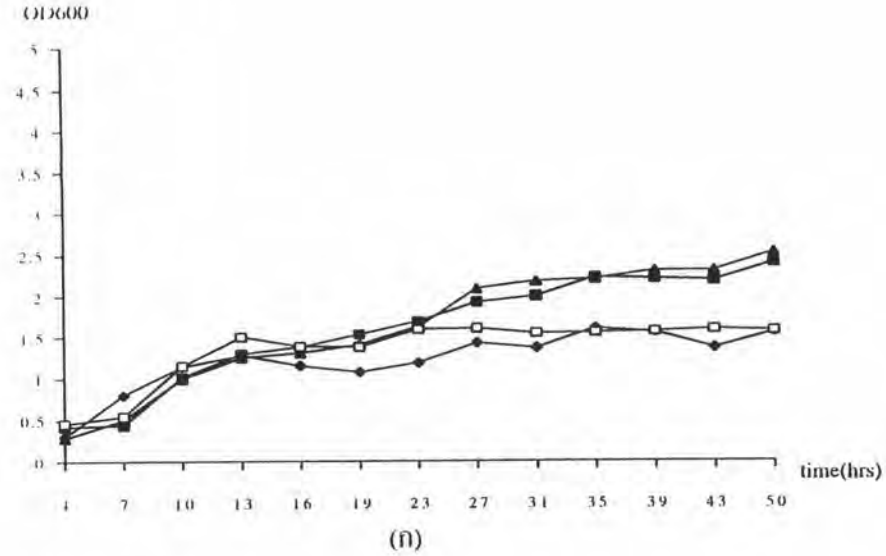
บทที่ 4

ผลการทดลอง

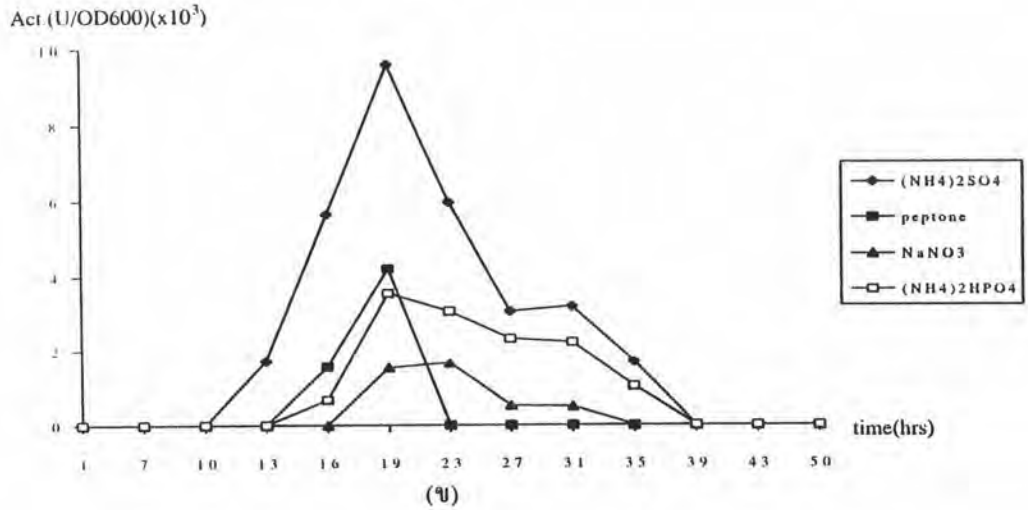
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

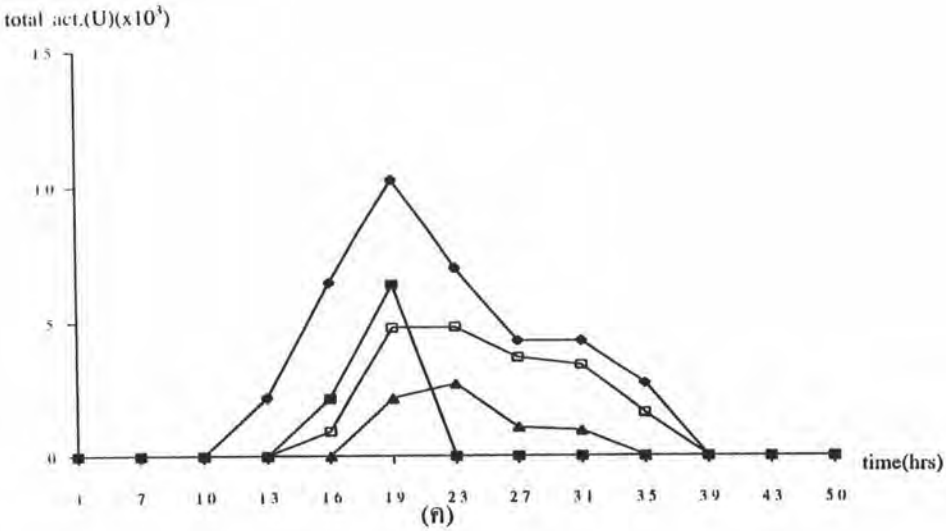
ผลการทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2SO_4$], เปปโตน(peptone), โซเดียมไนเตรต($NaNO_3$), และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต[$(NH_4)_2HPO_4$] เข้มข้น 0.13 เปอร์เซนต์ ผสมในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซนต์ pH 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.1 พบว่าการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกันนักเมื่อให้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน แต่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน



(ก)

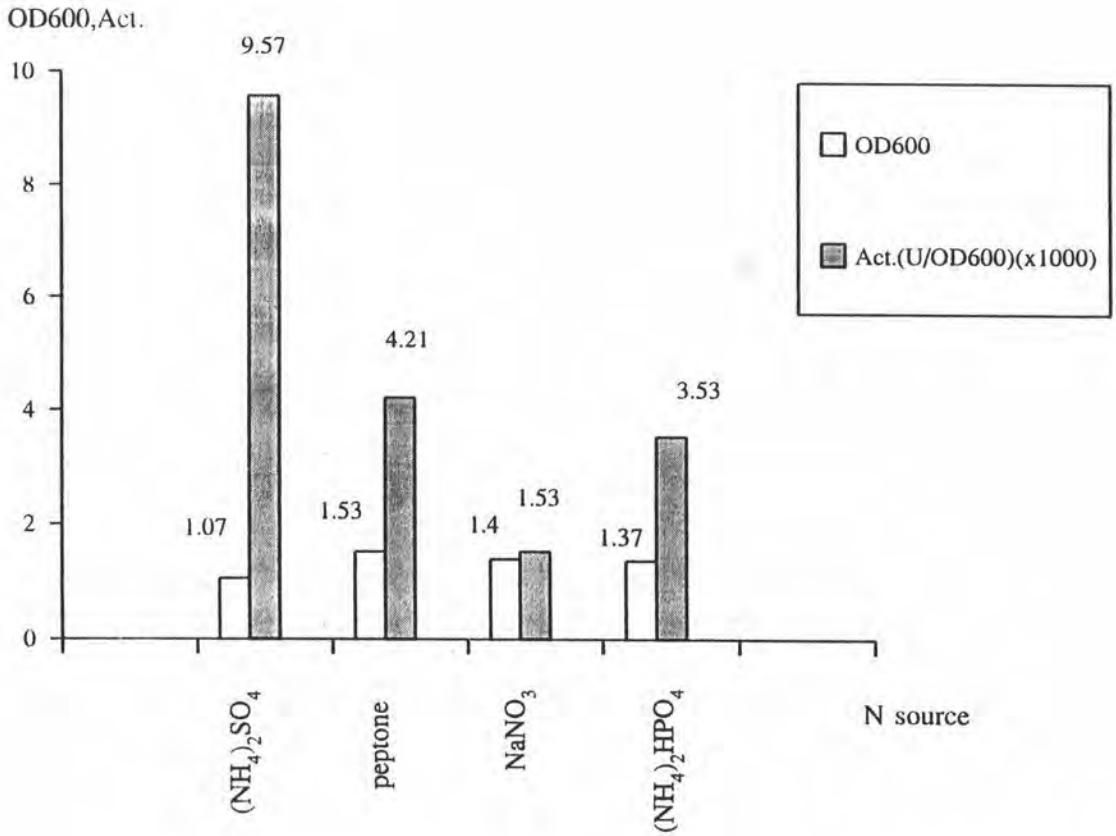


(ข)



(ค)

รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำ ปริมาตร 250 มล.ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0



