บทความวิชาการ

พันธุวิศวกรรม: ยุทธศาสตร์สำคัญเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไลเพส

ปวีณ์นุช เลขะพันธุ์[1] ฐานกร จันทร์หอม[1] ชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์[2,3]
ณษพัฒน์ บุญวิทยา[4] เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม[4] และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล[1,2*]

บทคัดย่อ

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และไลเพสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้เมื่ออยู่ในสภาพที่มีน้ำน้อย ด้วยเหตุนี้ทำให้ไลเพสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลายและหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตสารชะล้าง การผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์มีความน่าสนใจมากกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เนื่องจากไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีข้อดีหลายประการ และปัจจุบันยังได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์อีกด้วย ในบทความนี้จะกล่าวถึงแนวทางในการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสโดยใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งจะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไลเพสจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสูง ซึ่งก็คือ *Fusarium solani* ระบบการแสดงออกของไลเพสในเซลล์เจ้าบ้านชนิดใหม่ คือ *Pichia pastoris* และการนำไลเพสไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารชะล้าง

คำสำคัญ: ไลเพส พันธุวิศวกรรม *Fusarium solani, Pichia pastoris*

[1] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] หน่วยปฏิบัติการวิจัย การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3] หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[4] สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี ปตท.
[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: warawut.c@chula.ac.th

Genetic Engineering: An Important Strategy to Improve the Efficiency of Lipase Production

Paweenuch Lekhapan[1] Thanakorn Chanhorm[1]
Jinaporn Wongwatanapaiboon[2,3] Nassapat Boonvitthya[4],
Chalermchai Ruangchainikorn[4] and Warawut Chulalaksananukul[1,2*]

ABSTRACT

Lipases are enzyme that catalyze the hydrolysis of ester bond of triglyceride and give glycerol and free fatty acid as product. Besides, the reaction is reversible and theses enzyme can catalyze esterification and transesterification in conditions with less water. From these reasons, lipases have been widely used in a number of industries like in food, chemical, pharmaceutical, and especially, detergent industries. Microbial lipases are more attractive than animal and plant lipases because of their versatile tools. Moreover, it is well known that there is useful of genetic engineering technique for improving the efficiency of microbial lipase production. This article is focused on the overexpression of lipase by genetic engineering technique. The topics include the basic knowledge about lipases, microorganism producing lipase with high catalyzing ability that is *Fusarium solani,* heterologous expression system which is the expression system of gene in another host like *Pichia pastoris,* and beneficial application of lipases in detergents.

Keywords: Lipases, Genetic engineering, *Fusarium solani, Pichia pastoris*

[1]Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University
[2]Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University
[3]Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
[4]PTT Research & Technology Institute
[*]Corresponding author, e-mail: warawut.c@chula.ac.th

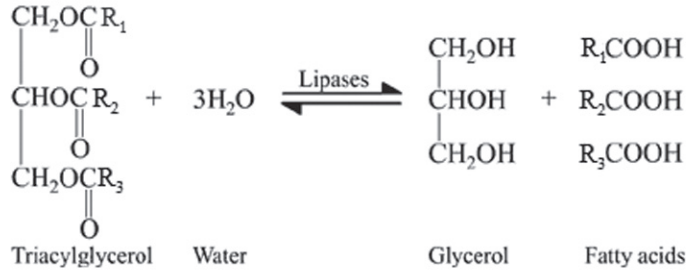
บทนำ

ไลเพส (lipase, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ปฏิกิริยาเกิดบริเวณผิวร่วมระหว่างน้ำกับไขมันหรือน้ำมัน [1] ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และไลเพสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ได้ เมื่ออยู่ในสภาพที่มีน้ำน้อย ด้วยเหตุนี้ทำให้เอนไซม์นี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลายและหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตสารชะล้าง [2] แหล่งในการผลิตไลเพสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยที่การผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์กำลังเป็นที่น่าสนใจมากกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เนื่องจากไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้อย่างหลากหลาย มีปริมาณผลผลิตสูง มีค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ ง่ายต่อการดัดแปลงพันธุกรรม มีความทนต่อสารละลายอินทรีย์ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ (cofactor) ในการทำปฏิกิริยา และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) ที่หลากหลาย [3] จุลินทรีย์กลุ่มที่ถูกใช้ในการผลิตไลเพสกันอย่างแพร่หลาย คือ จุลินทรีย์กลุ่มรา (fungi) ในสกุล *Fusarium* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Fusarium solani* ซึ่งเป็นราเส้นใยที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ และไลเพสที่ได้ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสูง [4, 5] แต่เนื่องจากไลเพสที่ผลิตได้มีราคาสูง [6] และ *F. solani* เป็นราเส้นใยที่มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ [7] จึงได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไลเพส ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ที่มีระบบการแสดงออกที่เหมาะสมกับการแสดงออกของไลเพส คือ *Pichia pastoris* [8] ดังนั้นการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจาก *F. solani* ใน *P. pastoris* จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งสามารถทำได้โดยคัดเลือกยีนที่ผลิตไลเพสจาก *F. solani* มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และเชื่อมกับพลาสมิด pGAPZαA ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยโพรโมเตอร์ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAP) ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำ [9] หรือเชื่อมกับพลาสมิด pPICZαA ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วยส่วนของโพรโมเตอร์ Alcohol oxidase 1 (AOX1) ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกได้ด้วยเมทานอล (methanol) [10] จากนั้นฝากถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้ (recombinant plasmid) เข้าสู่ *P. pastoris* แล้วเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลเพื่อให้มีการผลิตไลเพสออกมานอกเซลล์ในระดับที่ต้องการ เพื่อที่จะนำไลเพสที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะเอสเทอร์ ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ โดยจะอยู่ในรูปอิมัลชัน (emulsion) ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 1 ปฏิกิริยาเกิดบริเวณผิวร่วมระหว่างน้ำกับไขมันหรือน้ำมัน และยังพบว่าไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และมอนอกลีเซอไรด์ (monoglyceride) อาจเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ และเนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate)

