

วิจารณผลของการทดลอง

Hofstee (๑๘๕๖) พบร้า ใน homogenate ที่เตรียมใหม่ ๆ จากตับอ่อนของหมู จะให้ activity ของเอสเทอเรส noisy ต่อเมื่อหั่นไว้ activity จะเพิ่มขึ้น ปรากฏว่า เอสเทอเรสจากกรามีสกัดจาก homogenate ที่เตรียมใหม่ ๆ ก็ให้ activity น้อยกว่า เมื่อหั่น homogenate ไว้ ๔๐ ชั่วโมงประมาณ ๖๐ นาที เช่นกันทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า จะต้องอาศัยเวลาการแยกเพื่อให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพจาก inactive เอนไซม์ (zymogen) มาเป็น active เอนไซม์ หรืออาจเป็นเพราะว่า มีหมู่ของสารบางอย่างบัง active site อยู่ (particulate matter) ต่อเมื่อให้เวลาการแยก สภาพที่เป็นส่วนของ active site ของเอนไซม์ได้แตกคัดสลายมากขึ้น ทำให้ substrate สามารถรวมกับเอนไซม์ได้เต็มที่ แต่ถ้าหั่น homogenate ไว้นานเกินไป ปรากฏว่า activity ของเอนไซม์กลับลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า เมื่อไก่เอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาเต็มที่แล้ว เอนไซม์เป็นสารที่ไวต่อการสูญเสีย จึงถูกทำลาย activity ไป แม้ว่าการเก็บเอนไซม์ที่ - ๒๐° ซ. ก็สามารถทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลงได้

Gjessing and Clements (๑๘๕๘) ทดลองเกี่ยวกับผลของ ionic strength ที่มีต่อเอสเทอเรสและไอบีสจากตับอ่อน และสรุปว่าถ้าเพิ่มเกลือลงไปใน incubation mixture จะทำให้ ionic strength เพิ่มขึ้น การเพิ่มของ ionic strength นี้ โดยทั่วไปทำให้แรงดึงดูดระหว่างโปรตีนไม่เดbuldin อย่างดี จากการทดลองของเขานั้น มีเกลือที่เป็นกลางบางอย่างสามารถเพิ่ม activity ของเอนไซม์ได้ แต่เกลือเป็นกลางบางอย่าง กลับทำให้activity ของเอนไซม์ลดลง ซึ่งในสาเหตุหลักนี้ มีเกลือโซเดียมคลอไรด์รวมอยู่ด้วย ไอบีสจากกรามีสกัดคุณภาพ ๐.๙ % ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ปรากฏว่า ไอบีส activity ของไอบีส noisy กว่าสกัดด้วยน้ำเดือนอยู่ด้วยเช่นกัน

เօสเทอเรสท์สกัดจากปีสค์ และความเนื้อหน้นไว้ก่อความร้อน, ที่ ๘๐°ซ. จะทำลายเอนไซม์โคห์นด Downey and Andrews (๑๙๖๕) พบว่า skinned milk esterase ชั้งแยกโดยวิธี gel filtration เมื่อให้ความร้อน ๖๐ - ๘๐°ซ. ๒ นาที activity ของเอนไซม์จะลดลง เพียง ๑๐ - ๖๐ % ซึ่งทำให้เข้าสู่ปัวใน skinned milk มีเօสเทอเรสอยู่เพียง ๒๐ % นอกนั้นเป็น nonenzymatic protein และพวงสารไม่เดาถูกทำอ่อน ๆ การที่ p - Nitrophenyl acetate สามารถถูกไออกอิลส์ ด้วย nonenzymatic protein ไคน์ทรับกันผ่านแล้ว แท็กยังนิยมใช้ p - Nitrophenyl acetate เป็น substrate ของเօสเทอเรส เพราะอาจจะทดสอบไอยอาศัยการไว้ก่อความร้อน ว่าการไออกอิลส์ ไอกีลของ p - Nitrophenyl acetate นั้น เนื่องมาจากเอนไซม์หรือ non - enzyme ใน การทดสอบเกี่ยวกับเօสเทอเรสจารганน์ ก็ตาม ไกว่า การไออกอิลส์ ของ p - Nitrophenyl acetate นั้น เนื่องมาจากเอนไซม์ เพราะว่าเมื่อให้ความร้อนกับเอนไซม์ไม่สูงนัก ก็สามารถทำลาย activity ของเอนไซม์โคห์นด์ เก็บ หมัด เก็บ ความร้อน ๖๐°ซ. ๒ นาที จะทำลายเอนไซม์โคห์นด์ถึง ๙๐ %