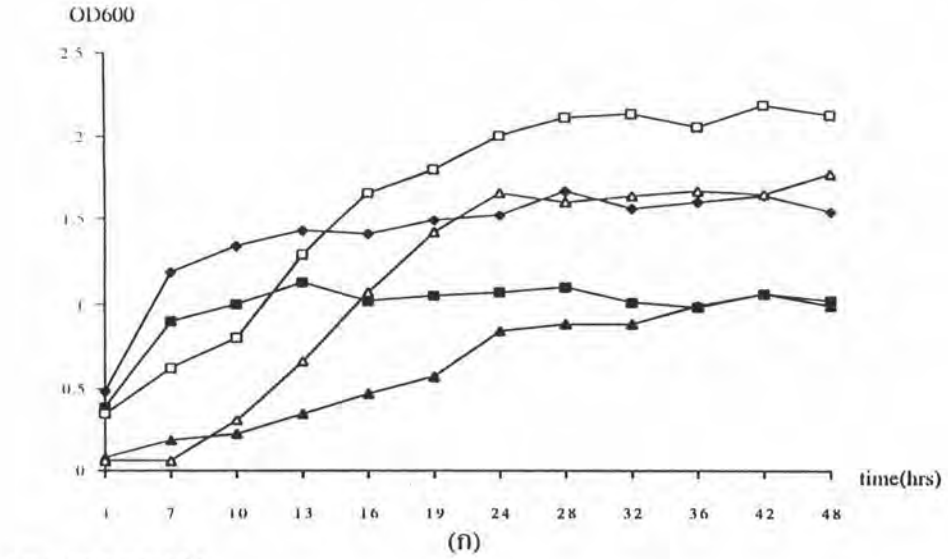
รูปที่ 2 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0

4.1.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

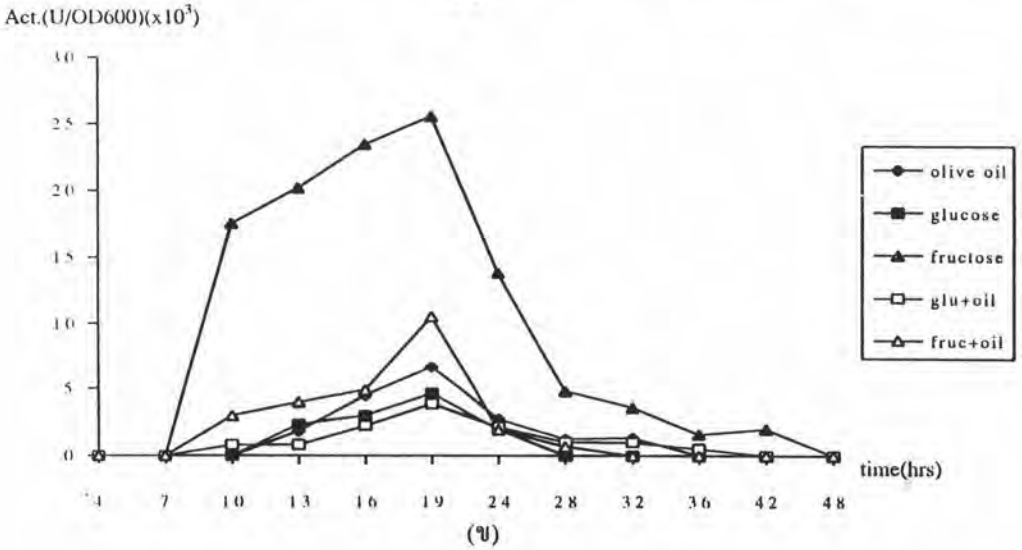
จากการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันมะกอก, กลูโคส, มอลโตส, ฟรุกโตส, กาแลคโตส และซูโครส เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ผสมในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 เปอร์เซนต์ pH 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.2 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิตไลเปสได้เร็วขึ้นและสูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนในอาหารที่มีมอลโตส, กาแลคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้และไม่ให้แอคติวิตีของไลเปส

เมื่อทดลองใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับน้ำมันมะกอก และ ฟรุกโตสกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเป็น 1 เปอร์เซนต์ พบว่าการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีฟรุกโตสผสมกับน้ำมันมะกอกดีกว่าในอาหารที่มีกลูโคสผสมกับน้ำมันมะกอก แต่การผลิตไลเปสในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมจะต่ำกว่าในอาหารที่มีฟรุกโตสอย่างเดียว

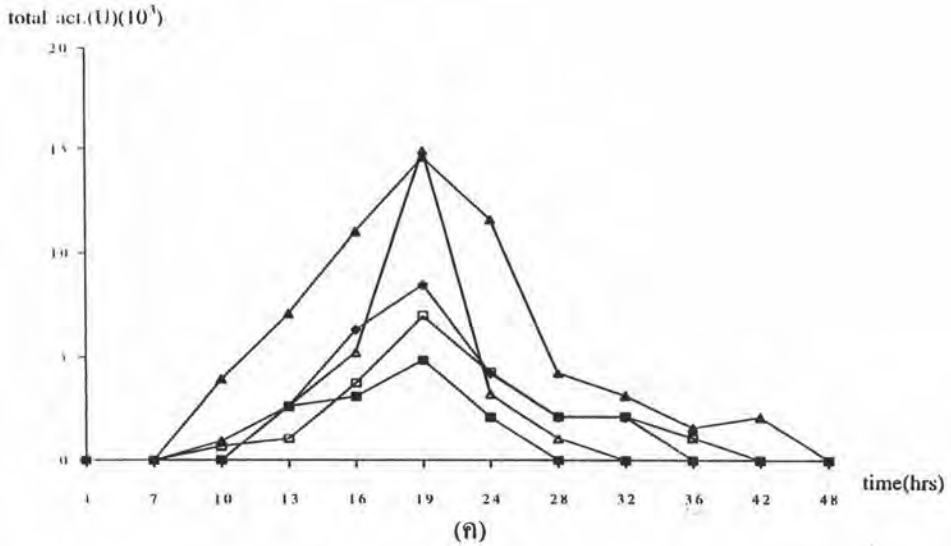
จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารต่อการเจริญและการผลิตไลเปสดังวิธีการทดลองในข้อ.3.4.2 พบว่าเชื้อจะสังเคราะห์ไลเปสได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เปอร์เซนต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 2.5 เปอร์เซนต์และ 3 เปอร์เซนต์ พบว่าแอคติวิตีของไลเปสลดลงและไม่มีแอคติวิตีตามลำดับ



(ก)

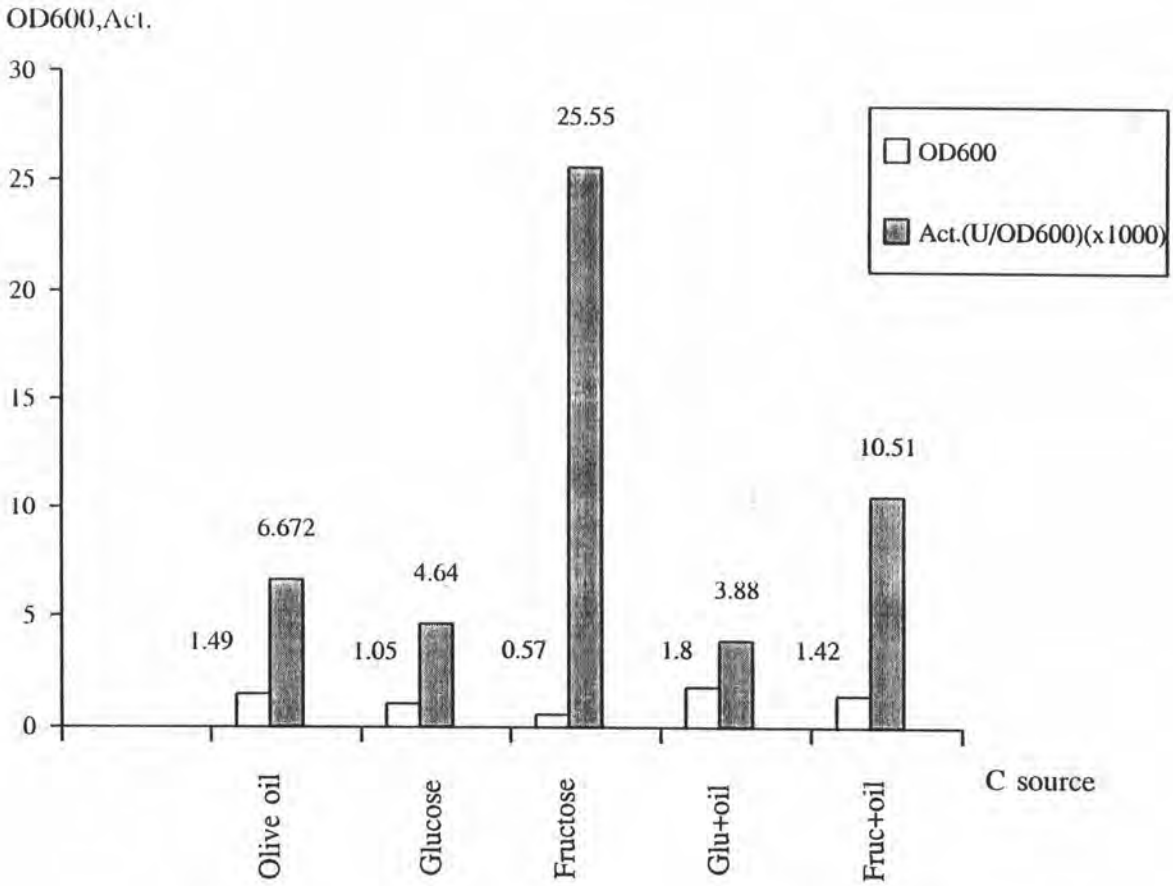


(ข)

