector

9.2.1 นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีปลายแบบ sticky end มาใช้ในการโคลนยีน โดยเป็นชิ้น insert

9.2.2 นำ vector pUC19 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และใช้สภาวะเดียวกัน

9.2.3 นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาเชื่อมกับ pUC19 vector โดยเตรียม Reaction mixture ดังแสดงในตาราง

Component	Volume ( $\mu$ l)
10x reaction buffer (vivantis)	2
Insert	2 (0.06 pmol ends)
Vector (pUC19)	2 (50 ng)
Sterile water	To 20
T4 DNA ligase (vivantis)	0.5

9.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง

9.2.5 DNA Transformation

- เตรียม water bath ที่ 42 องศาเซลเซียส
- นำ S.O.C medium ออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (รอจนกระทั่งอาหารมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง)
- เกลี่ย X-gal (50  $\mu$ l) และ IPTG (6  $\mu$ l) บน LB medium + ampicillin (100  $\mu$ g/ml) และวางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
- นำ competent cell จาก -80 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง ประมาณไม่เกิน 5 นาที
- นำชิ้น inserts ที่ต่อกับ vector แล้วมา 2-4  $\mu$ l ใส่ในหลอดที่บรรจุ competent cells ที่ละลายแล้ว บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที
- Heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ย้ายมาวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที (ห้ามเขย่า)
- ใส่ S.O.C medium ปริมาตร 250  $\mu$ l นำไปเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำ S.O.C medium ที่ผสมกับ competent cell ที่เขย่าเสร็จแล้วมา spread บนอาหาร LB agar + ampicillin (100  $\mu$ g/ml) โดยใช้หนึ่งหลอดปฏิกิริยาต่อ 1 จานอาหาร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

## 10. การวิเคราะห์โคลนที่ได้ด้วยวิธี PCR

### 10.1 การวิเคราะห์โคลนที่ได้จาก vector pJET1.2

10.1.1 เตรียม Reaction mixture ดังแสดงในตาราง

Component	Volume ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	2
dNTP mix, 2 mM each	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.2
pJET 1.2 Forward sequencing primer, 10 $\mu$ M	0.4
pJET 1.2 Reverse sequencing primer, 10 $\mu$ M	0.4
Water	13.9
Taq DNA polymerase	0.1
<b>Total</b>	<b>20</b>

10.1.2 ผสมให้เข้ากัน และแบ่งใส่หลอด PCR หลอดละ 20  $\mu$ l และเติม Template (Recombinant plasmids และ plasmids) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

10.1.3 ดำเนินปฏิกิริยา PCR สำหรับคู่ไพรเมอร์ pJET 1.2 Forward sequencing primer และ pJET 1.2 Reverse sequencing primer ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Step	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	25
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

10.1.4 นำ PCR product ไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR product 5  $\mu$ l ผสมกับ 6x Gel loading buffer ปริมาตร 1  $\mu$ l

## 10.2 การวิเคราะห์โคลนที่ได้จาก vector pUC19

10.2.1 เตรียม Reaction mixture ดังแสดงในตาราง

Component	Volume ( $\mu$ l)
10X Taq buffer	2.5
dNTP mix, 10 mM each	0.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
M13F-20, 10 $\mu$ M	1.25
M13R-pUC, 10 $\mu$ M	1.25
Water	11.25
Taq DNA polymerase	0.75
<b>Total</b>	<b>20</b>

10.2.2 ผสมให้เข้ากัน และแบ่งใส่หลอด PCR หลอดละ 20  $\mu$ l และเติม Template (Recombinant plasmids และ plasmids) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

10.2.3 ดำเนินปฏิกิริยา PCR สำหรับคูไพร M13F-20 และ M13R-pUC ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Step	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	30
Annealing	52	45 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1

10.2.4 นำ PCR product ไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR product 5  $\mu$ l ผสมกับ 6x Gel loading buffer ปริมาตร 1  $\mu$ l

## 11. การเตรียม Competent cell ของ *E. coli* ด้วยวิธี $\text{CaCl}_2$

11.1 เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm จาก LB agar plates (ที่บ่มเชื้อ 16-20 ชั่วโมง) ใส่ลงใน LB broth ปริมาตร 100 ml ใน flask ขนาด 250 ml

11.2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที จนเชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid log phase ย้ายเซลล์ใส่ในหลอด centrifuge ที่เย็นจัด ปริมาตรหลอดละ 50 ml. บ่มที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และทิ้งส่วนใส คว่ำหลอดไว้ประมาณ 1 นาที เพื่อให้ส่วนใสไหลออกให้หมด

11.4 แขนวลอยเซลล์ใน 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจัด ปริมาตร 10 ml. และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และทิ้งส่วนใส คว่ำหลอดไว้ประมาณ 1 นาที เพื่อให้ส่วนใสไหลออกให้หมด แขนวลอยเซลล์ใน 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 ml.

## 12. การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

12.1 ปรับปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 5 หรือ 6 ให้เป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ Deionized ปราศจากเชื้อ

12.2 เติม Buffer PCR ปริมาตร 5 volume แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex

8.3 ใส่สารละลายดีเอ็นเอที่มีสีเหลืองลงใน Column (หากสารละลายมีสี ส้ม/ชมพู/แดง ให้เติม 3M Sodium acetate (pH 5.2) และผสมให้กลับมาเป็นสีเหลือง)

12.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000  $\times g$  เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนของสารละลายที่ไหลลงมาอยู่ในหลอดเก็บ แล้วล้าง Column ด้วย Wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร

12.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งสารละลายที่ไหลลงมาอยู่ในหลอดเก็บ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดเอทานอลที่เหลือ

12.5 ย้าย Column ไปวางบน Microcentrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อ เติม Elution buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง Column membrane และตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

12.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งในส่วนของ Column และนำส่วนของดีเอ็นเอที่ไหลลงมาในหลอดเก็บด้านล่าง ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 13. การแยกดีเอ็นเอออกจาก Agarose gel ด้วย PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Invitrogen, ประเทศเยอรมนี)

13.1 ตั้งอุณหภูมิของ Waterbath ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

13.2 ใช้มีดตัด Agarose gel บริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและนำชิ้นเจลที่ได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่ปลอดเชื้อและนำไปแช่น้ำหนัก

13.3 ใส่บัฟเฟอร์ L3 ในอัตราส่วน 3:1 ของน้ำหนักชิ้นเจลที่ตัดได้ นำไปแช่ใน Waterbath ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยต้องพลิกหลอดกลับไปมาทุก 3 นาที หลังจากครบ 10 นาที ให้บ่มต่ออีก เป็นเวลา 5 นาที ให้ชิ้นส่วนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ให้หมด

13.4 ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลที่ได้ใส่ลงใน Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่มากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องและทั้งสารละลายที่ไหลลงมาในหลอดเก็บ

13.5 ล้าง Column ด้วย Wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้แรงมากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทั้งสารละลายที่ไหลลงมาในหลอดเก็บ

13.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 -2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทั้งหลอดเก็บและย้าย Column ไปใส่ใน Recovery tube และปิเปต Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลาง Filter ที่อยู่ใน Column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

13.7 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้แรงมากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนของ Column และนำส่วนของดีเอ็นเอที่ไหลผ่าน Column ลงมา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 14. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (Sambrook & Russell, 2001)

14.1 เจือจางดีเอ็นเอ 200 เท่า โดยปิเปตดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรและเติมน้ำ DI ปราศจากเชื้อปริมาตร 995 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge ที่ปราศจากเชื้อ (เก็บดีเอ็นเอที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

14.2 ปิเปตดีเอ็นเอ 1 มิลลิตรลงใน Quartz cuvet แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) ด้วยเครื่อง Microplate reader

14.3 คำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากสมการ โดยนำค่าที่คำนวณได้มาแปลผลดังแสดงในตาราง

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } A_{260} \text{ นาโนเมตร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } A_{280} \text{ นาโนเมตร}}$$

$A_{260} / A_{280}$	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ
1.65-1.85	ดีเอ็นเอบริสุทธิ์
น้อยกว่า 1.65	ปนเปื้อนโปรตีน
มากกว่า 1.85	ปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ

#### 14.4 คำนวณความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่  $A_{260}$  นาโนเมตร  $\times$  50  $\times$  Dilution factor  
(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

#### 15. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

15.1 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

15.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือโดยดูจากค่า QV ที่ปรากฏ โดยใช้โปรแกรม Sequence scanner 1.0 และแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit ตามด้วยการใช้ BLASTn เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา

#### 16. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 3 sequences ขึ้นไปวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL omega

#### 17. การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสไป Translate ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม EMBOSS Transeq โดยใช้ bacterial codon table จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย BLASTp

#### 18. การโคลนยีนนำรหัสไลเปสใน *Escherichia coli*

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เพิ่มจำนวนยีนไลเปสจากจีโนมที่ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003 โดยใช้ไพรเมอร์ LIPCD-F และ LIPCD-R ซึ่งมีบริเวณจดจำสำหรับเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR products และเวกเตอร์ pET-26b(+) ไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วเชื่อมต่อยีนไลเปสเข้าสู่เวกเตอร์ pET-26b(+) แล้วถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ One

Shot® BL21(DE3) Chemically competent *E. coli* คัดเลือกโคลน (transformants) ด้วยวิธี colony PCR ตามวิธีที่อธิบายไว้ในคู่มือของบริษัทผู้ผลิตเวกเตอร์ (pET system manual)

## 19. การผลิต recombinant lipase

นำ transformants ที่มี recombinant pET-26b(+) plasmid ไปเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani ที่มี kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้น ย้ายเชื้อไปลงในอาหาร LB ที่มี kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนของเชื้อต่ออาหาร เป็น 1:100 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนได้ค่า OD600 เท่ากับ 0.7-1.0 จากนั้นเติม IPTG ลงในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.7 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มต่ออีก 2, 4 และ 8 ชั่วโมง (เลี้ยงเชื้อโดยไม่ได้เติม IPTG ลงในอาหารเป็นชุดควบคุม) เก็บเซลล์ที่เวลาต่างๆ ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บ Supernatants ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

## 20. การวิเคราะห์ Recombinant lipase ด้วยวิธี SDS-PAGE

### ส่วนที่ 1 การเตรียม Resolving gel 12%

- 1.1 เตรียมหลอดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในการเตรียมส่วนผสมต่างๆ โดยปิเปตน้ำกลั่น DI ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 4.08 มิลลิลิตร
- 1.2 จากนั้นปิเปตสารละลายอะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร
- 1.3 ปิเปตบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (พีเอช 8.8) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมลงไป
- 1.4 เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร
- 1.5 ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร
- 1.6 สุดท้ายเติมสารละลาย TEMED ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากันอย่างเบาๆ (หมายเหตุ : เติมสารต่างๆ ตามลำดับขั้นตอนดังที่ระบุไว้ข้างต้น)
- 1.7 เตรียมอุปกรณ์ SDS-PAGE Gel ให้พร้อมในการแคชเจล จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ปิเปตลงไปใส่อุปกรณ์ที่เตรียมไว้ โดยปิเปตสารลงไปให้ลดต่ำจากกระจกประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร แล้วปิเปตน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปให้เต็มถึงขอบกระจกด้านบน ทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที เจลแข็งตัว นำกระดาษกรองตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ดูดซับน้ำออกจนหมด เหลือเพียง Resolving gel เท่านั้น

