บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสที่เสถียรต่อความร้อนเป็นที่ได้รับความสนใจ และมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการแปรรูปไขมันและน้ำมัน เพื่อนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในการเร่งปฏิกิริยาสารประเภทไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูง ซึ่งไม่สามารถใช้ไลเปสจากแหล่งจุลินทรีย์ mesophile ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 35-40 °C ไปเร่งปฏิกิริยาที่มีไขมันเป็นสับสเตรทในระดับอุตสาหกรรมได้[32] แบคทีเรียทนความร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงสามารถผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้เช่นกัน[33] ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้เพิ่มปริมาณการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* TP811 ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยทำการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากโคลน pUC-TP811 (ซึ่งได้จากการโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus stearothermophilus* TP811 ขนาด 2.2 กิโลเบส เข้าสู่ดีเอ็นเอ พาหะ pUC 19 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5α จาก ดร. วรชาติ สิรวราภรณ์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ด้วยวิธี PCR เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* M15 [pREP4] และศึกษาสมบัติเฉพาะบางประการของไลเปสที่ส่งออกนอกเซลล์ที่ผลิตได้จากโคลนยีนไลเปส พร้อมทั้งศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์โดยการเติมสารที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

4.1 การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 และ pUC-TP811

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสของแบคทีเรียทนความร้อน TP811 ในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดยีสต์ ทริปโตน และน้ำมันมะกอกในสารละลายเบสผสมและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M , pH 7.2 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที พบว่า TP811 เจริญเติบโตได้มากที่สุดในช่วง 24-36 ชั่วโมง (รูป 3.1) โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงมี OD_{620} เท่ากับ 1.04 ซึ่งสูงที่สุด และเริ่มผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง และผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตไลเปสได้มากที่สุดเท่ากับ 7.57 U/ml และมีแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์เท่ากับ 0.46×10^3 U/mg เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate (รูป 3.2) และไม่พบไลเปสภายในเซลล์ของ TP811 ไลเปสที่ผลิตได้ยังมีแอคติวิตีต่ำกว่าที่พบในรายงานของ Sigurgisladottis S.และคณะ[33] ซึ่งได้เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์มาจากน้ำพุร้อนในประเทศไอซ์แลนด์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว NB แยกไลเปสจากน้ำเลี้ยง

มาทดสอบแอคติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate พบว่า มีจำนวน 7 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุดได้แก่ สายพันธุ์จำพวก *Thermus sp.* และ *Bacillus sp.* โดยมีแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ประมาณ 28 และ 20 U/ml ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสจากโคลน pUC-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C พบว่า pUC-TP811 เจริญเติบโตได้ดีกว่า TP811 โดยเจริญมากที่สุดในช่วง 18-30 ชั่วโมง (รูป 3.1) เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มี OD_{620} สูงที่สุดเท่ากับ 1.22 และ pUC-TP811 สามารถเริ่มผลิตไลเปสส่งออกเซลล์โดยมีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 126.76 U/ml คิดเป็น 17 เท่าของไลเปสนอกเซลล์ของ TP811 (7.57 U/ml) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบแอคติวิตีของไลเปสภายในเซลล์ของ pUC-TP811 สูงที่สุดเท่ากับ 334.46 U/ml คิดเป็น 2.5 เท่าของไลเปสภายนอกเซลล์ ผลการทดลองที่ได้ pUC-TP811 ยังผลิตไลเปสได้ไม่สูงตามที่ต้องการจึงได้พยายามปรับปรุงการแสดงออกของยีนไลเปสโดยการเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะเป็น pQE 60 และใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น *E.coli* M15[pREP4] ในการทดลองขั้นต่อไป