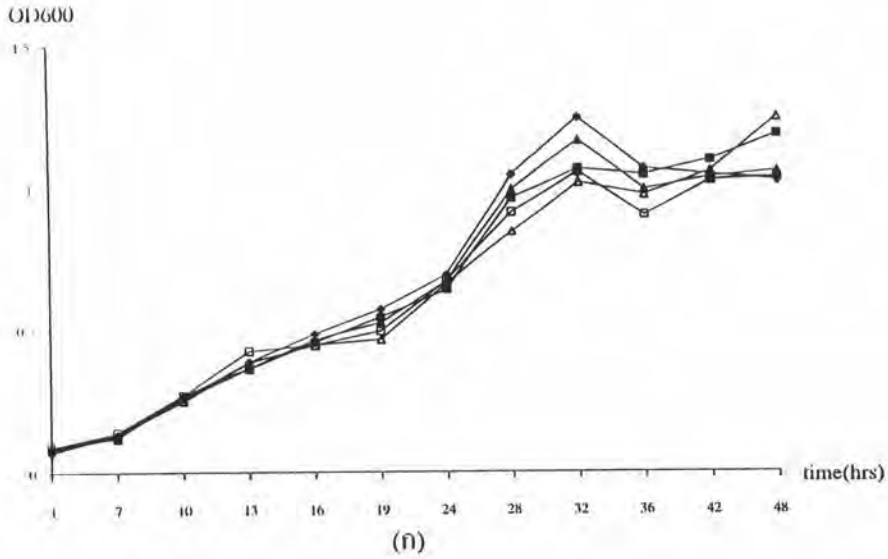


(ค)

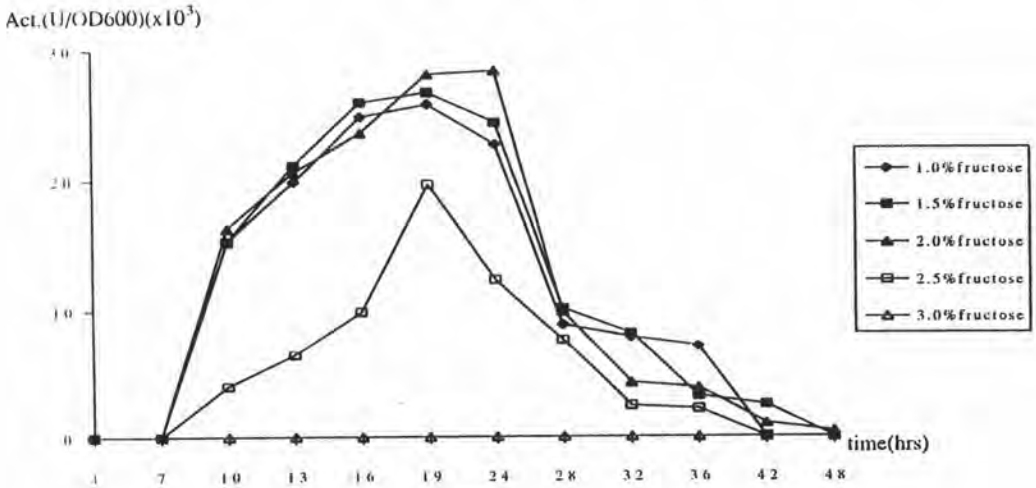
รูปที่ 3 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำ ปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0



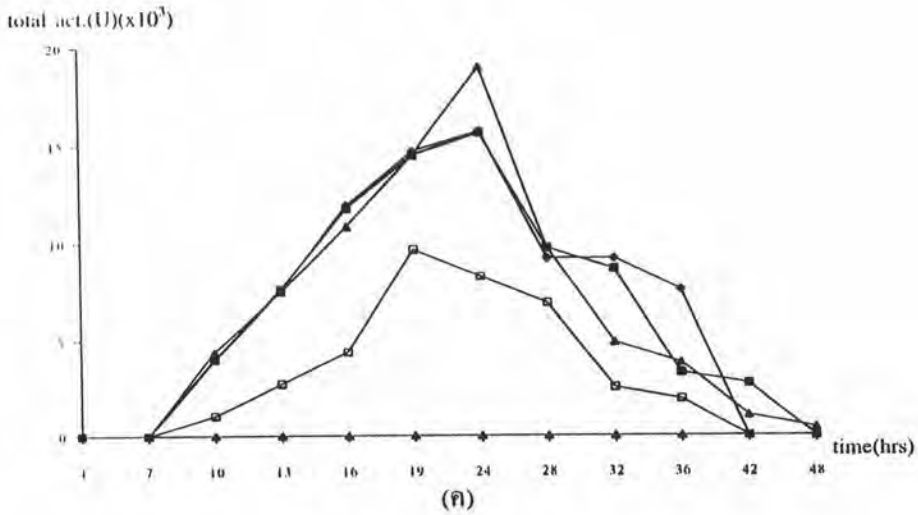
รูปที่ 4 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0



(ก)

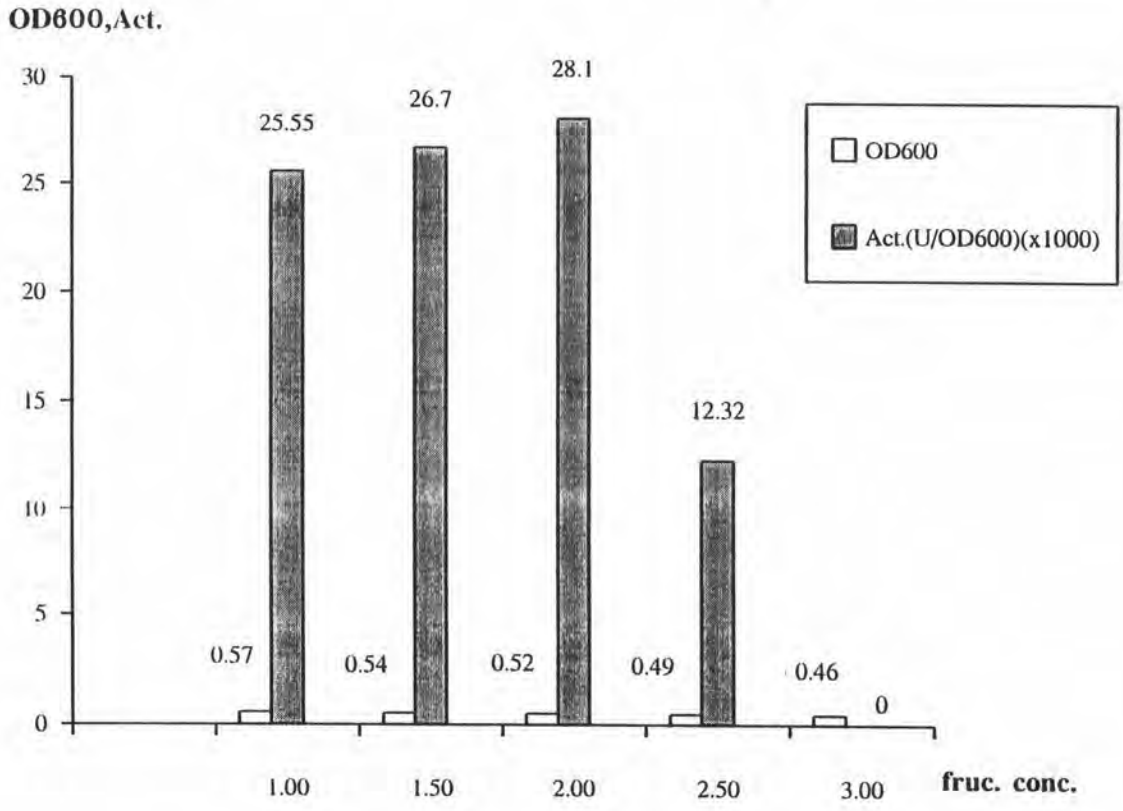


(ข)



(ค)