### ส่วนที่ 2 การเตรียม Stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 5

- 2.1 เตรียมหลอดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในการเตรียมส่วนผสมต่างๆ โดยปิเปตน้ำกลั่น DI ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 3.42 มิลลิลิตร

- 2.2 จากนั้นปิเปตสารละลายอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 1.02 มิลลิลิตร
- 2.3 ปิเปตบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (พีเอช 6.8) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมลงไป
- 2.4 เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร
- 2.5 ปิเปตสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
- 2.6 สุดท้ายเติมสารละลาย TEMED ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากันอย่างเบาๆ (หมายเหตุ : เติมสารต่างๆ ตามลำดับขั้นตอนดังที่ระบุไว้ข้างต้น)
- 2.7 จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ปิเปตลงไปเติมในส่วนของ Resolving gel ให้เต็มจนถึงขอบกระจก แล้วค่อยๆ เสียบหัวปิกลงไปด้านบน รอเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที
- 2.8 ค่อยๆ ดึงหัวด้านบนเจลออก แล้วนำเจลที่แคชไว้ในกระจกที่ประกบกันทั้ง 2 ด้าน ลงไปใส่ในอุปกรณ์ที่ใช้ Run gel ปิดให้สนิท แล้ว Tris-glycine 1X (พีเอช 8.3) ลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของอุปกรณ์
- 2.9 จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้แต่ละตัวอย่างไปผสมกับ 2X loading buffer ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ตัวอย่างละประมาณ 18 ไมโครลิตร ปิเปตลงเจล และปิเปต Chromatein Prestained Protein Ladder ในปริมาณ 5 ไมโครลิตร
- 2.10 จากนั้นทำการ Run gel ที่ 200 โวลต์ นาน 45 นาที
- จากนั้นเทสารละลายตรึงโปรตีน (Fixing solution ) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในกล่องพลาสติก แล้วนำเจลที่ได้ใส่ลงไปปิดฝากล่องให้สนิท นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 90 รอบต่อนาที นานกว่า 2 ชั่วโมงขึ้นไป เมื่อครบตามเวลาแล้วเทสารละลายออกจากนั้นเทสีย้อม (Coomassie Blue staining solution) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไป นำไปเขย่านาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดก็เทสีย้อมทิ้งให้หมดแล้วทำการล้างเจลด้วย (Destaining solution) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเช่นเดียวกันอีกหนึ่งรอบ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เทสารละลายที่ใช้ล้างเจลออก แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้สะอาด แล้วนำเจลที่ได้ตรึงด้วยพลาสติกใสให้เรียบ แล้วนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนภาพ

## 21. การวิเคราะห์คุณสมบัติและการแสดงออกของ recombinant lipase

บ่ม recombinant lipase ที่ได้จากการเลี้ยง transformants ตามวิธีที่แสดงในข้อ 14 จากนั้นนำ supernatants ไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ (25 อุณหภูมิห้อง 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส) และค่า pH ที่แตกต่างกัน (บัฟเฟอร์อะซิเตท พีเอช 4.0 และ 5.0, โฟสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 และ 7.0, บัฟเฟอร์ ทริสคลอไรด์ (Tris-HCl) พีเอช 8.0 และ 9.0, บัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต พีเอช 10.0) โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ และแสดงผลเป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %)

21.1 เตรียมส่วนผสมสำหรับชุดทดสอบและ Blank โดยปิเปตสารต่างๆลงในขวดรูปชมพู่



แล้วเขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน (ทำ 3 ซ้ำ)

Component	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
	ชุดทดสอบ (Test)	Blank
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	2.5	2.5
บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่ต้องการ ทดสอบ	1	1
น้ำมันปาล์ม	3	3

21.2 นำขบวนการผสมที่มีส่วนผสมต่างๆเรียบร้อยแล้วไป pre-warm ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

21.3 นำชุดทดสอบและ Blank ออกจากตู้บ่ม

- นำ Blank มาเติมสารละลายเอนไซม์ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทันที\*\*\* ทิ้งไว้ 30 นาที

- นำชุดทดสอบ มาเติมสารละลายเอนไซม์ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วไปบ่มบนเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ (25 อุณหภูมิห้อง 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที

21.4 เมื่อครบเวลาให้นำชุดทดสอบมาเติมเอทานอล (95%) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำเช่นเดียวกันกับ Blank)

3.5 หยด Phenolphthalein ลงไปในชุดทดสอบและ Blank ชุดละ 3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์

3.6 ทำการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีจากใสไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ถูกใช้ไป

3.7 คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย 1 microequivalent ของกรดไขมัน จากไตรกลีเซอไรด์ภายในเวลา 1 ชั่วโมงที่ pH 7.2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์สุทธิ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)} \times 1000 \times \text{time conversion factor} \times \text{df}}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

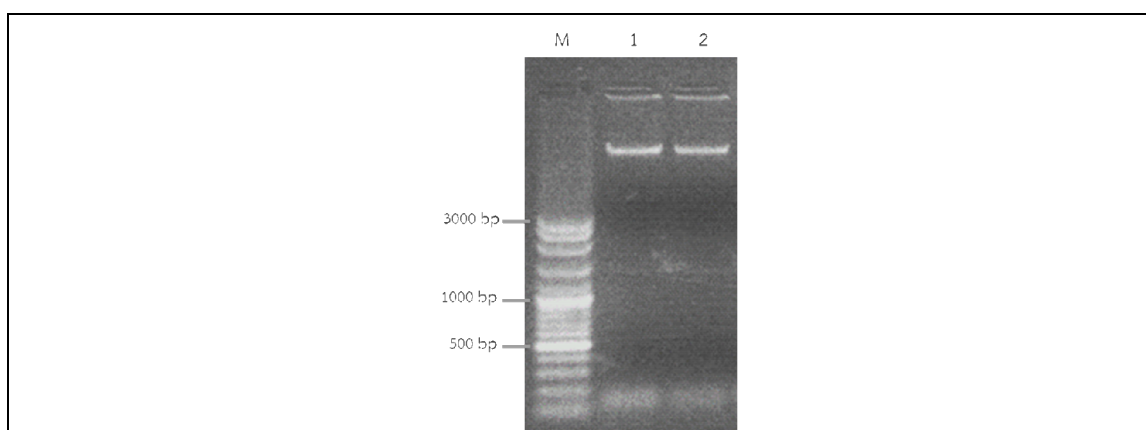
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 1. การผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

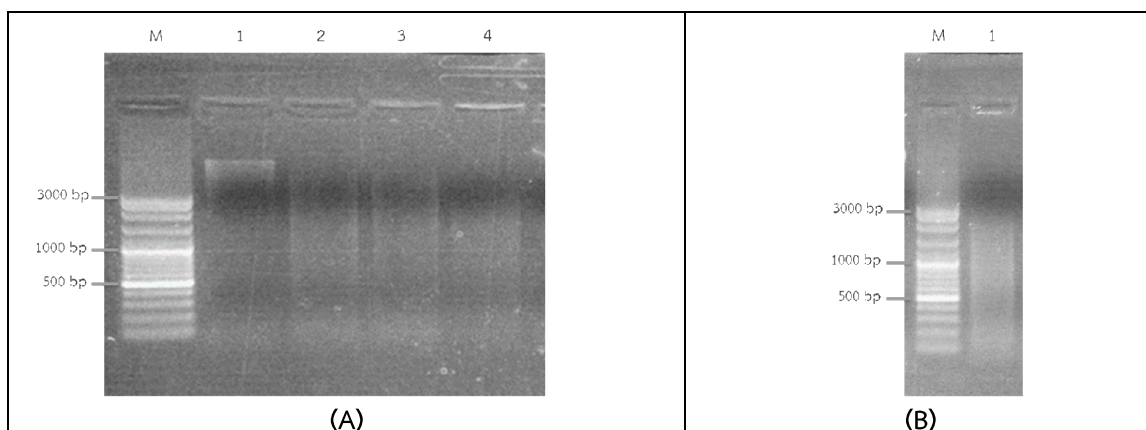
จากการนำเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD003 มาเลี้ยงในอาหาร Production medium ที่เติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปส หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วนำ Crude lipase ที่ได้ไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ 4-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส  $1.55 \pm 0.38$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 2. การโคลนและการจำแนก full length lipase-encoding gene

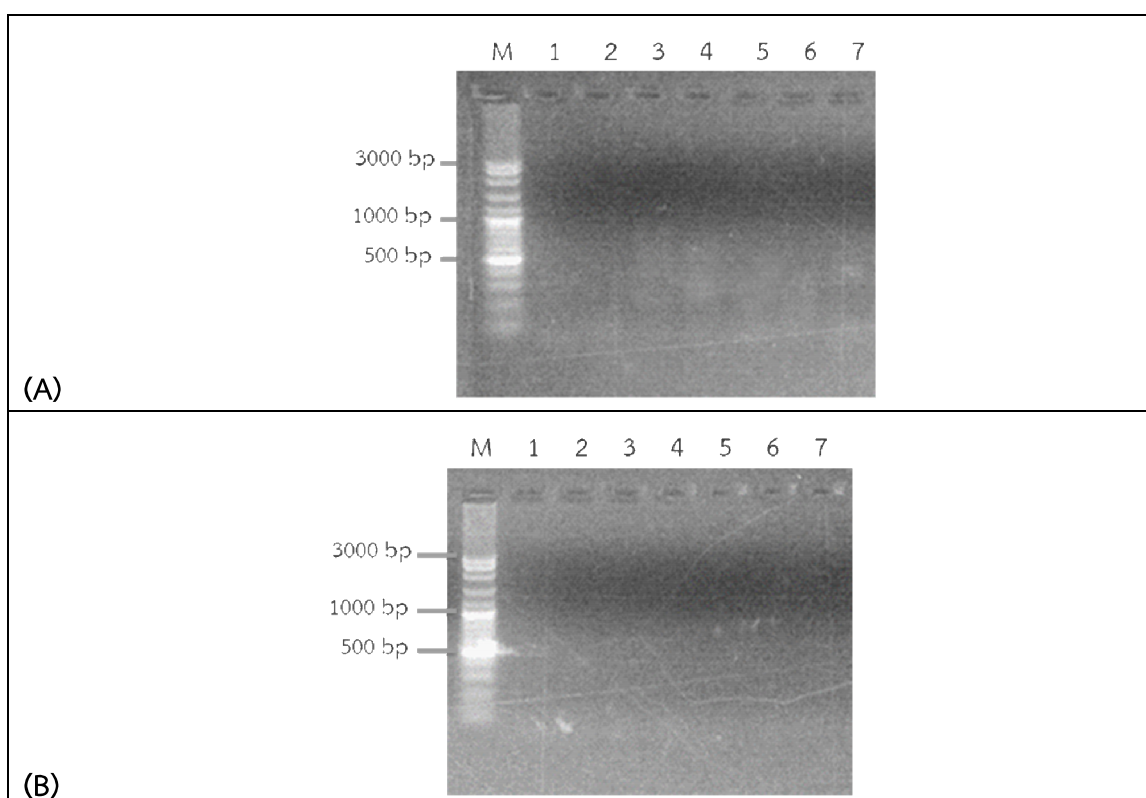
ในการศึกษาครั้งนี้ มีจุดมุ่งหมายในการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. BLCD003 โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003 (ภาพที่ 3) มาตัดโดยเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่มีบริเวณจดจำอยู่ภายในยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสบางส่วน ได้แก่ *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII* และ *NcoI* (ภาพที่ 4) จากนั้นนำ Digested DNA ไปทำ self-circularization เพื่อเชื่อมปลายของ Digested DNA เข้าด้วยกันแล้วนำไปเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอโดยใช้คู่มือไพรเมอร์ LIPCD\_F1 และ LIPCD\_R1 และคู่มือไพรเมอร์ LIPCD\_F2 และ LIPCD\_R2 ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับบริเวณภายในยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสบางส่วน จากนั้นนำ PCR products ไป transform เข้า JM109 Competent cells ผลปรากฏว่าไม่พบ PCR products จากการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส พบไม่ว่าจะใช้ไพรเมอร์คูใดก็ตาม ดังแสดงในภาพที่ 5 จึงไม่สามารถทำการโคลนนิ่งต่อไป