Aldridge (๑๙๖๓ a,b) พบว่า ชีร์รัมเօสเทอเรสจากสัตว์หลาย ๆ ชนิด มี optimum pH ออยู่ในราوا ๗.๔ แต่ Wilde and Kekwick (๑๙๖๔) พบว่า ชีร์รัมเօสเทอเรสจากคน มี optimum pH ประมาณ ๘.๔ แต่ใน การทดสอบทาง ๆ ของเข้า ก็ยังคงไว้ pH ๗.๔ ออยู่ เพราะที่ pH ๘.๔ นั้น p - Nitrophenyl acetate จะถูกไออกอิลส์ได้เร็วในสภาพที่ไม่มีเอนไซม์ sh, Laval and Rahim (๑๙๖๗) พบว่า optimum pH ของเօสเทอเรสที่สกัดจาก Nocardia Restrictus เทากับ ๔.๐ ซึ่งจะเห็นว่าเօสเทอเรสจากแหลงกำเนิดทาง ๆ กัน มี optimum pH แตกต่างกันด้วยหรือไม่แม้แต่เป็นแหลงกำเนิดเดียวกัน ตามมาจากสัตว์คนละ species ก็อาจให้ optimum pH ผิดไป ส่วน optimum pH ของเօสเทอเรสจารган์อยู่ในราوا pH ๘.๔ ขึ้นไป การที่ค่า optimum pH ของเօสเทอเรสมีช่วงกว้าง อาจเนื่องมาจากการเป็นสมบัติไอยเนพะของเอนไซม์ หรือ เพราะว่าเอนไซม์ที่สกัดได้เป็นเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ก็ได้

สำหรับ optimum pH ของไลเปสจากร่านน์ อยู่ในระหว่าง ๖.๐ - ๗.๐ ซึ่งก็เป็นช่วงกว้างเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุเดียวกันกับที่มิยาจิ ใบอนุรักษ์เอสเทอเรส optimum pH นี้ ก็คือกับไลเปสจากแผลงกำเนิดตอน ๗ เดือน Will (๑๙๔๘) พบว่า optimum pH จากไลเปสของตับอ่อนอยู่ประมาณ ๗.๘ ใน การทดลองนี้เขาใช้ olive oil emulsion เป็น substrate แต่ในไลเปสจากตับอ่อนแผลงกำเนิดเดียวกันนี้ Archibald (๑๙๕๖) ได้เคยศึกษาโดยใช้ Tween ๒๐ เป็น substrate พบว่า optimum pH ของไลเปสคือ ๖.๔ ซึ่งจะเห็นว่า แม้ว่าจะเป็นไลเปสจากแผลงกำเนิดเดียวกัน ถ้าใช้ substrate กันจะเป็นตัวเดียวกันนี้ optimum pH ทางกัน นอกจากนี้ optimum pH ของไลเปสยังแตกต่างกันตามแผลงกำเนิดต่าง ๆ กันด้วย เช่น จาก adipose tissue มี optimum pH ๗.๔ (Vangham, Berger and Steinberg, ๑๙๖๔) จากตับไส้เล็ก เทากัน ๔.๐ (Dinella, Meng and Park, 1960)