4.2 การโคลนยีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811

4.2.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย pUC-TP811และpQE60

จากการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUC-TP811 ด้วยวิธี alkaline lysis พบว่า pUC-TP811 ประกอบด้วยแถบของดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ มีขนาดดีเอ็นเอตรงกับ 23130, 6557 และ 3235 คู่เบส (รูป 3.4) ทุกแถบของดีเอ็นนั้นเป็นดีเอ็นของ pUC-TP811 ทั้งสิ้นแต่อยู่ในรูปร่างที่ต่างๆกัน และจากการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะของ pQE 60 พบว่าประกอบด้วยดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ มีขนาดตรงกับ 23130 , 4168 และ 2187 คู่เบส (รูป 3.4) และทุกแถบเป็นดีเอ็นเอของ pQE 60 ทั้งสิ้น กล่าวคือดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่มีรูปร่างที่ต่างกัน จะมีการเคลื่อนที่บน agarose gel ด้วยความเร็วที่ต่างกัน โดยรูปร่างวงกลมที่ขดเป็นเกลียว (superhelical circular DNA) เคลื่อนที่ได้เร็วกล่าวดีเอ็นเอที่เป็นเส้น (linear DNA) ส่วนดีเอ็นเอวงกลมที่คลายเกลียว (open circular หรือ nick circular DNA)จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด[27] การเตรียมพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จะใช้ SDS ทำให้ผนังของแบคทีเรียแตกและทำลายธรรมชาติของโปรตีน และ NaOH จะทำลายสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอทั้งพลาสมิดและโครโมโซม มีเพียงดีเอ็นเอที่เป็นวงกลมขนาดเล็กที่สามารถ re-anneal เหมือนเดิม ดังนั้นระหว่างขั้นตอนการเตรียมพลาสมิดอาจเกิดการขาดของดีเอ็นเอที่ต้องการจึงทำให้ขนาดของดีเอ็นเอที่

เตรียมได้มีขนาดต่างกัน นอกจากนี้ยังมีอาร์เอ็นเอปะปนออกมาระหว่างขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย[24,26] ดังนั้นจึงต้องทำการกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ เนื่องจากอาร์เอ็นเอจะมีผลไปรบกวนการทำงานของตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นต้น[24,26]

จากผลการกำจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอพบว่าแถบขนาดของอาร์-เอ็นเอที่มีขนาดน้อยกว่า 2027 คู่เบสหายไปเมื่อใช้ Rnase A เข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 μg/μl (รูป 3.6) พบเพียงแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ที่มีขนาดตรงกับ 23130, 6557 และ 3235 คู่เบส และ 23130 , 4168 และ 2187 คู่เบส ตามลำดับ ในบางกรณีการใช้เอนไซม์ Rnase A ในปริมาณที่มากเกินพอนั้นการกำจัดเอนไซม์ Rnase A ซึ่งเป็นโปรตีนออกด้วยวิธี Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol อาจต้องทำหลายครั้งและอาจทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้และมีการคุณภาพของดีเอ็นเอลดลงเนื่องจากการขาดของดีเอ็นเอ[24]

4.2.2 **การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR**

ผลการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUC-TP811 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Lipase F และ Lipase R primer โดยใช้ *Bacillus stearothermophilus* P1(pUC-P1) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ positive control เนื่องจากลำดับเบสของ pUC-P1 มีความเหมือนกับ pUC-TP811 (รูป 3.8) และใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจาก pUC 19 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับ negative control พบว่าเมื่อใช้ pUC-P1 และ pUC-TP811 เป็น ดีเอ็นเอแม่แบบนั้นได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบที่มีขนาดเท่ากับ 1285 และ 1122 คู่เบส เหมือนกัน โดยที่ดีเอ็นเอขนาด 1285 คู่เบสให้แถบดีเอ็นเอที่เข้มกว่า 1122 คู่เบส (รูป 3.9) ผลิตภัณฑ์ยีนไลเปสจากวิธี PCR ที่ พบจำนวน 2 แถบนั้นอาจเกิดจากการตั้งช่วงอุณหภูมิของการ annealing ต่ำเกินไปซึ่งทำให้การ annealing มีประสิทธิภาพดีทำให้มีโอกาสเกิด mispriming[24] ได้แต่เนื่องจากแถบดีเอ็นเอขนาด 1122 คู่เบส นั้นมีปริมาณน้อยกว่าขนาด 1285 คู่เบสและอยู่ห่างกันเมื่อทำ agarose gel electrophoresis ดังนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอขนาด 1285 คู่เบสออกโดยใช้ Rapid gel extraction kit ได้ ซึ่งมีรายงานการทดลองการโคลนยีนไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* ลงใน ดีเอ็นเอพาหะ pUC 19 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* DH 5 α เพื่อ subclone ลงใน *Saccharomyces cerevisiae* ได้มีการใช้ M13 reverse primer และ RLP4 primer ในการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสจากจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Rhizopus oryzae*[37]

4.2.3 **การทำยีนไลเปสจากวิธี PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Rapid gel extraction kit**

การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR โดยใช้ pUC-TP811 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าดีเอ็นเอขนาด 1122 คู่เบสปะปนอยู่ จึงทำการแยกยีนไลเปสที่ต้องการออกจากแผ่น

agarose gel ด้วยวิธี Rapid gel extraction พบว่าเมื่อสกัดดีเอ็นเอของยีนไลเปสออกจากเจลแล้ว ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพียง 1 แถบที่มีขนาด 1285 คู่เบส (รูป 3.10) เพื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Nco* I ต่อไป ซึ่งมีรายงานการทดลองการโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* I เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* DH5α ได้สกัดดีเอ็นเอออกจาก agarose gel ด้วยวิธี Rapid gel extraction ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ต้องการ[16]

4.2.4 การตัดยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*-III และ *Nco* I

เมื่อเตรียมยีนไลเปสจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC-TP811 และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hind* III และ *Nco* I ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าดีเอ็นเอของยีนไลเปสจาก pUC-TP811 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส สำหรับดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีขนาด 3.4 กิโลเบส (รูป 3.11) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 2- 4 Unit/μg ของดีเอ็นเอทั้งนี้ไม่ควรให้ปริมาณเอนไซม์เกิน 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เนื่องจากเอนไซม์ถูกเก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol ผสมอยู่ แต่ถ้าความเข้มข้นของ glycerol มากเกิน 10 % เอนไซม์จะทำงานไม่ได้[28]

เมื่อได้ดีเอ็นเอของยีนไลเปสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ซึ่งพร้อมจะนำไปเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase เข้าด้วยกันจึงได้ดีเอ็นเอสายผสมเพื่อนำไปทรานสฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] โดยการเตรียม competent cell ด้วยวิธี $CaCl_2$ – RbCl method ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่า การใช้ $CaCl_2$ เพียงอย่างเดียว[24] ในการวิจัยนี้ได้ใช้โดยการเติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินและเติมลงในอาหารเหลว LB ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15 [pREP4] และดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ของดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ

4.2.5 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี Restriction enzyme analysis

เมื่อได้โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้น LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและกานามัยซิน แล้วจึงทำการสุ่มเลือกโคโลนีบนอาหารวุ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจากโคโลนีตัวอย่าง แล้วตัดดีเอ็นเอจากโคโลนีตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์ม

แมนท์ของดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกต้อง พบว่าโคโลนีตัวอย่างหมายเลข 7 เมื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วตัดด้วย *EcoR* I แล้วให้ขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 4.6 กิโลเบส (รูป 3.13) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอสายผสม (ยีนไลเปสขนาด 1.2 กิโลเบสและดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ขนาด 3.4 กิโลเบส) ซึ่งคาดว่าเป็นทราสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้อง แล้วจึงใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีหมายเลข 7 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อคัดตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR ต่อไป นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธี Restriction enzyme analysis ในการหาตำแหน่งของการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะในพลาสมิดดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอสายผสมเพื่อต้องการทราบตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด ที่มีรายงานการทดลองการหาตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pLIP 1 (map of pLIP1) ซึ่งมียีนไลเปสของ *Bacillus thermocatenulatus* I ในดีเอ็นเอพาหะ pUC 18 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน E.coli DH5α เพื่อหาตำแหน่งในการ subclone ของดีเอ็นเอให้มีขนาด 6.7 และ 4.9 กิโลเบส[16]

4.2.6 การตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอจากโคโลนีตัวอย่างหมายเลข 7 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบหาชิ้นยีนไลเปสด้วยวิธี PCR อีกรั้งหนึ่งโดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ Lipase F ,Lipase R, Lipase pQE F และ Lipase pQE R primer พบว่าเมื่อใช้โคโลนีตัวอย่างหมายเลข 7 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.2 กิโลเบสซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนไลเปสที่ใช้ในการโคลนยีนซึ่งเหมือนกันเมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด (รูป 3.14) ดังนั้นโคโลนีตัวอย่างหมายเลข 7 จึงมียีนไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* TP811 อยู่ ซึ่งเรียกโคโลนีดังกล่าวว่า pQE-TP811 ซึ่งนำไปศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกนอกและภายในเซลล์ต่อไป