ภาพที่ 3 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BLCD003 บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder เลนที่ 1-2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003)

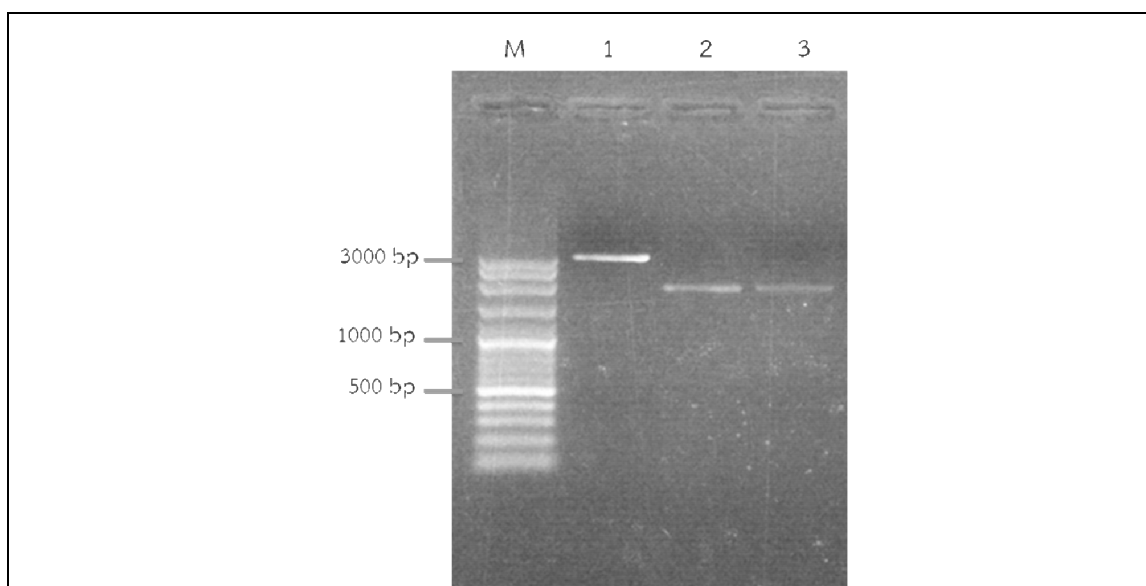


**ภาพที่ 4** จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BLCD003 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder, จีโนมิกดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ (A) เลนที่ 1: *Bam*HI เลนที่ 2: *Pst*I เลนที่ 3: *Hind*III และเลนที่ 4: *Nco*I และ (B) เลนที่ 1: *Eco*RI)



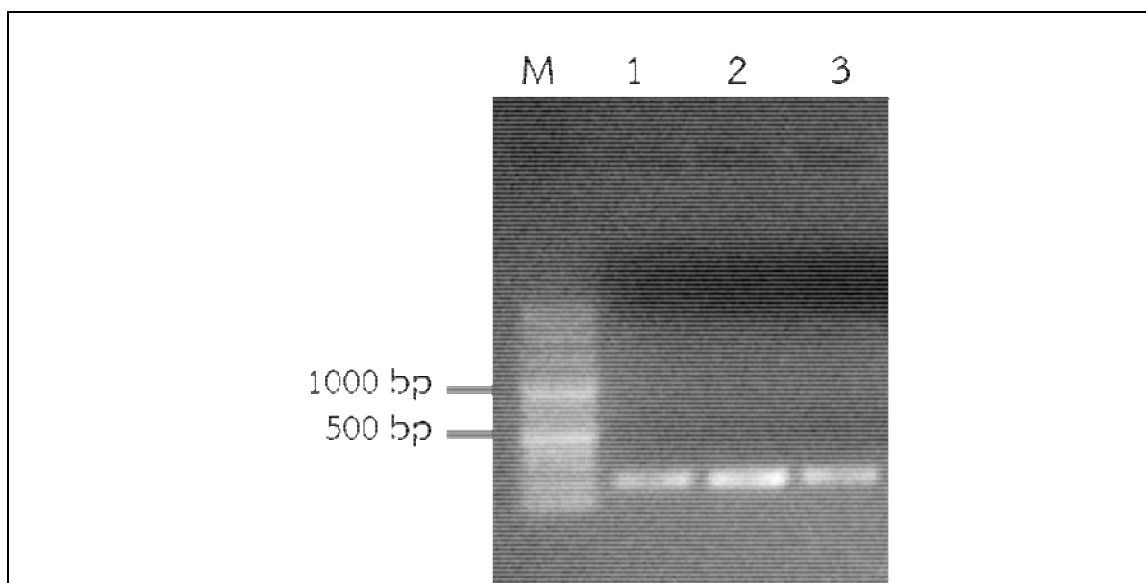
**ภาพที่ 5** ผลจากการเพิ่มจำนวนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BLCD003 ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (A) LIPCD\_F1 และ LIPCD\_R1 และ (B) LIPCD\_F2 และ LIPCD\_R2 บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder, จีโนมิกดีเอ็นเอ หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ เลนที่ 1: *Bam*HI เลนที่ 2: *Pst*I เลนที่ 3: *Hind*III เลนที่ 4: *Nco*I เลนที่ 5: *Eco*RI เลนที่ 6: NTC และเลนที่ 7: NPC)

เนื่องจากปัญหาที่อาจเกิดขึ้นจากกระบวนการ Self-circularization ของ Digested DNA ที่ไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง มีความเป็นไปได้ว่าปลายของ Digested DNA ทั้งสองข้างไม่เกิดการเชื่อมต่อกัน หรือมีไม่ก็โมเลกุลที่เกิดการเชื่อมต่อกัน หรือเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างดีเอ็นเอคนละเส้น ส่งผลให้ไม่มี PCR products เกิดขึ้น ดังนั้น ในขั้นถัดมา จึงได้นำ Digested DNA ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET 1.2 แล้วนำไป transform เข้า JM109 Competent cells และ TOP10 Competent cells พบว่า มีโคลนของ transformants ซึ่งเป็นโคโลนีสีขาวจำนวน 2 โคลน เจริญอยู่บนอาหารคัดเลือก จึงได้นำไปสกัดพลาสมิด พบว่า Recombinant DNA (pjet1.2-lip) มีการเคลื่อนที่บนเจลอะกาโรสแตกต่างจากเวกเตอร์ pJET 1.2 ที่ไม่มีชิ้น Insert ดังแสดงในภาพที่ 6 เมื่อนำ transformant DNA ไปยืนยัน positive transformants โดยใช้คู่มือ primer pJET 1.2 forward และ pJET 1.2 reverse primers พบ PCR products ขนาดประมาณ 200 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่ถูกต้องหากมีชิ้น DNA insert แทรกอยู่ นอกจากนี้ PCR products ดังกล่าวยังมีขนาดไม่แตกต่างจาก PCR products ที่ได้จากการใช้เวกเตอร์เปล่าเป็นดีเอ็นเอแม่แบบอีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งผลที่ปรากฏแสดงให้เห็นว่าเวกเตอร์ pJET 1.2 ไม่มีส่วนของชิ้นยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสแทรกอยู่



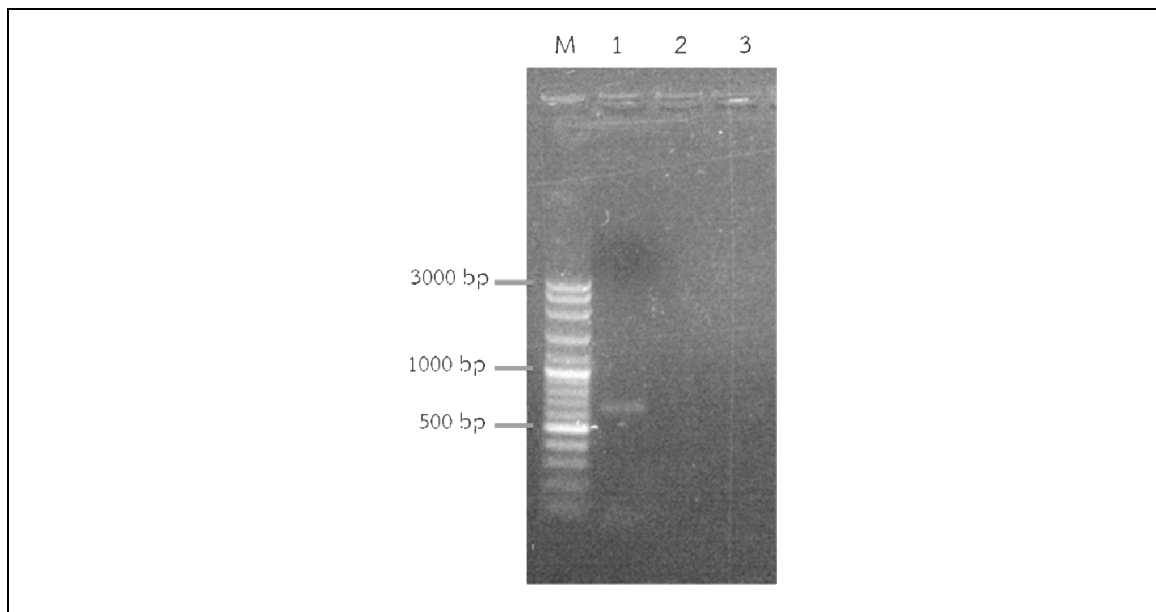
**ภาพที่ 6** Recombinant plasmids จากโคลนของ transformants บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder เลนที่ 1 คือ pJet1.2 vector เลนที่ 2 คือ pJet1.2-lip จากโคลนที่ 1 และเลนที่ 3 คือ pJet1.2-lip จากโคลนที่ 2