จึงอาจขึ้นกับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น [11] ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ นอกจากนี้ไลเพสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ เมื่ออยู่ในสภาพที่มีน้ำน้อย [2]



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของไลเพส [12]

ไลเพสจากจุลินทรีย์

ไลเพสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เนื่องจากไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน แหล่งของไลเพสที่สำคัญซึ่งพบในพืช เช่น ผลปาล์มน้ำมัน ผลมะกอก เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน และเมล็ดข้าวสาลี เป็นต้น [13] ส่วนไลเพสที่พบในสัตว์พบได้ในอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร และลำไส้ นอกจากนี้ยังพบไลเพสในน้ำนมของสัตว์ด้วย [14]

ไลเพสจากจุลินทรีย์กำลังเป็นที่น่าสนใจมากกว่าไลเพสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้อย่างหลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพส มีปริมาณผลผลิตสูง มีค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ ง่ายต่อการดัดแปลงพันธุกรรม มีความทนต่อสารละลายอินทรีย์ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ในการทำปฏิกิริยา มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่หลากหลาย และยังมีอัตราการผลิตไลเพสที่สูงอีกด้วย [3]

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสสามารถพบได้ในแหล่งต่างๆ เช่น ในดินหรือน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมันหรือน้ำมัน [15, 16] เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย [17] รวมถึงน้ำพุร้อน [18] ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสที่ถูกใช้ในทางการค้า 98 สายพันธุ์ แบ่งเป็นรา 39 สายพันธุ์ ยีสต์ 20 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 39 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสที่ใช้ทางการค้า [19-21]

แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
Achromobacter sp.	*Absida corymbifera*	*Candida* sp.
A. lipolyticus	*A. hyalospora*	*C. antarcea*
Acinetobacter sp.	*Amylomyces rouxii*	*C. auricularia*
A. pseudoalcaligenes	*Aspergillus* sp.	*C. curvata*
Alcaligenes sp.	*A. flavus*	*C. lipolytica*
A. denitrificans	*A. fumigatus*	*C. deformans*
Arthrobacter sp.	*A. nidulans*	*C. foliorum*
Bacillus cereus	*A. niger*	*C. humicula*
B. megaterium	*A. oryzae*	*C. rugosa*
B. laterosporus	*Chaetomium* sp.	*C. tsukubaensis*
B. sphereicus	*Coelomyceles* sp.	*Pichia miso*
B. stearothermophilus	*Fusarium oxysporum*	*Saccharomyces fragilis*
B. thaiminolyticus	*F. solani*	*S. fibuligera*
B. thermonocatenulatus	*Geotrichum* sp.	*S. lipolytica*
B. thermoleovocans	*Glomus versiforme*	*S. cerevisiae*
Burkhoderia cepacia	*Hansenula anomala*	*Schizosaccharomyces* sp.
C. chocolatum	*Humicola grisea*	*Talaromyces thermophilus*
C. viscosum	*H. lanuginose*	*Thielavia minor*
Corynebacterium acnes	*Microthrix parvicella*	*Torula thermophila*
Crytococus laurentii	*Mucor javanicus*	*Ustilago maydis*
Enterococus faecalis	*M. lipolyticus*	
Flavobacterium arborescens	*M. miehei*	
F. ferruginem	*M. pusillus*	
Lactobacillus sp.	*Neurospora sitophila*	
Leishmania donovani	*Nocardia amarae*	
Malbrancheae pulcella	*Penicillium crustosum*	
Micrococus frendenreichii	*P. camembert*	
Mycobacterium chelonae	*P. cyclopium*	
Myxococus xantus	*P. roquefortii*	
Propionibacterium acnes	*P. candidum*	
P. granulosum	*P. citrinum*	

ตารางที่ 1 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสที่ใช้ทางการค้า [19-21]

แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
Protaminobacter alboflavus	*P. simplicissimum*	
Pseudomonas sp.	*P. solitum*	
P. aeruginosa	*P. uriticae*	
P. cepacia	*Phycomyces nitens*	
P. fluorescen	*Rhizomucor miehei*	
P. fragi	*Rhizopus* sp.	
P. pseudoalcaligens	*R. chinensis*	
P. stutzeri	*R. delemar*	

วราภรณ์ มลิลาศ [5] ได้คัดแยกราจากตัวอย่างดินและพืชน้ำมัน 21 แหล่งด้วยวิธีทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต เมื่อนำราที่ได้มาทดสอบการผลิตไลเพสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BYPO ที่ใส่น้ำมันปาล์มและโรดามีน บี พบว่ามีราจำนวน 38 ไอโซเลตสามารถผลิตไลเพสได้ จากนั้นนำราที่สามารถผลิตไลเพสได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพสโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวชักนำในการผลิตไลเพส เมื่อทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสพบว่าราเส้นใย *F. solani* ผลิตไลเพสที่มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุด คือ 87.73 ± 0.99 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Maia คณะ [4] รายงานค่าพีเอชที่เหมาะสำหรับการผลิตไลเพสของ *F. solani* คือ 8 และอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการผลิตไลเพสของ *F. solani* คือ อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การเติมไมโครมิเนอรัลส์ (microminerals) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ *F. solani* มีการผลิตไลเพสมากกว่าอาหารที่ไม่เติมไมโครมิเนอรัลส์และการบ่มไลเพสด้วยนอร์มอลเฮกเซน (n-hexane) และโทลูอีน (toluene) ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรจะทำให้ไลเพสมีแอกทิวิตีสูงที่สุด และไม่พบแอกทิวิตีของไลเพสเมื่อบ่มด้วยสารละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนี้ Jallouli และคณะ [22] ยังพบว่าไลเพสจาก *F. solani* มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,610 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

โครงสร้างสามมิติของไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์

ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนัก 19-60 กิโลดาลตัน มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลในรูปแบบที่เรียกว่า α/β-hydrolase fold ซึ่งประกอบไปด้วยแกนกลางที่เป็นแผ่นพับเบต้าแบบขนานกัน (parallel β-sheets) จำนวน 8 โมเลกุล (β1-β8) ที่มีความแตกต่างกันเชื่อมต่อกันด้วยเกลียวแอลฟา (α-helices) จำนวน 5 โมเลกุล (A-F) สำหรับบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของไลเพส ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีน (serine), กรดแอสพาร์ทิค (aspartic acid) หรือกรดกลูตามิค (glutamic acid), และฮิสทิดีน (histidine) [3]

ปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ของไลเพสจะเริ่มขึ้นเมื่อออกซิเจนอะตอมของกรดอะมิโนเซอรีนที่อยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเพสเข้าไปจับอะตอมของคาร์บอนที่สร้างพันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้นแบบ nucleophilic attack แล้วเกิดสารตัวกลางที่มีโครงสร้างเป็นเตทตระฮีดรัล (tetrahedral) หลังจากนั้นจะมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารตัวกลางดังกล่าวกับไนโตรเจนอะตอมของกรดอะมิโนที่อยู่ในสายโซ่หลักของพอลิเพปไทด์ตรงบริเวณที่เรียกว่า oxyanion hole หลังจากนั้นจะมีการกำจัดแอลกอฮอล์ออกไป เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไลเพสกับกรดไขมัน (acyl-lipase complex) และมีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกไปในท้ายที่สุด จากนั้นไลเพสก็จะกลับคืนมาสู่สภาพเดิม [3]

เนื่องจากปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของไลเพสจะเกิดขึ้นบริเวณผิวร่วมระหว่างน้ำกับน้ำมัน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สมการ Michaelis-Menten ในการอธิบายกลไกการทำงานของไลเพสได้ เนื่องจากสมการนี้ใช้อธิบายเฉพาะปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสถานะใดสถานะหนึ่งเท่านั้น และจากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของไลเพส (รูปที่ 2) พบว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเพสจะมีกรดอะมิโนเรียงตัวเป็นรูปร่างเกลียว (α-helix) ปกคลุมอยู่ เรียกว่า ลิด (lid) หรือแฟลป (flap) และเนื่องจากพื้นที่ผิวส่วนใหญ่ของไลเพสมีลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobia) ดังนั้นไลเพสจึงจับกับบริเวณผิวร่วมระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ดี เมื่อไลเพสอยู่ที่บริเวณผิวร่วมระหว่างน้ำกับน้ำมันลิดจะหลุดออกไป ทำให้บริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเพสสัมผัสกับสารละลายที่อยู่รอบๆ และเกิดปฏิกิริยาได้ [3]

รูปที่ 2 โครงสร้างสามมิติของไลเพสจากจุลินทรีย์ [3]

ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของไลเพส

ความจำเพาะของไลเพสมี 3 ลักษณะ ได้แก่ ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันหรือซับสเตรท และความจำเพาะต่อไอโซเมอร์ (stereochemical specificity)

Macrae [11] ได้แบ่งไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ กลุ่มแรก คือ กลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเพสกลุ่มนี้จะสลายโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระอย่างสมบูรณ์ กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่ทำปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์เจาะจงที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1,3 Sn specificity) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเพสกลุ่มนี้จะสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1,2 (2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น 1,3-diglyceride และ 1-monoglyceride ตามลำดับในที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม Jallouli และคณะ [23] รายงานว่าไลเพสจาก *F. solani* มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 2 (1,2 Sn specificity) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพส

P. pastoris เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ (methylotrophic yeast) และระบบการแสดงออกของ *P. pastoris* มีข้อดีหลายข้อ ได้แก่ สามารถสกัดโปรตีนที่ *P. pastoris* ผลิตออกมาได้สะดวก สามารถผลิตโปรตีนที่มีการม้วนพับถูกต้องและผ่านกระบวนการการปรับแต่งหลังการแปลรหัส (post translation modification) และสามารถปล่อยโปรตีนออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณมาก ด้วยเหตุผลดังกล่าว *P. pastoris* จึงได้รับการปรับปรุงให้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีระบบการแสดงออก เหมาะสำหรับการผลิตและปล่อยโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น หรือที่เรียกว่าระบบการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัส (heterologous expression system) [24]

ขั้นตอนในการสร้างระบบการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัสใน *P. pastoris* ต้องอาศัยเทคนิคพันธุวิศวกรรม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน [25] ได้แก่

1) ใส่ยีนที่ต้องการเข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีน (expression vector)
2) นำเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris*
3) ทดสอบการแสดงออกของยีนที่ใส่เข้าไปใน *P. pastoris* เพื่อให้สร้างโปรตีนที่ต้องการ

พลาสมิดที่ใช้ในระบบการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัสของ *P. pastoris*

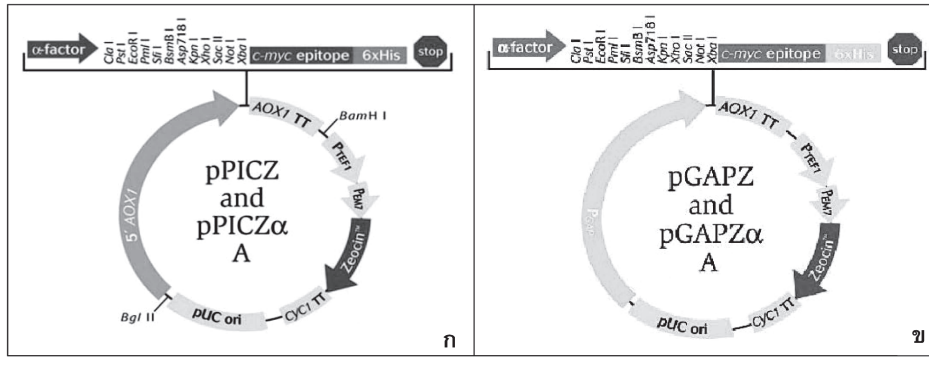
- พลาสมิด pPICZαA

การใช้พลาสมิด pPICZαA (รูปที่ 3 ก) ในระบบการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัสของ *P. pastoris* มีข้อดี คือ พลาสมิด pPICZαA ประกอบด้วยส่วนของโพรโมเตอร์ AOX1 ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกได้ในระดับที่เหมาะสมด้วยเมทานอล นอกจากนี้พลาสมิด pPICZαA ยังประกอบด้วย α-factor prepropeptide จาก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งช่วยให้ *P. pastoris* สามารถหลั่งโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ และมี C-terminal $(His)_6$ tag ที่ช่วยให้กระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ทำได้สะดวกยิ่งขึ้น นอกจากนั้นพลาสมิด pPICZαA ยังมีส่วนของยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะซีโอซิน (Zeocin) ซึ่งใช้สำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ที่ได้รับพลาสมิดแล้ว [24]

- พลาสมิด pGAPZαA

การใช้พลาสมิด pGAPZαA (รูปที่ 3 ข) ในระบบการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัสของ *P. pastoris* มีข้อดี คือ พลาสมิด pGAPZαA ประกอบด้วยส่วนของโพรโมเตอร์ GAP ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่ส่งผลให้ยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมีการแสดงออกตลอดเวลา โดยไม่ต้องมีการเติมสารเหนี่ยวนำเหมือนกับพลาสมิด pPICZαA [26] นอกจากนี้พลาสมิด pGAPZαA ยังประกอบด้วย α-factor prepropeptide จาก *S. cerevisiae* และ C-terminal $(His)_6$ tag รวมถึงส่วนของยีนที่ทำให้ต้านยาปฏิชีวนะซีโอซินเช่นเดียวกับพลาสมิด pPICZαA [24]

