

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2540

รายงานผลการวิจัย

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของไลเปสจาก

Pseudomonas aeruginosa

โดย

นภา ศิวรังสรรค์

พฤษภาคม 2540

พ
วท 15
007236



กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ ที่ได้ช่วยเหลือเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำการวิจัย ตลอดจนนสารเคมีบางส่วนเพื่อให้งานวิจัยเริ่มต้นได้และจบลงอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้งานวิจัยจะปราศจากผู้ช่วยวิจัยที่มีฝีมือก็คงจะไม่มีวันได้ผลสำเร็จ จึงขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยคือ น.ส. รักชนก ธีรกวินสกุล ท้ายนี้ขอระลึกถึงท่านคณะกรรมการพิจารณาเงินทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2540 ทุกท่านที่ให้โอกาสได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของไลเปสจาก

Pseudomonas aeruginosa

ชื่อผู้วิจัย น.ส. นภา ศิวรังสรรค์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤษภาคม 2540

บทคัดย่อ

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย สามารถถูกชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้นได้โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.0 ในอาหารสูตรปรับค่าที่มี 0.13 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมี 2 % ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการผลิตไลเปสถูกกดคั้งในสภาวะที่มีกลูโคสด้วยกระบวนการคาตาบอลิซึมที่เพรสชัน เมื่อทำให้ crude เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยอุลตราฟิลเตรชันและแยกโดย Sephadex G-100 คอลัมน์โครมาโตกราฟี เอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 10.92 เท่า จากการศึกษาลักษณะสมบัติของไลเปสที่มีความบริสุทธิ์บางส่วนนี้ พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 6.5 และ 35 องศาเซลเซียส แคลเซียมไอออนช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยแมงกานีสไอออน แต่ถูกยับยั้งบางส่วนด้วยไอออนของเหล็ก (2+), แมกนีเซียมไอออน, EDTA และ SDS เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ได้ทั้งสับสเตรทที่เป็นกรดไขมันสายสั้นและสายยาวโดยน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการทดลองโดยค่า Km ค่อน้ำมันมะกอกเท่ากับ 4.09 มก./มล. ที่ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 เอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH 6.0-7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Partial Purification and Characterization of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*

Name of the Investigator Miss Napa Siwarungson

Year June 1997

Abstract

A chemical-defined medium with 0.13 %ammonium sulphate as nitrogen source and 2% fructose as carbon source at pH 7.0 and 37°C were the most suitable culturing condition for the production of extracellular lipase by a local strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Glucose was found to repress on the lipase production through catabolite repression. Lipase from *P.aeruginosa* was partial purified 10.92 fold by using ultrafiltration and Sephadex G-100 gel chromatography. The partial purified enzyme was a complex of subunits with molecular weight of 63,000. The optimum pH and temperature were 6.5 and 35°C, respectively. The enzyme was able to hydrolyse both long chain fatty acyl ester and short chain fatty acyl ester of glycerol. Enzyme activity was activated by calcium ion but was completely inhibited by Mn²⁺ and was partially inhibited by Fe²⁺, EDTA and SDS. The Km for the purified lipase with olive oil was found to be 4.09 mg./ml. at 37°C and then assayed at pH 6.0 and 37°C, the purified enzyme was found to be stable in the pH rang 6.0-7.5. The purified enzyme was stable over 30-40°C at pH 6.0 .

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทที่		
1	บทนำ.....	1
2	ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	
	2.1 ครุภัณฑ์	16
	2.2 เคมีภัณฑ์.....	18
	2.3 วัสดุคืบที่ใช้ในการทดลอง.....	19
	2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	19
3	วิธีการทดลอง	
	3.1 การเตรียมสาร.....	20
	3.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	25
	3.3 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ.....	25
	3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	26
	3.5 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส.....	27
	3.6 การวัดปริมาณ โปรตีน.....	27
	3.7 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์	27
	3.8 การทำเอสดีเอส-โพลีอะครลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	29
	3.9 การศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน.....	31
4	ผลการทดลอง	
	4.1 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ.....	36
	4.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude ไลเปส.....	48
	4.3 ผลการเตรียมเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์.....	49
	4.4 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	49
	4.5 ผลการศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน	55
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	68
	เอกสารอ้างอิง.....	82



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ ดฟ ๐๓ 15
เลขทะเบียน ๐๐ 7236
วัน,เดือน,ปี 11 พ.ค. 42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขั้นตอนการแยกเอโนไซม์ไลเปสจาก <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่างๆ ให้บริสุทธิ์	14
2	แสดงผลการแยกเอโนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์	53
3	แสดงผลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอกติวิตีของไลเปส	65
4	แสดงผลการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด	66
5	แสดงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้	79
6	แสดงสูตรโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท	79
7	แสดงค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Pseudomonas</i> ที่ได้จากผลการทดลองและที่มีรายงาน	80

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

- 1 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่าปริมาตร 250 มล.ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.0.....37
- 2 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.0.....38
- 3 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่าปริมาตร 250 มล.ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.0.....40
- 4 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.0.....41
- 5 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่าปริมาตร 250 มล.ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.042
- 6 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.043
- 7 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่าปริมาตร 250 มล.ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน45
- 8 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน46
- 9 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50⁰ซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5

	โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์.....	47
10	แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัตถุประสงค์ที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์.....	48
11	รูปแบบการแยกและทำไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุเอนไซม์เข้มข้นจากอุลตราฟิลเตรชันลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 2.0x55 ซม. ชะด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 อัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล.(วิธีทดลองข้อ 3.7.2) โดยคอลัมน์นี้มี $V_0=80$ มล. และมี $V_i=172.79$ มล.....	52
12	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์ไลเปส ให้บริสุทธิ์แยกโดย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน.....	54
13	รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐานและไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150(ขนาด 2.3x90 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.9 โดยชะคอลัมน์ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ อัตราการไหล 24 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. โดยคอลัมน์นี้มี $V_0=126$ มล., $V_i=374$ มล.....	57
14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ตามวิธีทดลองข้อ 3.9.....	58
15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเข็มหลักโดย SDS-PAGE.....	59
16	แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน วัตถุประสงค์ที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์.....	60
17	แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน	

	วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50 °ซ ที่ pH 6.0 ซ ตามวิธี ทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วย ซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์.....	61
18	แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี pH ต่างๆ ตั้งแต่ 5-8 เป็นเวลา 30 นาทีแล้ววัดแอกติวิตีที่ pH 6.0	62
19	แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วยในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 25-50 °ซ นาน 30 นาที วัดแอกติวิตีที่ 37 ⁰ ซ.....	63
20	ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเก็บเอนไซม์ 30 หน่วยในสารละลาย 0.05 โมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในช่วงเวลาต่างๆกันที่ อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 °ซ	64
21	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ไลเปสทำการวัดแอกติวิตีที่ อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ pH 7.0 กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณ ของกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกในเวลา 1 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน.....	67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่างๆ ให้บริสุทธิ์ 14
2	แสดงผลการแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ 53
3	แสดงผลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอกติวิตีของไลเปส 65
4	แสดงผลการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด 66
5	แสดงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้ 79
6	แสดงสูตรโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท 79
7	แสดงค่า K_m และ V_{max} ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Pseudomonas</i> ที่ได้จากผลการทดลองและที่มีรายงาน 80

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.0.....37
2	เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.0.....38
3	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. ที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.0.....40
4	เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.0.....41
5	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. ที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.042
6	เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 ⁰ ซ, pH 7.043
7	แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. ที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน45
8	เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี (NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน46

9 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัดแอกติวิตีที่ อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50°ซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์.....47

10 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัด แอกติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลองใน ข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์.....48

11 รูปแบบการแยกและทำไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุเอนไซม์เข้มข้นจากอูลตราฟิลเตรชันลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 2.0x55 ซม. ะด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 อัตรา การไหล 20 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล.(วิธีทดลองข้อ 3.7.2) โดยคอลัมน์นี้มี $V_0=80$ มล. และมี $V_r=172.79$ มล.....52

12 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ไลเปส ให้บริสุทธิ์แยกโดย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน.....54

13 รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐานและไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อหา น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150(ขนาด 2.3x90 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.9 โดยชะคอลัมน์ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ อัตราการไหล 24 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. โดย คอลัมน์นี้มี $V_0=126$ มล., $V_r=374$ มล.....57

14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน โดย คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ตามวิธีทดลองข้อ3.9.....58

15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ \log ของ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ แอมป์เข็มหลักโดย SDS-PAGE.....59

16 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์ บางส่วน วัดแอกติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37°ซตามวิธี ทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วย

- ซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์.....60
- 17 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน
วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50 °ซ ที่ pH 6.0 ซ ตามวิธี
ทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วย
ซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์.....61
- 18 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์
30 หน่วยที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี pH ต่างๆ
ตั้งแต่ 5-8 เป็นเวลา 30 นาทีแล้ววัดแอกติวิตีที่ pH 6.062
- 19 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์
30 หน่วยในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ
ตั้งแต่ 25-50 °ซ นาน 30 นาที วัดแอกติวิตีที่ 37 °ซ.....63
- 20 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเก็บเอนไซม์ 30 หน่วยในสารละลาย
0.05 โมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในช่วงเวลาต่างๆกันที่
อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 °ซ64
- 21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ไลเปสทำการวัดแอกติวิตีที่
อุณหภูมิ 37 °ซ pH 7.0 กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณ
ของกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกในเวลา 1 นาที
ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโคร โมลของกรดไขมัน.....67



บทที่ 1

บทนำ

เอนไซม์ไลเปส หรือ อีกชื่อหนึ่งคือ glycerol ester hydrolase หรือ acylglycerol hydrolase (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล พบว่าไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ โดยไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain aliphatic acid) กับกลีเซอรอล โดยไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Macrae, 1983)

จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ดังนี้ ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นตัวสร้างกลิ่นรส (flavor) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งพวกที่มีการบ่ม (ripening) เช่น Italian cheese, blue cheese และ Roquefort cheese (Arnold และคณะ, 1975) นอกจากนี้ไลเปสยังทำให้อาหารสุ่นขรรสชาติดีขึ้น และช่วยขจัดเศษเนื้อและเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากรัตถุดิบก่อนจะนำมาทำเนยผลิตภัณฑ์หนึ่งด้วย (Posorsze, 1984) ไลเปสยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง การผลิต aliphatic fatty acid และการกำจัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน (Macrae, 1983)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

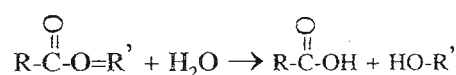
ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืชพวก ข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวไรน์(rye) ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง (Arnold และคณะ, 1975) ส่วนในสัตว์จะพบในตับอ่อน(pancreatic lipase) และในนม(milk lipase) (Shahani, 1975) แต่ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (ทนง, 2522)

ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละชนิดจะให้ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางพวกจะผลิต alkaline lipase เช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) บางพวกจะผลิต neutral lipase เช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และบางพวกก็จะผลิต thermostable lipase เช่น *Bacillus* sp. (Sugihara และคณะ, 1991) จากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันนี้เอง ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย (Yamane, 1987)

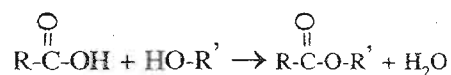
การทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane, 1987) คือ

- 1) ไฮโดรไลซ์เอสเทอร์

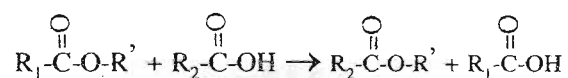


- 2) สังเคราะห์เอสเทอร์

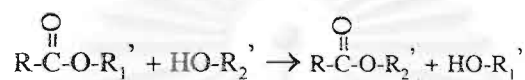


3) ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งแบ่งได้เป็น

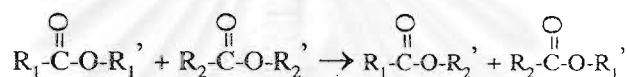
3.1) Acidolysis



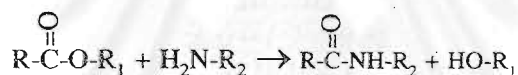
3.2) Alcoholysis



3.3) Ester exchange (interesterification)



3.4) Aminolysis



ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไลเปสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญ (growth phase) ที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลาย logarithmic phase ทั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) และยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่อเลย logarithmic phase ไปแล้ว (อยู่ในช่วง stationary phase) เช่น *Alcaligenes sp. No.679* (Kokusho และคณะ, 1982) และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) โดยในการผลิต extracellular enzyme นั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร (semi-starved) จะเหมาะสมต่อ

การผลิตเอนไซม์มาก เนื่องจาก extracellular enzyme ส่วนมากถูกปล่อยออกมามากที่สุดในช่วง late หรือ post exponential growth phase ซึ่งสภาพขณะนั้นสัปดาห์ที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว (Suzuki และคณะ, 1988)

นอกจากช่วงการเจริญแล้วสารอาหารซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารก็มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เช่น *Pseudomonas aeruginosa* EF2 ต้องการ Tween 80 (Gilbert และคณะ, 1991) ขณะที่ *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิดคือ soluble starch และ soybean meal (Yamaguchi และคณะ, 1973) ในทำนองเดียวกันแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสในจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็แตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ, 1973) แต่ *Alcaligenes* sp. ต้องการโซเดียมไนเตรตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kokusho และคณะ, 1982) นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้วแร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยจะพบว่า K_2HPO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็น องค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งใน *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Bacillus* sp. Strain 398 (Kim และคณะ, 1994)

นอกจากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุแล้ว สารเคมีที่สำคัญที่ถูกกล่าวถึงเสมอว่ามีบทบาทต่อการผลิตไลเปสก็คือ ไตรกลีเซอไรด์ โดยบทบาทของไตรกลีเซอไรด์ที่มีต่อการผลิตไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันมาก เช่น เชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะไตรกลีเซอไรด์ปริมาณ

เล็กน้อยจะทำหน้าที่เป็น inducer ตัวสำคัญในการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้สูง (Omar และคณะ, 1987) แต่ในทางตรงกันข้ามมีรายงานว่าไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิต alkaline lipase จาก *Pseudomonas fragi* (Watanabe, 1977) จากรายงานดังกล่าวคาดว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสจะแบ่งได้เป็น 2 พวก พวกแรกเป็นพวกที่ผลิตไลเปสในรูป constitutive enzyme ที่ไม่จำเป็นต้องเติมไตรกลีเซอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตไลเปสได้สูง อีกพวกหนึ่งจะผลิตได้ทั้ง constitutive lipase และ inducible lipase แต่ inducible lipase จะมีปริมาณมากกว่ามาก จึงจำเป็นต้องมีไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส อย่างไรก็ตามถ้ามีไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการผลิตไลเปสได้เช่นกัน (Suzuki และคณะ, 1988)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

1) อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสที่มี optimum pH อยู่ในช่วงเป็นกลางเช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) บางชนิดมี optimum pH ในช่วงเป็นกรดเช่น *Bacillus* sp. (Sugihara และคณะ, 1991) และ *Rhizopus niveus* (Kohno และคณะ, 1994) และบางชนิดมี optimum pH อยู่ในช่วงเป็นด่างเช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) และ *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima และคณะ, 1994)

ในการทำงานเดียวกันจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมี optimum temperature ต่างกัน บางชนิดมี optimum temperature ที่อุณหภูมิสูงเช่น *Bacillus* sp. มี optimum temperature ที่ 60⁰ซ

(Sugihara และคณะ, 1991) บางชนิดมี optimum temperature ที่อุณหภูมิปานกลางเช่น *Aspergillus oryzae* มี optimum temperature ที่ 30⁰ ซ (Toida และคณะ, 1995)

อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างนอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วยเช่น โไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 จะคงตัวอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่าง 5 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 45⁰ ซ เป็นเวลา 24 ชม.และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60⁰ ซ นาน 20 ชม.เอนไซม์ก็ยังคงมีแอกติวิตีอยู่ (Omar และคณะ, 1987) โไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* AK102 คงตัวในช่วงความเป็นกรดต่าง 4 ถึง 10 แต่จะคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50⁰ ซ นาน 1 ชม. (Kojima และคณะ, 1994) ส่วนไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* จะคงตัวในช่วงความเป็นกรดต่าง 6 ถึง 9 ที่ 25⁰ ซ นาน 18 ชม. และจะคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30⁰ ซ นาน 3 ชม. จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าไลเปสแต่ละชนิดจะคงตัวในช่วงอุณหภูมิที่ไม่กว้างนัก แต่จะมีความคงทนในช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้าง

2) แคลเซียมไอออน

จากการศึกษาไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) จากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) และจากแบคทีเรียพวก *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะสามารถช่วยให้ไลเปสเหล่านี้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งอธิบายได้ว่ากรดไขมันซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของไลเปสจะทำให้ reaction mixture มีความเป็นกรดมากขึ้นทำให้ไลเปสทำงานได้ลดลง แต่แคลเซียมไอออนจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (insoluble calcium soap) แล้วตกตะกอนทำให้กรดไขมันลดลง

ความเป็นกรดต่างของ reaction mixture ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทำงานของไลเปสจึงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไอออนจะสามารถช่วยให้ไลเปสจากจุลินทรีย์ทำงานได้มากขึ้นก็ต่อเมื่อใน reaction mixture มีการสะสมกรดโอเลอิก เพราะกรดโอเลอิกจะทำหน้าที่กระตุ้นให้แคลเซียมไอออนทำงาน แคลเซียมไอออนนี้จะทำงานได้ดีต่อเมื่อสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวกที่เป็น higher fatty acid เท่านั้น ถ้าสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก lower fatty acid พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน สรุปว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นในบางกรณีเท่านั้น การที่แคลเซียมไอออนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้นั้น ไม่ได้ขึ้นกับความคงตัวของเอนไซม์ ไม่ได้ขึ้นกับการขจัด (remove) กรดไขมันออกจากระบบของปฏิกิริยารวมทั้งไม่ได้ขึ้นกับการเปลี่ยนรูปเป็นเกลือแคลเซียมด้วย แต่จะขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ emulsion state ของ reaction mixture ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เนื่องมาจากการทำงานของเกลือแคลเซียมที่มาจากกรดไขมัน (Tsujiyaka และคณะ, 1972)

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการคือ

1. แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ทำให้ทำงานได้ดีขึ้น
2. แคลเซียมไอออนเพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของไลเปสที่ interface oil/water

3. แคลเซียมไอออนช่วยจัดกรดไขมันออกจาก oil/water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามเกลือแคลเซียมไม่ได้ช่วยการทำงานของไลเปสเสมอไป โดยแคลเซียมไอออนจะยับยั้งการทำงานของไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* (Kohr และคณะ, 1986) แต่แคลเซียมไอออนกลับไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonicus* NR400 (Suzuki และคณะ, 1986)

3) Emulsifying agent

เช่นเดียวกับปัจจัยอื่นๆ emulsifying agent ก็มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต่างกันออกไป โดยพบว่า bile salt สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ alkaline lipase จาก *Alcaligenes* sp. (Kokusho และคณะ, 1982) ในขณะที่ sodium deoxycholate และ sodium taurocholate จะยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Streptococcus thermophilus* (De Moraes และ Chandan, 1982) ส่วนไลเปสจาก *Candida rugosa* จะไม่ถูกยับยั้งโดย Neodol 91-6 ซึ่งเป็น nonionic surfactant ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Linfield และคณะ, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่า detergent บางชนิด เช่น Triton X-100, Lubrol PX, β -octylglucoside และ CHAPS ไม่ทำให้ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* เสียแอกติวิตี แต่ cetyltrimethylammonium bromide และ SDS จะยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Stuer และคณะ, 1986)