ในลำดับถัดมา ผู้วิจัยได้ทดลองนำ Digested DNA ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pUC19 แล้วนำไป transform เข้า JM109 Competent cells และ TOP10 Competent cells พบว่า ไม่มีโคลนของ Transformants เจริญขึ้นบนอาหารคัดเลือก



**ภาพที่ 7** ผลจากการเพิ่มจำนวน Recombinant DNA (pJet1.2-lip) จากโคลนของ transformants ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ pJET 1.2 forward primer และ pJET 1.2 reverse primer บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder เลนที่ 1 คือ pjet1.2 vector เลนที่ 2 คือ PCR product จากโคลนที่ 1 และเลนที่ 3 คือ PCR product จากโคลนที่ 2

ต่อมา ผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวนยีนนำรหัสไลเปสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F และ LIPCD\_R ซึ่งมีเบสคู่สมกับบริเวณส่วนต้นและปลายของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus pumilus* โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่า มี PCR product ขนาด 650 คู่เบส ถูกสร้างขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 8 จึงได้นำ PCR product ดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Sequence scanner และ Bioedit พบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาด 648 คู่เบส (ภาพที่ 9) และผลจากการ BLAST กับฐานข้อมูล Nucleotide collection พบว่าซีเอ็นดีเอ็นเอดังกล่าวมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึง 98 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 ดังแสดงในตารางที่ 1



**ภาพที่ 8** ผลจากการเพิ่มจำนวนยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BLCD003 ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F และ LIPCD\_R บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ใน 1xTAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (เลนที่ M คือ VC 100 bp plus DNA ladder เลนที่ 1 คือ PCR product เลนที่ 2 คือ NTC เลนที่ 3 คือ NPC)

```

ATGAAAGTGATTTCGATTTAAGAAAAGGAGTTTGCAAATTTTGATTGCGCTTGCATTAGTGGTT
GGATCAATGGCCTTCATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTGCGCATAATCCGGTTGTAATG
GTACCCGGCATGGGCGGTGCGTTTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTGGTATCACAG
GGATGGGATCAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTTCATAGACAAAACAGGTAATAACCTGAAC
AATGGCCCCGCTCTCTCGAGATTTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTA
GATATTGTGGTCATAGTATGGGTGGTGCGAACACGTTATACTATATTA AAAACCTAGACGGC
GGAGATAAAAATTGAAAACGTCGTCACACTTGGTGGAGCGAATGGACTCGTATCACTCAGAGCA
TTACCAGGCACCGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACATCTGTCTATAGTTCAGCCGATCTC
ATTGTCGTCAACAGCCTCTCACGTTTAAATTGGCGCGAGAAAACGTCCTCATCCACGGCGTTGGA
CATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTCAAAGGGTATGTGAAAGAAGGATTGAATGGCGGA
GGACAGAATACGAATTAA

```

**ภาพที่ 9** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. BLCD003

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank

Description	Accession No.	% Query coverage	% Identity
<i>Bacillus pumilus</i> strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds	KF229753.1	100	98
<i>Bacillus pumilus</i> strain SW41 lipase gene, complete cds	KJ013340.1	100	96
<i>Bacillus stratosphericus</i> strain L1 lipase (LipBST) gene, partial cds	KP331444.1	99	96
<i>Bacillus pumilus</i> strain XJU-13 lipase gene, partial cds	EF434173.1	97	95
<i>Bacillus pumilus</i> strain SG2 lipase gene, partial cds	GQ398414.1	96	95
<i>Bacillus pumilus</i> strain L21 lipase gene, complete cds	JX163856.1	100	94

จากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปส (215 amino acid residues) ที่ Translate มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปส พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 109-113 เป็น AHSMG หรือ Ala-His-Ser-Met-Gly ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของบริเวณ conserved motif ที่เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (ภาพที่ 10) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบในเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. (Shi *et al.*, 2010) เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสใน BLASTp เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Non-redundant protein sequences พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตรงกับเอนไซม์ในตระกูล Alpha/beta hydrolases (abhydrolases superfamily) และมีความคล้ายคลึงสูงสุดที่ 98% กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus pumilus* (ตารางที่ 2)

```
MKVIRFKKRSLLQILIALALVVGSMFIQPKEAKAAAHNPVVMVPGMGGAFYNFASIKRYL
VSQGWQDQNQLFAIDFIDKTGNLNNPRLSRFVKDVLAKTGAKKVDIVAHSMGGANTLYY
IKNLDGGDKIENVVTLGGANGLVSLRALPGTDPNQKILYTSVYSSADLIVNSLSRLIGA
RNVLIHGVGHIGLLTSSQVKGYYKEGLNGGGQNTN
```

ภาพที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการ Translate ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปส

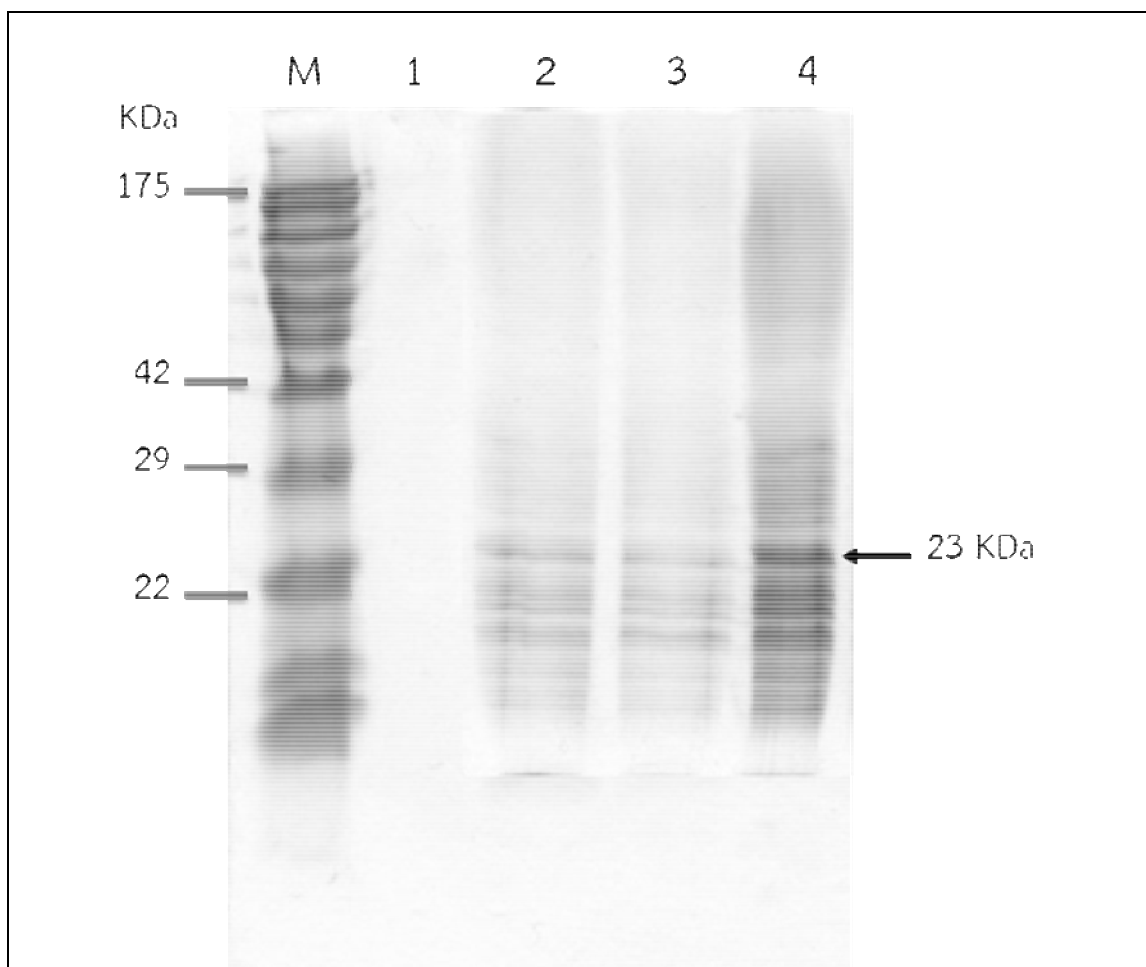
ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนของไลเปส ที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank

Description	Accession	%Coverage	%Similarity
lipase [ <i>Bacillus pumilus</i> ]	AGW07449.1	100	98
lipase [ <i>Bacillus stratosphericus</i> ]	AJW76889.1	100	97
lipase [ <i>Bacillus pumilus</i> ]	AFU81786.1	100	96
lipase precursor [ <i>Bacillus pumilus</i> ]	ABK80759.1	100	93
lipase precursor [ <i>Bacillus pumilus</i> ]	AAR84668.1	100	92

### การโคลนและการแสดงออกของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสใน *E. coli*

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003 มาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไลเปส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LIPCD\_F และ LIPCD\_R จากนั้นนำ PCR product ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET-26b(+) แล้วถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* strain BL21(DE3) พบว่า มีโคลนของ transformants เจริญขึ้นมาจำนวนทั้งสิ้น 19 โคลนี จึงได้ตรวจสอบยืนยัน positive transformants ด้วยวิธี colony PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 promoter primer และ T7 terminator primer พบว่ามี 1 โคลนที่ให้ PCR products ที่มีขนาดที่ถูกต้อง (ประมาณ 950 คู่เบส) และเมื่อนำ recombinant lipase (pET-26b(+)-lip) ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนนำรหัสเอนไซม์ไลเปสใน *E. coli* ด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 KDa อยู่ในส่วน Supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี IPTG เป็นเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ในขณะที่ในชุดควบคุมที่เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มี IPTG ไม่พบโปรตีนดังกล่าว (ภาพที่ 11) น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่ทำนายจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (22.97 KDa) โดยใช้ Compute pI/Mw tool (ExPASy) และจากเครื่องมือดังกล่าวยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีค่า pI เท่ากับ 9.96