4.3 การเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์ของ pQE-TP811

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 μg/ml และ กานามัยซิน 25 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์ของ pQE-TP811 จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 พบว่า เจริญเติบโตได้มากที่สุดในช่วงเวลา 18-30 ชั่วโมง และเจริญเติบโตได้สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงมี OD_{620} เท่ากับ 1.25 (รูป 3.15) และพบว่าที่ช่วงเวลา 6-18 ชั่วโมง pQE-TP811 เจริญเติบโตได้ดีกว่า pUC-TP811 และ TP811 แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่และใกล้เคียงกับ pUC-TP811 แต่เจริญได้ดีกว่า TP811

จากการศึกษาการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811 พบว่า pQE-TP811 เริ่มการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ 6 ชั่วโมงและมีปริมาณไลเปสส่งออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีแอคติวิตีของไลเปสภายนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 329.63 U/ml คิดเป็น 2.6 และ 43.5 เท่าของไลเปสส่งออกนอกเซลล์จาก pUC-TP811(126.76 U/ml) และ TP811(7.76 U/ml) เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ 24 ชั่วโมง (รูป 3.16) และพบแอคติวิตีของไลเปสภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ 6 ชั่วโมงและมีไลเปสภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 380.43 U/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าไลเปสภายในเซลล์ของ pUC-TP811 (334.46 U/ml) เพียงเล็กน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าโคลน pQE-TP811 สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้เพิ่มขึ้นจาก pUC-TP811 เดิมเพียง 2.6 เท่า และยังมีไลเปสบางส่วนค้างอยู่ภายในเซลล์ และพบว่าแอคติวิตีจำเพาะนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 46.62×10^3 U/mg ซึ่งสูงกว่า pUC-TP811 และ TP811 คิดเป็น 3 และ 101 เท่า ซึ่งมากกว่าที่พบจากรายงานของ Schmidt D.C. และคณะ[16] ซึ่งพบแอคติวิตีจำเพาะของการโคลนยีนไลเปส BTL-2 ของ *B. thermocatenulatus* I ใน pUC 19 พบแอคติวิตีจำเพาะไลเปสนอกเซลล์เท่ากับ 25.3×10^3 U/mg ที่อุณหภูมิ 60° C แล้วจึงนำไลเปสส่งออกนอกเซลล์ ของ pQE-TP811 ไปศึกษาสมบัติบางประการต่อไป

4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสส่งออกนอกเซลล์จากแบคทีเรีย pQE-TP811

ผลการศึกษาการทำงานของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ไลเปสทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-55°C โดยมีแอคติวิตีสูงสุดที่ 55°C (รูป 3.17) ซึ่งจัดได้ว่าเป็นไลเปสที่เสถียรต่อความร้อน (Thermostable lipase) เช่นเดียวกับไลเปสที่ได้จาก *Streptomyces rimosus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซ์สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenol palmitate ที่ 55-65 °C[38]

เมื่อศึกษาการทำงานของไลเปสจาก pQE-TP811 ที่ pH ต่างๆ พบว่า ไลเปสทำงานได้ดีที่ pH 8.0 (รูป 3.18) และการทำงานของไลเปสลดลงเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่า 8.0 เช่นเดียวกับไลเปสทนความร้อนจาก *Bacillus thermocatenulatus* I[16] และ *Pseudonomas sp.* LP 7315[39] มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.0-9.0 ซึ่งแตกต่างไปจากไลเปสทนความร้อนจาก *Streptomyces rimosus* ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 9.0-10.0 [38]

เมื่อแช่ไลเปสจาก pQE-TP811 ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหาแอคติวิตี พบว่าไลเปสสามารถทนต่อความร้อนจากการแช่นานเป็นเวลา 1 ชั่วโมงได้โดยคงเหลือแอคติวิตี 50 % ของแอคติวิตีเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 60 °C (รูป 3.19) และสามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่

อุณหภูมิ 70 °C โดยมี % แอคติวิตีเหลืออยู่ 6 % ของแอคติวิตีเริ่มต้น ซึ่งทนต่อความร้อนที่พบต่ำกว่าไลเปสจาก *Pseudomonas sp.* KWI-56 เป็นไลเปสที่ทนความร้อนได้สูงมาก โดยจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 90 % ของแอคติวิตีเริ่มต้นเมื่อแช่ไลเปสที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง[35]

4.5 การศึกษาผลความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสจาก pQE-TP811