4) Physical state ของสัปสเตรท (oil/water interface)

ไลเปสจะทำงานย่อยสัปสเตรทที่ต่อเมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน (oil/water interface) และไลเปสถูกดูดซับระหว่าง oil-water interface เนื่องจากสภาพสัปสเตรทต้องอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ

(insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface และพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท

5) ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท

Macrae (1983) แบ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสพวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง(intermediate)ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2. ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน, 1,2 (2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่ 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว (unstable) ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกละลายได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และในพวก rhizopus อีกหลาย species

3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี ยกเว้นไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวกเช่น ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะ

ย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) กับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ไม่มี double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) จะแบ่งไลเปสออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือ พวกที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ และพวกที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกันโดยเด็ดขาด

Okumura และคณะ (1981) พบว่าไลเปสพวกที่มีความจำเพาะจะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ระหว่างที่มีการไฮโดรไลซ์ ขณะที่ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะจะไม่มี reverse hydrolysis ทำให้มีการไฮโดรไลซ์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ

6) lipase activator

Uyeda และคณะ (1983) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* No. NB.BR-1381 ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็น activator ของไลเปสได้ โปรตีนชนิดนี้มีชื่อว่า LAV ซึ่งมีคุณสมบัติคงตัวที่ pH 3.7 ที่อุณหภูมิ 37^oซ เป็นเวลา 20 ชม. และจะคงตัวที่ pH ดังกล่าวที่ 4^oซ เป็นเวลา 5 วัน LAV ที่บริสุทธิ์จะทนความร้อนได้สูง แต่จะไม่มีผลต่อการทนความร้อนของไลเปสจาก *Phycomyces niten* LAV จะสามารถกระตุ้นไลเปสจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น ไลเปสจาก *Phycomyces niten*, *Chromobacterium viscosum* และ *Geotrichum candidum* ส่วนกลไกการทำงานของ LAV นั้นเชื่อว่าเป็นเพราะกรดโอเลอิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการทำงานของไลเปสนั้นจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ เนื่องจากกรดโอเลอิกจะทำให้ pH ลดลง แต่ถ้ามี LAV ในระบบ LAV จะดูดซับ (adsorb) กรดโอเลอิกไว้ ทำให้ไม่เกิด product inhibition ขึ้น

ดังนั้น LAV จึงป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากกรดไขมันได้ ทำให้เอนไซม์มีการทำงานดีขึ้น

7) lipase inactivator

Sugiura และคณะ (1975) พบว่าสารพวก glycerophospholipids 3 ชนิด คือ phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl choline (PC) และ phosphatidyl inositol (PI) ที่สร้างโดย *Candida paraliopolytica* ที่อยู่ทั้งในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์ตัวเดียวกันได้ พบว่าที่ pH 8.2 phospholipid ทั้ง 3 ชนิดสามารถทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ แต่ที่ pH 6.0 ซึ่งเป็น optimum pH ของไลเปสชนิดนี้จะมีเพียง PE เท่านั้นที่ทำงานได้

8) ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

นอกจากปัจจัยอื่นๆที่กล่าวมาแล้วไอออนโลหะ ก็มีผลต่อการทำงานของไลเปสเช่นกัน โดยทั่วไปแล้วไอออนของโลหะหนักพวก Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} และ Co^{2+} จะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสไม่ว่าจะมาจากแหล่งเชื้อ *Chromobacterium* sp. (Yamaguchi และคณะ, 1973) หรือ *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) ขณะที่ไลเปสจากบางแหล่งอาจจะทนการยับยั้งการทำงานจากโลหะบางชนิดได้ แต่ก็ยังถูกยับยั้งจากไอออนของโลหะอีกหลายชนิดเช่น ไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) ทนต่อ Co^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} และ Zn^{2+} (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) หรือไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* 22.39B ถูกยับยั้งจาก Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} น้อย แต่ถูกยับยั้งมากถ้าเป็น Zn^{2+} , Fe^{2+} และ Fe^{3+} (Nishio และคณะ, 1987b) ส่วนไลเปสจาก *Rhizopus japonicus* NR400 จะทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}

และ Sn^{2+} (Suzuki และคณะ, 1986) โดยยังไม่มีรายงานใดเลยที่พบว่าโลหะหนักจะช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปส

ในทางตรงกันข้ามกับไอออนของโลหะหนัก ไอออนบางชนิดจะสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสบางชนิดได้ เช่น Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ และ Li^+ ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium* ได้ (Yamaguchi และคณะ, 1973) ทำนองเดียวกัน Li^+ , K^+ และ Ca^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *H. lanuginosa* (Omar และคณะ, 1987) อย่างไรก็ตามไอออนของโลหะไม่ได้เพิ่มการทำงานของไลเปสเสมอไป โดยพบว่า Ca^{2+} และ Mg^{2+} ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *C. deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985)

การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์

การทำเอนไซม์จาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ให้บริสุทธิ์เท่าที่ผ่านมาทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น การกรองด้วย Ultrafiltration, การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, Ion-exchange chromatography และ Gel filtration เป็นต้น

เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* นี้พบในส่วนตะกอนของบ่อเลี้ยงกุ้ง และอาหารของกุ้งก็มี fish oil ซึ่งประกอบด้วย unsaturated fatty acid (C_{18} ขึ้นไป) เป็นองค์ประกอบหลัก (38%) และมีกรดโอเลอิก (16%) และกรดลิโนเลอิก (15%) รวมอยู่ด้วย (SBP Board of Consultants & Engineers, 1985) ดังนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* นี้จึงควรจะย่อย fish oil ได้ด้วย และยังมีรายงานว่า *Pseudomonas* ที่ผลิตไลเปสได้ในส่วน hindgut ของกุ้ง (Dempsey และ Kitting, 1987) แสดงว่า

ไลเปสจาก *Pseudomonas* มีส่วนช่วยในการย่อยไขมันเพื่อให้กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ดังนั้นถ้ามีการเติมไลเปสลงไปให้อาหารของกุ้งก็ น่าจะช่วยให้กุ้งได้รับกรดไขมันเพิ่มขึ้นและโตเร็วขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง

เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญในแง่ใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวข้างต้น การศึกษาหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสชนิดที่ต้องการในปริมาณสูง หรือเพื่อค้นหาเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น หรือเหมาะสมมากขึ้นในการใช้งานแต่ละด้านจึงเป็นงานวิจัยที่นอกจากจะมีความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจในการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานแล้ว ยังอาจเกิดศักยภาพการนำไปประยุกต์ใช้ได้ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้ คือ

1. ศึกษาสภาวะของการผลิตไลเปสในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*
2. ศึกษาวิธีทำให้ไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน
3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และจลนศาสตร์ของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน
4. ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนในการย่อยสลายไขมัน
5. เปรียบเทียบเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนกับไลเปสที่มีผู้ศึกษามาก่อนนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ให้บริสุทธิ์

ชื่อ	ชนิดของไลเปส	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas fragi</i>	alkaline lipase	-Ultrafiltration,dialysis,lyophilization -(NH ₄) ₂ SO ₄ -fractionation -DEAE-Sephadex	Mencher และ Alford (1967)
<i>Pseudomonad</i>	alkaline lipase	-Sephadex G-100 -Sephadex G-200	Lawrence, Fryer และ Reiter (1967)
<i>P. aeruginosa</i>	-	-Ultrafiltration -CHAPS solubilization -IEF	Stuer, Jaeger และ Winkler (1986)
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain ATCC 21808	-	-Ultrafiltration -Q-Sepharose -Octyl-Sepharose	Kordel และคณะ (1991)
<i>P. aeruginosa</i> EF2	-	-Ultrafiltration -Mono-Q -Superose	Gilbert, Cornish และ Jones (1991)

ชื่อ	ชนิดของไลเปส	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
<i>P. cepacia</i>	acidic lipase	-Arcinol treatment -Macro-Prep methyl HIC -Sephacryl S-100HR	Sukihara และคณะ (1992)
<i>P. fluorescens</i> AK102	alkaline lipase	-(NH ₄) ₂ SO ₄ -precipitate -DEAE-Toyopearl -Phenyl-Toyopearl	Kojima, Yokoe และ Mase (1994)
<i>P. fragi</i> CRDA 323	alkaline lipase	-Acid precipitate -(NH ₄) ₂ SO ₄ -precipitate	Pabai, Kermasha และ Morin (1995)

าลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Spectronic 20D	Bausch & Lomb, U.S.A.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Model DU 650	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
3. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge) Beckman Model J-21C	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
4. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled Environment Incubator Shaker) Psychrotherm Model G 760	New Brunswick Scientific Co.,Inc., Edison, N.J., U.S.A.
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) Model HA-30	Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Model Heraeus Type B 5050E	Heraeus, Germany
7. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) Kokusan Model H-103N Series	Kokusan, Japan
8. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary Water Bath Shaker)	New Brunswick Scientific Co.,Inc., Edison, N.J., U.S.A.
9. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) Model PHM 83 Autocal	Radiometer, Copenhagen, Denmark
10. เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) Model Lyph-Lock 1L	LABCONCO, U.S.A.

ครุภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
11. เครื่องแช่แข็ง (Freezer) Model SF-C9	ชันโย ยูนิเวอร์แซล อิเลคทริก ประเทศไทย
12. เครื่องกรอง (Ultrafiltration) Model CDS 10	Amicon Div., W.R. Grace & Co., U.S.A.
13. เครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction Collector) Model LKB Redifrac	Pharmacia
14. ชุดทำไฟฟ้าโครมาโตกราฟีอิเล็กโตรโฟรี ซิส (Electrophoresis Unit) Model 2050 MIDGET	LKB Produkter AB, Sweden
15. Oil Rotary Vacuum Pump, Model RP- 350M	Makashi Seisakusho Co. Ltd., Japan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
Fructose	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
Gum Arabic	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
Standard Protien	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
-Chymotrypsinogen A	
-Ovalbumin	
-BSA	
-Myoglobin	
Tributyrin	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
Galactose	BDH Laboratory Chemical Division England
Maltose Monohydrate	BDH Laboratory Chemical Division England
Lactose	BDH Laboratory Chemical Division England
Oleic acid	BDH Laboratory Chemical Division England
Ferric chloride	BDH Laboratory Chemical Division England
Disodium ethylenediamine tetraacetate	Fluka AG. Buch, Switzerland
Tween 80	Fluka AG. Buch, Switzerland
Ammonium Sulfate	Fluka AG. Buch, Switzerland
Glucose	Fluka AG. Buch, Switzerland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	Fluka AG. Buch, Switzerland
Phenolphthalein	May&Baker Ltd., England
Calcium chloride dihydrate	May&Baker Ltd., England
Manganese chloride	May&Baker Ltd., England
Ethanol	E.Merk Ag. Darmstadt Germany
Acetic acid, glacial	E.Merk Ag. Darmstadt Germany
Di-potassium hydrogen phosphate, anhydrous	E.Merk Ag. Darmstadt Germany
Potassium dihydrogen phosphate	E.Merk Ag. Darmstadt Germany
Sodium chloride	E.Merk Ag. Darmstadt Germany

เคมีภัณฑ์	บริษัท/ประเทศ
Bacto-agar	Difco Laboratories, U.S.A.
Bacto-peptone	Difco Laboratories, U.S.A.
Yeast extract	Oxoid Mallinckrod.Inc., U.S.A.
Sephadex G-100, G-150	Phamacia Fine Chemicals, Sweden
Phenyl-Sepharose CL-4B	Phamacia Fine Chemicals, Sweden

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ	บริษัท
น้ำมันถั่วเหลือง ทรายอุน	บริษัทน้ำมันพืชไทยจำกัด มหาชน
น้ำมันละหุ่ง	บริษัทวิทยาสตรมจำกัด
น้ำมันมะกอก	บริษัทวิทยาสตรมจำกัด
น้ำมันข้าวโพด ทรายมาโซลา	บริษัทซีพีซี/อายุ ประเทศไทย จำกัด

2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ โดย คุณเปรมสุตา สมาน เป็นผู้คัดแยกได้จากส่วนของน้ำและดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อำเภอ ระโนด จังหวัดสงขลา ประเทศไทย เมื่อส่งไปตรวจแยกสายพันธุ์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1. การเตรียมสาร

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1.1 Luria-Bertani medium (LB)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^oซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² นาน 15 นาที

3.1.1.2 อาหารสูตรปรับต่ำ (minimum medium)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.9	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.6	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม

yeast extract	0.1	กรัม
olive oil	10.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับ pH เป็น 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วเติม olive oil จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารแข็ง (minimum medium agar plate) ให้เติม Bactoagar 15 กรัม ใน minimum medium จำนวน 1 ลิตร

3.1.2 การเตรียมสารในการหาแอกติวิตีของไลเปส

3.1.2.1 การเตรียมอิมัลชันของสับสเตรท (1.5% olive oil emulsion)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sugihara และคณะ (1991) ในสารละลายประกอบด้วย

1% (w/v) gum arabic solution	300	มล.
1 M NaCl	30	มล.
2% (w/v) CaCl ₂	7	มล.

ผสมทั้ง 3 ส่วนให้เข้ากันดีแล้วเติม olive oil 1.5 มล. ต่อ ส่วนผสม 100 มล. แล้ว

ปั่นด้วยเครื่องปั่น moulinex ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที

3.1.2.2 การเตรียม 0.05 M Acetate buffer , pH 5.0-5.5

-0.05 M Sodium acetate

ละลาย CH₃COONa 2.051 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

-0.05 M Acetic acid

ผสมกรดอะซิติก 1.43 มล.ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

ในกรณีที่จะเตรียมบัฟเฟอร์ pH 5.0 ผสมสารละลายกรดอะซิติกกับสารละลายโซเดียมอะซิเตทในอัตราส่วน 50:86.9 มล.

ในกรณีที่จะเตรียมบัฟเฟอร์ pH 5.5 ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 20:109.9 มล.

3.1.2.3 การเตรียม 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0-7.5

-0.05 M K_2HPO_4

ละลาย K_2HPO_4 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

-0.05 M KH_2PO_4

ละลาย KH_2PO_4 3.4022 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 6.0 ผสม 0.05 M K_2HPO_4 :0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 13.04:89.96 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 6.5 ผสม 0.05 M K_2HPO_4 :0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 32.43:67.57 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 7.0 ผสม 0.05 M K_2HPO_4 :0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 60.16:39.84 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 7.5 ผสม 0.05 M K_2HPO_4 :0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 82.73:17.27 มล.

3.1.2.4 การเตรียม 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

ละลายทริส 1.212 กรัมในน้ำ 100 มล. นำสารละลายนี้มา 50 มล.แล้วปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

3.1.1.3 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด

(Bradford, 1976)

3.1.3.1 สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มก. ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มล. เติม 85% กรดฟอสฟอริกปริมาตร 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.3.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มก./มล.)

ละลาย Bovine serum albumin 10 มก. ในน้ำกลั่น 10 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.1.4 การเตรียมสารละลายสำหรับเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.1.4.1 สารละลายอะไครลาไมด์ (สารละลาย A)(30 เปอร์เซ็นต์อะไครลาไมด์, 0.8 เปอร์เซ็นต์บิส-อะไครลาไมด์)

นำอะไครลาไมด์ 29.2 กรัมและบิส-อะไครลาไมด์ 0.8 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

3.1.4.2 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8 เข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่งทริส 24.2 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.1.4.3 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8 เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งทริส 12.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.1.4.4 สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์เอสดีเอส

ละลายเอสดีเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.

3.1.4.5 สารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล

ผสม 50 มล.กลีเซอรอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์กับน้ำกลั่น 50 มล.

3.1.4.6 สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์โบรโมฟินอลบลู

ละลายโบรโมฟินอลบลู 100 มก.ในน้ำกลั่น 10 มล.

3.1.4.7 สารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโตรคัมบัฟเฟอร์ pH 8.3

ชั่งทริส 3.0 กรัม เอสดีเอส 1.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล.ปรับ pH เป็น 8.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.1.4.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลาย 0.1 กรัมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตในน้ำกลั่น 1.0 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

3.1.4.9 สารละลายสำหรับ separating gel (สารละลาย B)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8 75 มล.

สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์เอสดีเอส 4 มล.

น้ำกลั่น 21 มล.

3.1.4.10 สารละลายสำหรับ stacking gel (สารละลาย C)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8 50 มล.

สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์เอสดีเอส 4 มล.

น้ำกลั่น 46 มล.

3.1.4.11 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (Sample buffer)

สารละลายทริสไฮโดรคลอริก pH 6.8 0.6 มล.

สารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล	5.0 มล.
สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์เอสดีเอส	2.0 มล.
2-mercaptoethanol	0.5 มล.
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์โบรโมฟินอลบลู	1.0 มล.
น้ำกลั่น	0.9 มล.

3.1.4.12 น้ำย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie Blue R-250 1 กรัมในเมทิลแอลกอฮอล์ 450 มล. เติมกรดอะซิติก 100 มล. และน้ำกลั่น 450 มล.

3.1.4.13 น้ำล้างสีข้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมทิลแอลกอฮอล์ 100 มล. กับกรดอะซิติก 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เก็บใน LB ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดและปิดทับด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20°C เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลองให้นำมาเลี้ยงบน minimum medium agar plate ใหม่

3.3. การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ

3.3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 15 ชม.

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 7.5 มล. ลงในขวดรูปกรวยที่มีอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. นำมาเขย่าต่อที่ 37⁰ซ

3.3.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

เทน้ำเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3.2 ประมาณ 5 มล. ที่เวลาต่างๆออกมาวัดการเจริญ(ความขุ่น) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 20D)

3.4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

3.4.1 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 โดยมีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ได้แก่ peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจน 0.13% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 โดยมีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ olive oil, กลูโคส, กาแลคโตส, ฟรุคโตส, มอลโตส หรือ ซูโครส ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอน 1% (w/v หรือ v/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม แล้วหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลเปส โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 โดยเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงที่อุณหภูมิ

33, 37 และ 40⁰ซ

3.5. การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. กับอิมัลชันของสับสเตรท 15 มล. และบัฟเฟอร์ 5 มล. ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์(ซึ่งมีฟีนอลฟทาไลน์ละลายอยู่ในสัดส่วน 0.43%) 20มล. แล้วนำไปไทเตรทกับ 0.05 M KOH จนฟีนอลฟทาไลน์เปลี่ยนเป็นสีชมพู เพื่อหาปริมาณกรดไขมันที่ถูกปลดปล่อยออกมา เนื่องจากการย่อยน้ำมันมะกอก

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของกรดไขมัน(fatty acid)ที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกที่ 37⁰ซ ในเวลา 30 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน

3.6. การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-15 ไมโครกรัม

3.7. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์

ในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.3 ในภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4. หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4⁰ซ นาน 30 นาทีแยกเก็บส่วนน้ำใส เรียกส่วนนี้ว่า crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่ 4⁰ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.7.1 การทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุตราพิลเตรชัน

กรอง crude enzyme ผ่านอุตราพิลเตรชันชนิดซึ่งใช้แผ่นกรอง(membrane)เบอร์ YM10 ซึ่งกรองโมเลกุลที่มีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป โดยมีแก๊สไนโตรเจนช่วยดันที่ความดัน 55 psi กรองจนเหลือปริมาตรประมาณ 40 มล. เก็บสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่เหลือนีไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปทำให้อริสุทธิต่อไป

3.7.2 การทำเอนไซม์ไลเปสให้อริสุทธิด้วยการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

3.7.2.1 การเตรียมคอลัมน์

แช่ Sephadex G-100 ซึ่งแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,000-150,000 ดาลตัน ปริมาณ 20 กรัม ใน 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 600 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. หรือนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0x55 ซม. ให้ได้เจลสูง 50 ซม. ผ่านสารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0 อีกประมาณ 15 ซม. ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุล ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 4 มก./มล. และโปเจาสเซียมไดโครเมต 1 มก./มล.