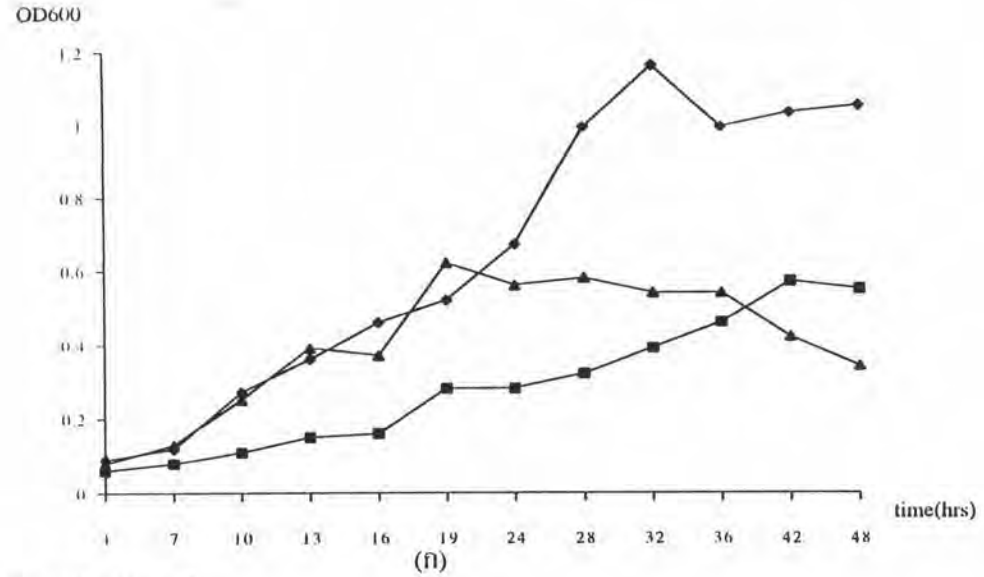
<u>รูปที่ 5</u> แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำ ปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0



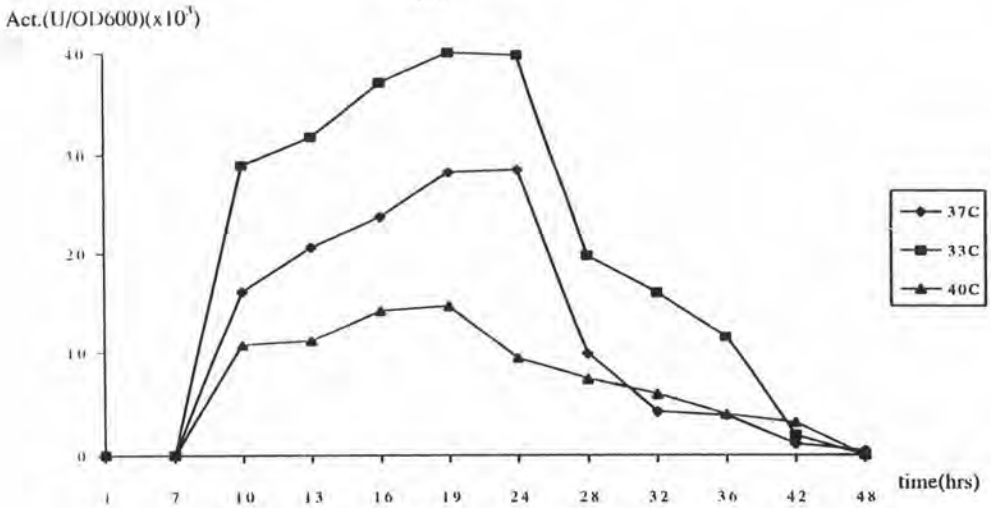
รูปที่ 6 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37°ซ, pH 7.0

4.1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

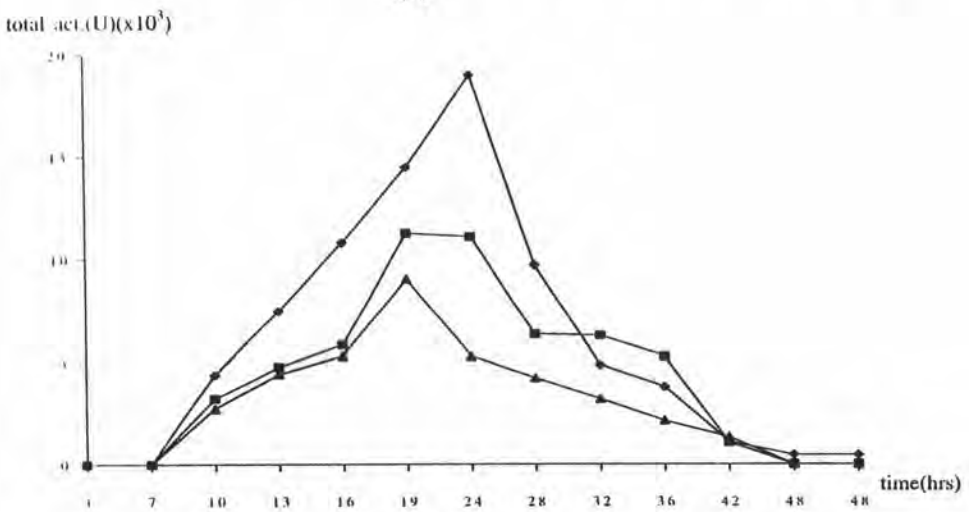
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 33, 37 และ 40^{0}ซ ในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.4.3 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดและให้แอคติวิตีรวมสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ เนื่องจากในการทดลองนี้ต้องการปริมาณเอนไซม์โดยรวมสูงๆเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์และศึกษาต่อไป



(ก)

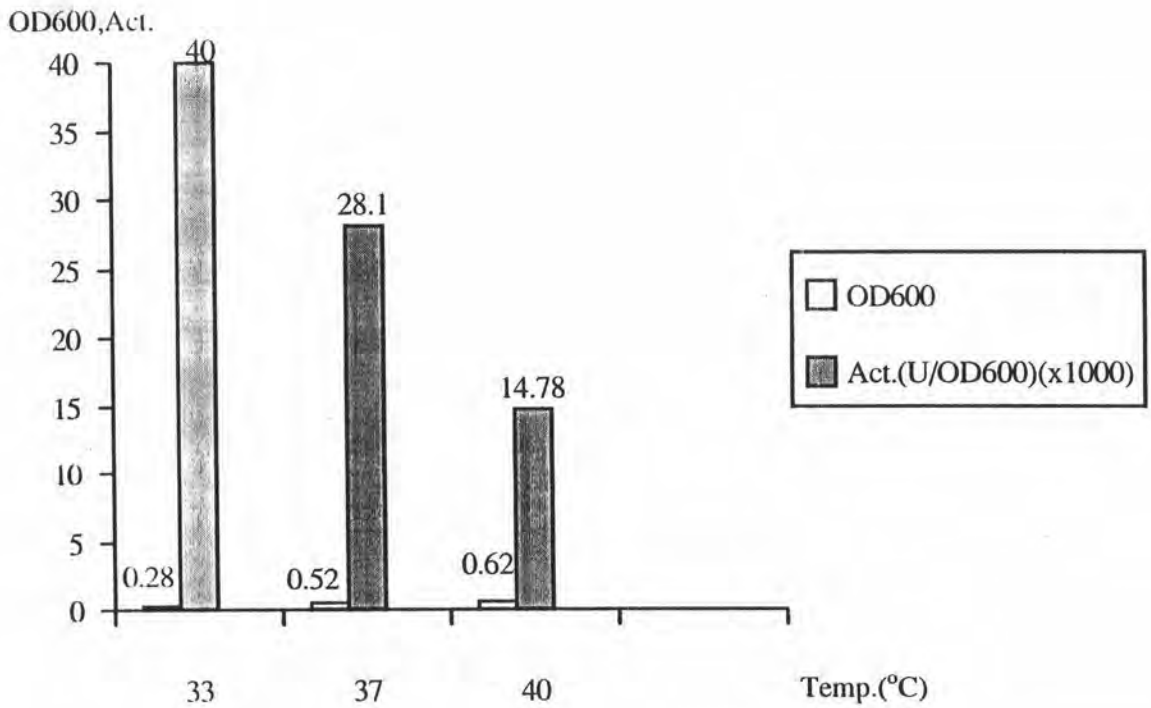


(ข)



(ค)

รูปที่ 7 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอคติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล.ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน

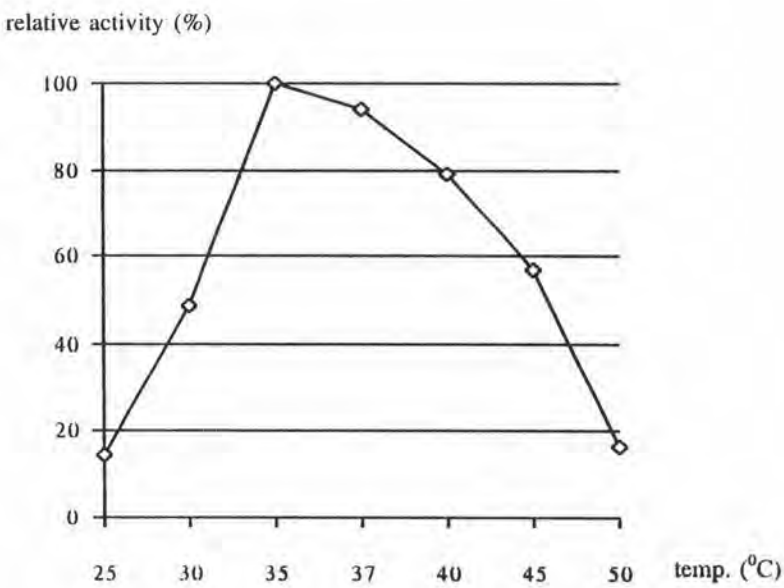


รูปที่ 8 เปรียบเทียบความข่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน

4.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme

4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude ไลเปส

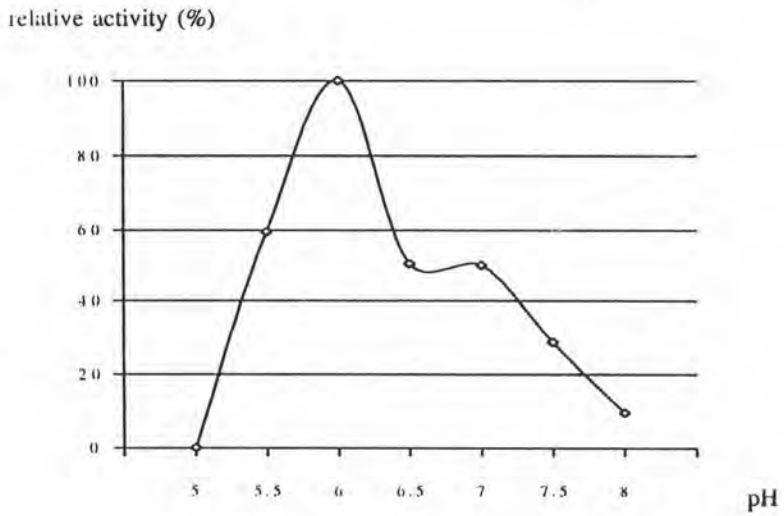
จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude ไลเปสที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 40, 45 และ 50°ซ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35°ซ



รูปที่ 9 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ crude lipase วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50°ซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์

4.2.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของ crude lipase

จากการศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของ crude lipase ที่ pH 5-8 พบว่า crude เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0



รูปที่ 10 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของ crude lipase วัดแอคติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่ อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณแอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซนต์

4.3 ผลการเตรียมเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มี 2 เปอร์เซนต์ ฟรุกโตส 250 มล. ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37^{0}ซ เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมินี้ให้แอคติวิตีรวมของไลเปสสูงที่สุด ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อสูงสุดที่เวลา 32 ชม.และผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ 24 ชม. ดังนั้นในการทดลองที่ต้องเตรียมเอนไซม์ปริมาณมากๆ จึงเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล.จำนวน 16 ขวด เก็บเอนไซม์ที่เวลา 24 ชม.หลังจากเลี้ยงเชื้อ จะเตรียมสารละลาย crude เอนไซม์ได้ประมาณ 4 ลิตร สารละลายนี้มีแอคติวิตีของไลเปส 24.2 หน่วย/มล. และปริมาณโปรตีน 48.36 ไมโครกรัม/มล.

4.4 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำ crude เอนไซม์จากข้อ 3.4.3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่างๆได้ผลดังนี้

4.4.1 ผลการทำ crude เอนไซม์ให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน

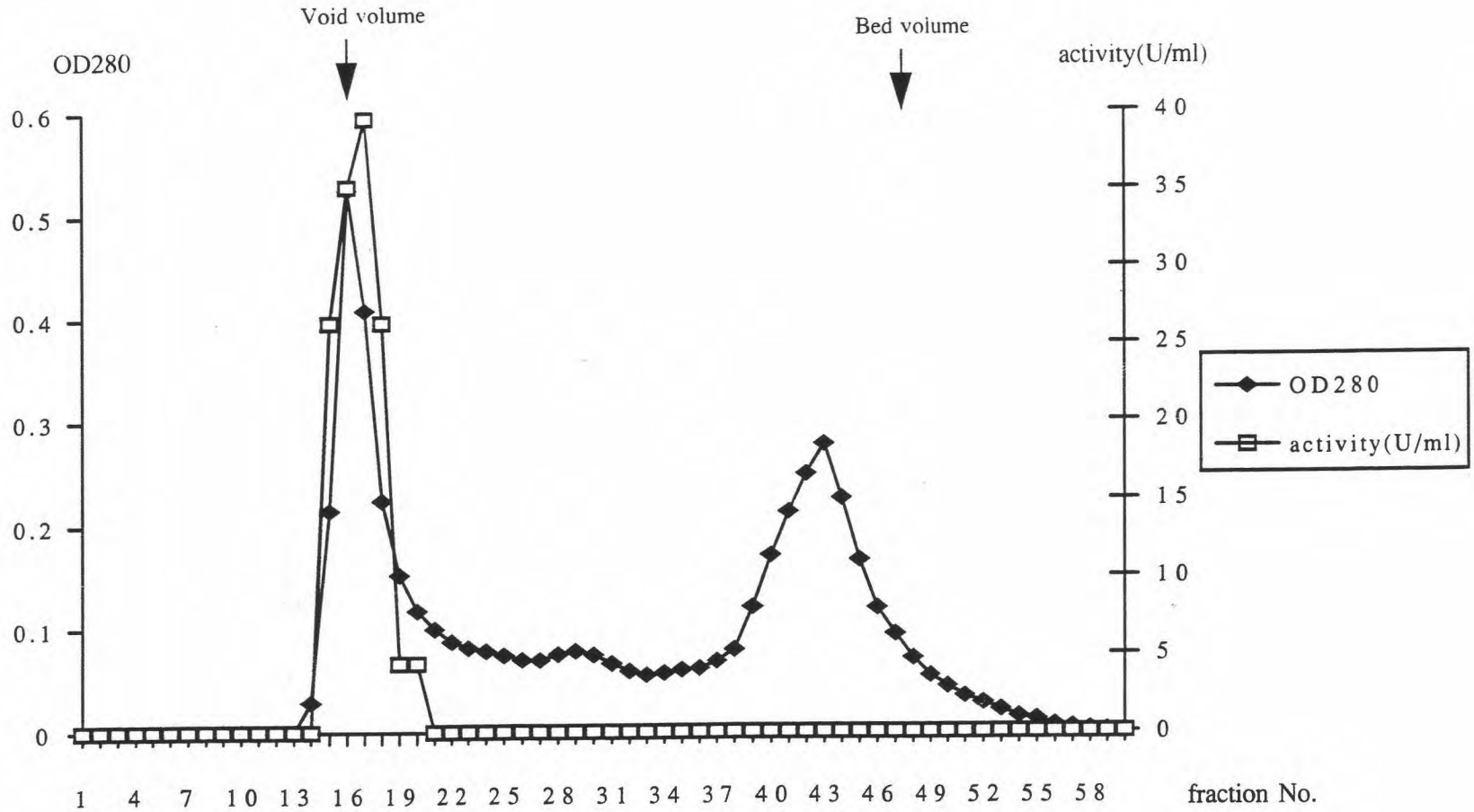
เมื่อ crude เอนไซม์ผ่านการกรองด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชันปริมาณโปรตีนรวมจะลดลงเหลือประมาณ 21 เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่เดิม แอคติวิตีรวมก็ลดลงเหลือ 74 เปอร์เซนต์ โดยเปอร์เซนต์ผลผลิตเอนไซม์(% yield) ที่ได้มีค่า 74 เปอร์เซนต์ แต่สารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้มามีแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นประมาณ 3.54 เท่า(ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.54 เท่า) จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100 เพื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

4.4.2 ผลการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100

เพื่อจะทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นจึงได้นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.4.1 ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100 (2.0x55 ซม.) จากผลการทดลองดังรูปที่ 11 จะพบว่าโปรตีนแยกเป็น 2 พีค (peak) โดยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนในพีคแรกซึ่งมีแอคติวิตีของไลเปส

