ผลของการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับเอสเทอเรส

๑. ผลของการแช่น้ำและการ homogenization ในการสกัดเอสเทอเรสจากรำ

ได้ทดลองสกัดเอนไซม์เอสเทอเรสออกจากรำข้าวที่เพิ่งสีใหม่ ๆ โดยการแช่น้ำเฉย ๆ และโดยการ homogenization ด้วย Waring blender แล้วแช่ homogenate นั้นไว้ ใช้ระยะเวลาทดลองต่าง ๆ กัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ๑ จะเห็นได้ว่า เอนไซม์เอสเทอเรสนี้ สกัดจากรำได้ง่าย เพียงแต่แช่รำในน้ำสัก ๒๐ นาที ก็จะสกัดเอนไซม์ได้เกือบหมด การ homogenization ไม่ช่วยให้สกัดได้ดีขึ้นกว่าเมื่อแช่รำเฉย ๆ มากนัก ซ้ำถ้า homogenize นานเกิน ๕ นาที ยิ่งจะทำให้ได้เอนไซม์น้อยลงเสียอีก อีกประการหนึ่ง supernatant ที่ได้จากการสกัดเอนไซม์ โดยวิธี homogenization นั้น เป็น emulsion ซึ่งไม่เหมาะต่อการวัด enzyme activity โดยการวัด optical density ด้วยเหตุผลดังกล่าว เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไปทุกครั้ง จึงเตรียมโดยการแช่น้ำเฉย ๆ

จากตารางที่ ๒ จะเห็นว่า การแช่สกัดเอนไซม์จากรำนั้น ถ้าใช้เวลาการแช่รำเกิน ๑๓ นาทีขึ้นไป ก็จะได้เอนไซม์ออกมาเกือบหมดแล้ว ตารางที่ ๓ แสดงว่า การแช่รำไว้เพียง ๑๕ นาที ก็จะสกัดเอสเทอเรสออกมาได้ถึง ๘๓ % ดังนั้นในการสกัดเอสเทอเรส เพื่อการทดลองต่อ ๆ ไปนั้น จึงสกัดด้วยน้ำเพียงครั้งเดียว โดยใช้เวลาแช่น้ำประมาณ ๒๐ นาที

ส่วนรำข้าวเก่าและรำข้าวใหม่นั้น ปรากฏว่า ให้เอนไซม์เอสเทอเรสในปริมาณทัดเทียมกัน (รูปที่ ๑) ในรูปเดียวกันนั้นแสดงด้วยว่า ในการสกัดถ้าใช้รำเปอร์เซ็นต์สูง ก็จะได้เอนไซม์มากเป็นสัดส่วนเกือบเป็นเส้นตรง

ตารางที่ ๑

แสดงผลของการ homogenize การแช่รำ ในการสกัดเอสเทอเรส ออกจากรำ

เวลาที่ homogenize (นาที)	เวลาที่แช่รำที่ ๔° ซ. (ชั่วโมง)	Esterase activity
๐	๐	๐.๒๐๕
๐	๑/๒	๐.๒๔๐
๐	๑	๐.๒๔๐
๐	๒๐	๐.๒๗๐
๑	๐	๐.๒๐๐
๑	๑/๒	๐.๒๑๐
๑	๑	๐.๒๑๐
๒	๐	๐.๒๐๐
๒	๑/๒	๐.๒๑๐
๒	๑	๐.๒๒๐
๕	๐	๐.๒๔๐
๕	๑/๒	๐.๒๓๐
๕	๑	๐.๒๓๐
๑๕	๐	๐.๒๐๐
๑๕	๑/๒	๐.๒๐๐
๑๕	๑	๐.๒๐๐
๑๕	๒๐	๐.๒๔๐
๑๕	๔๐	๐.๒๒๐
๑๕	๖๐	๐.๑๓๐

ตารางที่ ๒

แสดงปริมาณเอสเทอเรสที่สกัดได้จากการแช่รำที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่แช่รำ (นาที)	Esterase activity จาก ๑๐ % suspension	Esterase activity จาก ๓๐ % suspension
๐	๐.๑๐๐	๐.๓๑๐
๑๓	๐.๑๗๐	๐.๓๖๐
๒๕	๐.๑๖๐	๐.๓๗๐
๔๐	๐.๑๕๐	๐.๓๙๐
๖๐	๐.๑๕๐	๐.๔๐๐

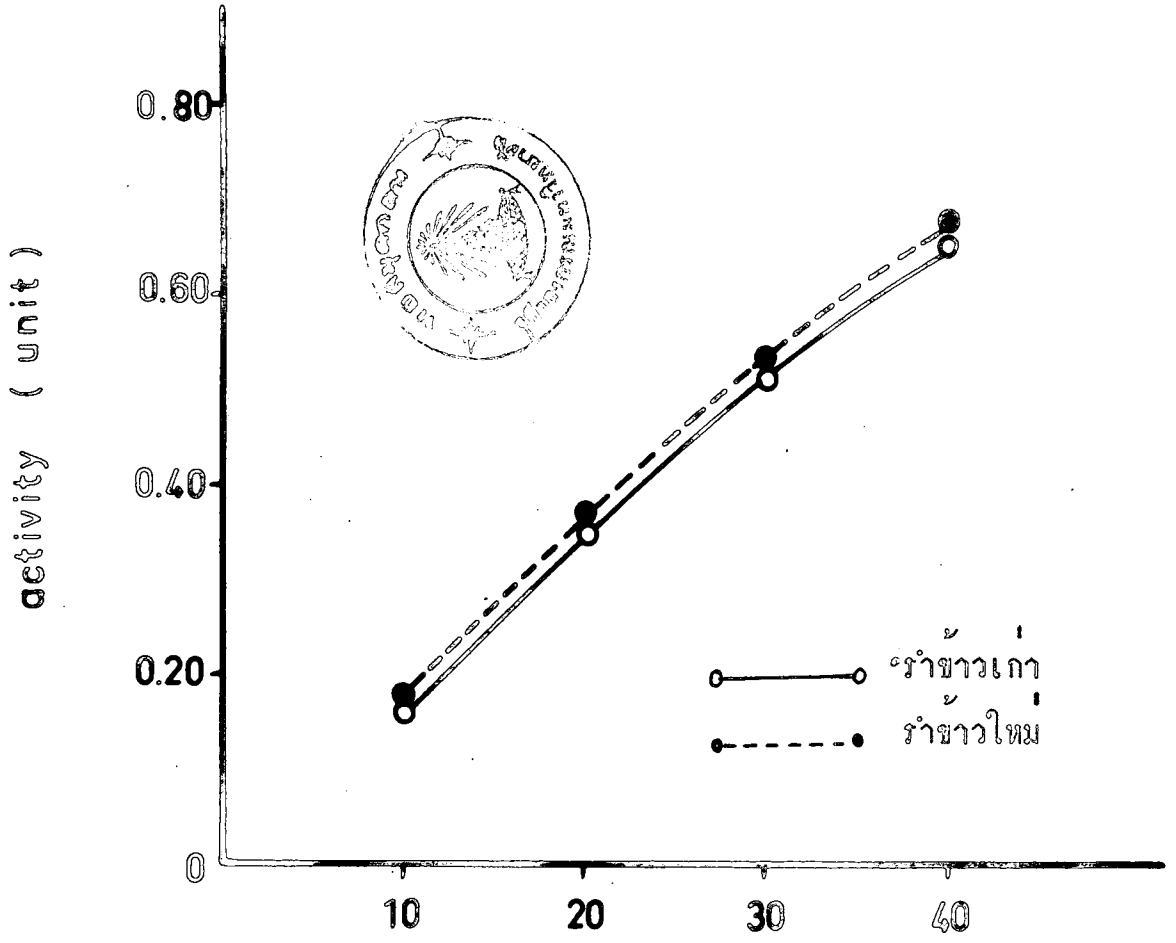
ตารางที่ ๓

แสดงปริมาณเอสเทอเรสจากรำโดยใช้น้ำสกัดหลาย ๆ ครั้ง

การสกัดครั้งที่	Esterase activity	% Activity
๑	๐.๒๒๐	๘๓
๒	๐.๐๔๐	๑๓
๓	๐.๐๐๕	๔

หมายเหตุ ใช้รำข้น ๒๐ % รำที่ไม่ homogenize จะสกัดได้ supernatant ใสดี ส่วนรำที่ homogenize ได้ supernatant ขุ่นเป็นน้ำนม เนื่องจากไขมันถูก emulsify

