การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะสมบัติของไลเปสจาก
Pseudomonas aeruginosa

นส. รักชนก ธีรกวินสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-413-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa*

Miss Ragchanok Teeragawinsakul

A Thesis Submitted in Patial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-636-413-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะ**สมบัติของ**ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*
โดย	นส. รักชนก ธีรกวินสกุล
สาขาวิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

รักชนก ธีรกวินสกุล : การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะสมบัติของไลเปส จาก *Pseudomonas aeruginosa* (PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa*) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ, 92 หน้า, ISBN 974-636-413-8

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย สามารถถูกชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้นได้โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.0 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี 0.13 % $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมี 2 % ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการผลิตไลเปสถูกกดดันในสภาวะที่มีกลูโคสด้วยกระบวนการคาตาบอไลต์รีเพรสชั่น เมื่อทำให้ crude เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยอุลตราฟิลเตรชั่นและแยกโดย Sephadex G-100 คอลัมน์โครมาโตกราฟี เอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 10.92 เท่า จากการศึกษาสมบัติของไลเปสที่มีความบริสุทธิ์บางส่วนนี้ พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 6.5 และ 35 องศาเซลเซียส แคลเซียมไอออนช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยแมงกานีสไอออน แต่ถูกยับยั้งบางส่วนด้วยไอออนของเหล็ก (2+),แมกนีเซียมไอออน, EDTA และ SDS เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ได้ทั้งสับสเตรทที่เป็นกรดไขมันสายสั้นและสายยาว โดยน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในสภาวะที่ทำการทดลองโดยค่า Km ต่อน้ำมันมะกอกเท่ากับ 4.09 มก./มล. ที่ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 เอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH 6.0-7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.0

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต รักชนก ธีรกวินสกุล

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นภา ศิวรังสรรค์

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิไล อโนมะศิริ

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626008 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD:
: LIPASE / BACTERIAL LIPASE / *Pseudomonas aeruginosa*

RAGCHANOK THERAGAWINSAGUL : PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NAPA SIWARUNGSON. THESIS COADVISOR : ASSO. PROF. VILAI ANOMASIRI, Ph.D. 92 p.p. ISBN 974-636-413-8

A chemical-defined medium with 0.13 %ammonium sulphate as nitrogen source and 2% fructose as carbon source at pH 7.0 and 37°C were the most suitable culturing condition for the production of extracellular lipase by a local strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Glucose was found to repress on the lipase production through catabolite repression. Lipase from *P.aeruginosa* was partial purified 10.92 fold by using ultrafiltration and Sephadex G-100 gel chromatography. The partial purified enzyme was a complex of subunits with molecular weight of 63,000. The optimum pH and temperature were 6.5 and 35°C, respectively. The enzyme was able to hydrolyse both long chain fatty acyl ester and short chain fatty acyl ester of glycerol. Enzyme activity was activated by calcium ion but was completely inhibited by Mn^{2+} and was partially inhibited by Fe^{2+}, EDTA and SDS. The Km for the purified lipase with olive oil was found to be 4.09 mg./ml. at 37°C and then assayed at pH 6.0 and 37°C,the purified enzyme was found to be stable in the pH rang 6.0-7.5. The purified enzyme was stable over 30-40°C at pH 6.0 .

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ..... .

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... .

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... .

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาคอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาอนุญาตให้นำเชื้อ *Psuedomonas aeruginosa* ซึ่ง นส. เปรมสุดา สมาน เป็นผู้คัดแยกจาก อ. ระโนด จ. สงขลา มาทำการศึกษาได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณคณะกรรมการพิจารณาทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชา ชีวเคมี และบุคลากรในภาควิชา สำหรับสถานที่และการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิตในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีทางชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้องและเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1
2 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์
2.1 ครุภัณฑ์ 16
2.2 เคมีภัณฑ์ 18
2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 19
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 19
3 วิธีการทดลอง
3.1 การเตรียมสาร 20
3.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 25
3.3 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ 25
3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส 26
3.5 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส 27
3.6 การวัดปริมาณโปรตีน 27
3.7 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์ 27
3.8 การทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น 29
3.9 การศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน 31
4 ผลการทดลอง
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ 36
4.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude ไลเปส 48

4.3 ผลการเตรียมเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ 49
4.4 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 49
4.5 ผลการศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน 55
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 68
เอกสารอ้างอิง 82
ภาคผนวก 88
ประวัติผู้เขียน 92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆให้บริสุทธิ์	14
2	แสดงผลการแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์	53
3	แสดงผลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส	65
4	แสดงผลการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด	66
5	แสดงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้	79
6	แสดงสูตรโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท	79
7	แสดงค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* ที่ได้จากผลการทดลองและที่มีรายงาน	80

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล.ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	37
2	เปรียบเทียบความข้นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	38
3	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	40
4	เปรียบเทียบความข้นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	41
5	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	42
6	เปรียบเทียบความข้นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ, pH 7.0	43
7	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน	45
8	เปรียบเทียบความข้นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน	46

9 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ crude lipase วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50°ซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ 47

10 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของ crude lipaseวัดแอคติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ 48

11 รูปแบบการแยกและทำไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ภรรจุเอนไซม์เข้มข้นจากอุลตราฟิลเตรชันลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 2.0x55 ซม. ชะด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 อัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล.(วิธีทดลองข้อ 3.7.2) โดยคอลัมน์นี้มี V_o=80 มล. และมี V_t=172.79 มล. 52

12 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์แยกโดย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 54

13 รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐานและไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150(ขนาด 2.3x90 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.9 โดยชะคอลัมน์ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ อัตราการไหล 24 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. โดยคอลัมน์นี้มี V_o=126มล., V_t=374มล. 57

14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ตามวิธีทดลองข้อ3.9 58

15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเข้มหลักโดย SDS-PAGE 59

16 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน วัดแอคติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วย

ซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซนต์.....60

17 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่25-50°ซที่ pH 6.0 ซ ตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วย ซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซนต์.....61

18 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยที่อุณหภูมิ 37°ซ ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี pH ต่างๆ ตั้งแต่ 5-8 เป็นเวลา 30 นาทีแล้ววัดแอคติวิตีที่ pH 6.0.....62

19 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่25-50°ซ นาน 30 นาที วัดแอคติวิตีที่ 37°ซ.....63

20 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเก็บเอนไซม์ 30 หน่วยในสารละลาย 0.05 โมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในช่วงเวลาต่างๆกันที่ อุณหภูมิ 4, -20 และ -80°ซ.....64

21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ไลเปสทำการวัดแอคติวิตีที่ อุณหภูมิ 37°ซ pH 7.0 กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกในเวลา 1 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน.....67