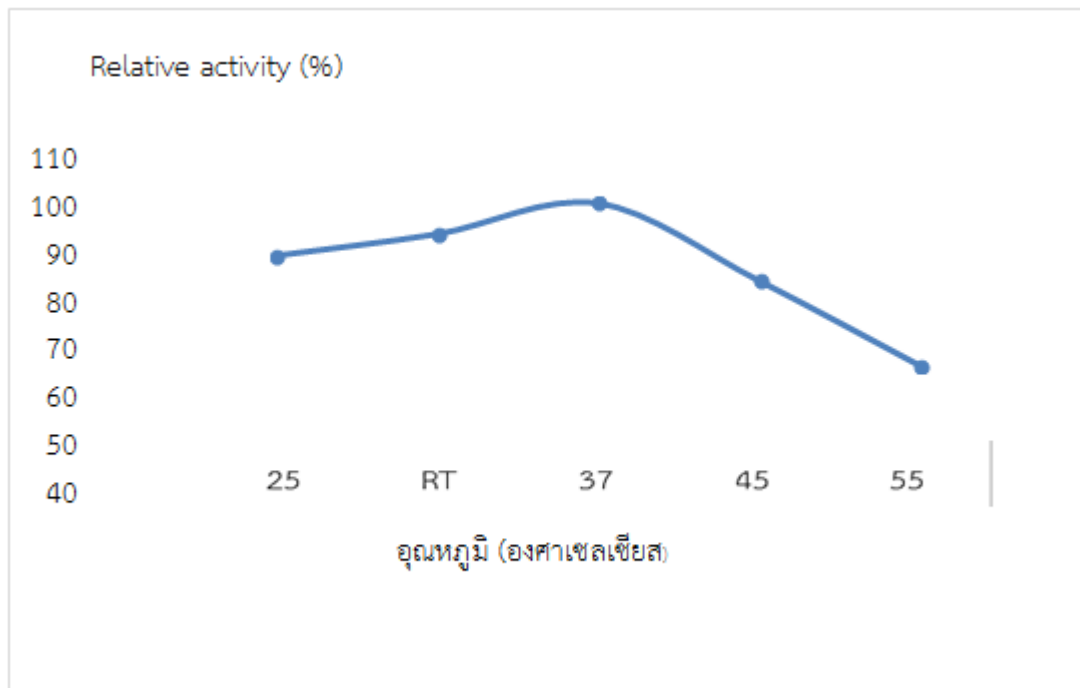




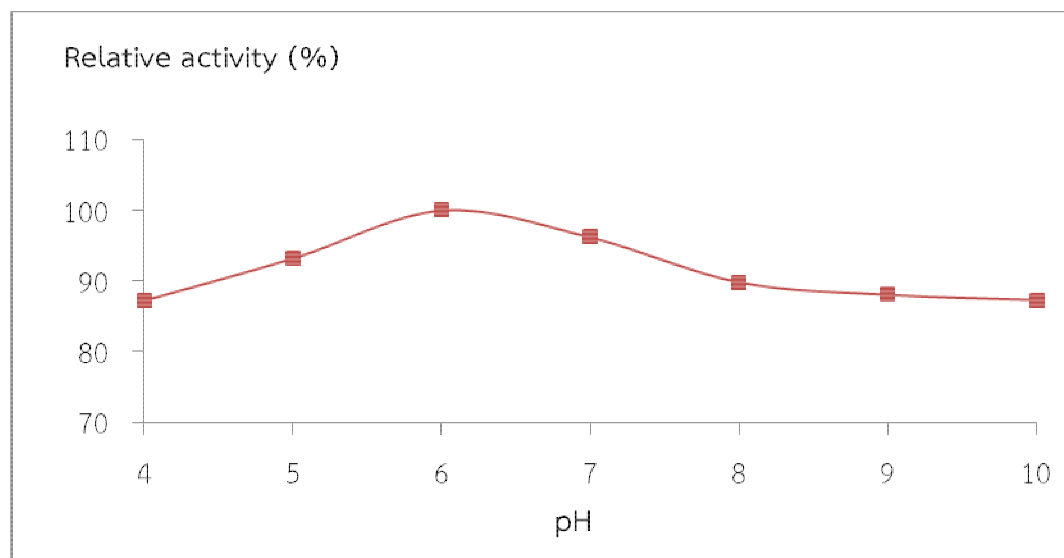
**ภาพที่ 11** Recombinant protein จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE (เลขที่ M คือ Chromatein prestained protein ladder, เลขที่ 1 คือ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยง *E. coli* strain BL21(DE3) ที่มี pET-26b(+)-lip ในสภาวะที่ไม่มี IPTG, เลขที่ 2, 3 และ 4 คือ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยง *E. coli* strain BL21(DE3) ที่มี pET-26b(+)-lip ในสภาวะที่มี IPTG 0.7 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

#### การศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant lipase

จากการนำ *E. coli* BL21(DE3) transformants ที่มี pET-26b(+)-lip ไปเลี้ยงในสภาวะที่มี IPTG 0.7 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำ supernatants ไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (25 อุณหภูมิห้อง 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส) โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นสับเสตรของเอนไซม์พบว่า Recombinant lipase มีกิจกรรมสูงสุด ( $0.16 \pm 0.02$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมคงเหลือที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 66 ถึง 93.6% (ภาพที่ 12) เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่ค่า pH ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 4.0-10.0 พบว่า Recombinant lipase มีกิจกรรมสูงสุด ( $0.14 \pm 0.05$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่ค่า pH 6.0 และมีกิจกรรมคงเหลือที่ค่า pH อื่น ๆ ในช่วง 87.2 ถึง 96.2% (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 12 กิจกรรมสัมพันธ์ของ Recombinant lipase ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน



ภาพที่ 13 กิจกรรมสัมพันธ์ของ Recombinant lipase ที่ค่า pH แตกต่างกัน

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

#### สรุปผลการวิจัย

*Bacillus* sp. BLCD003 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในอาหาร Production medium ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปศึกษาในระดับอนุชีววิทยาพบว่ามียีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปส ขนาด 648 คู่เบส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึง 98 เปอร์เซ็นต์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 และ Translated protein (215 residues) มีลำดับกรดอะมิโน Ala-X-Ser-X-Gly ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบได้ในเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. BLCD003 ใน *Escherichia coli* พบว่า Recombinant lipase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและค่า pH เท่ากับ 6.0 และสามารถรักษากิจกรรมเอาไว้ได้ไม่ต่ำกว่า 66% ที่อุณหภูมิและค่า pH อื่น ๆ ที่ทดสอบ

#### อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบยืนยันการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ขับออกนอกเซลล์จาก *Bacillus* sp. BLCD003 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสารเหนี่ยวนำ (Inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้ (ณกัญภัทร จินดาและทรัพย์ทวี ฝุ่นละทอง, 2549)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งชิ้นยีน ซึ่งมีขนาด 648 คู่เบส โดยขนาดของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสทั้งชิ้นยีน (Full length) ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ใน *Bacillus pumilus* SG2 พบว่ามีขนาด 650 คู่เบส (Sangeetha et al., 2014) ใน *Bacillus pumilus* strain F3 พบว่ามีขนาด 648 คู่เบส (Heravi et al., 2009) ใน *Bacillus subtilis* FS1403 พบว่ามีขนาด 639 คู่เบส (Shi et al., 2010) ในขณะที่ใน *B. stearothermophilus* L1 มียีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสขนาดประมาณ 1200 bp (Kim et al., 1998) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสใน *Bacillus* sp. L2 ที่มีขนาด 1251 คู่เบส (Shariff et al., 2011)

Translated protein ที่ได้จากยีนเข้ารหัสเอนไซม์ไลเปสมีขนาด 215 amino acid residues โดยมี catalytic pentapeptide ที่เป็น Ala-X-Ser-X-Gly ซึ่งเป็น conserved motif ที่พบได้ใน *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ เช่นกัน (Shi et al., 2010) จากการศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant lipase ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า Recombinant lipase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของ Recombinant lipase จาก *Bacillus subtilis* FS1403 (Shi et al., 2010) ในขณะที่บางรายงานการศึกษาพบว่า เอนไซม์ไลเปส (Native enzyme) จาก *Bacillus pumilus* SG2 มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa และมีลักษณะโครงสร้างแบบ Dimer (Sangeetha et al., 2014)

นอกจากนี้ จากการศึกษาที่ยังพบว่า Recombinant lipase มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและค่า pH เท่ากับ 6.0 ในขณะที่ Recombinant lipase จาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่นๆ มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิและค่า pH ที่แตกต่างกันออกไป ไม่ว่าจะเป็น Recombinant lipase จาก *Bacillus subtilis* FS1403 ที่มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและค่า pH เท่ากับ 8.0 (Shi et al., 2010) ซึ่งความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงอาจเกิดมาจากชนิดของ กรดอะมิโนที่แตกต่างกันในบางตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ที่ต่างกัน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แม้ว่าเอนไซม์ ไลเปสจะถูกผลิตมาจากแบคทีเรียสกุลเดียวกัน แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งอาศัยของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย นอกจากนี้ ผลการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลในระดับยีนและโปรตีนที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ให้มีคุณสมบัติที่ต้องการสำหรับการนำไปเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้

**รายงานสรุปการเงิน**  
**เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802336 สัญญาเลขที่ 32/2558**  
**โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)**  
**ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558**  
**มหาวิทยาลัยบูรพา**

**ชื่อโครงการ** การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus sp.* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส  
 ประสิทธิภาพสูง

**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน** พิชรนนท์ อมรรัตนพันธ์

**รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่** 1 ตุลาคม 2557 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2560

**ระยะเวลาดำเนินการ** 2 ปี 5 เดือน

**รายรับ**

**จำนวนเงินที่ได้รับ**

**งวดที่ 1 (50%)** 360,000 บาท

**งวดที่ 2 (40%)** 288,000 บาท

**งวดที่ 3 (10%)** 72,000 บาท

**รายจ่าย**

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้จริง (บาท)	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน (บาท)
1. ค่าตอบแทน	120,000		
2. ค่าจ้าง	144,000		
3. ค่าวัสดุ	19,000		
4. ค่าใช้สอย	360,000		
5. ค่าครุภัณฑ์	-		
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	5,000		
7. เงินทุนอุดหนุนการวิจัยของ มหาวิทยาลัย เป็นค่า สาธารณูปโภค ร้อยละ 10	72,000	72,000	0
<b>รวม</b>	720,000		

(พิชรนนท์ อมรรัตนพันธ์)  
 หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