ผลการศึกษาการเติม IPTG ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811ในอาหารเหลว LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.1-0.5 mM ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา (OD_{620} ประมาณ 1.23) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IPTG เป็น 0.6 –2.0 mM ทำให้มีการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 เพิ่มขึ้นจากเดิม โดยมี OD_{620} ประมาณ 1.42 และค่อนข้างคงที่ จากการวัดแอคติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์พบว่า pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.1-0.5 mM จะผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดาที่ไม่เติม IPTG.มีแอคติวิตี ประมาณ 330 และ 370 U/ml ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม IPTG เข้มข้น 0.6-2.0 mM จะผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์และในเซลล์เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 990 และ 445 U/ml คิดเป็น 3 และ 1.2 เท่า ตามลำดับของการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ไม่เติม IPTG (ตาราง 3.13) จากการหาปริมาณโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์เพื่อคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะ พบว่า pQE-TP811 มีแอคติวิตีของไลเปสจำเพาะภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อมี IPTG เข้มข้น 0.6-2.0 mM ในอาหารเหลว LB ซึ่งมีค่าประมาณ 110×10^3 U/mg

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์แถบของโปรตีนภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า เมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.1-0.5 mM ลงในอาหารเหลว LB นั้นแถบของโปรตีนไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร LB ธรรมดา (รูป 3.21) แต่เมื่อมีความเข้มข้นของ IPTG เพิ่มเป็น 0.6-2.0 mM จะพบแถบโปรตีนเข้มข้นเมื่อเทียบกับแถบของโปรตีนจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร LB ธรรมดา ดังนั้นจากผลการศึกษาความเข้มข้นของ IPTG ต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส พบว่าความเข้มข้นของ IPTG เท่ากับ 0.6 mM เพียงพอต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสจาก pQE-TP811 ได้ผลแตกต่างจากการโคลนยีน phospholipase A, จาก *Serratia sp.* MKI ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* JM109 ในดีเอ็นเอพาหะ pQE 70 ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ pQE 60 ที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งประกอบด้วย T_5 promoter เหมือนกันซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนที่ต้องการแสดงออกด้วย IPTG ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าที่ความเข้มข้นของ IPTG เท่ากับ 0.2 mM สามารถเหนี่ยวนำการผลิต phospholipase ได้ [36]

เนื่องจาก pQE 60 เป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับใช้ในการแสดงออกของยีน (expression vector) ซึ่งมีอัตราของการ transcription สูง เนื่องจากมี T5 promotor โดยระดับการ transcription จะถูกควบคุมด้วยปริมาณของ *lac* repressor protien ภายในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] มีพลาสมิดอีกชนิดหนึ่งคือ พลาสมิด pREP4 ซึ่งประกอบด้วยยีนสำหรับต่อต้านยาปฏิชีวนะกานา-มัยซินและ *lac* I gene ที่ควบคุมการแสดงออกของ *lac* repressor protein เมื่อเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] มีการจำลองตัวเองจะมีการคัดลอกเอาพลาสมิด pREP4 ในปริมาณมากและจะผลิต *lac* repressor protein ออกมาในปริมาณมากเช่นกัน ซึ่งจะไปจับกับในส่วนของ operator sequences ของดีเอ็นเอสายผสมใน pQE 60 ซึ่งทำให้การแสดงออกของโปรตีนน้อยลง ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 และ pQE 70 ในการโคลนยีนจำเป็นต้องใช้การเหนี่ยวนำด้วย IPTG ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจาก IPTG จะจับกับ *lac* repressor protein ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้การแสดงออกของโปรตีนสูงขึ้น[25] เช่นเดียวกับรายงานของ Iizumi T. และคณะ[14] ได้ใช้แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* JM103 ภายในเซลล์มีพลาสมิด pLP64 ซึ่งมีส่วนของ *lac* gene อยู่ เมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.1 mM ลงในอาหารเหลว LB ขณะเลี้ยงพบว่าแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากเติม 0.2 U/ml เป็น 22.5 U/ml นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Maia M.D. และคณะ[40] พบว่าสารพวกน้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันงา เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ *Fusarium solani* สามารถเพิ่มการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ได้

4.6 การศึกษาการเพิ่มการส่งออกไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสโดยเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ลงในอาหารเหลว LB พบว่าแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 3 เท่า และยังคงมีไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงศึกษาการเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์ให้มากขึ้น โดยเติมสารเคมีบางชนิดที่สามารถทำให้เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียเปลี่ยนไปในทิศทางที่หลั่งไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้น ในการทดลองนี้ใช้ Tween 80 และ Triton X-100