จากรายงานของ Delroisse และคณะ [26] พบว่าโพรโมเตอร์ GAP มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนมากกว่าโพรโมเตอร์ AOX1 โดยเมื่อถ่ายยีน *Tribolium castaueum carboxylesterase (TCE)* เข้าสู่ *P. pastoris* โดยอาศัยพลาสมิดที่ถูกควบคุมโดยโพรโมเตอร์ GAP และโพรโมเตอร์ AOX1 เป็นเวกเตอร์ พบว่ายีน *TCE* ที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยโพรโมเตอร์ GAP มีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่าเมื่อถูกควบคุมการแสดงออกโดยโพรโมเตอร์ AOX1 ประมาณ 2 เท่า แต่จากการรายงานของ Boonvitthya และคณะ [24] พบว่าโพรโมเตอร์ AOX1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนมากกว่าการใช้โพรโมเตอร์ GAP โดยเมื่อถ่ายยีนเบต้ากลูโคสิเดส (beta-glucosidase) จาก *Aspergillus oryzae* เข้าสู่ *P. pastoris* โดยอาศัยพลาสมิดที่ถูกควบคุมโดยโพรโมเตอร์ GAP และโพรโมเตอร์ AOX1 เป็นเวกเตอร์เช่นกัน พบว่ายีนเบต้ากลูโคสิเดสที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยโพรโมเตอร์ AOX1 มีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่าที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยโพรโมเตอร์ GAP ประมาณ 1.4 เท่า



รูปที่ 3 ก ส่วนประกอบของพลาสมิด pPICZαA
ข ส่วนประกอบของพลาสมิด pGAPZαA

การศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสใน *P. pastoris*

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ใน *P. pastoris* ดังนี้ Brunel และคณะ [27] ศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจากยีน *CpLIP 2* จาก *Candida parapsilosis* ใน *P. pastoris* โดยใช้พลาสมิด pPIC 9K เป็นเวกเตอร์สำหรับการฝากถ่ายยีน และคัดเลือก *P. pastoris* ที่ได้รับพลาสมิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicilin) พบว่าไลเพสที่ได้มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 74 ± 8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งค่าแอกทิวิตีจำเพาะดังกล่าวมากกว่าไลเพสที่ผลิตจาก *C. parapsilosis* โดยตรง 60 เท่า Quyen และคณะ [28] ได้ศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจากยีน *BTL2* ของ *Bacillus thermocatenulatus* ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 โดยใช้พลาสมิด pPICZαA เป็นเวกเตอร์สำหรับการฝากถ่ายยีนและคัดเลือก *P. pastoris* ที่ได้รับพลาสมิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะซีโอซิน พบว่าเมื่อใช้ไตรบิวทีริน (tributyrin) และไตรโอเลอิน (triolein) เป็นสารตั้งต้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสที่ได้จาก *P. pastoris* คือ 65 และ 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 7.5 และ 9 ตามลำดับ และเมื่อนำไลเพสไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์บิวทิล-เซฟาโรส (butyl-Sepharose) พบว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 23,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนเมื่อใช้ไตรบิวทีรินเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบว่าไลเพสที่ได้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 4 อะตอม มากที่สุด และยังมีความเสถียรสูงเมื่ออยู่ในสารละลายอินทรีย์หรือสารชะล้าง Zhao และคณะ [29] ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนไลเพสจาก *Candida rugosa* ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 โดยใช้พลาสมิด pGAPZαA เป็นเวกเตอร์สำหรับการฝากถ่ายยีนและคัดเลือก *P. pastoris* ที่ได้รับพลาสมิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะซีโอซินพบว่าไลเพสที่ได้มีค่าแอกทิวิตีที่สูงสุดเท่ากับ 14,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยอุณหภูมิและค่าพีเอชที่ทำให้ไลเพสมีแอกทิวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 26 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ Yu และคณะ [30] ได้ศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจากยีน *YlLip2* ของ *Yarowia lipolytica* ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 โดยใช้พลาสมิด pPICZαA เป็นเวกเตอร์สำหรับการฝากถ่ายยีนและคัดเลือก *P. pastoris* ที่ได้รับพลาสมิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะซีโอซินพบว่าไลเพสที่ได้มีค่าแอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12,500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 19,880 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งค่าแอกทิวิตีจำเพาะดังกล่าวไม่แตกต่างจากไลเพสที่ผลิตจาก *Y. lipolytica* โดยตรง และพบว่าไลเพสที่ได้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนสายยาวเท่ากับ 12-16 อะตอม มากกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น นอกจากนี้คุณสมบัติต่างๆ ของไลเพสที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* ยังเหมือนกับไลเพสที่ผลิตจาก *Y. lipolytica* ซึ่งมีอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ 8 ตามลำดับ และไลเพสที่ได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 39 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ Wang และคณะ [31] ได้ศึกษาการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจากยีน *YlLIP2* ของ *Y. lipolytica* ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 โดยใช้พลาสมิด pGAPZαA เป็นเวกเตอร์สำหรับการฝากถ่ายยีนและคัดเลือก *P. pastoris* ที่ได้รับพลาสมิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะซีโอซิน พบว่าไลเพสที่ได้มีค่าแอกทิวิตีที่สูงสุดเท่ากับ 13,500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ 8 ตามลำดับ เช่นเดียวกับไลเพสที่ผลิตจาก *Y. lipolytica* โดยตรง แต่ไลเพสที่ได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 37 กิโลดาลตัน ซึ่งต่างจากไลเพสที่ผลิตจาก *Y. lipolytica*