Dimella et al (1960) ยังได้ศึกษาความทนทานของไลเปสจากตับไส้เล็ก pH ทาง ๆ เกณฑ์ ๗๐-๘๐. เอนไซม์จะเสีย activity ไปภายใน ๑๐ นาที ถ้าให้อยู่ใน buffer pH น้อยกว่า ๕.๐ หรือมากกว่า ๗๐.๐ แต่เมื่อให้ความร้อนกับเอนไซม์ถึง ๕๕๐ ๙๐๐ นาที เอนไซม์ยังคงมี activity อยู่ เมื่อให้อยู่ใน buffer pH ๗.๐ ใน การทดลองหลาย ๆ กันนี้กับเอสเทอเรสจากตับ พบว่า activity ของเอสเทอเรสจะเสียไปถึง ๖๖ % เมื่อแขวนใน pH ๗.๐ เพียง ๑๐ นาที ที่อุณหภูมิ ๓๐๐ ๙๐๐ และที่เวลาเดียวกันนี้ ถ้าให้เอสเทอเรสแขวนอยู่ใน buffer pH ๖ - ๗ ดาว เอนไซม์จะเสียไปได้เพียง ๔๖ % เมื่อให้อยู่ใน pH ๗.๐ (๗.๐ - ๘.๐) จะทำให้ charge ในโมเลกุลของเอนไซม์เปลี่ยนไปซึ่งเป็นเหตุให้สมบัติบางอย่างของเอนไซม์เปลี่ยนไปด้วย เช่น ลดสภาพการเป็นเอนไซม์คง และเมื่อทำให้เอนไซม์กลับคืนสู่สภาพ optimum pH อีกครั้งหนึ่ง คือในขณะหา activity ของเอนไซม์นั้น นั้นในสามารถกลับคืน activity ให้เหมือนเดิมได้หมด และความสามารถกลับคืน activity นี้ จะมีได้ไม่เทากัน

ต่างๆ กับ buffer pH ต่างกัน

ส่วนในด้าน activity ของเอสเทอเรสที่สกัดจากราก พบ *p-Nitrophenyl acetate* พมว่า มีตราเร็วของปฏิกิริยาสูงน้อยกว่า เอสเทอเรสที่สกัดจาก *Nocardia Restrictus* ที่มี Km เท่ากับ 4.5×10^{-5} มิลลิกรัม ของ *p - Nitrophenyl acetate* (Sih et al., ๑๙๖๓) เพราะเอสเทอเรสจากราก มีค่า Km ประมาณ 4.0×10^{-5} มิลลิกรัม ของ *p - Nitrophenyl acetate* แต่เอสเทอเรสที่สกัดจากยีสต์และกล้ามเนื้อกระต่าย มีตราเร็วน้อยกว่า คือ มีค่า Km ประมาณ $5.0 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ มิลลิกรัม ของ *p - Nitrophenyl acetate*

(Taylor and Meriwether, ๑๙๖๓) แต่ค่า Km ของไลเปสที่สกัดได้ตามวิธีนี้ ได้คาดว่าไม่แน่นอน ซึ่งเห็นได้ว่าต้องปรับปรุงวิธีทำเกี่ยวกับการศึกษาธรรมชาติของไลเปส ทั้งในด้านการเตรียมเอนไซม์ ให้ได้ activity สูง และในด้านการเตรียม substrate ให้มีความเข้มข้นของ emulsion สูงกว่ามาก ๆ

Herggin and Lapides (๑๙๕๗) ผู้เริ่มทดลองใช้ *p - Nitrophenyl acetate* เป็น substrate ของเอสเทอเรส ก็ยังทราบไม่แน่นอน ว่า เอสเทอเรสที่สกัดได้ มีชนิดเดียวกับหรือคล้ายชนิด Aldridge, (๑๙๕๓) จึงได้พยายามแยกชนิดของเอสเทอเรส โดยใช้ organic phosphate compound เช้าทัดลองกับเอสเทอเรสที่สกัดจากธรรมชาติของหมู และได้แยกเอสเทอเรสออกเป็น ๒ ชนิด คือ เอสเทอเรสนิค A เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไคลอฟอฟฟิค organic phosphate compound ที่มีชื่อว่า Di-isopropyl fluoro phosphate เช่นเดียวกับ DFP หรือ E ๖๐๐ แท้ในถูกห้ามปฏิกิริยาโดยสารตัวนี้ และแยกเป็นเอสเทอเรสนิค B เมื่อสามารถไฮโดรไคลอฟอฟฟิค E ๖๐๐ และถูกห้ามปฏิกิริยาโดยสารตัวนี้ด้วย การทึบแสงของเดียวตนี้เป็นไปอย่างกว้างขวาง นาเสียหายที่ไม่สามารถหา E ๖๐๐ มาทดสอบได้ จึงไม่สามารถแบ่งชนิดของเอสเทอเรสจากรากได้ แต่จากการศึกษาตัวเอดปฎิกิริยาต่าง ๆ พอบรุ่งนภาที่บกม. เอสเทอเรสจากเหลืองกำเนิดอ่อน ๆ ได้ คังกอกไปนี้