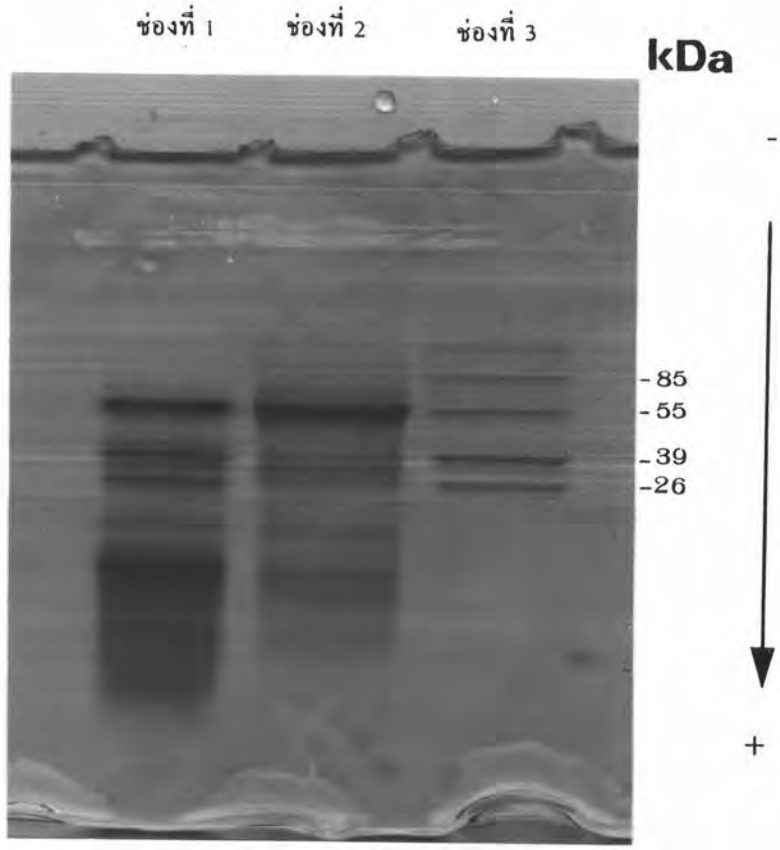
ผลการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์สรุปไว้ในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าจากสารละลาย crude เอนไซม์เริ่มต้นเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกเอนไซม์ไลเปสออกจากโปรตีนอื่นได้ และพบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.92 เท่า และได้ผลผลิต 44.42%

เมื่อนำพีคที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยเซฟาเด็กซ์ จี-100 มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผ่านวิธีอุลตราฟิลเตรชัน ผลการทดลองได้ดังรูปที่ 12


Void volume
Bed volume
OD280
activity(U/ml)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
40
35
30
25
20
15
10
5
0
OD280
activity(U/ml)
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58
fraction No.

ตารางที่ 2 ผลการแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์(โดยผลที่แสดงเป็นผลการทดลองเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง)

ขั้นตอน	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำ าเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	เปอร์เซนต์ผลผลิต	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
crude เอนไซม์	88,000	193.43	454.94	100	1
เอนไซม์เข้มข้น	65,120	40.47	1609.09	74	3.54
คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100	39,086	7.87	4966.46	44.42	10.92



รูปที่ 12 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ แยกโดย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 1 เอนไซม์เข้มข้น(จากอุลตราฟิลเตรชัน)แอคติวิตี 70 หน่วย (โปรตีน 40ไมโครกรัม)

ช่องที่ 2 ไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน(จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100) แอคติวิตี 140 หน่วย (โปรตีน 30 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน(ชนิดละ 2 ไมโครกรัม)

1. F-6-P kinase(MW 85,204)
2. Glutamate dehydrogenase(MW 55,562)
3. Aldolase(MW 39,212)
4. Triose phosphate isomerase(MW 26,626)

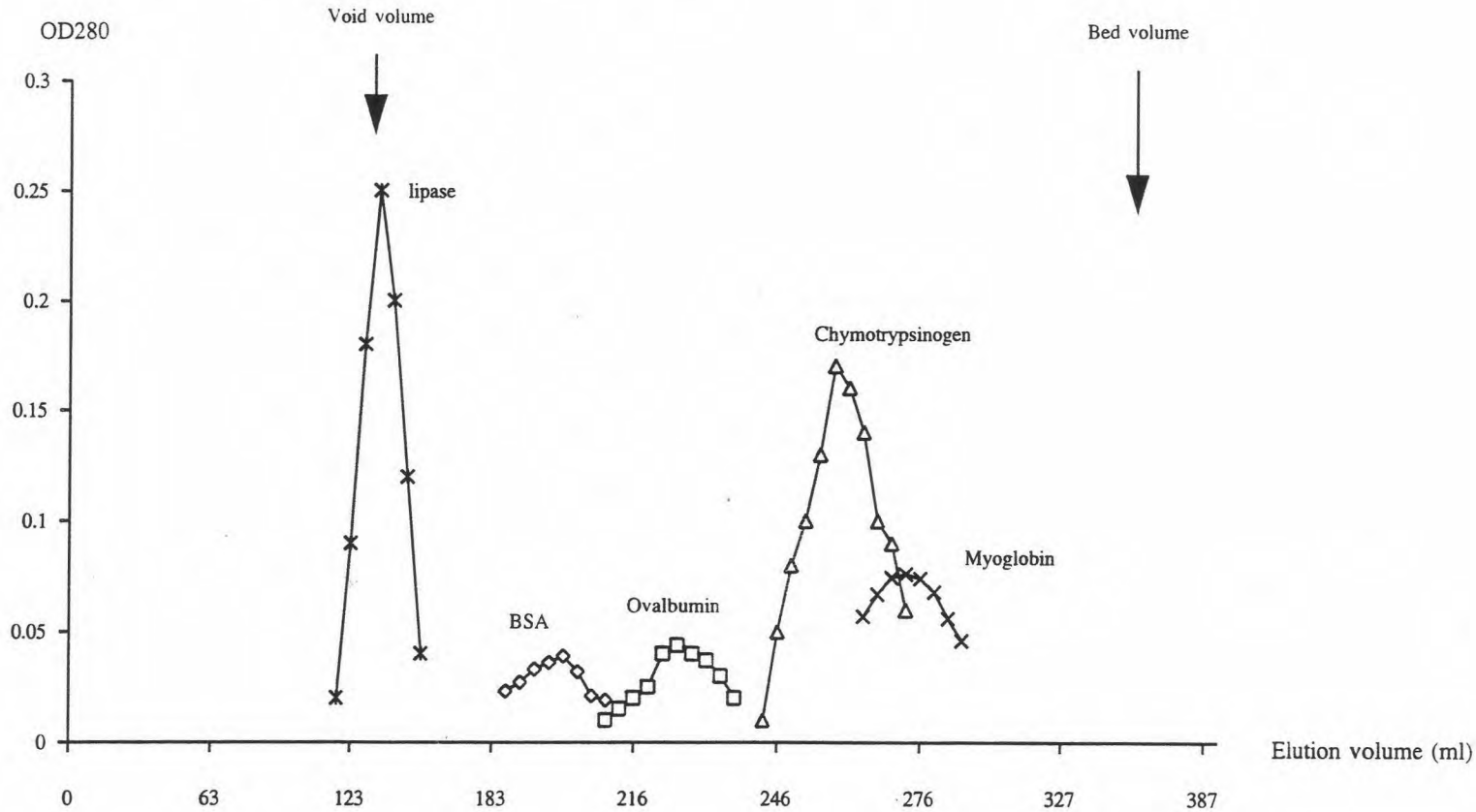
4.5 ผลการศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

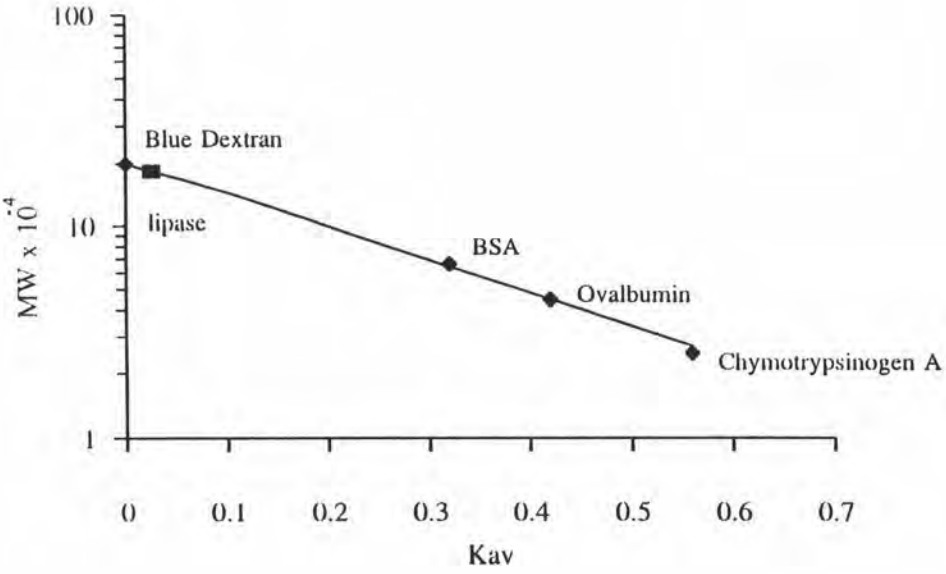
4.5.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้คอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-150