รูปที่ ๑ แสดง activity ของเอสเทอเรสที่สกัดจาก
รำข้าวเก่าและรำข้าวใหม่ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



๒. ความเสถียร(Stability) ของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลในตารางที่ ๔ แสดงว่า เอสเทอเรสทั้งที่สกัดออกมาโดยการแช่น้ำก็ดี หรือยังอยู่ในรำข้าวก็ดี ปรากฏว่ามีความเสถียรมาก ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ (- ๒๐° ซ.) activity จะลดลงเล็กน้อยเท่านั้นในเวลา ๒ เดือน แต่รำข้าวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ ๓๐° ซ.) จะทำให้เอนไซม์น้อยลงไปมากภายในระยะเวลาเก็บเท่า ๆ กัน

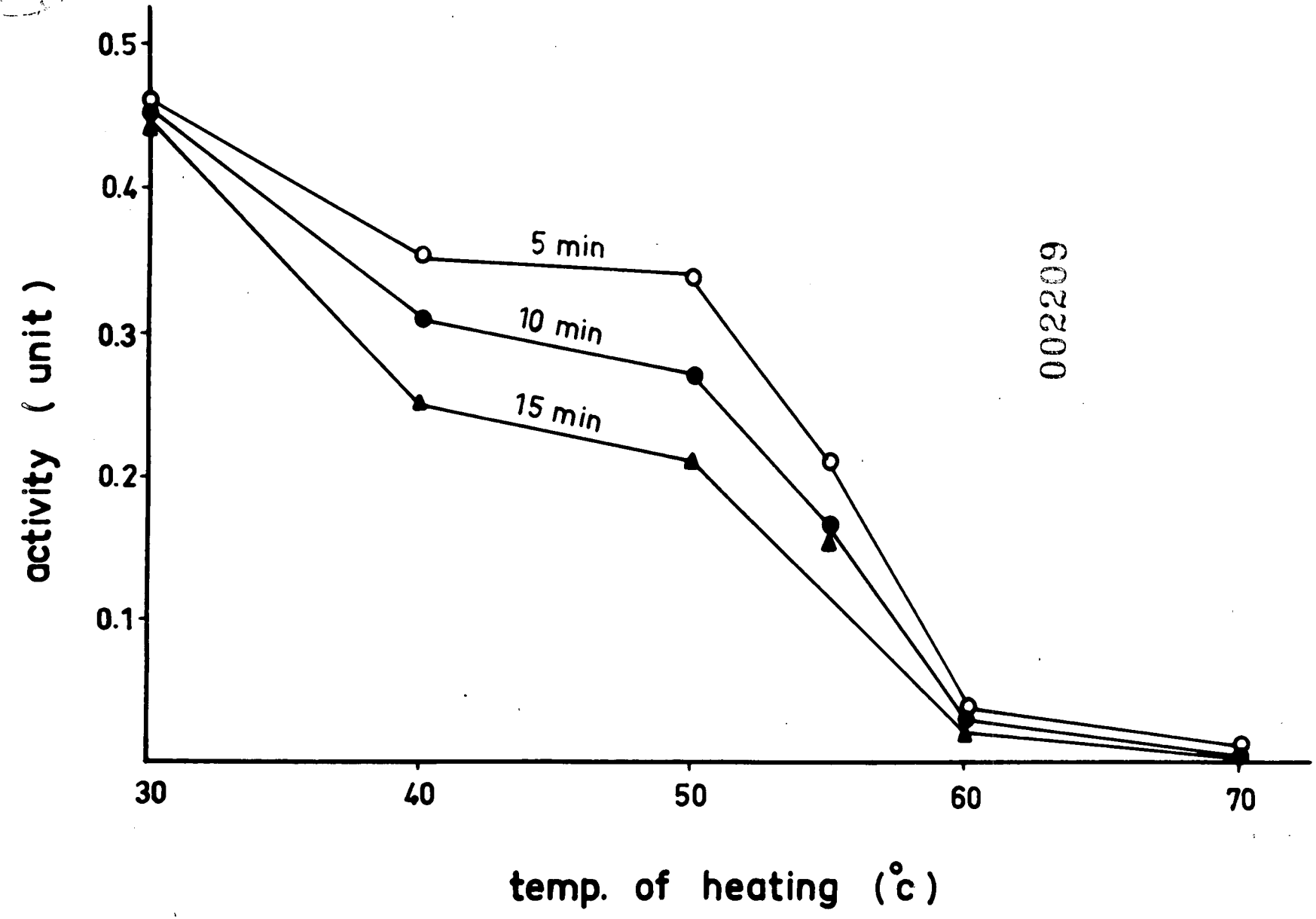
ในการทดลองให้ความร้อนแก่เอนไซม์เอสเทอเรส ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิสูง ๆ ระยะเวลาต่าง ๆ กัน แสดงผลในรูปที่ ๒ ซึ่งปรากฏว่า เอนไซม์เอสเทอเรสไวต่อความร้อนมาก แค่อุณหภูมิ ๔๐° ซ. ๒๐ นาที จะทำให้เอนไซม์เสียไป ๕๐ % และจะเสียสภาพของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ เมื่อให้ความร้อน ๖๐° ซ. ๒๐ นาที

ตารางที่ ๔

แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ในสภาพต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาที่เก็บเอนไซม์ (เดือน)	ใน supernate ที่เก็บไว้ที่ - ๒๐° ซ.		ในรำที่เก็บไว้ที่ - ๒๐° ซ.		ในรำที่เก็บไว้ที่ ๓๐° ซ.	
	activity	% decrease	activity	% decrease	activity	% decrease
๐	๐.๕๕๐	๐	๐.๕๕๐	๐	๐.๕๕๐	๐
๑	๐.๕๓๐	๔	๐.๕๗๐	๐	๐.๔๕๐	๑๙
๒	๐.๕๑๐	๘	๐.๕๑๐	๕	๐.๓๓๐	๔๐
๔.๕	-	-	๐.๔๘๐	๑๓	๐	๑๐๐
๖.๕	๐.๔๒๐	๒๔	-	-	-	-

รูปที่ ๒ แสดงความเสถียรของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิสูง ๆ ในเวลาต่าง ๆ กัน



002209

๓. ผลของ pH ต่อเอสเทอเรส

ที่ pH ต่างกัน p- Nitrophenol (สารที่ได้จากการไฮโดรไลส์ของเอสเทอเรส) จะมีค่า optical density ต่างกัน (ดูรูปที่ ๓) สีของ p- Nitrophenol จะจางมาก ถ้า pH น้อยกว่า ๖ และจะเข้มมาก ถ้า pH มากกว่า ๘ จึงทำให้การศึกษาผลของ pH ต่อเอสเทอเรสโดยวิธีนี้ ทำได้เฉพาะช่วง pH ๖ - ๘ เท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำ p - Nitrophenol curve เพื่อใช้แก้ไขค่า optical density ที่อ่านได้จากปฏิกริยา เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริง ที่เนื่องมาจากเอนไซม์เอสเทอเรสเท่านั้น

ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส (ที่แก้ไขแล้วดังข้างต้น) แสดงในรูปที่ ๔ ซึ่งเป็นแบบตัวอย่างจากการทดลองมากกว่า ๕ ครั้ง จะเห็นว่าที่ pH ต่ำ ๆ เช่น pH ๕.๕ activity ของเอสเทอเรสจะน้อย และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น สูงที่สุดที่ pH ประมาณ ๗.๒ - ๘.๐ ซึ่ง optimum pH ของเอสเทอเรสก็อยู่ใน range นี้ แต่ไม่เป็น optimum pH ที่ชัดเจนนัก เพราะไม่สามารถศึกษาได้เกิน pH ๘ ดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาเอสเทอเรสในการทดลองส่วนมาก จึงใช้ pH ๗.๕ - ๗.๖ เป็น pH ที่ทำการทดลอง

ในการศึกษาผลของ pH ต่อเอสเทอเรสนี้ ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาความเสถียรของเอสเทอเรสในสภาพของ pH ต่าง ๆ กันด้วย โดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้ ไปแช่ในสารละลาย buffer ซึ่งมี pH ต่าง ๆ กัน (ระหว่าง pH ๓ - ๑๐) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ภายในเวลา ๖๐ นาที) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำเอนไซม์นี้ไปวัด activity ของเอสเทอเรสที่ pH ๗.๖ ทั้งนี้ได้ทำ control ด้วยทุกครั้ง (control คือเอนไซม์ที่สกัดได้ ซึ่งปกติมี pH ประมาณ ๖.๖ -๖.๘ เติมน้ำลงไปแทน buffer) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยระยะเวลาเท่ากับ ที่ทำการทดลองกับเอนไซม์ที่แช่ใน buffer)

