LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
5 SEP 1996

# STUDIES OF LIPASE EXPRESSED IN *E.COLI* FROM A CLONED GENE OF A THERMOPHILIC BACTERIUM AND FROM A SYNTHETIC GENE OF *PSEUDOMONAS FRAGI*

SITTIRUK ROYTRAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
S628a
1996

36145

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อนและจากการโคลนยีนสังเคราะห์ของไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* ในเชื้อ *E.coli*

ผู้วิจัย สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ประหยัด โกมารทัต, Ph.D.

ยงยุทธ ยุทธวงศ์, D.Phil.

วรชาติ สิรวราภรณ์, ปร.ด.

วันที่สำเร็จการศึกษา 6 มีนาคม พ.ศ. 2539

## บทคัดย่อ

ยีนสำหรับสร้างเอ็นไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ TL71 ถูกตัดต่อเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 และถูกแสดงออกในเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* พบว่าโคลน pUCTL71-1 สามารถสร้างเอ็นไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณสูง วิทยานิพนธ์นี้กล่าวถึงการทำให้เอ็นไซม์นี้บริสุทธิ์โดยผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอ็นไซม์สะสมอยู่ลงในคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสซีแอลสี่บี และคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอ็นไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 276 เท่า มีปริมาณ activity หลงเหลือเป็น 68.8% และมี specific activity เท่ากับ 11,452 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อทำการศึกษาขนาดของเอ็นไซม์นี้โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี 100 พบว่ามีขนาดใหญ่กว่า 100,000 ดาลตัน แต่มีขนาด 38,000 ดาลตัน เมื่อทำการวิ่งวุ้นโพลีอะคริละไมด์ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ และยังค้นพบต่อไป อีกว่า แถบโปรตีนขนาด 38,000 ดาลตันที่ได้หลังการวิ่งวุ้นโพลีอะคริละไมด์เท่านั้นจึงจะแสดงสมบัติของเอ็นไซม์ไลเปสหลังจากกำจัด SDS ออกจากแผ่นวุ้นแล้ว จึงสรุปได้ว่าเอ็นไซม์ไลเปสนี้เป็น โมเลกุลเดี่ยวที่มีขนาด 38,000 ดาลตัน ซึ่งจะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนขนาดใหญ่

Copyright© by Mahidol University

กว่า 100,000 ดาลตัน ในภาวะที่ไม่มี SDS อย่างไรก็ตามเอ็นไซม์นี้ยังคงแสดงสมบัติของเอ็นไซม์ไลเปส โดยการย่อยโมเลกุลของสับสเตรทชนิดน้ำมันมะกอกหรือ *p*-NPP ทั้งเอ็นไซม์ที่อยู่ในรูปโมเลกุลเดี่ยวหรือเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน นอกจากนี้ยังพบว่า เอ็นไซม์นี้มีค่า *pI* เท่ากับ 7.75 และเสถียรในช่วง pH 8-12 ส่วนผลของอุณหภูมิพบว่า เอ็นไซม์นี้เกิดปฏิกริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและทนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลากว่า 5 วัน โดยยังคงมี activity เหลืออยู่สูงถึง 65% แต่ activity ของเอ็นไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 68 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการศึกษาผลของ สารเคมีต่อ activity ของเอ็นไซม์พบว่า activity ของเอ็นไซม์จะลดลง 17% เมื่อมี PMSF อยู่เป็นปริมาณ 10 mM แต่ EDTAที่ความเข้มข้น 10 mM ไม่มีผลต่อ activity ของเอ็นไซม์เลย แสดงว่ากรดอะมิโนเซรีนอาจเกี่ยวข้องกับ active site ของเอ็นไซม์ และไม่ว่า EGTA หรือ $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 10 mM ก็ไม่มีผลต่อ activity ของเอ็นไซม์ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เอ็นไซม์ไลเปสนี้ไม่มีส่วนจับแคลเซียมประกอบในโมเลกุล นอกจากนี้ยังมีผลการทดลองที่แสดงว่า activity ของเอ็นไซม์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อมี 4% Triton X-100 หรือ 3M ยูเรียผสมอยู่ และ activity ของเอ็นไซม์จะลดลงทันทีที่มี SDS เข้มข้นมากกว่า 1%

สายยีนสังเคราะห์สำหรับเอ็นไซม์ไลเปส (JPLip1) ได้ถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นโดยมีพื้นฐานจากลำดับกรดอะมิโนของเชื้อซูโดโมแนสฟราจี สายพันธุ์ IFO 3458 แต่จากการตรวจสอบพบว่า ลำดับเบสบนสายยีนสังเคราะห์ดังกล่าวยังมีความผิดพลาดอยู่ วิทยานิพนธ์นี้จึงกล่าวถึงการซ่อมแซมสายยีนสังเคราะห์ JPLip 1 จนกระทั่งได้สายยีนสังเคราะห์ JPLip 2 ที่มีลำดับเบสเหมือนกับ JPLip 1 เว้นแต่มีการกลายของเบสที่ตำแหน่ง 156 จาก A เป็น G และตำแหน่ง 172 จาก T เป็น A ซึ่งการกลายดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ตามที่ออกแบบไว้แต่แรก