## บรรณานุกรม

- กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. (2532). *การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชรินทร์ เตชะพันธุ์. (2542). *การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์*. วันที่สืบค้นข้อมูล 15 มีนาคม 2557, เข้าถึงได้จาก [http://www.agro.cmu.ac.th/e\\_books/protein/protein.html](http://www.agro.cmu.ac.th/e_books/protein/protein.html)
- ณกัญภัทร จินดา. (2547). เอนไซม์ไลเปส 1 แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 24(3), 114-131.
- ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. (2549). เอนไซม์ไลเปส: การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 26(2), 20-34.
- นภัสพร พันธุ์ทอง. (2551). การสลายไขมันจากกระบวนการผลิตปลาสดโดยแบคทีเรียที่สลายลิพิดและการประยุกต์เพื่อการบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิตา รัตนาปนนท์ (ม.ป.ป.). *น้ำมันปาล์ม*. วันที่ค้นข้อมูล 7 เมษายน 2558, เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1300/palm-oil-น้ำมันปาล์ม>
- พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์. (2557). การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วัชรินทร์ รังษิภาณูรัตน์ และอิสยา จันทน์วิทยานุกิต. (2553). แบซิลลัส. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดาพร ปุกแก้ว. (2550). *การเตรียมสารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์*. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศูนย์ปฏิบัติการเศรษฐกิจการเกษตร. (2558). *เล็งอนาคตปาล์มไทย เมื่อต้องไต่บนเส้นลวด สศก. เเจาะหลากมุ่มมอง ร่วมหาทางออกอุตสาหกรรมปาล์ม*. วันที่ค้นข้อมูล 2 กุมภาพันธ์ 2560, เข้าถึงได้จาก [http://oae.go.th/ewt\\_news.php?nid=20474&filename=index](http://oae.go.th/ewt_news.php?nid=20474&filename=index)
- ศูนย์บริหารการแก้ไขปัญหาสินค้าปาล์มน้ำมันอย่างเป็นระบบครบวงจร. (2559). *พยากรณ์สถานการณ์การผลิต การตลาด และราคา ปี 2559/60*. วันที่ค้นข้อมูล 2 กุมภาพันธ์ 2560, เข้าถึงได้จาก [https://www.moac.go.th/more\\_news.php?cid=975](https://www.moac.go.th/more_news.php?cid=975)
- เอกรัตน์ เชียงฉิน. (2545). *การโคลนยีน การทำบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุนทุมิสูง Bacillus sp. UN16a*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อามีเนาะ โดยมาตุ. (2548). *การผลิตเอนไซม์ของ Bacillus sp.* สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ (จุลชีววิทยา), คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.
- Agino, H., Akagi, R., Doukyu, N., Gemba, Y., Hiroshima, SH., Ishikawa, H., Ishimi, K.,

- Katou, Y., Mimitsuka, T., & Yasuda, M. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Extremophiles*, 11, 809-817.
- Amornrattanapan, P., and Ruangrit, A. (2012). Study of *Bacillus* spp. capable of lipase production from different oils. Paper presented at: Burapha University International Conference (Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Thailand)
- Arpigny, J.L., & Jaeger, K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry Journal*, 343: 177-183.
- Arroyo, S., & Sinisterra, J.V. (1995). Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letter*, 17, 525-530.
- Bell P.J., Sunna A., Gibbs M.D., Curach N.C., Nevalainen H., & Bergquist P.L. (2002). Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, 148 (Pt 8), 2283-2291.
- Cho, A.R., Yoo, S.-K., and Kim, E.-J. (2000). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 235-238.
- Christner, J., Pfeiderer, E., & Taeger, T. (1991). Enzyme-Aided Soaking Process for Skins and Hides. United Kingdom Patent 2233665.
- Clark, S.J., Wangner, L., Schrock, M. D., & Pienaar, P. G. (1984). Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1632-1638.
- Colburn, J. T. (1969). Lipase-treated milk fats in production of butter/margarine flavors. United States Patent 3477857.
- Cvengros, J., & Cvengrosova, Z. (1994). Quality control of rapeseed oil methyl eaters by determination of acyl conversion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1349-1352.
- Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K., and Colson, C. (1992). Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1131, 253-260.
- Desuell, P., & L. Sarda. (1985). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochimistry Biophysical Acta*, 30, 513-521.
- Dharmstithi, S., & Luchai, S. (1999). Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol letters*, 179, 241-246.

- Elibol, M., & Ozer, D. (2001). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36, 325-329.
- Figurin, Y. V., Shestakova, I. S., Mironova, T. F., Shtein, I. V., & Arends, I. M. (1990). Method of processing hides and skins. Union of the Soviet Socialists Republic Patent 1567634.
- Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 621-634.
- Garcia, H. S., Yang, B., & Parkin, K. L. (1995). Continuous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. *Food Research International*, 28, 605-609.
- Gilbert, E. J., Cornish, A., & Jones, C. W. (1991). Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*, 137, 2223-2229.
- Godfrey, T., & Reichelt, J. (1983). Industrial enzymology. *The Application of Enzyme in Industry*. Retrieved May 7, 2013, from Macmillan Publishers Ltd: England.
- Gulati, R., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, W. S. (1999). Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry*, 35, 459-464.
- Hasan, F., Shah, A., and Hameed, A. (2006a). Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology*, 56, 247-252.
- Hasan, F., Shah, A.A., and Hameed, A. (2006b). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.
- Hatzinikolaou, D. G., Kourentzi, E., Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kolisis, F. N., Kekos, D., & Macris, B. J. (1999). A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cell : production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1), 53-56.
- Heravi, K.M., Yakhchali, B., Eftekhari, F., Vafadar-Isfahani, B., Ghomi, H.H., & Ahmadi-Danesh, H. (2009). Molecular cloning and characterization of a lipase from an indigenous *Bacillus pumilus*. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 20(3), 213-220.
- Huang, A.H.C., & Brockman, B. H. L. (1984). Plant lipases. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*, 65, 897-899.
- Huang, A. H. C., Lin Y. H., & Wang, S. (1988). Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 897-899.
- Jaeger, K.-E., and Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in*



*Biotechnology*, 13, 390-397.

- Jaeger, K.-E., and Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.
- Kanmani, P., Kumaresan, K., & Aravind, J. (2015). Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1235-1243.
- Kanwar, S. S., Kaushal, R. K., Jawed, A. & Chimni, S. S. (2005). Evaluation of methods to inhibit lipase in colorimetric assay employing p-nitrophenyl palmitate. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42, 233–237.
- Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B., and Oh, T.K. (2002). Expression and characterization of Ca<sup>2+</sup>-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1583, 205-212.
- Kim, H.-K., Park, S.-Y., Jung-Kee, L., and Oh, T.-K. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 66-71.
- Kim, H. K., Sung, M. H., Kim, H. M., & Oh, T. K. (1994). Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 961-962.
- Kim, I., & Oh, T. K. (2002). Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biotechnology*, 346-349.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., & Morita, Y. (1994). Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1007-1012.
- Krawczyk, T. (1996). Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *American Oil Chemists Society*, 8, 801-815.
- Lawson, L. D., & Hughes, B. G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acid or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152, 328-335.
- Lee, S. Y., & Rhee, J. S. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 617-623.
- Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168 and extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 216, 155-160.

- Liu, W. H., Beppu, T., & Arima, K. (1973). Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(1), 157-163.
- Macrae, A. R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. *Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain*, 61, 1067-1071.
- Magos, T.J., Jones, K.C., & Foglia, T.A. (1999). Lipase-catalyzed synthesis of structured low-calorie triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1127-1132.
- Mayordomo, I., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2000). Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 105-109.
- Mba, O. I., Dumont, M. J., & Ngadi, M. (2015). Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review. *Food Science*, 10, 26-41.
- Mitsuhashi, K., Yamashita, M., Hwan Y.S., Ihara, F., Nihira, T., & Yamada, Y. (1999). Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acenitobacter* nov. sp. Strain KM109. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1959-1964.
- Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed S. A., & Fahmy, A. S. (2000). Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresorch Thechnology*, 11, 227-234.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P. Krieger, N., & Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131.
- Patil, J. K., Chopda, Z., and Mahajan, T. R. (2011). Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 971-982.
- Pleanjai, S., and Gheewala, S.H. (2009). Full chain energy analysis of biodiesel production from palm oil in Thailand. *Applied Energy* 86, Supplement 1, S209-S214.
- Posorske, L. H. (1984). Industrial-scale application of enzymes to the fats and oils industry. *Ibid*, 61, 1758-1760.
- Rhathi, P., Saxina R.K., & Gupta R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37, 187-192.
- Roberto, A., Arreguin, B., & Gonzalez, C. (2000). Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, chrysomelidae). *Biotechnology Applied Biochemistry*, 31, 239-244.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. (3rd ed.). USA: Cold Spring

Harbor Laboratory Press.

- Sangeetha, R., Arulpani, I., & Geetha, A. (2014). Molecular characterization of a proteolysis-resistant lipase from *Bacillus pumilus* SG2. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000200004>
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U., & Schmid, R. D. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1214, 43-53.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H., & Schmid, R. D. (1996). Thermoalkaliphilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301, 105-114.
- Seitz, E. W. (1974). Industrial applications of microbial lipase-a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51, 12-16.
- Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2011). A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2917-2934.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Shi, B., Wu, W., Wen, J., Shi, Q., & Wu S. (2010). Cloning and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* FS1403 in *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 60(3), 399-404.
- Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F.-M., and Chen, S.-T. (2001). Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization. *Protein Expression and Purification*, 22, 388-398.
- Steiner, J.M., & Williams, D.A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochemistry*, 84, 1243-1251.
- Stehr, M.K., Kroger, C., Hube, B., & Schafer, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 347-355.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp.. *Journal of Biochemistry*, 109(2), 211-216.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T., & Tominaga Y. (1994). Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum* lipases. *Protein engineering*, 7, 585-588.
- Sulong, M.R., Zaliha Raja Abd. Rahman, R.N., Salleh, A.B., and Basri, M. (2006). A novel

- organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Protein Expression and Purification*, 49, 190-195.
- Thamsiroj, T., and Murphy, J.D. (2009). Is it better to import palm oil from Thailand to produce biodiesel in Ireland than to produce biodiesel from indigenous Irish rape seed? *Applied Energy*, 86, 595-604.
- Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang, F. F., & Shaw, J. F. (1988). Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 628-633.
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663-670.
- Xie, Z. R., Zhang, X. L., Ding, J. M., Li, J. J., Yang, Y. J., & Huang, Z. X. (2013). Cloning, expression and characterization of a lipase from *Bacillus Subtilis* Strain I<sub>4</sub> with potential application in biodiesel production. *Applied Mechanics and Materials*, 291-294, 243-248.
- Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64, 1657-1662.
- Zambiasi, R. C., Przybylski, R., Zambiasi, M. W., & Mendonca, C. B. (2007). Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 1 (6), 111-120.