ผลการเสีย activity เนื่องจากการแช่ buffer ที่ pH ต่าง ๆ กัน เมื่อเทียบกับ control ของมันแล้ว แสดงในรูปที่ ๕ จะเห็นได้ว่า เอสเทอเรส

เสีย activity ได้มากที่ pH ต่ำ ๆ เช่นเมื่อแช่ที่ pH ๓ เพียง ๑๐ นาที จะเสีย activity ไปถึง ๖๐ % ถ้า pH เพิ่มขึ้น การเสีย activity ก็จะน้อยลงตามลำดับ และจะเสถียรที่สุดประมาณ pH ๖ - ๗ แต่ถ้า pH สูงกว่านี้ก็จะเสีย activity ไปเล็กน้อย คือประมาณ ๑๐ % ถ้าแช่ใน buffer pH ๙ หรือ ๑๐ นาน ๑๐ นาที

๔. <u>ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรส</u>

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส ซึ่งได้จากการทดลอง ๔ ครั้ง แสดงเป็นแบบตัวอย่าง ในรูปที่ ๖ จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นประมาณ ๔ μmole / tube (๑.๓๓mM.) activity ของเอสเทอเรส ก็เริ่มเข้าเขต optimum concentration แต่เนื่องจาก p- Nitrophenyl acetate ละลายในน้ำได้น้อย ศึกษาได้เข้มข้นที่สุดแค่ ๒.๓ mM. เท่านั้น ซึ่งทำให้ไม่สามารถศึกษาผลของความเข้มข้น ของ substrate สูงกว่านี้ได้

รูปที่ ๗ แสดง Lineweaver and Burk's Plot (1934) คือการ plot ระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{S}$ ปรากฏว่าได้เส้นตรงที่ดีพอสมควร จากกราฟจะได้ค่า

$$\text{intercept} = \frac{1}{V} = 4.7$$

$$\text{slope} = \frac{Km}{V} = 2.5$$

จากนี้คำนวณได้ว่า

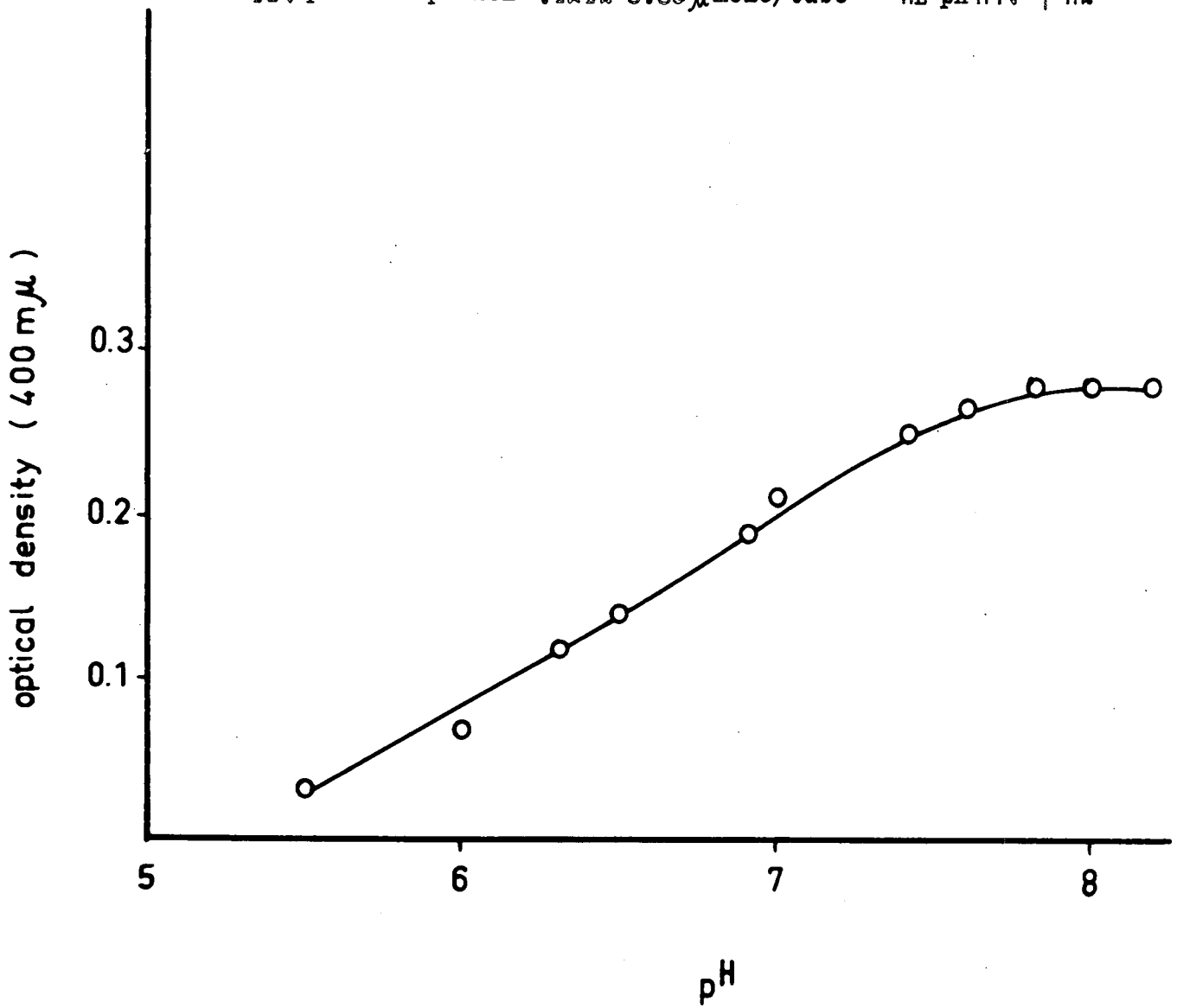
Michaelis - Menten Constant (Km)