4.6.1 การศึกษาผลของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

จากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน ร่วมกับการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เพิ่มสูงขึ้น (รูป3.24) และแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80

เท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร (1727.56 U/ml) คิดเป็น 1.7 และ 5 เท่า ของไลเปสนอกเซลล์เมื่อเติม IPTG และไม่เติม IPTG ตามลำดับ และแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่า 1.0 กรัม/ลิตร แต่ยังพบแอคติวิตีของไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์ประมาณ 430 U/ml และที่ความเข้มข้นของ Tween 80 สูงกว่า 6.0 กรัม/ลิตร แอคติวิตีของไลเปสในเซลล์จะลดลง

จากผลการทดลองแอคติวิตีภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อเติม Tween 80 0.5-1.25 กรัม/ลิตร แต่แอคติวิตีภายในเซลล์คงที่ ดังนั้น Tween 80 ที่เติมลงไปนั้นมีผลในแง่การช่วยให้การสร้างไลเปสและโปรตีนอื่นๆเพิ่มขึ้นจึงทำให้แอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่ช่วยในแง่การทำให้ไลเปสออกจากเซลล์ได้มากขึ้น ซึ่งจะยังคงพบแอคติวตีภายในเซลล์ของไลเปสซึ่งมีค่าคงที่ ดังรายงานของ Dalmau และคณะ[30] พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ลงในอาหาร YPD สามารถเพิ่มการผลิตไลเปสใน *Candida rugosa* ATCC 14830 และรายงานของ Corzo G.และคณะ[29] พบว่าเมื่อเติม Tween 80 0.5-2.0 กรัม/ลิตร ทำการผลิตไปสของ *Yarrowia lipolytica* 681 เพิ่มขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของมวลชีวภาพ (biomass)

จากผลปริมาณโปรตีนที่ส่งออกภายนอกเซลล์และในเซลล์ของ pQE-TP811(ตาราง 3.15) พบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของ Tween 80 เพิ่มมากขึ้นโปรตีนภายนอกเซลล์จะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์กลับเริ่มลด เนื่องจาก Tween 80 เป็น synthetic non-ionics detergent หรือ surfactants ซึ่งมีผลต่อในการละลาย (solubilisation)เยื่อเซลล์ (membrane) ซึ่งมีลักษณะเป็น lipids bilayers เมื่อความเข้มข้นของสารจำพวก surfactant เพิ่มสูงมากขึ้นอันตรกิริยา(interaction) ระหว่าง surfactant กับ lipid bilayers จะเพิ่มขึ้น[41] ทำให้เยื่อเซลล์เปลี่ยนสภาพไปในทิศทางที่ทำให้โปรตีนในเซลล์ออกมามากขึ้น เมื่อนำปริมาณโปรตีนมาหาแอคติวิตีจำเพาะพบว่า pQE-TP811 มีแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของ Tween 80 เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนภายในเซลล์อื่นๆมีแนวโน้มออกมานอกเซลล์เพิ่มขึ้น

4.6.2 การศึกษาผลของ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์ของ pQE-TP811

ผลการเติม Triton X-100 ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆร่วมกับการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ Triton X –100 ที่เพิ่มสูงขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 (รูป3.25) แอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 เท่ากับ 1.75 กรัม/ลิตร (1600 U/ml) ซึ่งมากกว่าไลเปสนอกเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเติม IPTG 0.6 mM เพียงอย่างเดียวและไม่เติม

IPTG คิดเป็น 1.6 และ 4.8 เท่า ตามลำดับ แต่มีค่าน้อยกว่าไลเปสนอกเซลล์เมื่อเติม Tween 80 เพียงเล็กน้อย แต่ยังพบไลเปสค้างอยู่ภายในเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ของการเติม IPTG และ Tween 80 เล็กน้อย และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 สูงขึ้น เนื่องจาก Triton X-100 เป็น synthetic non-ionics detergent หรือ surfactants เช่นเดียวกันกับ Tween 80 ดังนั้นเมื่อเติม Triton X-100 ลงไปประมาณ 1.75 กรัม/ลิตร มีผลในแง่การเพิ่มการสร้างไลเปสและโปรตีนอื่นๆเพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้แอคติวิตีนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับ Tween 80 แต่ไม่ได้ช่วยในแง่การส่งไลเปสออกนอกเซลล์ซึ่งยังพบว่ายังมีไลเปสภายในเซลล์ภายในเซลล์อยู่คงที่

จากผลการหาปริมาณโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์และภายในเซลล์ของ pQE-TP811 (ตาราง 3.17) พบว่าปริมาณโปรตีนภายนอกเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ Triton X-100 มากขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์กลับลดลง เนื่องจาก Triton X-100 นั้นส่งผลต่อการ solubilisation ของเยื่อเซลล์เช่นเดียวกันกับ Tween 80 ทำให้เยื่อเซลล์เปลี่ยนไปในทิศทางให้โปรตีนในเซลล์ออกมาได้เมื่อความเข้มข้นของ Triton X-100 มากกว่า 4.0 กรัม/ลิตร ดังนั้นเมื่อคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์จึงมีค่าลดลง เนื่องจากมีโปรตีนอื่นๆภายนอกเซลล์ออกมาเพิ่มมากขึ้น[41] เช่นเดียวกับการทดลองการเติม Triton X - 100 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas psedoalcaligenes* พบว่าความเข้มข้นของ Tritin X – 100 เท่ากับ 2.0 กรัม/ลิตร มีผลเพิ่มการส่งไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้น[29]

4.6.3 **การศึกษาผลการเติม glutamic acid เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว LB**

ผลการเติม glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB ให้มีความเข้มข้นต่างๆร่วมกับการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเจริญเติบโตของ pQE-TP811 เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ glutamic acid ที่เพิ่มสูงขึ้นและเจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา (รูป 3.26) และพบแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดเท่ากับ 1790.54 U/ml ที่ความเข้มข้นของ gluamic acid 1.5 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่า Tween 80 และ Triton X-100 เพียงเล็กน้อย และสูงกว่าการเติม IPTG 0.6 mM ประมาณ 1.8 เท่า และสูงกว่า pUC-TP811 และ TP811 คิดเป็น 14 และ 236 เท่า ตามลำดับ และยังพบแอคติวิตีไลเปสในเซลล์ประมาณ 435 U/ml ซึ่งใกล้เคียงกับไลเปสในเซลล์ของ Tween 80 และ Triton X-100 ดังนั้นการเติม glutamic acid ที่ความเข้มข้นประมาณ 1.5 กรัม/ลิตร เพื่อเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงจากอาหารเหลว LB ซึ่งประกอบด้วย Tryptone 1 %(w/v) Yeast extract 0.5%(w/v)

และ NaCl 0.5 %(w/v) นั้น pQE-TP811 สามารถนำ glutamic acid ไปเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและในการผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้เพิ่มสูงขึ้น

ผลการหาปริมาณโปรตีนภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 ในอาหารเหลว LB ที่ผสม glutamic acid (ตาราง 3.18) พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งภายนอกและภายในเซลล์จะค่อนข้างคงที่เมื่อมีความเข้มข้นของ glutamic acid เท่ากับ 2.0 กรัม/ลิตร และพบว่าแอคติวิตีจำเพาะภายนอกและภายในเซลล์ของ pQE-TP811 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ glutamic acid สูงขึ้น ดังนั้นในการเติม glutamic acid ในอาหารนั้นจะช่วยในแง่การเพิ่มการสร้างไลเปสและโปรตีนอื่นๆภายในเซลล์ให้สูงขึ้น แต่การส่งโปรตีนออกนอกเซลล์นั้นมีน้อย ดังนั้นโปรตีนที่ผลิตได้จึงค้างอยู่ภายในเซลล์ จึงทำให้แอคติวิตีจำเพาะภายในเซลล์ลดลง นอกจากนี้มีรายงานของ Rau M.L. และคณะ[17] ได้ใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนเติมลงในอาหารเหลว LB ในการเลี้ยง *B. thermocatenulatus* อีกด้วย

4.6.4 การศึกษาการเติม Tween 80 และ glutamic acid ลงในอาหารเหลว LB

จากผลการเติมทั้ง Tween 80 และ glutamic acid เข้มข้น 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร ซึ่งให้แอคติวิตีภายนอกเซลล์สูงสุดลงในอาหารเหลว LB ร่วมกับการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM เพื่อใช้เลี้ยงเซลล์ของ pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูป 3.27) และแอคติวิตีภายนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1791.32 U/ml ซึ่งมากกว่าการเติม glutamic acid ,Tween80 , Triton X-100 เพียงเล็กน้อยและมีไลเปสค้างอยู่ในเซลล์คงที่ประมาณ 435 U/ml จากการหาปริมาณโปรตีนนอกเซลล์และในเซลล์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนภายนอกเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน แต่ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์กลับลดลง ดังนั้นการเติมทั้ง Tween 80 และ glutamic acid จะมีผลร่วมกันกล่าวคือ การเติม glutamic acid เป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้กับเซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและกิจกรรมภายในเซลล์และช่วยในการผลิตไลเปสและโปรตีนอื่นๆด้วย ร่วมกับผลของ Tween 80 ซึ่งเป็น surfactant[17,41] ที่สามารถเพิ่มการผลิตไลเปสและโปรตีนอื่นๆได้เช่นกัน ดังนั้นทั้ง Tween 80 และ glutamic acid จะช่วยในแง่การเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตโปรตีนอื่นๆรวมทั้งไลเปสให้เพิ่มขึ้น แต่ไม่ช่วยในแง่การเพิ่มการส่งไลเปสออกจากเซลล์ ซึ่งจะเห็นได้จากการพบไลเปสภายในเซลล์นั้นคงที่

จากผลการศึกษาการเติม Tween 80 ,Triton X – 100 และ glutamic acid ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหารเหลว LB ที่ให้แอคติวิตีของๆไลเปสนอกและในเซลล์สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเปรียบเทียบกัน ดังรูป 3.28 พบว่าเมื่อเติม glutamic acid เข้มข้น

1.5 กรัม/ลิตร ลงในอาหารเหลว LB ให้แอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุด รองลงมาคือ การเติม Tween 80 ร่วมกับ glutamic acid ,Tween 80 ,Triton X-100 และ การเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ตามลำดับ สำหรับแอคติวิตีภายในเซลล์นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์กลับพบว่าการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM เพียงอย่างเดียวให้แอคติวิตีภายนอกเซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือ การเติม g;utamic acid , การเติม Tween 80 ร่วมกับ glutamic acid , Triton X-100 และ Tween 80 ตามลำดับ (รูป 3.29) เนื่องจากการเติม glutamoc acod,Tween 80และ Triton X-100 มีผลต่อการสร้างโปรตีนอื่นๆรวมทั้งไลเปสดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์ pQE-TP811 เพื่อให้ได้แอคติวิตีภายนอกเซลล์สูงสุดควรเลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสม glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM แต่ถ้าต้องการแอคติ-วิตีจำเพาะภายนอกเซลล์สูงแต่มีแอคติวิตีรองลงมานั้นควรเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM เพียงอย่างเดียว

4.7 สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าการโคลนยีนไลเปสของ *Bacillus starothermophilus* TP811 จากโคลน pUC-TP811 ที่มีขนาด 1.2 กิเบส โดยการเพิ่มปริมาณยีนไลเปสด้วยวิธี PCR เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pQE 60 ในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E.coli* M15[pREP4] พบว่ามีแอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์เท่ากับ 329.63 U/ml คิดเป็น 2.5 เท่า ของไลเปสที่ผลิตได้จาก pUC-TP811 ไลเปสจาก pQE-TP811 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C ทนความร้อนได้สูงถึง 60^{o}C และสามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.0 การเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ลงในอาหารเหลว LB เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไลเปสนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าของเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB ธรรมดา และยังพบไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ จึงทดลองเติม Tween 80 และ Triton X-100 ลงในอาหารเหลว LB พบว่า Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ช่วยให้การสร้างและเพิ่มไลเปสออกนอกเซลล์ได้ดีกว่าเมื่อใช้ Triton X-100 เข้มข้น 1.75 กรัม/ลิตร และไลเปสในเซลล์ยังมีปริมาณเท่าเดิม จากการเติม glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร pQE-TP811 มีการผลิตไลเปสเพิ่มขึ้นเป็น 1.7 เท่าของหารเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM เพียงอย่างเดียว ในอาหารเหลว LB เช่นเดียวกับการเติม Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และยังคงพบไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ของ pQE-TP811 ในปริมาณเท่าเดิม ดังนั้นโคลน pQE-TP811 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG และเติม Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร หรือ glutamic aicd เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ในอาหารเหลว LB สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 14 เท่าของ pUC-TP811 และ 236 เท่าของ TP811