---

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1. Tryptic Soy Broth (TSB)**

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0	กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	3.0	กรัม
Glucose (Dextrose)	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดลงในปิกเกอร์ และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในฟลาสก์ ข่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**2. Tryptic Soy Agar (TSA)**

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	15.0	กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดใส่ในขวด Duran และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนวุ้นหลอมละลาย ข่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปใส่ในอ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

**3. Production medium (พัชรนันท์ อมรัตน์พันธ์, 2557)**

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	กรัม
Sodium Chloride	1.25	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl <sub>2</sub> )	0.5	มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	990	มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	1	เปอร์เซ็นต์
pH	6.0	

ซึ่งส่วนประกอบข้างต้น (ยกเว้น น้ำมันปาล์ม) ใส่ลงในปิกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 990 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 6.0 แบ่งส่วนผสมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขวด

ละ 19.5 มิลลิลิตร จากนั้นบีบแต่น้ำมันปาล์มลงในขวดรูปชมพู่ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**สารเคมีและบัฟเฟอร์**

**1. การเตรียม Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก**  
สุดาพร ปุกแก้ว, 2550)

เตรียมสารละลาย  $K_2HPO_4$  และ  $KH_2PO_4$  โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

1.1.1 การเตรียมสารละลาย  $K_2HPO_4$

เตรียม Stock  $K_2HPO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

$K_2HPO_4$	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.1.2 เตรียมสารละลาย  $KH_2PO_4$

เตรียม Stock  $KH_2PO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

$KH_2PO_4$	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.1.3 นำ Stock  $K_2HPO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอช โดยค่อยๆ เท Stock  $KH_2PO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ลงไปจนกว่าจะได้พีเอช 7.0 จะได้ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.4 เจือจางให้ได้ Phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์มา 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จะได้ Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**2. การเตรียม Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์**

2.1.1 การเตรียมสารละลาย  $K_2HPO_4$

เตรียม Stock  $K_2HPO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

$K_2HPO_4$	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

2.1.2 เตรียมสารละลาย  $KH_2PO_4$

เตรียม Stock  $KH_2PO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

$KH_2PO_4$	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

2.1.3 นำ Stock  $K_2HPO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอช โดยค่อยๆ เท Stock  $KH_2PO_4$  ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ลงไปจนกว่าจะได้พีเอช 7.0 จะได้



Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4 เจือจางให้ได้ Phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์มา 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้ Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 3. โฟแทสเซียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4 และ พีเอช 5

- Solution A glacial acetic acid ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (0.2 โมลาร์)
- Solution B โฟแทสเซียมอะซิเตท ( $KC_2H_3O_2$ ) ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (0.2 โมลาร์)

เตรียมโดยดูพีเอชจากตารางด้านล่าง และผสม Solution A กับ Solution B เข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

พีเอช	Solution A (ml)	Solution B (ml)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

### 4. บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8 และ พีเอช 9

- ชั่ง 6.0 กรัม Tris-HCl ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก และเติมน้ำจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 5. บัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต พีเอช 10

- Solution A โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ ( $\text{NaHCO}_3$  MW=84.0)
- Solution B โซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  FW= 286.2)

เลือกพีเอชที่ต้องการจากตารางด้านล่าง แล้วผสม Solution A โซเดียมไบคาร์บอเนต กับ Solution B โซเดียมคาร์บอเนต เข้าด้วยกันตามปริมาตรจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

พีเอชที่ องศาเซลเซียส	พีเอชที่ 37 องศาเซลเซียส	Solution A (ml)	Solution B (ml)
9.4	9.1	80	20
9.5	9.4	70	30
9.8	9.5	60	40
9.9	9.7	50	50
10.0	9.9	40	60
20.3	10.1	30	70
20.5	10.3	20	80
10.8	10.6	10	90

### 6. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) (นภัสพร พันธุ์ทอง, 2551)

สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1.0 กรัม  
 เอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ (60% ethanol) 100 มิลลิลิตร  
 ละลาย Phenolphthalein ใน 60% ethanol เก็บในขวดสีชา

### 7. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (เสาวรัตน์ จันทะโร, 2551)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 กรัม  
 น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร  
 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับน้ำกลั่นเก็บในขวดแก้วหรือขวดสีชาปิดฝาให้สนิท

### 8. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม  
 น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร  
 เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3

### 9. 50x Tris-Acetate (TAE) buffer (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid (ทำใน Fume hood) ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 10. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ส่วนผสม

Ethidium bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ Magnetic stirrer จนละลายดี เก็บสารละลายโดยใช้หมัดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์หรือถ่ายใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 11. Agarose gels 1.2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งผง Agarose 1.2 กรัม เติม 1xTAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอม Agarose โดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้ Agarose ละลายจนหมด

### 12. Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0) (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Tris base	121.1	กรัม
HCl ใช้ปริมาตรตามค่า pH ที่ต้องการ		
pH	HCl (Concentrated)	
7.4	70	มิลลิลิตร
7.6	60	มิลลิลิตร
8.0	42	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 โดยเติม HCl ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ควรปล่อยให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องก่อนทำการปรับ pH ครั้งสุดท้าย และปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 13. Sodium dodecyl sulfat (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

SDS	100	กรัม
HCl (Concentrated)		
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย SDS 100 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 68 องศาเซลเซียสจนละลาย ปรับ pH ให้เป็น 7.2 โดยการหยดกรด HCl เพียงเล็กน้อย และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 14. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Disodium ethylene diamine tetra-acetate • 2H <sub>2</sub> O	186.1	กรัม
NaOH	~20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Disodium ethylene diamine tetra-acetate • 2H<sub>2</sub>O 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 โดยค่อยๆเติม NaOH จนละลายเข้ากันแล้ววัด pH ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 15. โซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

NaCl	292.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ละลาย NaCl 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 16. 6X Gel loading buffer

ส่วนผสม

0.25 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue
0.25 เปอร์เซ็นต์ Xylene cyanol FF
30 เปอร์เซ็นต์ Glycerol in water

ผสมสารเคมีดังกล่าว แบ่งใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**17. TE buffer, pH 8.0 (Sambrook & Russell, 2001)**

ปิเปต Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะทำให้ได้ Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ EDTA ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์

**18. Coomassie Blue staining Solution**

Coomassie brilliant blue R-250	0.05 กรัม
Methanol	50 มิลลิลิตร
Acetic acid	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	40 มิลลิลิตร

ชั่ง Coomassie brilliant blue R-250 มา 0.05 กรัม ลงไปในขวด Duran เติม Methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันกับสารเคมีข้างต้น จากนั้นเติม Acetic ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน สุดท้ายเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป 40 มิลลิลิตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

**19. Destaining solution**

Methanol	25 มิลลิลิตร
Acetic acid	35 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	440 มิลลิลิตร

ตวงสารละลาย Methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Acetic ปริมาตร 35 มิลลิลิตร และสุดท้ายเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 440 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

**20. Tris glycine buffer pH 8.3**

Tris base	15.15 กรัม
Glycine	72 กรัม
SDS	5 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ชั่งสารเคมีข้างต้นทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปวัด pH ให้เท่ากับ pH 8.3 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นตัวลงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**21. Fixing solution**

Methanol	50 มิลลิลิตร
----------	--------------

Acetic acid 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 40 มิลลิลิตร

ดวงสารละลาย Methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย 10 มิลลิลิตรจากนั้น  
เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 22. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$ 10%

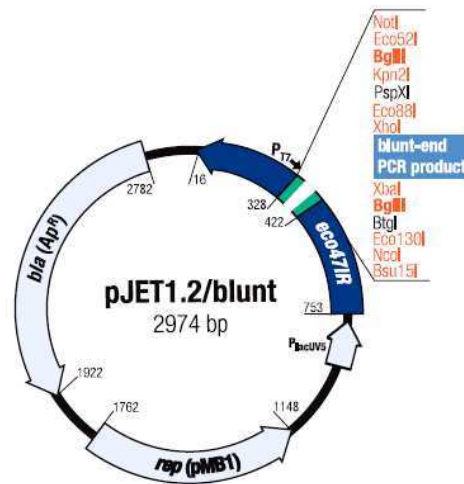
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$  0.03 กรัม

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 0.3 มิลลิลิตร

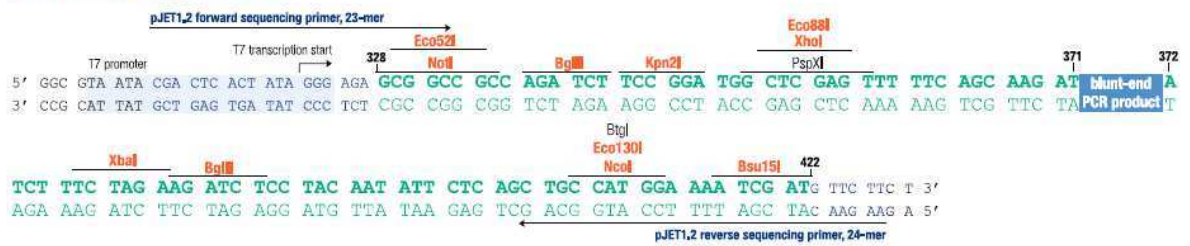
ชั่ง  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$  มา 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้  
เข้ากัน (ในการใช้แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ภาคผนวก ค  
แผนที่เวกเตอร์