เอสเทอเรสจากเหลืองกำเนิดแบบทุกอย่าง มี sulfhydryl group (-SH) เป็น active site ที่น้ำเพรำภูกามปฏิกิริยาด้วย iodoacetic

acid หรือบุพันของมัน ได้ *iodoacetamide* (Aldridge, 1953 ; Taylor and Meriwether, 1963 ; Wilde and Kekwick, 1964) แต่ก็เมื่อถูกห้ามปฏิกิริยาด้วย *iodoacetamide* เน้นเอสเทอเรสที่สกัดจาก

Nocardia Restrictus (Sih, et al., ๑๙๖๓) เอสเทอเรสจากรากถูกห้ามปฏิกิริยาด้วย *iodoacetamide* ด้วยเช่นกัน เช่น ๐.๐๓ มิลลาร์ของ *iodoacetamide* จะห้ามปฏิกิริยาได้ ๖๕ % และที่ ๐.๐๘ มิลลาร์จะห้ามปฏิกิริยาได้ ๘๔ % แสดงว่ามี-SH เป็นหนึ่ง active site ด้วย

ตามปกติแล้ว เอ็นไซม์ส่วนมากถูกห้ามด้วยโลหะหนัง เช่นปี Roth เป็นต้น เอสเทอเรสส่วนมากก็เช่นกัน และปรากฏว่าเอสเทอเรสจากรากห้าม *activity* โดย mercuric chloride เช่นเดียวกับเอสเทอเรสจากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ (Aldridge, ๑๙๕๓ ; Sih, et al., ๑๙๖๓ ; Taylor and Meriwether, ๑๙๖๓) นอกจากนี้เอสเทอเรสจากรากยังถูกห้ามปฏิกิริยาด้วย

p - Nitrobenzoic acid, sodium arsenite, potassium thiocyanate และ potassium fluoride สำหรับ p - Nitrobenzoic acid นั้นเป็นสูตรคล้ายกับ p - Nitrophenyl acetate ดังนั้นอาจจะทำให้เป็น competitive inhibitor ก็ได้ ส่วน arsenite, fluoride และ thio-cyanate นั้นปรากฏว่าไม่สามารถห้ามปฏิกิริยาของเอสเทอเรสจากชิรน (Wilde and Kekwick, 1964) จาก *Nocardia Restrictus* (Sih, et al., 1963) ได้ แต่ไออ่อนทั้ง ๒ นี้ ก็เป็นตัวห้ามปฏิกิริยาของไอลิปส์จาก fat pad (Rizack, ๑๙๖๑) จาก adipose tissue (Lynn and Perryman, ๑๙๖๐) ได้

การศึกษาตัวห้ามปฏิกิริยาของไอลิปส์จากรากยังทำอย่างมากเพียงแค่ ๒ ตัว ก็คือ *iodoacetamide* และ mercuric chloride ซึ่งปรากฏว่าห้ามปฏิกิริยาได้ทั้งสองตัว แสดงว่าไอลิปส์มี-SH เป็น active site และถูกห้ามด้วยโลหะหนังเช่นเดียวกับไอลิปส์จากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ เช่นกัน

การห้ามปฏิกิริยาโดย arsenite หรือ fluoride คล้าย ๆ กับไอลิปส์จากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ นั้น อาจเป็นไปได้ว่า ในการ

สกัดเอสเทอเรสมีไอลิปส์ปนมาด้วย เหราหงคูตางก์ละลายในน้ำได้ และไกท์คลอง ไช้ไลเปสที่อ่อนจากบรินท์ BDH มาก activity โดยใช้วิธีของเอสเทอเรต ปรากฏว่า สามารถให้สีของ p - Nitrophenol เพิ่มขึ้น แม้จะไม่รุดเร็วนักตาม ส่วนมาก activity ของเอสเทอเรสมักไม่เพิ่มขึ้นหรือลดลง เมื่อ จากแกลลิเซียมหรือแมกนีเซียมไอออน เบสเทอเรสจากกรั๊กเซนกัน แม้ว่าจะเพิ่มความ เชนขันของแกลลิเซียมไปจนถึง ๐.๐๙ โนลาร์แล้วก์ตาม แต่สำหรับไอลิปส์แล้ว แกลลิเซียมไอออนสามารถเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้จนถึงความเข้มข้น ๐.๐๔ โนลาร์ ทางก่อความเข้มข้นสูงกว่านี้ อัตราเร็วของปฏิกิริยากลับลดลง ส่วนแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีผลกระทบกระเทือน activity ของไอลิปส์เลย

การที่แกลลิเซียมไอออน สามารถเร่งปฏิกิริยาของไอลิปส์ได้ก็ความเข้มข้นสูง ๆ นี้ อาจเนื่องมาจาก เพราะว่า ionic strength ของ incubation mixture ถูกเพิ่มขึ้น เป็นผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการทดลองของ Gjessing, et al. (๑๙๕๕) ทำการเพิ่ม ionic strength ของ แมกนีเซียมไอออน ไม่มีผลกระทบกระเทือนเหมือนแกลลิเซียมไอออน ถ้าประการหนึ่ง แกลลิเซียมไอออนที่ความเข้มข้นเกิน ๐.๐๐๒ โนลาร์ จะตกตะกอนกับ phosphate buffer เป็นแกลลิเซียมฟอสเฟต ถ้าความเข้มข้นของแกลลิเซียมสูงขึ้น ปริมาณของ buffer ก็จะถูกตกตะกอนมากขึ้น ทำให้ ความเข้มข้นของ buffer ใน incubation mixture น้อยลง ซึ่งอาจมีผลกระทบกระเทือนถึง activity ของไอลิปส์ได้ หรืออาจเป็นเหตุว่า แกลลิเซียมไอออนไปจับกับกรดไขมันอิสระที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ เป็นเกลือแกลลิเซียมของกรดไขมัน ซึ่งไม่ละลายในน้ำ จึงตกตะกอน ออกมานำทำให้สมดุลย์ของปฏิกิริยาเสีย เอนไข่จึงสามารถเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา ให้สูงขึ้นได้

Loeb, et al. (๑๙๕๕) ไกท์คลองเก็บรำโดยใช้ตัวหามปฏิกิริยาดัง ท่อใบสี

๐.๓๑ % ethylene chlorhydrin

๐.๐๓ % sodium cyanide

หนึ่ง วิธีนี้จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันรำไก้ เพราะสามารถกำจัดกรดออกได้ง่ายกว่าน้ำ วิธีการก็สุดๆ

เมื่อพิจารณาดูของตัวห้ามปฏิกิริยาต่าง ๆ เท่าที่ศึกษามา ตัวห้ามปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น iodoacetamide, mercuric chloride หรือ sodium arsenite ก็อาจใช้เก็บรักษาไว้ได้ แต่ในการที่จะนำเอาวิธีนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันรำ มีข้อเสียที่ iodoacetamide ราคาแพง จะทำให้ผลผลิตราคาสูง ส่วนการใช้ mercuric chloride และ sodium arsenite นั้น จะต้องระมัดระวังในการกำจัดสารทั้งสองออกให้หมดจริง ๆ เพราะสารทั้งสองเป็นอันตรายโดยง่าย แม้จะรับประทานเข้าไปเพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

จากการศึกษาทั้งหมดนี้ ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในทางวิทยาศาสตร์ บริสุทธิ์พอสมควร และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันรำได้ ตรงความความมุ่งหมายที่ตั้งไว้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ทั้งสองนั้น ยังมีลักษณะที่อาจจะศึกษาเพิ่มเติมได้อีก เช่น เกี่ยวกับรายละเอียดของธรรมชาติใบเบส ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ทำไว้น้อย หรืออาจจะกวนหาไปถึง การแยกและทำให้เอนไซม์ บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สามารถศึกษาสมบัติของเอนไซม์แต่ละอย่างได้โดยเฉพาะจริง ๆ ผลที่ได้ก็อาจเป็นประโยชน์ นำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมน้ำมันรำได้มากขึ้น。