สายยีนสังเคราะห์ JPLip 2 สามารถผลิตโปรตีนในเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านชนิด *Escherichia coli* สายพันธ์ JM 109 ภายใต้การควบคุมของยีน *lac* Z ที่เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK+ คิดเป็นปริมาณ 12% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ โปรตีนที่ผลิตได้นี้จะสะสมอยู่ในโซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้านในรูปของอินคลูชั่นบอดี้ ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 19,000 ดาลตัน เท่ากับขนาดของโปรตีนที่ออกแบบไว้ (14,643 ดาลตัน) รวมกับปลายอะมิโนของเอนไซม์เบตา-กาแลคโตไซเดส และที่สำคัญคือ เอนไซม์นี้อยู่ในรูปที่ไม่มี activity จึงต้อง

Copyright by Mahidol University

ใช้กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์, ยูเรีย และ CTAB เพื่อละลายเอ็นไซม์ออกมาจากอินคลูชั่นบอดี้ และทำให้เอนไซม์คืนสู่สภาพที่มี activity ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเอ็นไซม์ที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวโดยใช้ CTAB จะมี activity สูงกว่าที่ใช้ยูเรียหรือกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ และเอ็นไซม์ที่ผ่านกระบวนการคืนสภาพโดยใช้ CTAB จะมี activity สูงกว่าเอนไซม์ตัวเดียวกันที่แสดงออกโดยสายยีนธรรมชาติกว่า 3.7 เท่า

Copyright by Mahidol University

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Studies of Lipase Expressed in *E.coli* from a Cloned Gene of a Thermophilic Bacterium and from a Synthetic Gene of *Pseudomonas fragi* |
| Name | Sittiruk Roytrakul |
| Degree | Master of Science (Biochemistry) |
| Thesis Supervisory Committee | |
| | Prayad Komaratat, Ph.D. |
| | Yongyuth Yuthavong, D.Phil. |
| | Worachart Sirawaraporn, Ph.D. |
| Date of Graduation | 6 March B.E. 2539 (1996) |

# ABSTRACT

The gene encoding extracellular lipase-producing thermophile, TL71, has been constructed and expressed in *Escherichia coli* by using pUC18 expression vector with the *lac*Z promoter. The pUCTL71-1 clone secreted highly active lipase in the cultivation medium. The extracellular lipase was purified from the supernatant by sequential column chromatography on Phenyl Sepharose CL-4B and DEAE-cellulose (DE-52). The final product, a protein with an Mr of 38,000 by SDS-PAGE, was purified nearly 276-fold from the original cell-free supernatant in a yield of about 69% and the specific activity of the purified enzyme was 11,452 unit/mg protein. SDS-PAGE and lipase activity stained gel (zymogram) of purified lipase revealed one enzymatically active protein band corresponding to a molecular weight of 38,000 Da indicating that the enzyme was catalytically competent as a monomer, The single subunit of lipase was capable of aggregation as indicated by presence of >100,000 Da protein on Sephadex G-100 gel filtration and exhibited lipase activity as measured with the insoluble substrate, olive oil, and with soluble substrate, *p*-nitrophenyl palmitate. The isoelectric point of the lipase, as determined by means of isoelectric focusing, was found to be 7.75. The enzyme had an optimum temperature of 45°C, when olive oil was used as the

substrate. It was stable at a broad pH range of 8 to 12. The enzyme retained 65% of its total activity even after incubation at 55°C for 5 days. Rapid loss of enzyme activity was observed above 68°C. Lipase activity was inhibited by 17% in the presence of 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and was not inhibited by 10 mM of the chelating agent ethylenediaminetetraacetate (EDTA), indicating the possible involvement of a serine residue in the active site of this enzyme. The lipase was neither inhibited by 10 mM ethyleneglycol-bis[-aminoethylether]-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) nor activated by 10 mM calcium chloride suggesting that a calcium binding site did not exist. Enzyme activity was significantly enhanced 2-fold by 4%Triton X-100 and 3M urea, and strongly inhibited by 1% and greater of sodium dodecylsulfate (SDS).

Based on the known (135 residues) amino acid sequences of *Pseudomonas fragi* IFO3458 lipase, a 434 bp gene was designed, and assembled from eight synthetic overlapping DNA fragments. The JPLip1 construct was found to contain a number of errors. This synthetic gene was therefore corrected. The resulting construct, JPLip2, has the same nucleotide sequence as JPLip1, except two point mutations at base position 156 (A to G) and at base position 172 (T to A). For expression in bacteria, the lipase-encoding gene (JPLip2) was inserted into the *lacZ* gene fragment contained in the small expression vector, pBluescript $SK^+$, and cloned into the *Escherichia coli* JM109. Expression of this construct yielded a protein approximately 19,000 in size, equivalent to expected protein, with an Mr of 14,643, plus 43 additional amino acids of β-galactosidase at the N-terminus. It was found that the high-level expression of this synthetic gene in *E.coli* JM109 resulted in its cytoplasmic deposition as biologically inactive and insoluble inclusion bodies, equivalent to 12 % of total cell protein. The expressed lipase was solubilized from inclusion bodies using either 6 M guanidinium hydrochloride (GuHCl), 8 M urea or by a cationic detergent, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The refolding efficiency resulting in final yield of purified expressed lipase was in the order of CTAB > urea > GuHCl. The refolded JPLip2 lipase also showed 3.7-fold greater lipolytic activity than that of native *Pseudomonas fragi* IFO3458 lipase.

Copyright by Mahidol University