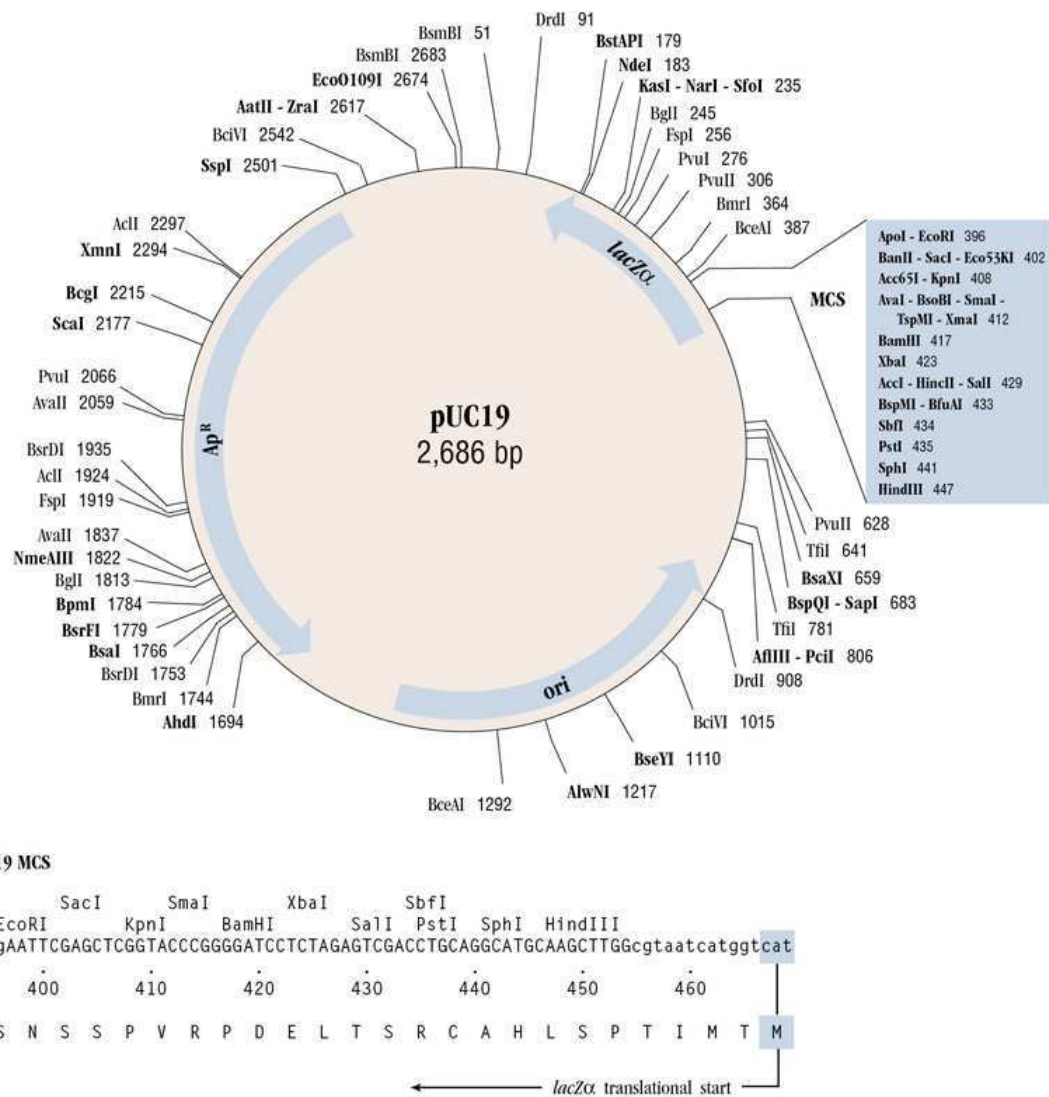
pJET1.2/blunt vector map



DNA sequence of MCS region

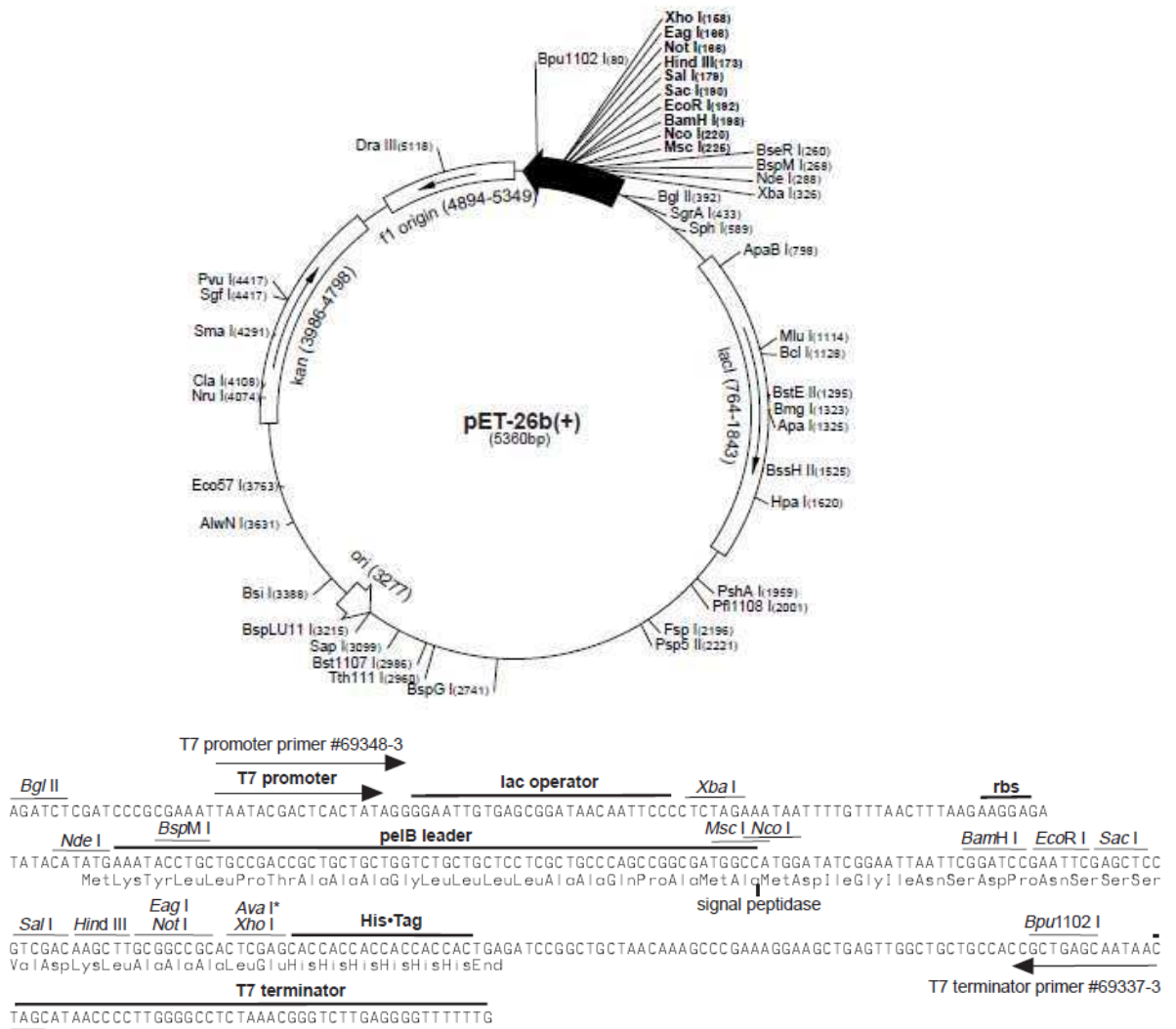


ภาพที่ 14 แผนที่เวกเตอร์ pJet1.2 และลำดับเบสบริเวณ MCS



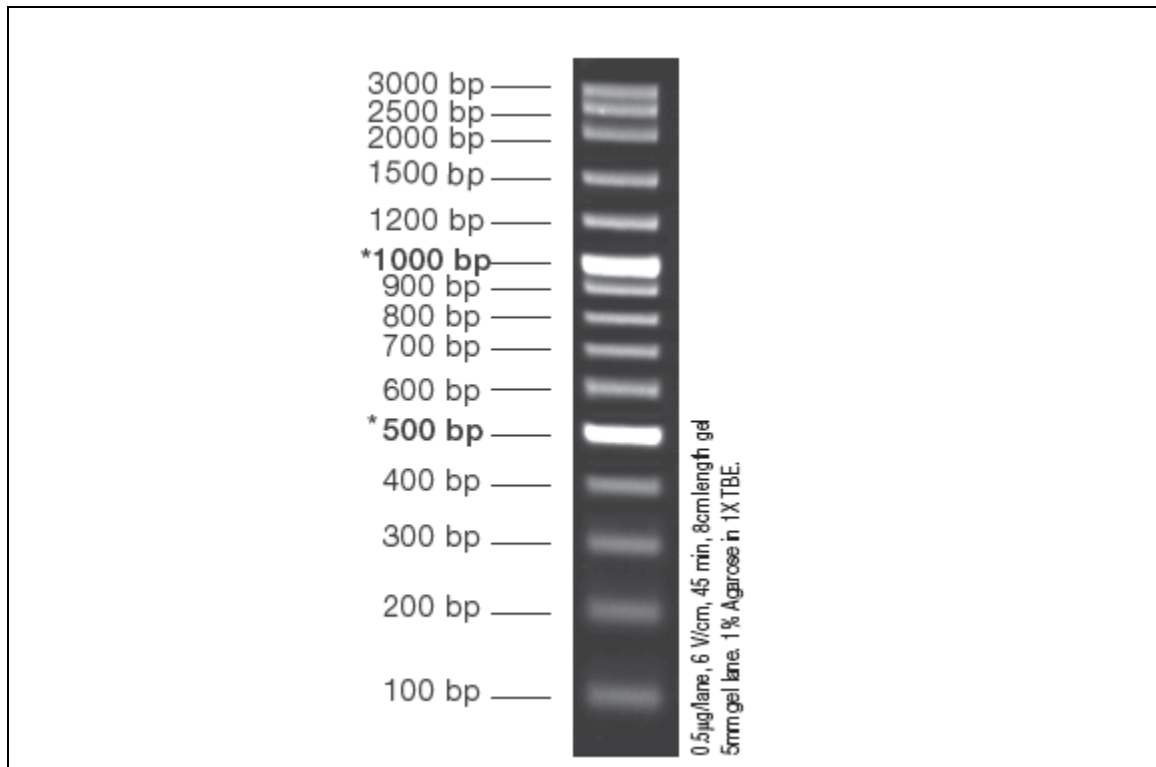
ภาพที่ 15 แผนที่เวกเตอร์ pUC19 และลำดับเบสบริเวณ MCS



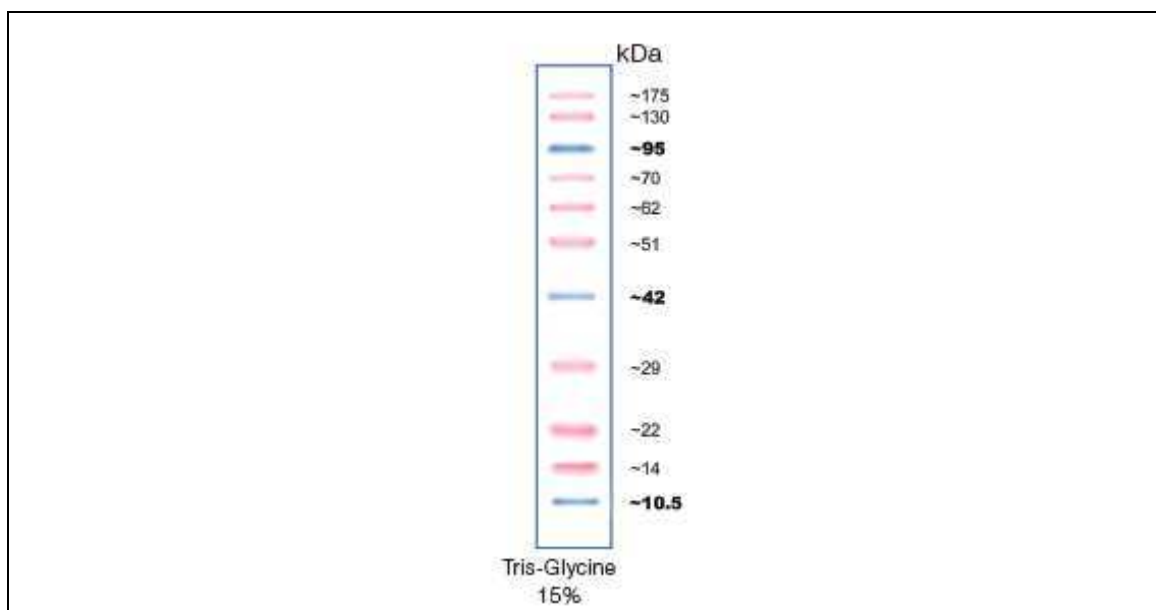


ภาพที่ 16 แผนที่เวกเตอร์ pET-26b(+) และลำดับเบสบริเวณ MCS และ Expression site

ภาคผนวก ง  
DNA ladder และ Preprotein ladder



ภาพที่ 17 ดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ของ VC 100bp Plus DNA ladder



ภาพที่ 18 โปรตีนขนาดต่าง ๆ ของ Chromatein prestained protein ladder

## ประวัตินักวิจัย

### หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Patcharanan Amornrattanapan
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)  
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
169 ถ. ลาดยาวบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131  
Email patcharanan@go.buu.ac.th

### 4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบ	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2549	ปริญญาเอก	Molecular Biology and Biotechnology	University of Sheffield, สหราชอาณาจักร
2544	ปริญญาตรี เกียรตินิยมอันดับ1 (ชีววิทยา)	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### 5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular machineries of pathogenic yeast morphologies and its physiology
- Gene expression and protein expression in yeasts and bacteria
- Microbial enzymes