$$= 5.2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

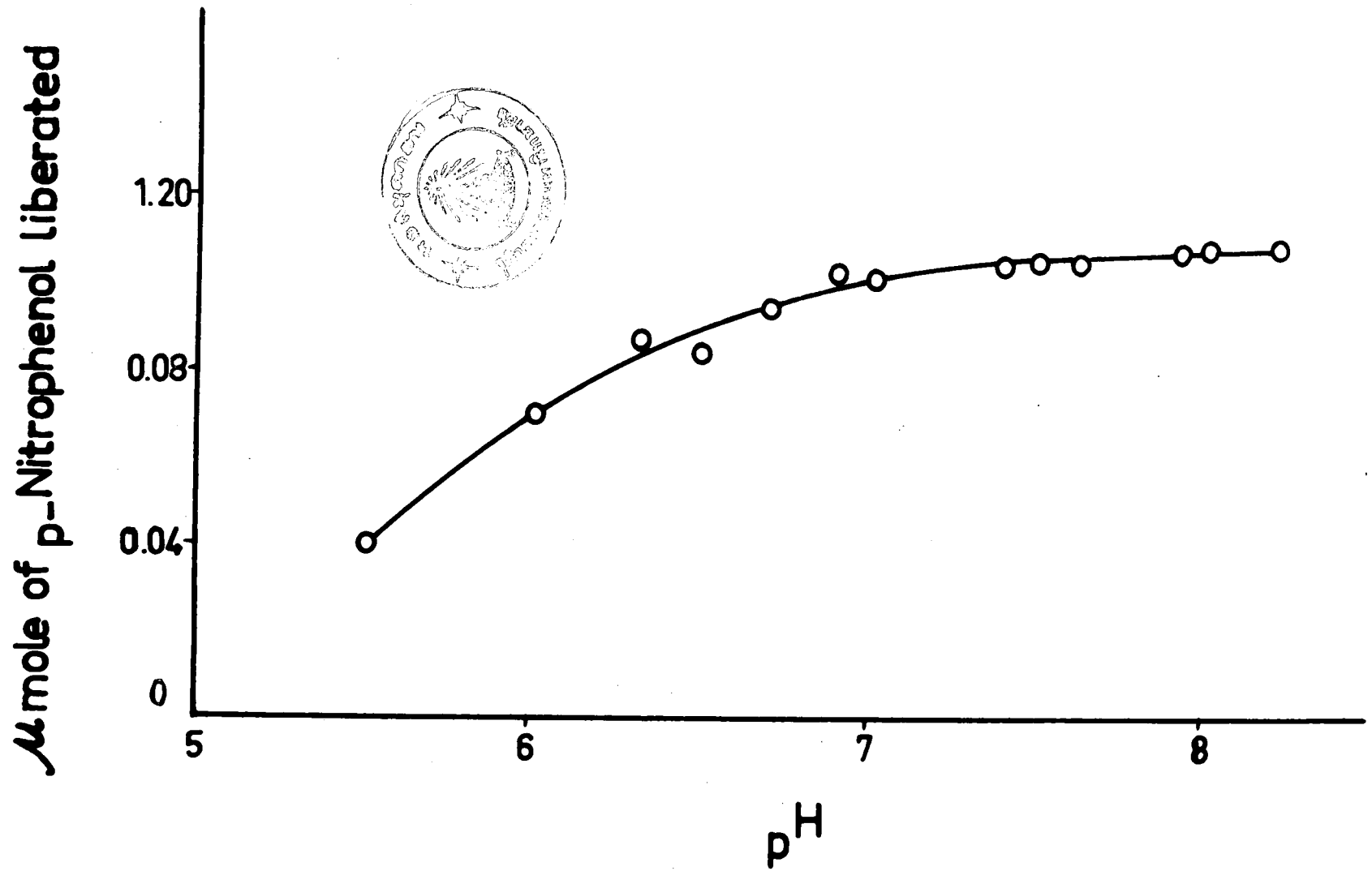
รูปที่ ๓ p Nitrophenol Curve

แสดงความสัมพันธ์ของ optical density ที่ ๔๐๐ มิลลิไมครอน

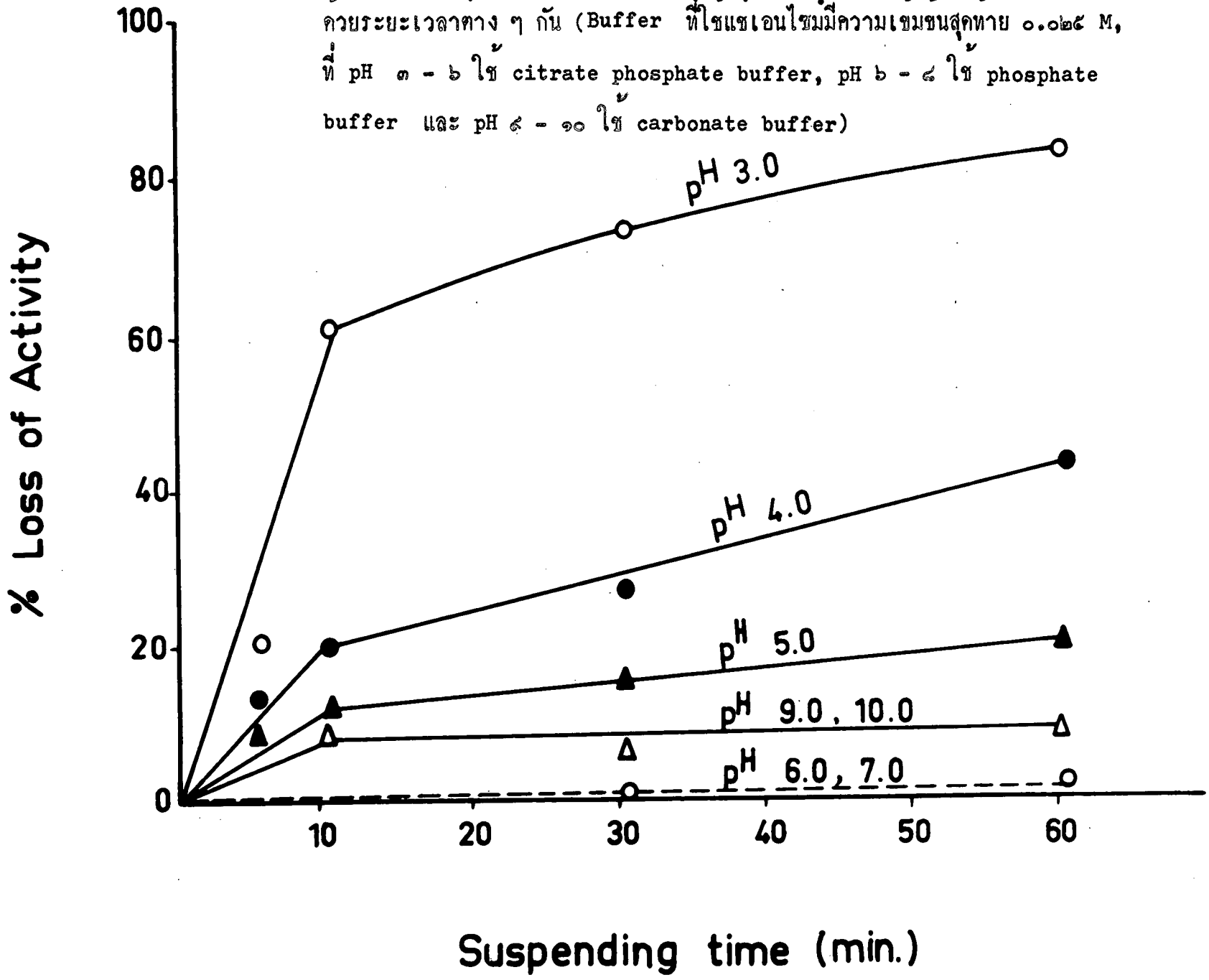
ของ p- Nitrophenol เข้มข้น ๐.๐๕ μmole/tube กับ pH ต่าง ๆ กัน