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วนลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-150 และชะด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ดังวิธีทดลองในข้อ 3.9.1 ผลการทดลอง(รูปที่ 13) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A และ Myoglobin จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 201, 225, 258 และ 273 มล.ตามลำดับ ในขณะที่ไลเปสจะออกจากคอลัมน์หลัง Blue dextran เล็กน้อยโดยมีค่า elution volume 132 มล. แสดงว่าไลเปสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าโปรตีนมาตรฐานที่ใช้มาก และหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยประมาณได้เท่ากับ 185,000 ดาลตันจากกราฟมาตรฐาน(รูปที่ 14)

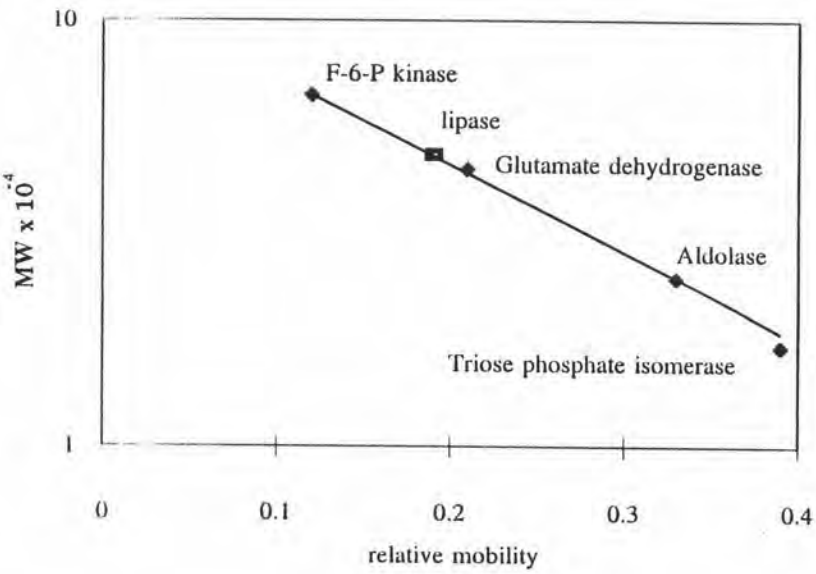
4.5.2 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วย เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส

นำสารละลายไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำอีเลคโตรโฟรีซีสโดยวิธีเอสดีเอสควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน ผลการทดลอง(รูปที่ 12) พบว่าโปรตีนมาตรฐาน Fructose-6-phosphate kinase, Glutamate dehydrogenase, Aldolase และ Triose phosphate isomerase จะมีการเคลื่อนที่ในแผ่นเอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล ซึ่งแสดงโดยค่า relative mobility เรียงลำดับดังนี้ คือ 0.12, 0.21, 0.33 และ 0.39 ส่วนแถบเข้มหลักของตัวอย่างมีค่า relative mobility 0.19 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน(รูปที่ 15) สามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 63,000 ดาลตัน


OD280
Void volume
Bed volume
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
lipase
Chymotrypsinogen
Myoglobin
Ovalbumin
BSA
0
63
123
183
216
246
276
327
387
Elution volume (ml)



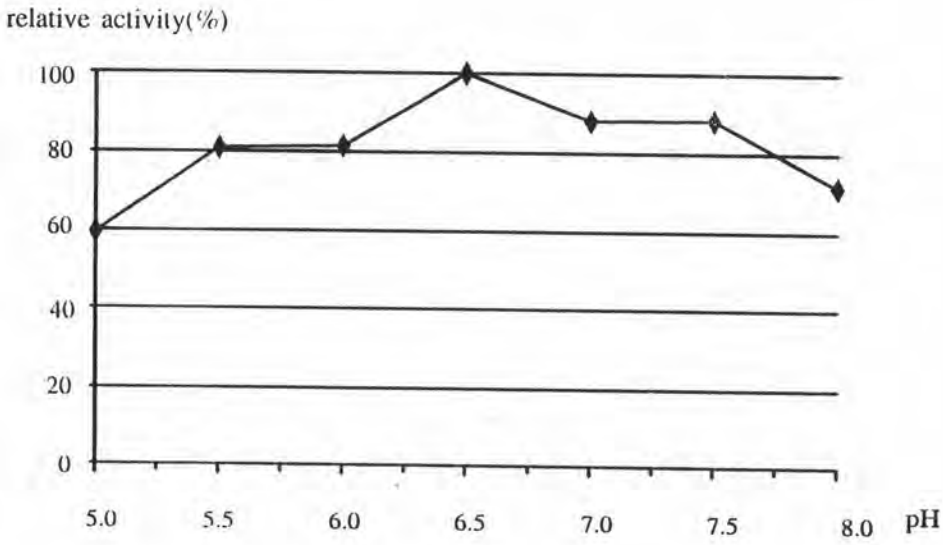
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kav และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนโดยกอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ตามวิธีทดลองข้อ3.9



รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเข้มหลักโดย SDS-PAGE

4.5.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อแอคติวิตีของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

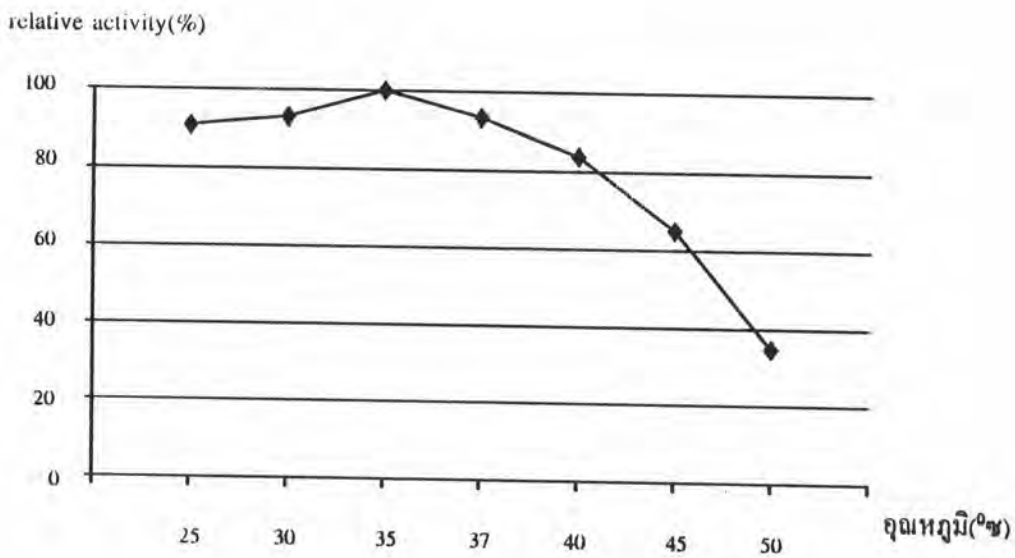
จากการศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่ pH 5-8 พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.5



รูปที่ 16 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน วัดแอคติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซนต์

4.5.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

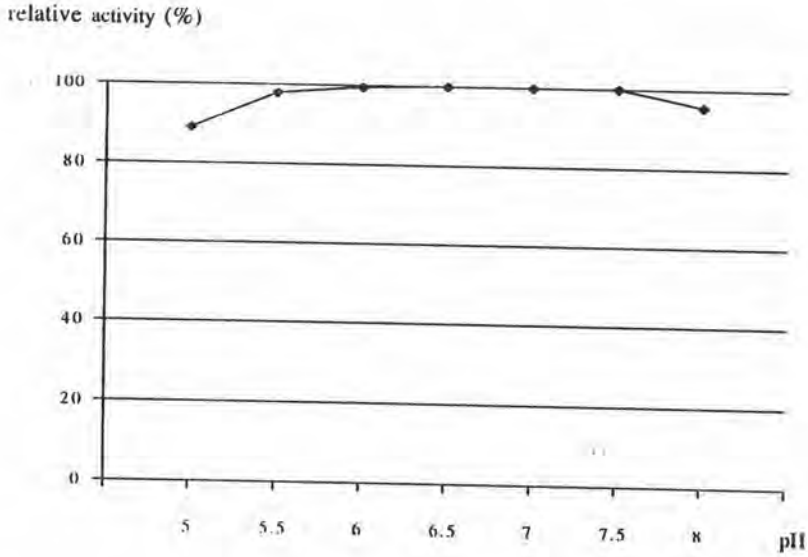
จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน ที่อุณหภูมิ25-50^{0}ซ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35^{0}ซ