จากการศึกษาข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสใน *P. pastoris* มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของยีนไลเพสและชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการฝากถ่ายยีน ดังแสดงในตารางที่ 2 กล่าวคือ สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของไลเพสจาก *C. parapsilosis* ได้ถึง 60 เท่า [27] เมื่อใช้พลาสมิด pPIC 9K ในการถ่ายยีนไลเพสเข้าสู่ *P. pastoris* ในขณะเดียวกัน การแสดงออกของไลเพสจาก *Y. lipolytica* ใน *P. pastoris* เมื่อใช้พลาสมิด pPICZαA ในการฝากถ่ายยีนยังคงใกล้เคียงกับไลเพสที่ได้จาก *Y. lipolytica* โดยตรง ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 21300 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน [32] และไม่สามารถเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของไลเพสจาก *C. rugosa* และ *Y. lipolytica* ใน *P. pastoris* เมื่อใช้พลาสมิด pGAPZαA ในการฝากถ่ายยีนกับการแสดงออกของไลเพสจาก *C. rugosa* และ *Y. lipolytica* โดยตรงได้ เนื่องจากยังไม่มีรายงานค่าแอกทิวิตีของไลเพสที่ได้จาก *C. rugosa* และ *Y. lipolytica* โดยตรง สำหรับการแสดงออกของยีนไลเพสที่ได้จาก *B. thermocatenulatus* โดยตรงพบว่าไลเพสที่ได้มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 29 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งในการวัดค่าแอกทิวิตีดังกล่าวใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยมี *p*-nitrophenylpalmitate เป็นซับสเตรท [33] ต่างจากการวัดแอกทิวิตีของไลเพสที่ผลิตจาก *P. pastoris* ซึ่งใช้วิธี pH-stat โดยมีไตรบิวทีรินรินเป็นซับสเตรท ดังนั้นจึงไม่สามารถนำค่าแอคทิวิตีดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันได้

ตารางที่ 2 สรุปการแสดงออกของยีนไลเพสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ใน *P. pastoris*

แหล่งที่มาของยีนไลเพส	พลาสมิด	แอกทิวิตีของไลเพส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	แอกทิวิตีจำเพาะที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	หมายเหตุ
C. parapsilosis	pPIC 9K	-	74 ± 8	60	วัดแอกทิวิตีด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ไตรโอเลอินเป็นซับสเตรท
B. thermocatenulatus	pPICZαA	-	23,000	-	วัดแอกทิวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยใช้ไตรบิวทีรินเป็นซับสเตรท
C. rugosa	pGAPZαA	14,000	-	-	วัดแอกทิวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท
Y. lipolytica	pPICZαA	12,500	19,880	1	วัดแอกทิวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท
Y. lipolytica	pGAPZαA	13,500	-	-	วัดแอกทิวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท

การนำไลเพสจากจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารชะล้าง

ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมากเนื่องจากไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติหลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงมีการนำไลเพสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย รวมถึงอุตสาหกรรมการผลิตสารชะล้างกว่า 40 ปี ที่ผ่านมามีการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารชะล้างอย่างแพร่หลาย ทั้งที่ใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรม เช่น น้ำยาล้างจาน ผงซักฟอก น้ำยาซักแห้ง และน้ำยาฟอกหนัง เป็นต้น เอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสารชะล้าง ได้แก่ เอนไซม์โปรตีเอส ไลเพส เซลลูเลส และอะไมเลส โดยไลเพสจะทำหน้าที่ในการย่อยสลายคราบไขมันต่างๆ เช่น น้ำมัน เนย หรือน้ำสลัด การเติมไลเพสลงไปในสารชะล้างจะช่วยลดปริมาณสารเคมีที่ถูกเติมลงในสารชะล้าง ซึ่งอาจตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทำให้ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในภายหลังได้ โดยที่ไลเพสไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม และไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีความเสถียรและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งเป็นสภาวะปกติของสารชะล้างยิ่งไปกว่านั้นการผลิตสารชะล้างที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบยังใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย สามารถปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ และมีการปล่อยแก๊สเรือนกระจกในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้เอนไซม์ที่เติมลงไปยังสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้หลังจากที่ขจัดคราบไขมันออกไปแล้ว และสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ อีกทั้งสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำทำให้ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน [34, 35]

นอกจากเอนไซม์แล้ว สารชะล้างยังมีส่วนประกอบอื่น เช่น โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต (sodium tripolyphosphate) โซเดียมแอลเคนซัลฟอเนต (sodium alkane sulphonate) โซเดียมเพอร์บอเรตเตทตระไฮเดรต (sodium perborate tetrahydrate) โซเดียมเพอร์คาร์บอเนต (sodium percarbonate) โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate) โซเดียมคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (Sodium carboxymethyl cellulose) โซเดียมพอลิอะคริเลต (sodium polyacrylate) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) โซเดียมเมต้าซิลิเกต (sodium metasilicate) สารเรืองแสง สารควบคุมการเกิดฟอง และน้ำหอม ซึ่งพบว่าสารบางชนิดที่เติมลงในสารชะล้างมีผลทำให้ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง จึงได้มีการปรับปรุงวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับเอนไซม์ เช่น มีการเติมสารบางอย่างเพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับเอนไซม์ นั่นคือสารกลุ่มนอนไอออนิคพอลิเมอร์ [34, 36] ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีการจดสิทธิบัตรมากมายเกี่ยวกับการผลิตสารชะล้างที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบ เช่น สิทธิบัตรเกี่ยวกับปริมาณของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ใช้เติมเป็นส่วนประกอบในสารชะล้าง หรือสิทธิบัตรเกี่ยวกับการเติมสารบางชนิดเพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของสารชะล้าง เป็นต้น

สรุป

ไลเพสจากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่กำลังเป็นที่ต้องการเป็นอย่างมาก เนื่องจากไลเพสจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลาย จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตสารชะล้างที่มีการเติมไลเพสลงไปเป็นส่วนประกอบหนึ่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของสารชะล้าง และลดปริมาณสารเคมีที่เติมลงในสารชะล้างที่อาจตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามพบว่าไลเพสที่ผลิตได้ในปัจจุบันมีราคาสูง ดังนั้น ที่ผ่านมาจึงได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไลเพสทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพด้วยวิธีการต่างๆ ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมและจุลินทรีย์ที่มีระบบการแสดงออกที่เหมาะสมกับการแสดงออกของไลเพส คือ *P. pastoris* เนื่องจากสามารถสกัดโปรตีนที่ *P. pastoris* ผลิตออกมาใช้ได้สะดวก และ *P. pastoris* ยังสามารถผลิตโปรตีนที่มีการม้วนพับถูกต้องและผ่านกระบวนการการปรับแต่งหลังทรานสเลชัน และสามารถปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ดียังคงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบจากการใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมควบคู่กันไป เนื่องจากหากมีการผลักดันการใช้เทคโนโลยีนี้โดยไม่มีการวางแผนที่ดีอาจทำให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศน์ทางธรรมชาติได้

เอกสารอ้างอิง

1. Pernas, M. A., Lopez, C., Pastrana, L., and Rua, M. L. 2000. Purification and Characterization of Lip2 and Lip3 Isoenzymes from a *Candida rugosa* Pilot-Plant Scale Fed-Batch Fermentation. *Journal of Biotechnology* 84: 163-174.
2. Harwood, J. 1989. The Versatility of Lipases for Industrial Uses. *Trends in Biochemical Sciences* 14: 125-126.
3. Jaeger, K. E., and Reetz, M. T. 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. *Trends In Biotechnology* 16: 396-403.
4. Maia, M. M. D., Heasley, A., de Morais, M. M. C., Melo, E. H. M., Morais Jr., M. A., Ledingham, W. M., and Lima Filho, J. L. 2001. Effect of Culture Conditions on Lipase Production by *Fusarium solani* in Batch Fermentation. *Bioresource Technology* 76: 23-27.
5. วราภรณ์ มลิลาศ. 2549. การคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันของราที่ย่อยลิปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
6. Ribeiro, B. D., de Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., and Freire, D. M. G. 2011. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research* Epub doi: 10.4061/2011/615803.
7. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล ธนธร วิทิตศานต์ และ อเนก โสภณ. 2555. ความหลากหลายของจุลินทรีย์ไลโปไลติกบนเกาะสีชัง. ได้จาก: http://sichang.webatu.com/index.php/sichang-project-research1/sichang-project-18. 14 กุมภาพันธ์ 2556.

8. Schmidt-Dannert, C. 1999. Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7: 2123-2130.
9. Chen, G. H., Yin, L. J., Chiang, I. H., and Jiang, S. T. 2007. Expression and Purification of Goat Lactoferrin from *Pichia pastoris* Expression System. *Journal of Food Science* 72: 67-71.
10. Cregg, J. M., Vedvick, T. S., and Raschke, W. C. 1993. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris. Biotechnology* 11: 905-910.
11. Macrae, A. R. 1983. Extracellular Microbial Lipases. In: Fogarty, W. M., Editors. Microbial Enzymes and Biotechnology. New York. Applied Science Publishers. p. 225-250.
12. Corkill, J. Triacylglycerols (TAGs), Soaps and Detergents at the Molecular Level. Available from: http://chemistry.ewu.edu/jcorkill/biochem/soap2000.html. 28 April 2013.
13. Huang, A. H. C. 1984. Plant Lipase. In: Borgstrüm, B., and Brockman, H.L., Editors. Lipase. Amsterdam. Elsevier. p. 419-442.
14. Wong, D. W. S. 1995. Food Enzyme: Structure and Mechanism. New York. Chapman & Hall. p. 170-200.
15. Gaoa, X. G., Cao, S. G., and Zhang, K. C. 2000. Production, Properties and Application to Nonaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas* Strain. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 74-82.
16. Fungthong, S. 2001. Production of Lipase-Producing Microorganisms for High Fat Wastewater Treatment. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University. Bangkok. Kasetsart University.
17. Sztajer, H., Maliszewska, I., and Wieczorek, J. 1998. Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi, and Actinomycetes. *Enzyme Microbial Technology* 10: 492-497.
18. Boonsinthai, B., and Phutragul, S. 1999. Effect of Metal Ions, Inhibitors and Denaturants on Extracellular Lipases from Three Thermophile Isolates and Their Clones. *Journal of Science, Faculty of Science, Chiang Mai University* 26: 1-11.
19. Pandey, A., Benjamint, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger N., and Soccol, V. T. 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29: 119-131.
20. Mayordomo, I., Randez-Gil, F., and Prieto, J. A. 2000. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans. Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 105-9.
21. Godtfredsen, S.E. 1990. Microbial Lipases. In: Fogarty, W.M., and Kelly, E.T., Editors. Microbial Enzymes and Biotechnology. Amsterdam. Elsevier. p. 255-274.

22. Jallouli, R., Khrouf, F., Fendri, A., Mechichi, T., Gargouri, Y., and Bezzine, S. 2012. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline (Phospho) Lipase from a Newly Isolated *Fusarium solani* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168: 2330-2343.
23. Jallouli, R., Fendri, A., Mechichi, T., Gargouri, Y. T., and Bezzine, S. 2013. Kinetic Properties of a Novel *Fusarium solani* (Phospho) Lipase: A Monolayer Study. *Chirality* 25: 35-38.
24. Boonvitthya, N., Tanapong, P., Kanngan, P., Burapatana, V., and Chulalaksananukul, W. 2012. Cloning and Expression of the *Aspergillus oryzae* Glucan 1,3-Beta-Glucosidase A (exgA) in *Pichia pastoris. Biotechnology Letters* 34: 1937-1943.
25. Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. 2000. Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris. FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66.
26. Delroisse, J. M., Dannau, M., Gilsoul, J. J., El Mejdoub, T., Destain, J., Portetelle, D., and Thonart, P. 2005. Expression of a Synthetic Gene Encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris. Protien Expression and Purification* 42: 286-94.
27. Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., and Dubreucq, E. 2004. High-Level Expression of *Candida parapsilosis* Lipase/Acyltransferase in *Pichia pastoris. Journal of Biotechnology* 111: 41-50.
28. Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. 2003. High-Level Expression of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some Properties of the Recombinant Lipase. *Protein Expression and Purification* 28: 102-110.
29. Zhao, W., Wang, J., Deng, R., and Wang, X. 2008. Scale-Up Fermentation of Recombinant *Candida rugosa* Lipase Expressed in *Pichia pastoris* Using the GAP Promotor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 189-195
30. Yu, M., Lange, S., Richter, S., Tan, T., and Schmid, R. D. 2007. High-level expression of Extracellular Lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its Purification and Characterization. *Protein Expression and Purification* 53: 255-263.
31. Wang, X., Sun, Y., Ke, F., Zhao, H., Liu, T., and Xu, L. 2012. Constitutive Expression of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Pichia pastoris* Using GAP as Promoter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166: 1355-1367.
32. Yu, M., Qin, S., and Tan, T. 2007. Purification and Characterization of the Extracellular Lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica. Process Biochemistry* 42: 384-391.
33. Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., StGcklein, W., Menge, U., and Schmid, R. D. 1994. Screening, Purification and Properties of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermocatenulatus. Biochimica et Biophysics Acta* 1214: 43-53.

34. Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., and Hameed, A. 2010. Enzymes Used in Detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology* 9: 4836-4844.
35. Palkhiwala, P. 2010. Enzymes for Detergent. Available from: http://www.mapsenzymes.com/Enzymes_Detergent.asp. 1 February 2013.
36. Hessel, J. F., Cardinali, M. S., and Hessel, J. F. 1990. Stabilized Lipolytic Enzyme-Containing Liquid Detergent Composition. United State Patent No. 4908150.

ได้รับบทความวันที่ 10 เมษายน 2556
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 29 เมษายน 2556