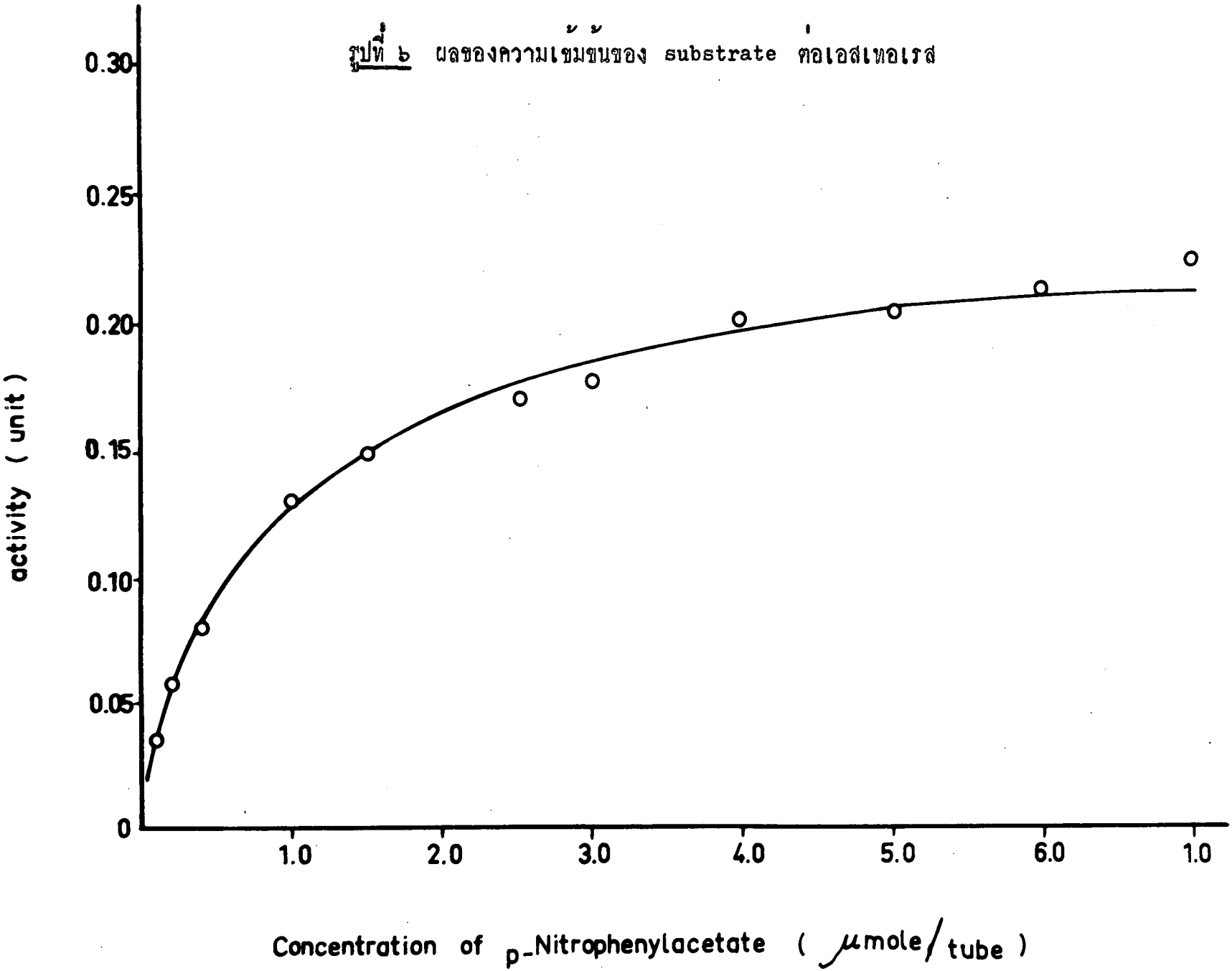


รูปที่ ๔ แสดงผลของ pH ต่อเอสเทอเรส

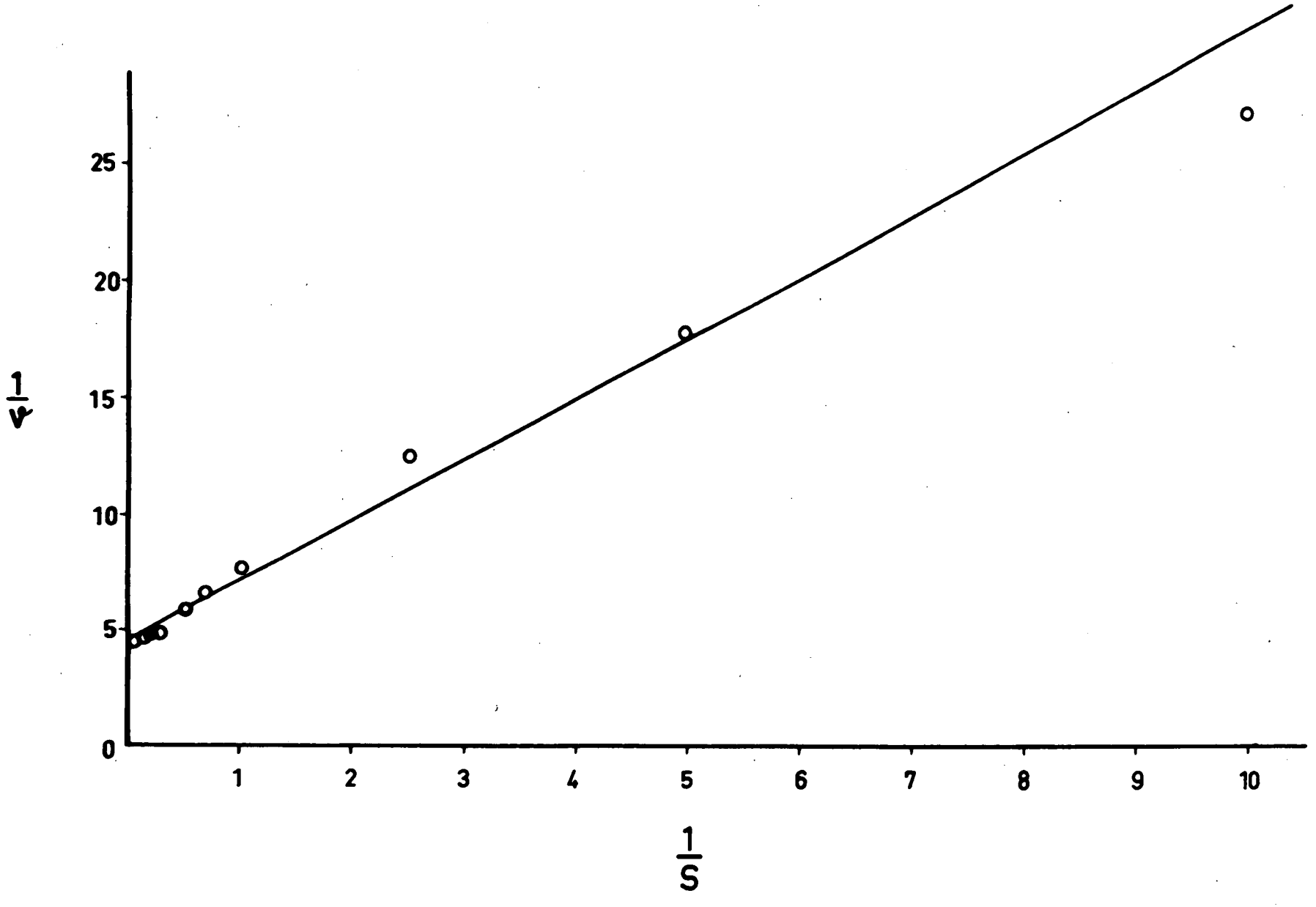


รูปที่ ๕ แสดงการเสีย esterase activity เมื่อแช่ใน buffer pH ต่าง ๆ กัน ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ กัน (Buffer ที่ใช้แช่เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้าย ๐.๐๒๕ M, ที่ pH ๓ - ๖ ใช้ citrate phosphate buffer, pH ๖ - ๘ ใช้ phosphate buffer และ pH ๘ - ๑๐ ใช้ carbonate buffer)




รูปที่ ๖ ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรส
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
activity (unit)
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
1.0
Concentration of p-Nitrophenylacetate (μmole/tube)

รูปที่ ๗ แสดงการหา Km ของเอสเทอเรส โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot



๕. ผลของตัวห้ามปฏิกริยา

ได้ศึกษาผลของตัวห้ามปฏิกริยาต่าง ๆ ต่อเอสเทอเรสในรำ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ๕ ปรากฏว่า p- Nitrobenzoic acid, iodoacetamide, mercuric chloride และ sodium arsenite สามารถห้ามปฏิกริยาได้ดีส่วน Iodoacetic acid, potassium thiocyanate, potassium fluoride และ potassium iodide สามารถห้ามปฏิกริยาได้บ้าง แต่ไม่ดีนัก และ sodium sulfate, sodium cyanide, calcium chloride และ magnesium chloride ไม่มีผลต่อ activity ของเอสเทอเรสเลย

ได้เลือกใช้ iodoacetamide เป็นตัวอย่าง ในการศึกษาว่า เป็นตัวห้ามปฏิกริยา ชนิด competitive หรือ noncompetitive inhibitor โดยวัด activity ของเอนไซม์ ที่ไม่มีและที่มีตัวห้ามปฏิกริยาอยู่ด้วย ที่ความเข้มข้นของ substrate ต่าง ๆ กัน

ในรูปที่ ๘ นั้น สำหรับกราฟที่แสดงถึง activity ของเอสเทอเรสเมื่อไม่มีตัวห้ามปฏิกริยา

$$\text{intercept} = \frac{1}{V} = 2.75$$

$$\text{slope} = \frac{Km}{V} = 1.35$$

คำนวณหา $Km = 0.49$ μmole

หรือ $= 4.9 \times 10^{-5}$ M

(ค่า Km ที่คำนวณได้นี้ ปรากฏว่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ในหน้า ๑๗)

แต่ในกราฟที่ใส่ตัวห้ามปฏิกริยาไปด้วย

$$\text{intercept} = \frac{1}{V}\left(1+\frac{I}{Ki}\right) = 4.5$$

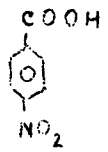
$$\text{Inhibitor Constant (Ki)} = 0.03 \ \mu\text{mole}$$

$$= 0.3 \times 10^{-5} \text{ M}$$

ซึ่งจากกราฟพบว่า iodoacetamide เป็น noncompetitive inhibitor

ตารางที่ ๕

แสดงผลของตัวต้านเอนไซม์เอสเทอเรส

สารที่ทดลอง	ความเข้มข้น (millimole / tube)	% Inhibition
p- Nitrobenzoic acid 	๐.๐๐๐๒	๓
	๐.๐๐๐๕	๑๑
	๐.๐๐๐๘	๒๓
	๐.๐๐๑	๒๖
Iodoacetic acid (ICH_2COOH)	๐.๑๐	๐
	๐.๒๕	๖
	๐.๕๐	๑๔
	๑.๗๐	๒๓
Iodoacetamide (ICH_2COONH_2)	๐.๐๐๐๑	๑๑
	๐.๐๐๑	๒๗
	๐.๐๑	๔๔
	๐.๑๐	๖๕
	๐.๒๐	๗๗
	๐.๓๐	๘๗
	๐.๕๐	๙๔
Mercuric chloride ($HgCl_2$)	๐.๐๐๐๐๑	๓
	๐.๐๐๐๑	๒๓
	๐.๐๐๑	๗๕
	๐.๐๐๒	๘๒
	๐.๐๐๕	๘๒

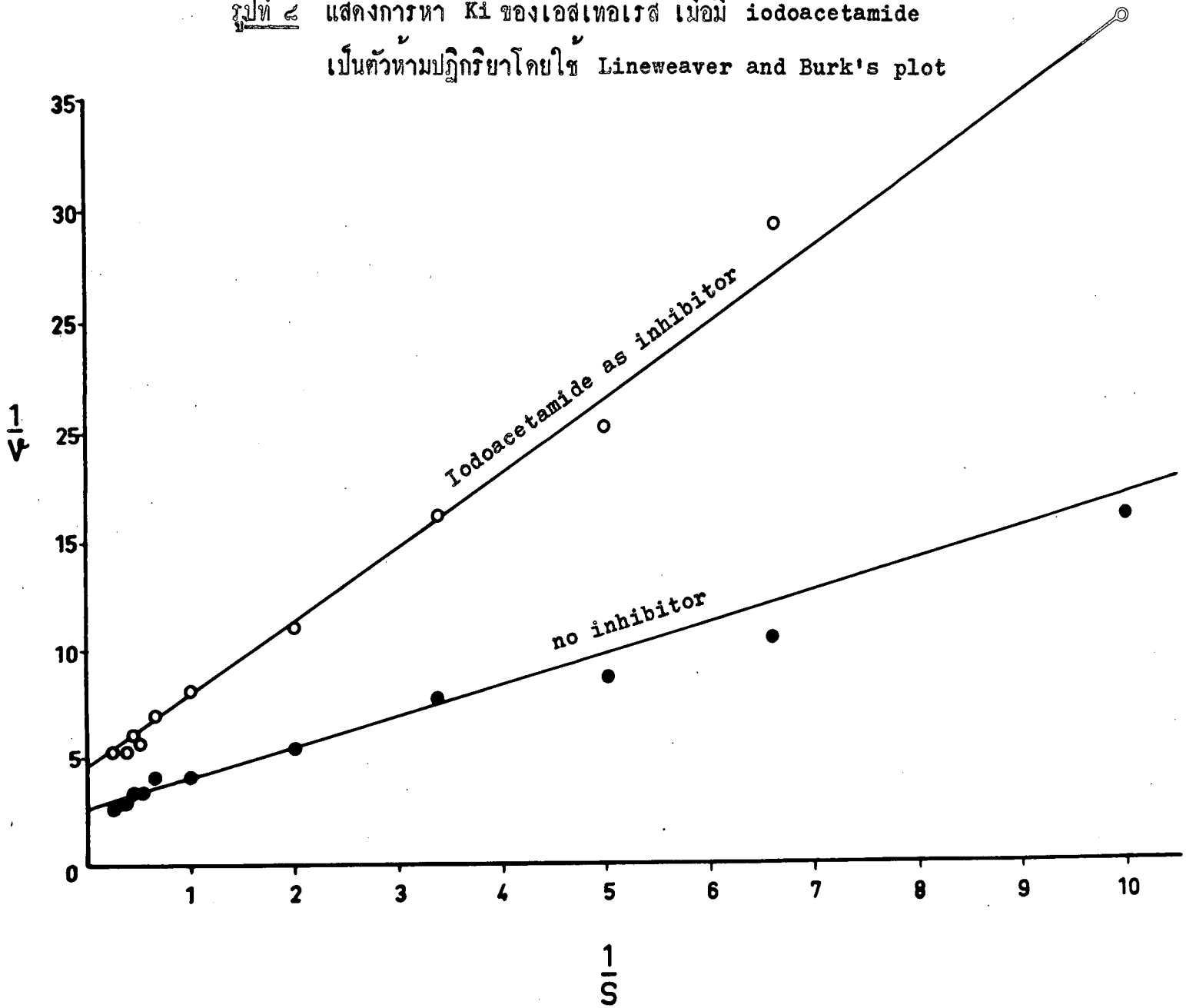
สารที่ทดลอง	ความเข้มข้น (millimole / tube)	% Inhibition
Sodium arsenite ($NaAsO_2$)	๐.๐๐๐๑	๘
	๐.๐๐๑	๓๒
	๐.๐๑	๗๔
	๐.๐๒๕	๘๔
	๐.๐๕๐	๘๕
Pot. thiocyanate (KCNS)	๐.๑๐	๔
	๐.๕๐	๓๘
Pot. fluoride (KF)	๐.๐๐๕	๒
	๐.๐๕	๒๗
	๐.๕๐	๗๕
	๐.๗๕	๘๐
Pot. iodide (KI)	๐.๒๐	๗
	๑.๐๐	๒๘
Sod. sulfate (Na_2SO_4)	๐.๕๐	๐
Sod. cyanide (NaCN)	๐.๕๐	๐
Calcium chloride ($CaCl_2$)	๐.๐๐๐๘	๐
	๐.๐๐๐๓	๐
	๐.๐๐๓	๐
Magnesium chloride ($MgCl_2$)	๐.๐๐๑๕	๐
	๐.๐๓	๐

หมายเหตุ

๑. p- Nitrobenzoic acid, mercuric chloride และ sodium arsenite ละลายในน้ำได้ไม่ดี จึงไม่สามารถศึกษาผลของสารทั้งสามได้เกินความเข้มข้นข้างบนนี้

๒. แคลเซียมคลอไรด์ และ แมกนิเซียมคลอไรด์ ตกตะกอนกับ phosphate buffer ที่ความเข้มข้นเกิน ๐.๐๐๑ และ ๐.๐๑ โมลาร์ตามลำดับ จึงไม่สามารถศึกษาผลของสารทั้งสองได้มากกว่านี้ เมื่อลองเปลี่ยนจาก phosphate buffer มาเป็น ๐.๐๓ โมลาร์ของ Tris. buffer pH ๗.๖ แทน (๐.๐๒๕ โมลาร์ของ phosphate buffer จะให้ activity ของเอสเทอเรส เท่ากับ ๐.๐๓ โมลาร์ของ Tris. buffer) ทำให้สามารถศึกษาผลของแคลเซียม และแมกนิเซียมไอออน ได้มากขึ้นเล็กน้อย แต่ก็ยังคงไม่ทำให้ activity ของเอสเทอเรสเปลี่ยนแปลงอยู่นั่นเอง

รูปที่ ๔ แสดงการหา Ki ของเอสเทอเรส เมื่อมี iodoacetamide เป็นตัวห้ามปฏิกริยาโดยใช้ Lineweaver and Burk's plot



การศึกษาเกี่ยวกับไลเปส

๑. สภาพต่าง ๆ ในการสกัดไลเปสจากรำ

ในการศึกษาเพื่อหาสภาพที่ดีที่สุด ในการสกัดไลเปสจากรำนั้น ได้ลองใช้น้ำ, phosphate buffer pH ต่าง ๆ และ ๐.๙% sodium chloride เป็นตัวสกัด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ ๖ ซึ่งจะเห็นได้ว่า น้ำเป็นตัวสกัดเอนไซม์ที่ดีที่สุด,phosphate buffer สกัดเอนไซม์ได้น้อยกว่าเล็กน้อย และใน pH กลาง ๆ จะสกัดได้ดีกว่า pH ที่เป็นกรดหรือด่าง แต่ถ้าใช้ ๐.๙ % sodium chloride จะได้ activity น้อยที่สุด คือเพียง ๗๕ % ของเมื่อใช้น้ำเป็นตัวสกัด

ส่วนในตารางที่ ๗ แสดงผลการศึกษาผลของการ homogenization และการแช่น้ำเฉย ๆ จะเห็นว่า การเอารำแช่น้ำที่ ๔°ซ แล้วเซ็นติฟิวต์เลย จะได้ไลเปสออกมาประมาณครึ่งเดียวเท่านั้น แม้จะแช่นานถึง ๑๔ ชั่วโมงก็ได้ activity เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย การ homogenization จะช่วยให้สกัดเอนไซม์ออกมาได้มากขึ้น แต่ไม่สูงสุดเพราะการแช่ homogenate ที่ได้นั้นไว้ ๑๔ ชั่วโมง จะให้ activity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีก แต่ถ้าแช่นานเกินกว่านี้ activity จะกลับลดลง

ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับไลเปส จึงเตรียมเอนไซม์โดย homogenize รำ ในน้ำข้น ๓๐ % (W /V) ๕ นาที แล้วจะแช่ไว้ที่ ๔°ซ. ๑๔ ชั่วโมง จึงค่อยนำมาใช้วัด activity เอนไซม์นี้เก็บไว้ที่ - ๒๐°ซ. ทำใช้เพียงภายใน ๑ อาทิตย์

๒. ผลของ pH ต่อไลเปส

ได้ศึกษาวัด activity ของไลเปสระหว่าง pH ๓ - ๑๐ จากการทดลอง ๓ ครั้ง ได้ผลแสดงในรูปที่ ๙ optimum pH ของไลเปสอยู่ประมาณ ๖.๐ - ๗.๐ และ activity จะน้อยลงถ้า pH ต่ำกว่า ๕ หรือเกินกว่า ๘

ตารางที่ ๖

ผลของการสกัดไลเปสด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

(ใช้ ๒๐ % รำแช่ไว้ที่ ๔°ซ. ๑๔ ชั่วโมง)

ของเหลวที่ใช้สกัด	Lipase activity (mEq.NaOH X 10^{-3})	% Activity
น้ำ	๖.๔๐	๑๐๐
๐.๐๔ M Phosphate Buffer pH ๖	๕.๖๔	๘๘
๐.๐๔ M Phosphate Buffer pH ๗	๕.๔๑	๙๒
๐.๐๔ M Phosphate Buffer pH ๗.๔	๕.๔๑	๙๒
๐.๐๔ M Phosphate Buffer pH ๘	๕.๖๑	๘๗
๐.๔ % NaCl	๔.๗๖	๗๔

ตารางที่ ๗

แสดงผลของการ homogenization และการแช่รำ

ในการสกัดไลเปสจากรำ

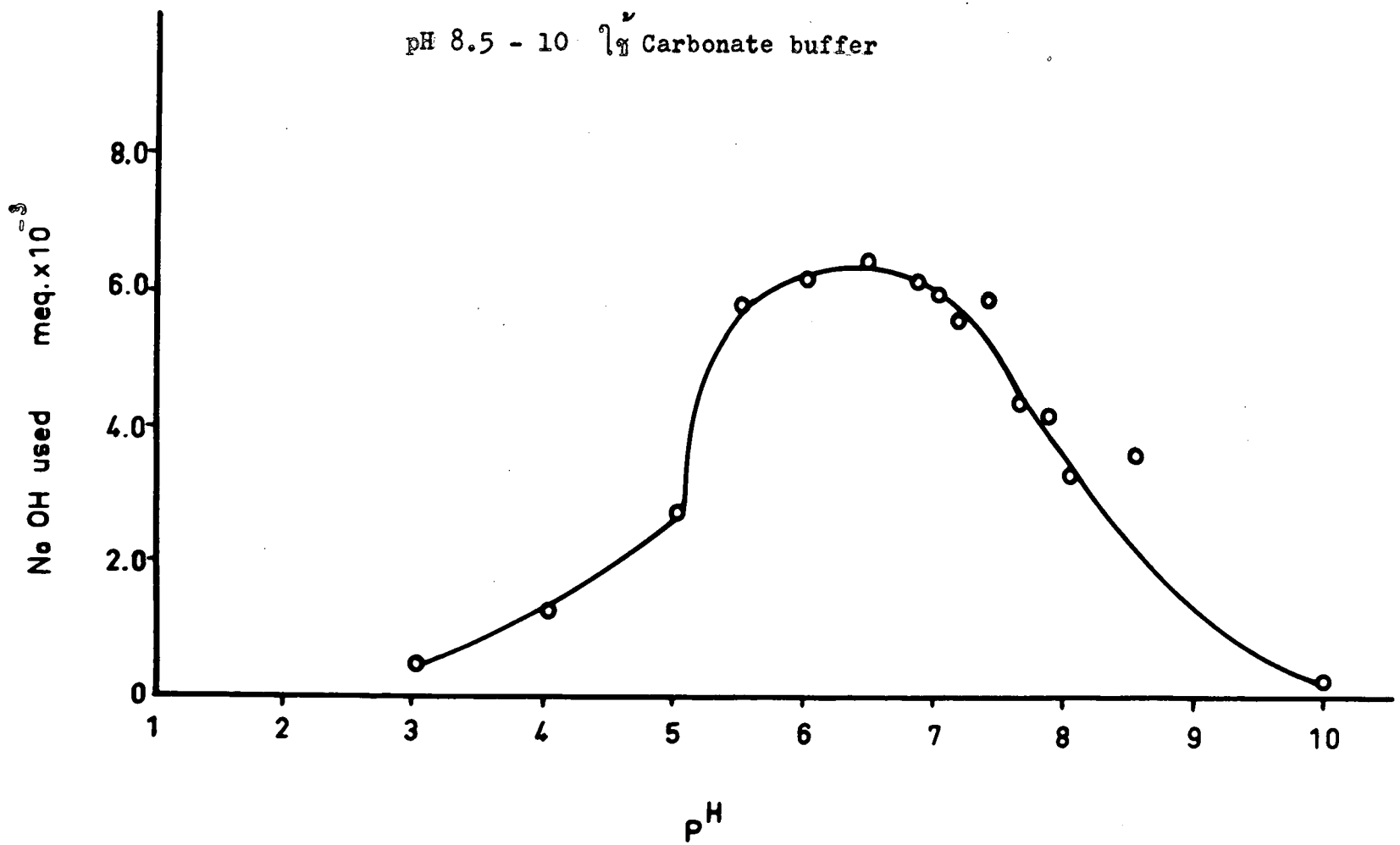
เวลาที่ homogenize (นาที)	เวลาที่แช่รำที่ ๔°ซ. (ชั่วโมง)	Lipase activity (mEq.NaOH X 10^{-3})
๐	๐	๖.๖๘
๐	๑๔	๗.๖๓
๕	๐	๘.๘๕
๕	๑๔	๑๖.๓๒
๕	๔๘	๑๒.๐๖
๕	๘๐	๐

รูปที่ ๔ แสดงผลของ pH ต่อไลเปส

ที่ pH 3 - 5.5 ใช้ Citrate - Phosphate buffer

pH 6 - 8.0 ใช้ Phosphate buffer

pH 8.5 - 10 ใช้ Carbonate buffer



๓. ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส

จากรูปที่ ๑๐ พบว่า optimum substrate concentration ของไลเปสเริ่มตั้งแต่ ๐.๒๖ % (v/v) ของ olive oil emulsion เนื่องจากการเตรียม emulsion ของ substrate โดยวิธีนี้ไม่สามารถเตรียมให้มีความเข้มข้นเกิน ๓ % (v/v) ได้ เพราะว่าจะมีน้ำมันบางส่วนถูก emulsify ไม่หมด จึงไม่สามารถศึกษาผลของความเข้มข้นเกินกว่าที่ทำแล้วได้

จาก Lineweaver and Burk's Plot (๑๙๓๔) ในรูปที่ ๑๑ นั้น เส้นตรงที่ไม่ดีนักตามเส้นที่ลากขึ้นคร่าว ๆ ในรูปที่ ๑๑ พบว่า

$$\text{intercept} = \frac{1}{V} = 1.5$$

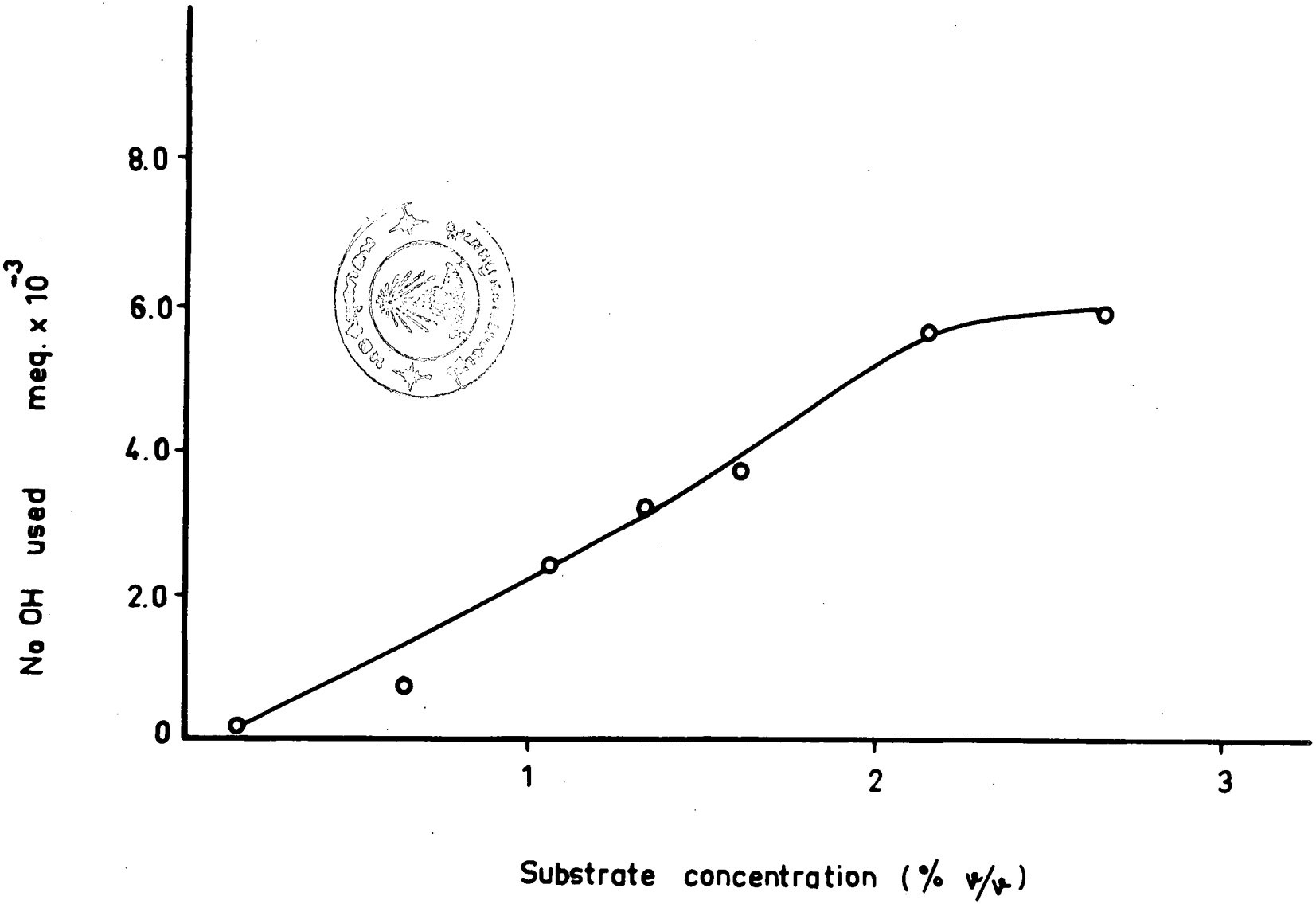
$$\text{slope} = \frac{Km}{V} = 0.25$$

จากนี้คำนวณได้ว่า

Michaelis - Menten Constant (Km)

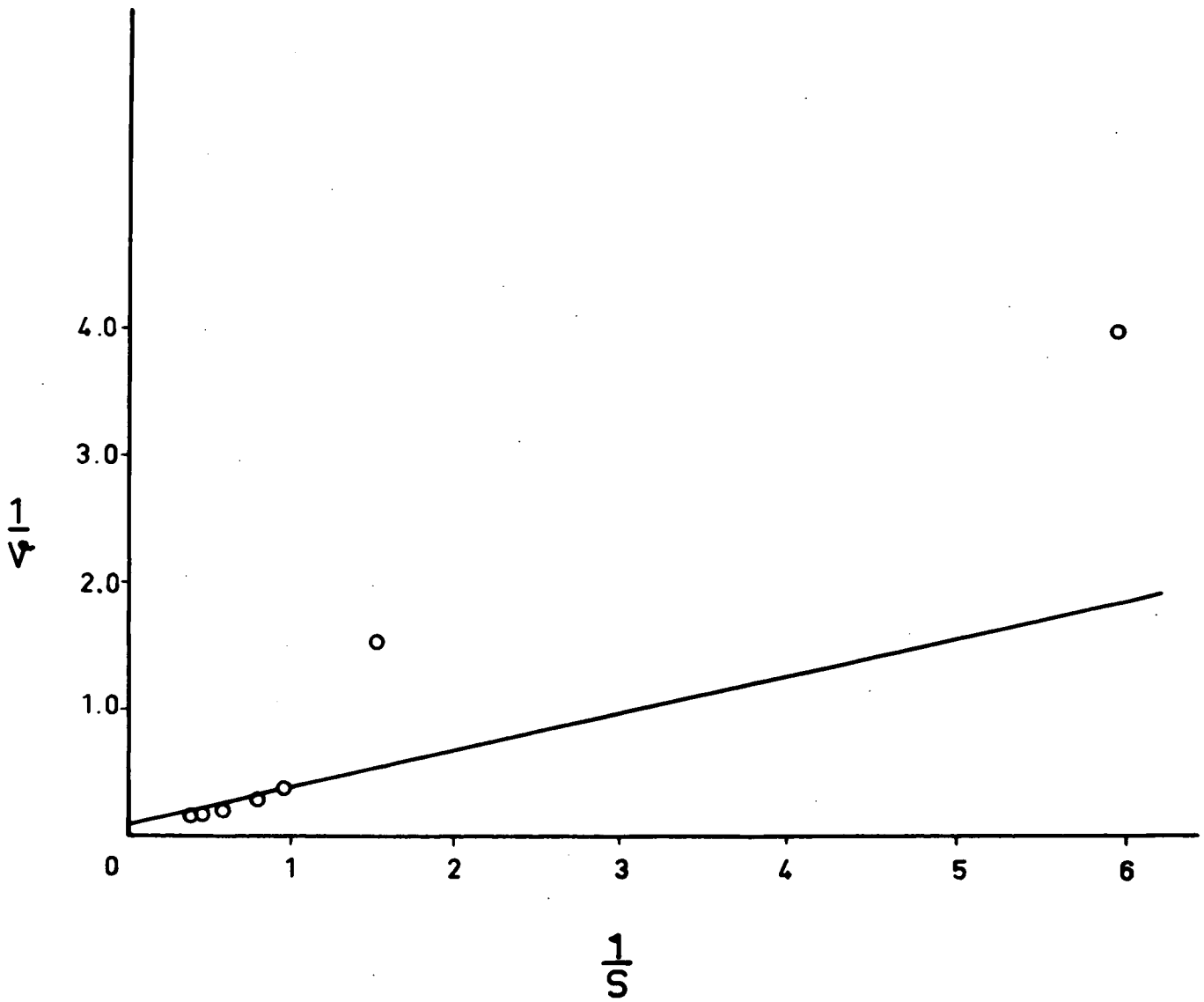
$$= 0.16$$

รูปที่ ๑๐ แสดงผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส



รูปที่ ๑๑ แสดงการหา Km ของไลเปส โดยใช้

Lineweaver and Burk's plot



๔. ผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกริยา

ได้ศึกษาผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกริยาของไลเปส ๔ ตัว ผลแสดงในตารางที่ ๘ จะเห็นได้ว่า แคลเซียมไอออนสามารถเร่งปฏิกริยาของไลเปสได้ดี คือที่ความเข้มข้น ๐.๐๒ โมลาร์ activity จะเพิ่มขึ้นถึง ๑๖๔ % แต่แมกนีเซียมไอออนที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ไม่มีผลต่อความเร็วของปฏิกริยา ส่วน iodo - acetamide และ mercuric chloride สามารถลดปฏิกริยาของไลเปสได้

ตารางที่ ๘

แสดงผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกริยาของไลเปส

สารที่ใช้	ความเข้มข้น (โมลาร์)	Lipase activity (mEq.NaOH X 10^{-3})	% Activity
Calcium chloride	๐.๐๐๐๑	๒.๗๘	๑๐๐
	๐.๐๐๕	๓.๔๐	๑๒๑
	๐.๐๑	๓.๕๖	๑๒๗
	๐.๐๒	๔.๕๔	๑๖๔
	๐.๐๔	๖.๕๖	๒๓๔
	๐.๐๖	๖.๐๖	๑๘๐
Mag. chloride	๐.๐๐๐๑	๒.๗๘	๑๐๐
	๐.๐๒	๒.๗๘	๑๐๐
Iodoacetamide	๐.๐๑	๑.๓๙	๕๐
	๐.๐๒	๑.๓๙	๕๐
Mercuric chloride	๐.๐๐๐๗	๒.๔๗	๘๘
Control	-	๒.๘๐	๑๐๐