รูปที่ 17 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50°ซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีทดลองข้อ 3.5โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซนต์

4.5.5 ผลการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน ที่ pH 5-8 พบว่าไลเปสจะมีความคงตัวในช่วง pH 6.0-7.5 เนื่องจากไม่เสียแอคติวิตีเมื่อบ่มที่ช่วง pH นี้ นาน 30 นาที อย่างไรก็ตามในช่วง pH ที่ทำการทดลองพบว่าไลเปสมีความคงตัวค่อนข้างสูง

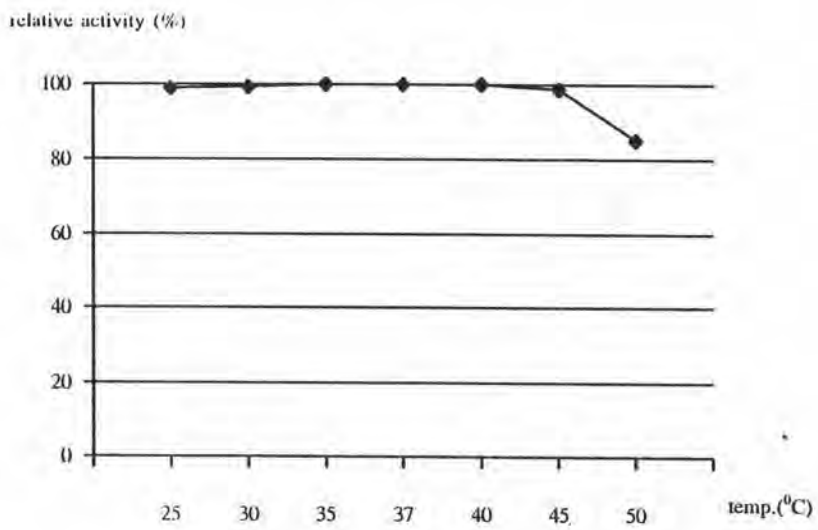


รูปที่ 18 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วย ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีที่ pH 6.0

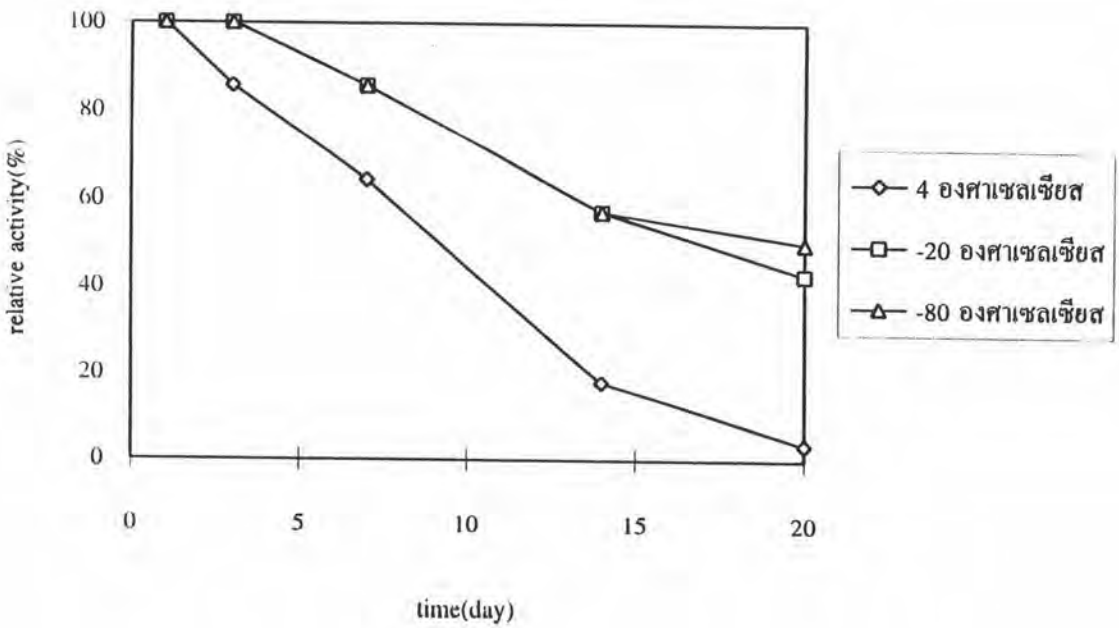
4.5.6 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิ 25-50^{0}ซ พบว่าไลเปสจะมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 25-45^{0}ซ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาว พบว่าเอนไซม์ที่เก็บในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะไม่สูญเสียแอคติวิตีเลยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 และ -80^{0}ซเป็นเวลา 3 วัน แต่จะสูญเสียแอคติวิตีไป 50 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้ 20 วัน ในขณะที่เอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ จะเสียแอคติวิตีเกือบหมดเมื่อเก็บไว้ 20 วัน



รูปที่ 19 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50^{0}ซ นาน 30 นาที วัดแอคติวิตีที่ pH 6.0



รูปที่ 20 ความเสถียรของไลเปสเมื่อเก็บเอนไซม์ 30 หน่วยในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในช่วงเวลาต่างๆกันที่อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 °ซ

4.5.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาพบว่า Mn^{2+} และ Fe^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ทั้งหมดและเกือบทั้งหมดตามลำดับ ส่วน Fe^{3+}, Mg^{2+}, Na^{+}, EDTA และ SDS ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้บ้าง แต่ Ca^{2+} ช่วยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดีขึ้น ส่วน K^{+} อาจเป็นตัวกระตุ้นแอคติวิตีของไลเปส

ตารางที่ 3 แสดงผลของสารเคมีบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปส เมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยใน 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0ที่มีสารเคมีเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นาน 30 นาที ที่ 37°ซ

สารเคมีที่ทดสอบ	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) (%)
-	100
Fe^{2+}	2.5
Fe^{3+}	30
Mn^{2+}	0
Mg^{2+}	35
Ca^{2+}	177.5
K^{+}	102.5
Na^{+}	65
EDTA	17.5
SDS	40

4.5.8 ผลการศึกษาการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิดของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

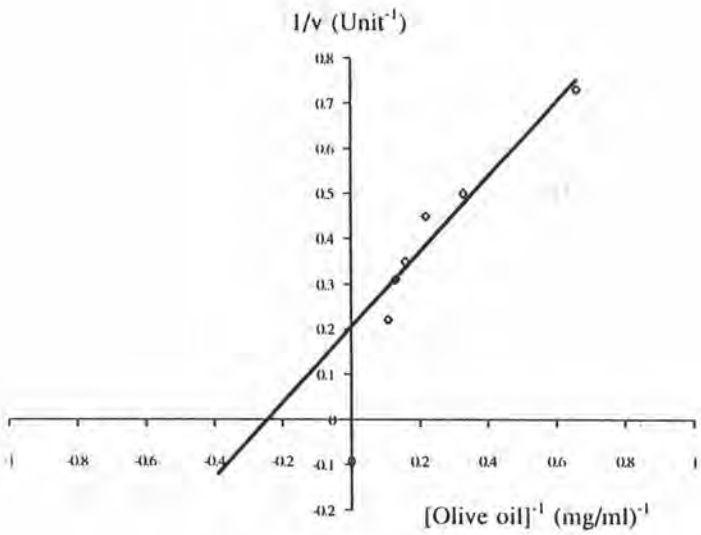
จากการทดลองพบว่าไลเปสที่เตรียมได้ย่อยน้ำมันได้หลายชนิด โดยย่อยน้ำมันมะกอกได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น แต่ไม่สามารถย่อยน้ำมันละหุ่งได้

ตารางที่ 4 แสดงผลการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด โดยปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งเท่ากับ relative activity 100 เปอร์เซนต์

สับสเตรท	relative hydrolysis(%)
น้ำมันมะกอก	100
น้ำมันข้าวโพด	57.14
น้ำมันละหุ่ง	0
น้ำมันถั่วเหลือง	14.29
ไตรบิวทิริน (tributyrin)	57.14

4.5.9 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเมื่อเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกต่างๆกัน(ภาคผนวกที่ 3) จะสามารถหาค่าความเร็วเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นต่างๆของสับสเตรทได้ และเมื่อนำค่าที่ได้มาพลอตแบบ Lineweaver-Burk plot จะสามารถหาค่า Km ได้เท่ากับ 4.09 มก./มล. และหาค่า Vmax ได้เท่ากับ 4.92 หน่วย



รูปที่ 21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ไลเปสทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 37°ซ pH 7.0 กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกในเวลา 1 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน