ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไลเปสนอกเซลล์จากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ ทีพี 811

ชื่อผู้เขียน นางสาวพัชณี แสงทอง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ

อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ

บทคัดย่อ

การทำการปรับปรุงการแสดงออกของยีนไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* TP811 ที่แยกได้จากน้ำและดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนเทพพนม จ.เชียงใหม่ ขนาด 1.2 กิโลเบสจากโคลน pUC-TP811 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Hind* III โดยใช้ pQE 60 เป็นดีเอ็นเอพาหะและใส่เข้าแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* M15[pREP4] นั้นทำโดยการเพิ่มปริมาณชิ้น insert ของยีนไลเปสโดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Lipase F และ Lipase R primer การศึกษาแอคติวิตีจากโคลน pQE-TP811 ที่อุณหภูมิ 55°C โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ p-nitrophenyllaurate พบว่าแอคติวิตีของไลเปสส่งออกนอกเซลล์(329.63 U/ml) มากกว่าที่ผลิตได้จากโคลน pUC-TP811 เดิม (126.76 U/ml) คิดเป็น 2.5 เท่า และพบว่าแอคติวิตีของไลเปสยังค้างอยู่ในเซลล์ (380.43 U/ml) ซึ่งมากกว่าไลเปสในเซลล์จากโคลน pUC-TP811 (334.56 U/ml) เพียงเล็กน้อย การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ได้จาก pQE-TP811 พบว่าเป็นไลเปสที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 55°C pH 8.0 สามารถทนต่อความร้อนจากการแช่นานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C โดยคงเหลือแอคติวิตี 50% ของแอคติวิตีเริ่มต้น

การศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตไลเปสจากโคลนด้วย IPTG พบว่าเมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ลงไปในอาหารเหลว LB เมื่อเลี้ยงเซลล์อายุได้ 3 ชั่วโมง สามารถผลิตไลเปสส่งออกนอก

เซลล์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 990 U/ml และมีไลเปสค้างอยู่ในเซลล์ 445 U/ml สามารถผลิตไลเปสนอกเซลล์ได้เป็น 3 เท่าของ pUC-TP811

การศึกษาการเพิ่มปริมาณไลเปสส่งออกนอกเซลล์โดยการเติม Tween 80 และ Triton X - 100 ร่วมกับการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM ในอาหารเหลว LB พบว่า Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร และ Triton X – 100 เข้มข้น 1.75 กรัม/ลิตร ให้แอคติวิตีของไลเปสนอกเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1727.56 และ 1600 U/ml ตามลำดับ คิดเป็น 1.7 และ 1.6 เท่าของไลเปสภายนอกเซลล์เมื่อเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM เพียงอย่างเดียว แอคติวิตีจำเพาะภายในเซลล์ของ pQE-TP811 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี Tween 80 และ Triton X-100 ลดลงเมื่อความเข้มข้นของTween 80 และ Triton X-100 เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามยังพบแอคติวิตีภายในเซลล์(440.54 และ 391.89 U/ml) ซึ่งมากกว่าที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี IPTG เพียงอย่างเดียวเพียงเล็กน้อย

การเติม glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ลงในอาหารเหลว LB ที่ผสม IPTG เข้มข้น 0.6 mM พบว่ามีแอคติวิตีภายนอกเซลล์ (1790.54 U/ml) มากกว่าการเติม Tween 80 และ Triton X-100 และแอคติวิตีจำเพาะภายนอกเซลล์ (85.18×10^3 U/mg) สูงกว่าการเติม Tween 80 (38.77×10^3 U/mg)และ Triton X-100 (41.44×10^3 U/mg) แต่น้อยกว่าการเติม IPTG เข้มข้น 0.6 mM (112.16×10^3 U/mg) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นโคลน pQE-TP811 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG และเติม Tween 80 เข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร หรือ glutamic acid เข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร ในอาหารเหลว LB สามารถผลิตไลเปสนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 14 เท่าของ pUC-TP811 และ 236 เท่าของ TP811

Thesis Title	Expression of Extracellular Lipase Gene from Thermophilic Bacteria Strain TP811	
Author	Miss Padchanee SangThong	
M.S.	Biotechnology	
Examining Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairman
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek	Member
	Lect. Dr. Dararat Tongkao	Member

Abstract

A thermostable lipase gene (1.2 Kb *Nco* I – *Hind* III fragment) from pUC-TP811 from a thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* TP 811 isolated from Teppanom hot spring in Chiang Mai was cloned into *Escherichia coli* M15[pREP4] using pQE 60 as a plasmid vector. Amplification of the lipase gene fragment was done by PCR using plasmid DNA isolated from pUC-TP811 and two oligonucleotide primers (Lipase F and Lipase R primer). The extracellular lipase activity was 329.63 U/ml which was higher than lipase activity from pUC-TP811 (126.76 U/ml) about 2.5 times when using p-nitriphenyllaurate as substrate at 55°C. However, intracellular lipase activity of pQE-TP811 was found to be 380.43 U/ml which was slightly higher than intracellular lipase from pUC-TP811(334.56 U/ml). Some properties of the lipase produced from pQE-TP811 were studied. It was found that the optimum temperature and pH are 55°C and 8.0 respectively. The enzyme could be stable up to 60°C when incubated for 1 h and 50 % of the activity remained.

Addition of 0.6 mM IPTG after culturing of pQE-TP811 for 3 h could induce the production of extracellular lipase up to 990 U/ml and the lipase activity inside the cell could also be found (445 U/ml). Increasing the extracellar lipase activity by addition of Tween 80 and Triton X-100 in LB medium and induction by 0.6 mM IPTG

was studied. The extracellular lipase activity from pQE-TP811 in LB medium in the addition of 1.0 g/l Tween 80 and 1.75 g/l Triton X-100 were 1727.56 and 1600 U/ml respectively (about 1.7 and 1.6 times of extracellular lipase activity from induced by 0.6 mM IPTG alone. It was found that the specific extracellular lipase activity of pQE-TP811 was decrease at high concentration of Tween 80 and Triton X-100. However, the intracellular lipase activity was found to be 440.54 and 391.89 U/ml which was slightly higher than intracellular lipase activity from pQE-TP811 induced by 0.6 mM IPTG.

Addition of 1.5 g/l glutamic acid and 0.6 mM IPTG in LB medium found that the extracellualr lipase activity was 1790.54U/ml which was higher than lipase activity from the addition of Tween 80 and Triton X-100 and the lipase activity was 14 times higher than lipase from pUC-TP811 and 236 times than TP811,respectively. The specific extracellular lipase activity on the addition of glutamic acid was 85.18 $x10^3$ U/mg which was higher than addition of Tween 80 (38.77 $x10^3$ U/mg) and Triton X-100(41.44 $x10^3$ U/mg) but lower than the addition of 0.6 mM IPTG alone. However, the intracellular lipase activity was found nearly the same as the addition of Tween 80.