3.7.2.2 การใช้คอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์เข้มข้นปริมาตร 3 มล. ลงในคอลัมน์ที่ 25°C เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 5 มล. ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของไลเปส แล้วนำหลอดที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์มารวมกันเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.7.3 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยวิธีไลโอไฟล์เซชัน (Lyophilization)

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.7.2.2 ใส่ในหลอดทนความเย็น แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ข้ามคืน นำหลอดบรรจุสารละลายแช่แข็งนี้ไปใส่ในขวด (freeze-drying flask) เพื่อนำไปต่อเข้ากับตัวเครื่อง (freeze-dryer) ซึ่งมีอุณหภูมิ -50°C จากนั้นเปิดปั๊มสุญญากาศจนภายนอกของ freeze-drying flask อุ่นขึ้นจนเท่าอุณหภูมิห้อง จึงจะแสดงว่ากระบวนการเสร็จสิ้น นำผงเอนไซม์ที่ได้มารวมกันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.7.4 การทำเอนไซม์ไลโปสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B

3.7.4.1 การเตรียมคอลัมน์

นำ Phenyl-Sepharose CL-4B ซึ่งแช่อยู่ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มาล้างด้วยน้ำกลั่น 10 ปริมาตร แล้วนำส่วนเจลมาแช่ใน binding buffer คือ 0.05M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ที่มี 1.7M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากนั้นนำไป de-gas แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0x30 ซม. ให้ได้เจลสูง 25 ซม. แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ต่ออีก 3 ปริมาตร

3.7.4.2 การใช้คอลัมน์

ละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 มก. ใน binding buffer แล้วผ่านสารละลายเอนไซม์ลงไปในคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 10 มล.ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของไลโปส

3.8. การหั่นออสดีเอส-โพลีอะครีลาไมด์เจลชนิดแผ่น

3.8.1 การเตรียมเจล (สำหรับเจล 2 แผ่น)

-เตรียม 12.5% separating gel โดยผสมสารละลายดังนี้

สารละลาย A

8.34 มล.

สารละลาย B	5.0	มล.
น้ำกลั่น	6.66	มล.
สารละลาย 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร
-เตรียม stacking gel ผสมสารละลายดังนี้		
สารละลาย A	1.34	มล.
สารละลาย C	2.0	มล.
น้ำกลั่น	4.6	มล.
สารละลาย 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	60	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

3.8.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างกับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:4 ในหลอดขนาดเล็ก นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 4 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.8.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบแผ่นเจลกับ electrode assembly โดยให้ปลายด้านล่างของแผ่นเจลแช่อยู่ในถาดบัฟเฟอร์ แล้วเติมอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ในภาชนะบรรจุที่ตั้งอยู่หลังแผ่นเจลและถาดด้านล่าง ปรับอุณหภูมิของภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์ให้ได้ 4⁰ซ นำสารละลายโปรตีนที่เตรียมในข้อ 3.8.2 ไปหยอดลงในช่องบนผิวหน้าเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 0.5 ซม.จากปลายล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.8.4 การย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล

แกะเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชม. จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.9. การศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลเพิลเตรชันและเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เซฟาเดกซ์จี-150 เจลเพิลเตรชันคอลัมน์

บรรจุ Sephadex G-150 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,000-400,000 ดาลตัน ปริมาณ 20 กรัมใน 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 800 มล. นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 5 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.3x90 ซม. ให้ได้เจลสูง 87 ซม. ผ่านสารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0 อีกประมาณ 50 ชม. ด้วยอัตราการไหล 24 มล./ชม. เพื่อให้เม็ดเจล เรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุล ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กชแทรน 4 มก./มล. และโพแทสเซียมไดโครเมต 1 มก./มล.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และ Myoglobin น้ำหนักโมเลกุล 17,200 ดาลตัน ในปริมาณ 5 มก./มล. ยกเว้นไลเปสจึงใช้ 2 มก./มล.

เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดแอกติวิตีของเอนไซม์และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์ นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_0 คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทผ่านออกมาจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ไลเปสลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์ โดยการวัดแอกติวิตี คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

แอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมเจล, สารละลายโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในทำนองเดียวกับข้อ 3.8.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Fructose-6-phosphate kinase น้ำหนักโมเลกุล 85,204 ดาลตัน Glutamate dehydrogenase น้ำหนักโมเลกุล 55,562 ดาลตัน Aldolase น้ำหนักโมเลกุล 39,212 ดาลตัน และ Triose phosphate isomerase น้ำหนักโมเลกุล 26,626 ดาลตัน จาก Calibration proteins for SDS gel electrophoresis ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมสำเร็จ มีความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิด 1-2 มก./มล.

การคำนวณหาหน้าหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วคำนวณหา mobility ดังนี้

$$\text{mobility} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวณค่า mobility ของเอนไซม์แล้วเทียบหน้าหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.9.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอกติวิตีของไลเปสตามวิธีในข้อ 3.5. โดยบ่มสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.0-5.5 (อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์), 6.0-7.5 (โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์), 8.0 (ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์)

3.9.3 การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability)

นำเอนไซม์มาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างๆ คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในข้อ 3.1.2 ที่อุณหภูมิ 37^oซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดแอกติวิตีที่เหลือตามวิธีในข้อ 3.5.

3.9.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอกติวิตีของไลเปสตามวิธีในข้อ 3.5. ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50^oซ

3.9.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ (Thermal stability)

นำเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆในช่วงระหว่าง 25-50^oซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดแอกติวิตีที่เหลือของเอนไซม์

ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาวด้วย โดยการนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -80, -20 และ 4 °C เป็นเวลา 1, 3, 7, 14 และ 20 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอกติวิตีที่เหลือของเอนไซม์

3.9.6 การศึกษาผลของไอออนบางชนิดและตัวบัฟเฟอร์เอนไซม์บางชนิดต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

บับสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. กับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 5.0 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดใดชนิดหนึ่งต่อไปนี้ คือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, EDTA, SDS, KCl, NaCl อย่างละ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C นำไปหาแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.5.

3.9.7 การหาความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด

วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.5. โดยศึกษาผลของการใช้สับสเตรทชนิดอื่นเทียบกับน้ำมันมะกอก โดยให้ความเข้มข้นของสับสเตรทแต่ละชนิดเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

3.9.8 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปส

วัดแอกติวิตีของเอนไซม์โดยเตรียมสารละลายในการทำปฏิกิริยาดังข้อ 3.5. ยกเว้นใช้บัฟเฟอร์ pH 7.0 เตรียมสับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ และวัดแอกติวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยการเติม 0.05 M KOH ลงไปใน reaction mixture เพื่อรักษา pH ให้คงที่ที่ 7.0 เติมเอนไซม์และจับเวลาแล้วอ่านปริมาณของ KOH ที่เติมลงไปทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 10 นาที จะได้ปริมาณของ KOH ที่เติมลงไปทุก 2 นาทีมาคำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการไตเตรท คำนวณหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจากกราฟแล้วนำไปเขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของ

น้ำมันมะกอก และหาค่า K_m และ V_{max} ของยับยั้งเอนไซม์โดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver

Burk plot



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

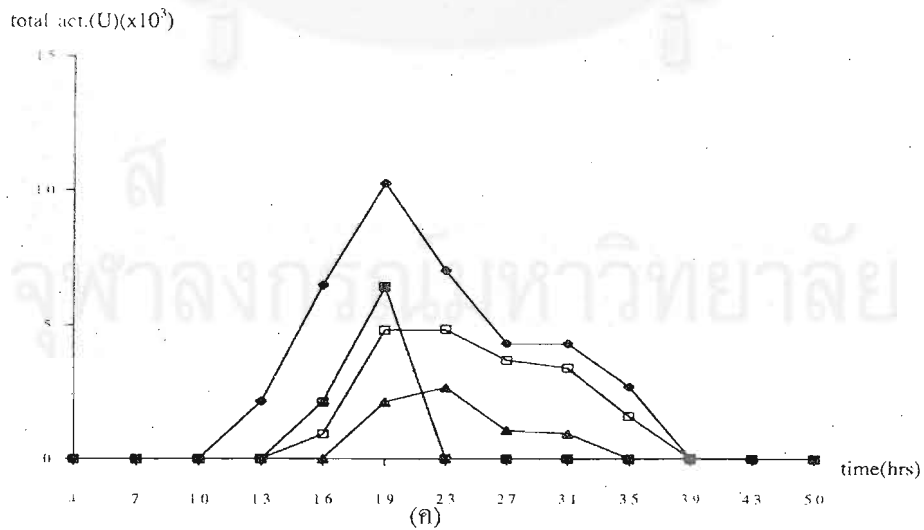
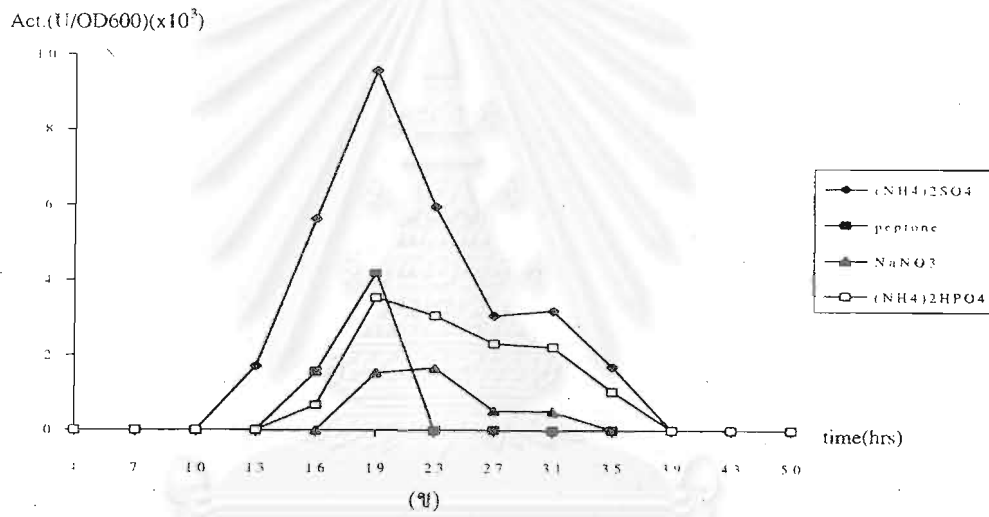
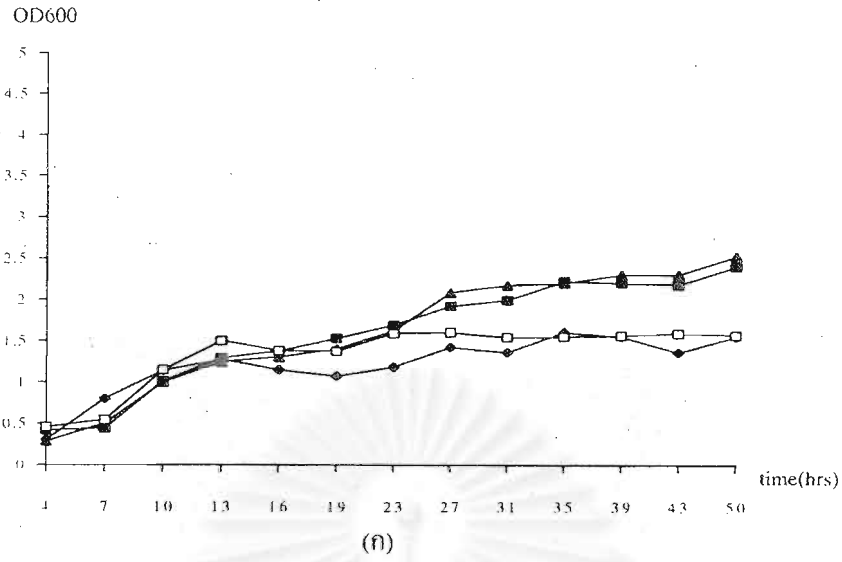
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ

Pseudomonas aeruginosa

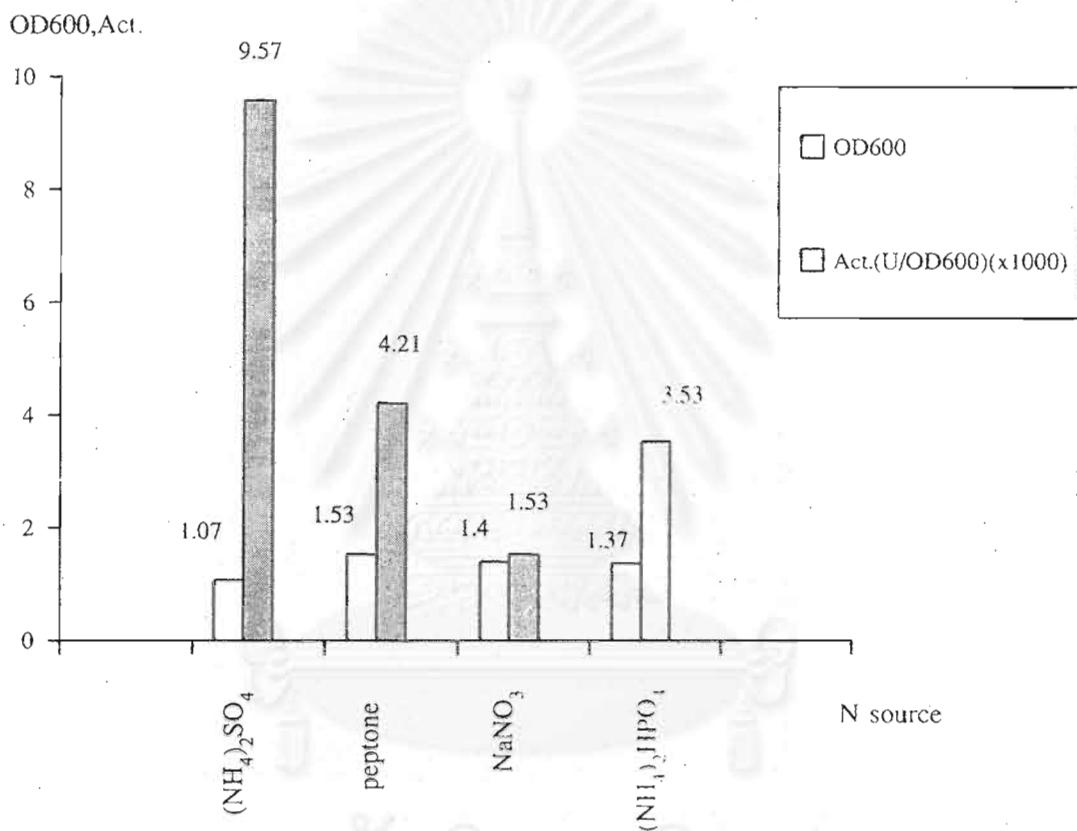
4.1.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ผลการทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต[(NH₄)₂SO₄], เปปโติน(peptone), โซเดียมไนเตรต(NaNO₃), และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต[(NH₄)₂HPO₄] เข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์ ผสมในอาหารสูตรปรับค่าที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ pH 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.1 พบว่าการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกันนักเมื่อให้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน แต่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่า ปริมาตร 250 มล. ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.0



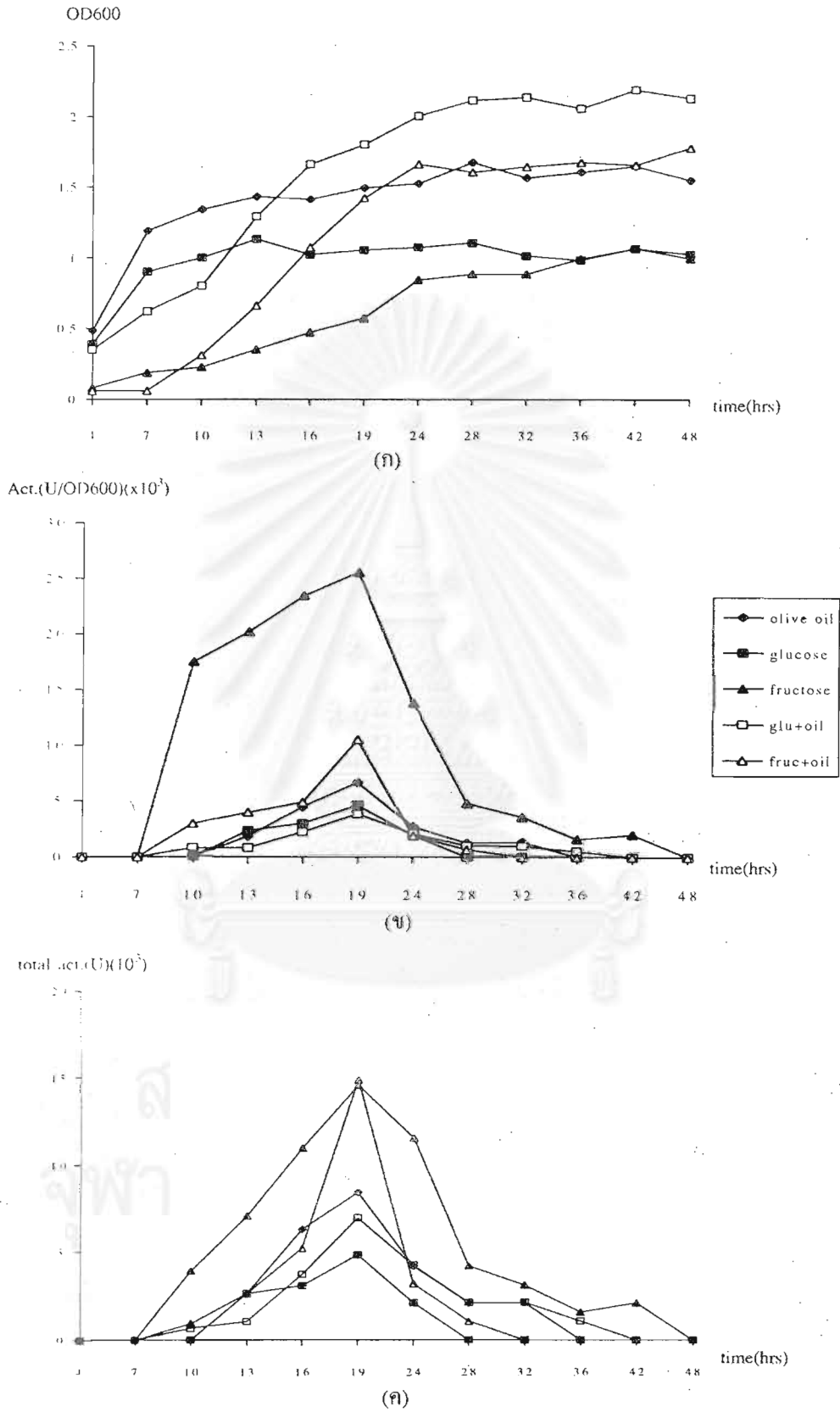
รูปที่ 2 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.0

4.1.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

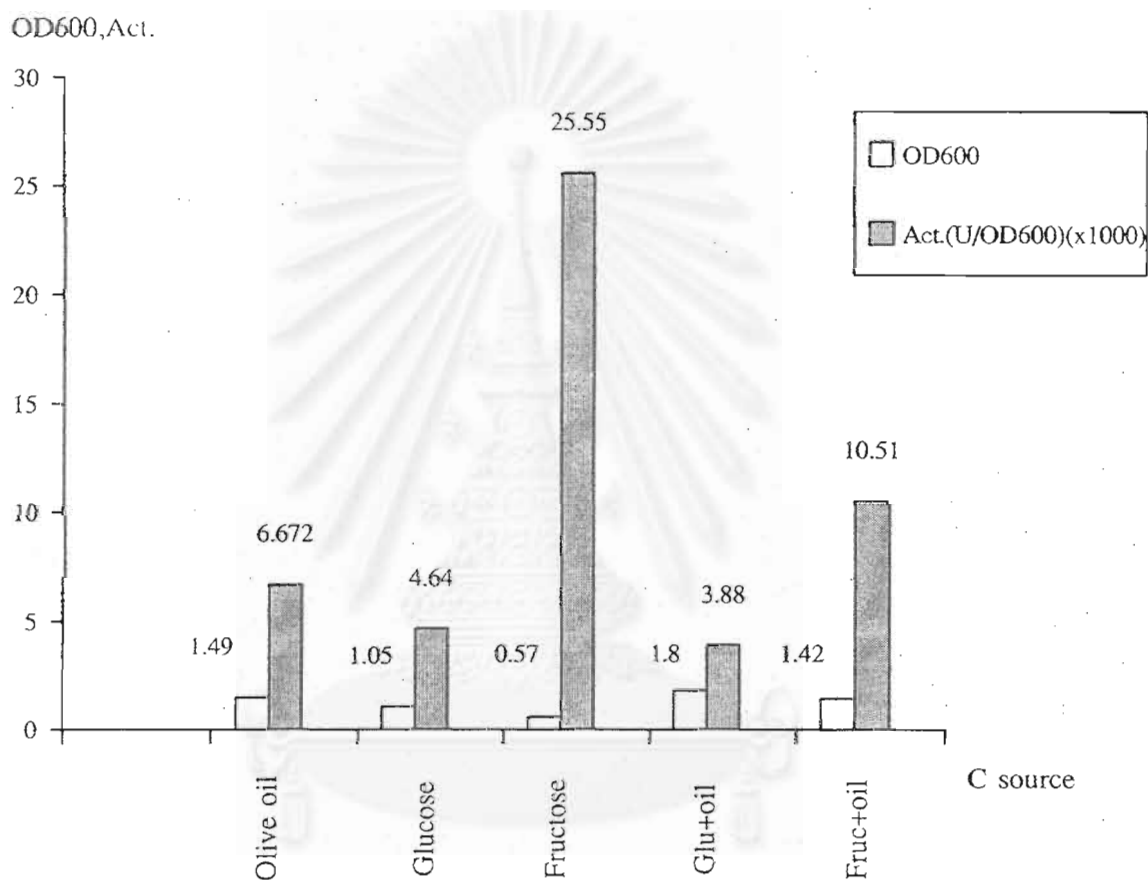
จากการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันมะกอก, กลูโคส, มอลโตส, ฟรุกโตส, กาแลคโตส และซูโครส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.13 เปอร์เซ็นต์ pH 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.4.2 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิตไลเปสได้เร็วขึ้นและสูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนในอาหารที่มีมอลโตส, กาแลคโตส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้และไม่ให้แอกติวิตีของไลเปส

เมื่อทดลองใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับน้ำมันมะกอก และ ฟรุกโตสกับน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีฟรุกโตสผสมกับน้ำมันมะกอกดีกว่าในอาหารที่มีกลูโคสผสมกับน้ำมันมะกอก แต่การผลิตไลเปสในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมจะต่ำกว่าในอาหารที่มีฟรุกโตสอย่างเดียว

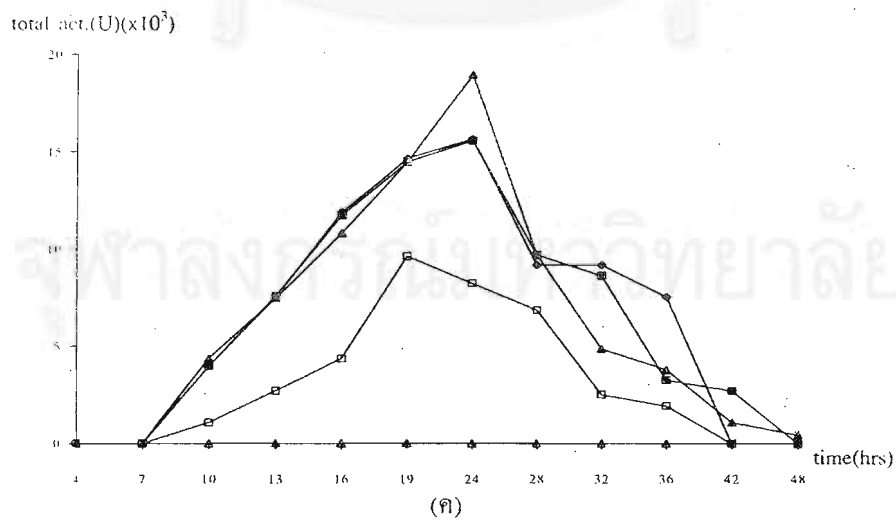
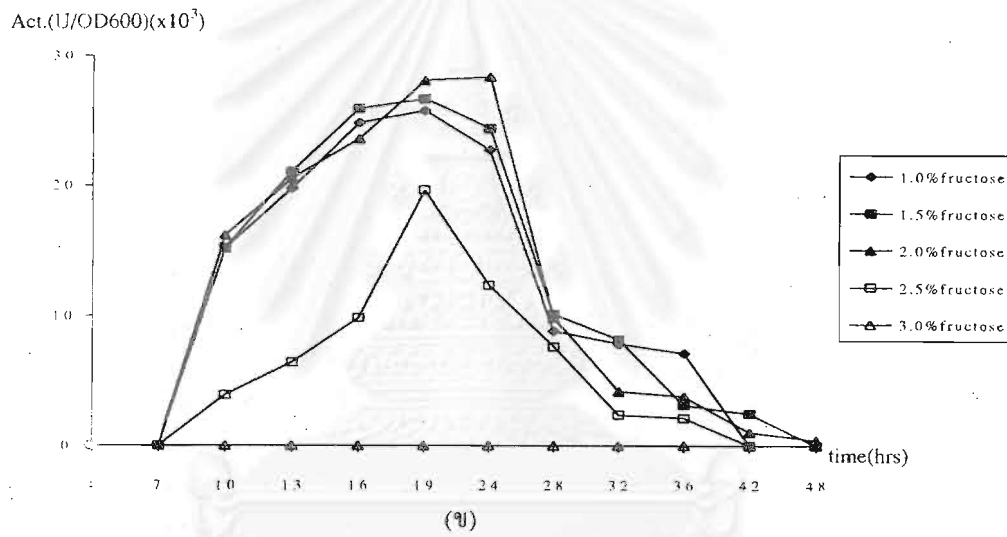
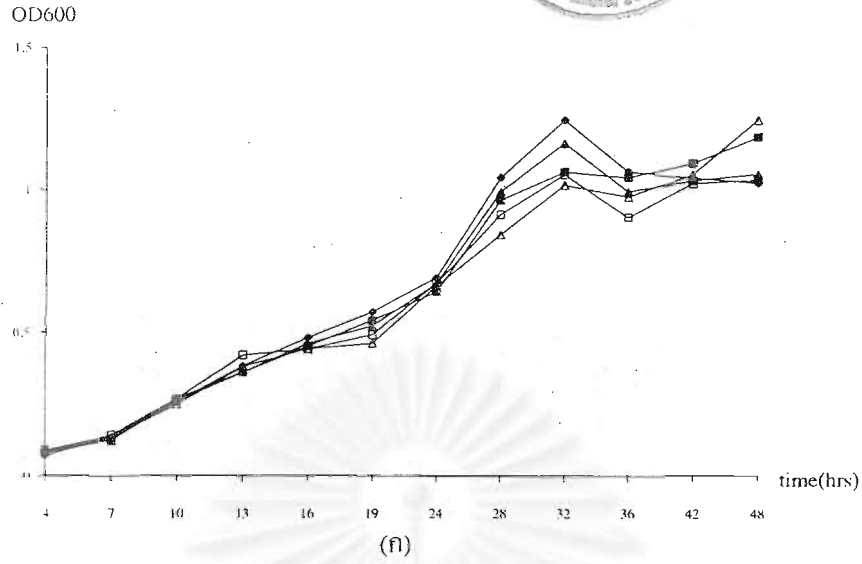
จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารต่อการเจริญและการผลิตไลเปสดังวิธีการทดลองในข้อ.3.4.2 พบว่าเชื้อจะสังเคราะห์ไลเปสได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแอกติวิตีของไลเปสลดลงและไม่มีแอกติวิตีตามลำดับ



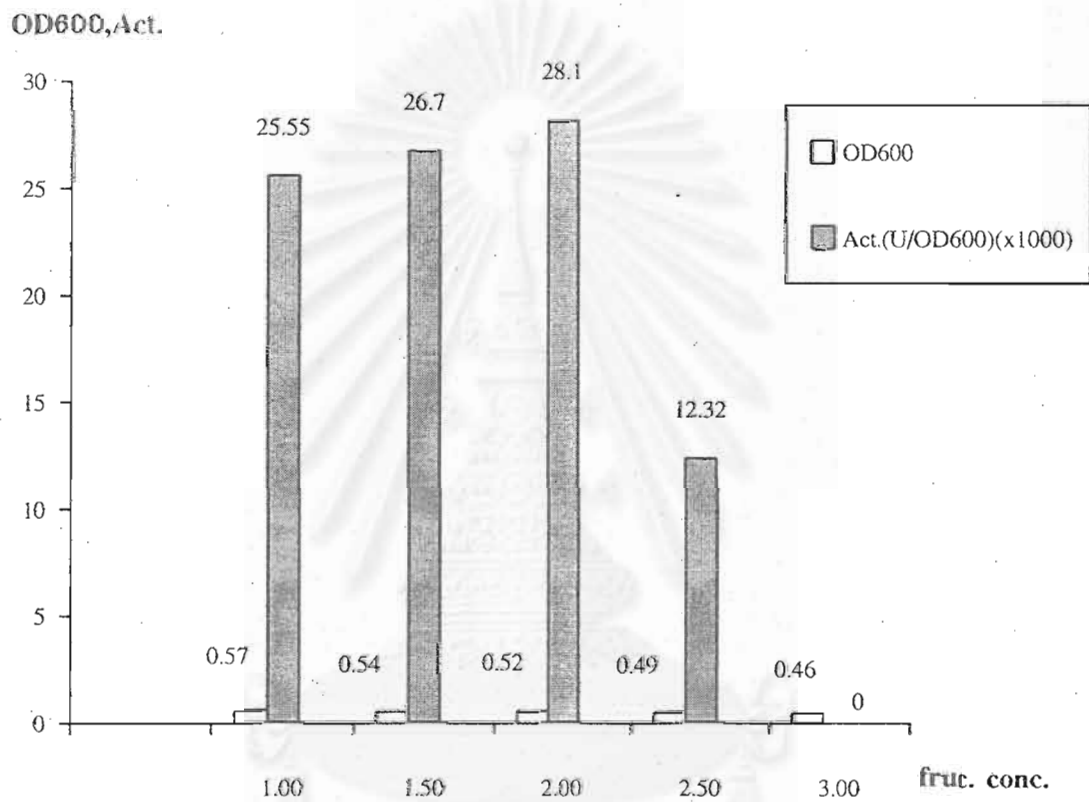
รูปที่ 3 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่า ปริมาตร 250 มล.ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.0



รูปที่ 4 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าพีเอช (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.0



รูปที่ 5 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลเปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลเปส(ค) ในอาหารสูตรปรับค่า ปริมาตร 250 มล. ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.0



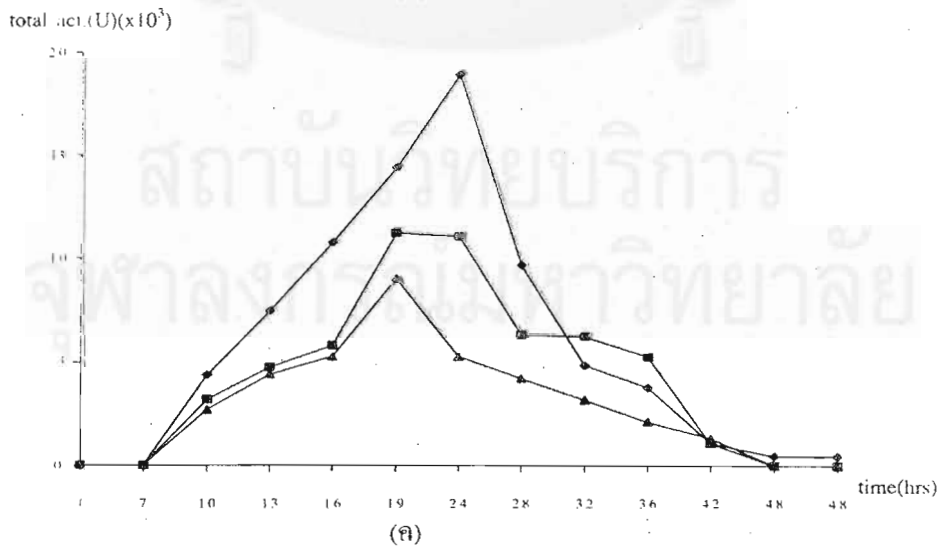
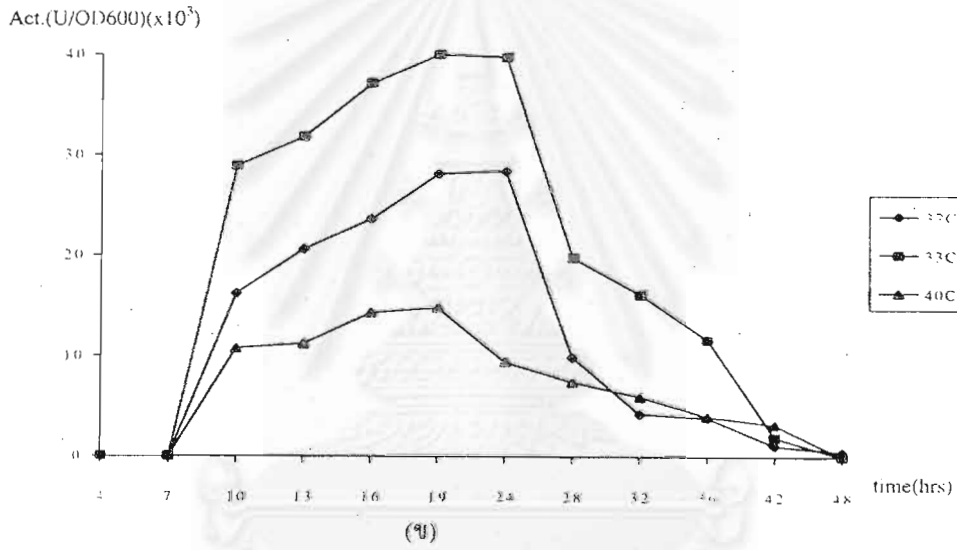
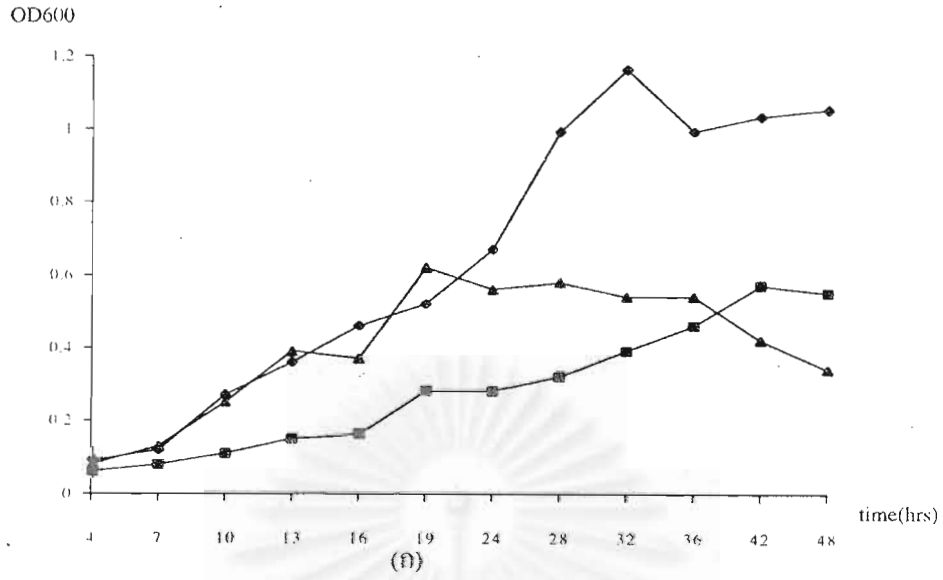
รูปที่ 6 เปรียบเทียบความขุ่นของเซลล์และการผลิตไลโปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับด่างที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37°C , pH 7.0

4.1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

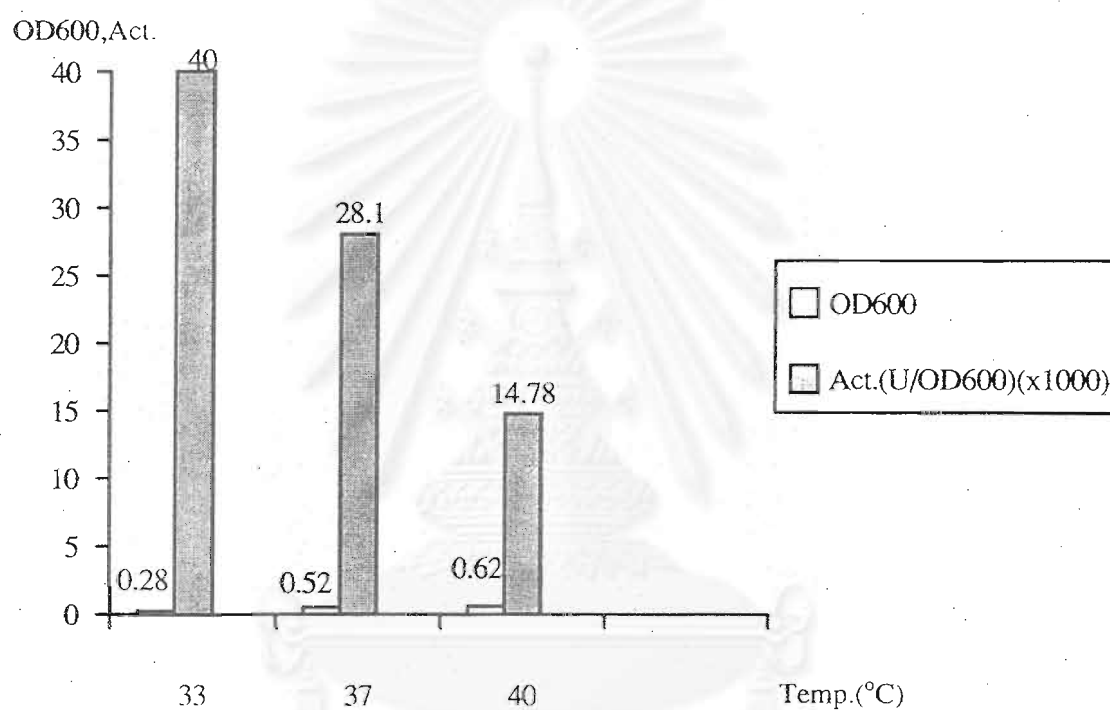
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 33, 37 และ 40⁰ซ ในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.4.3 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดและให้แอกติวิตีรวมสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37⁰ซ เนื่องจากในการทดลองนี้ต้องการปริมาณแอนไซม์โดยรวมสูงๆเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์และศึกษาต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงการเจริญของเชื้อ(ก) การผลิตไลโปส(ข) และแอกติวิตีรวมของไลโปส(ค) ในอาหารสูตรปรับต่ำ ปริมาตร 250 มล. ที่มี (NH₄)₂SO₄ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน

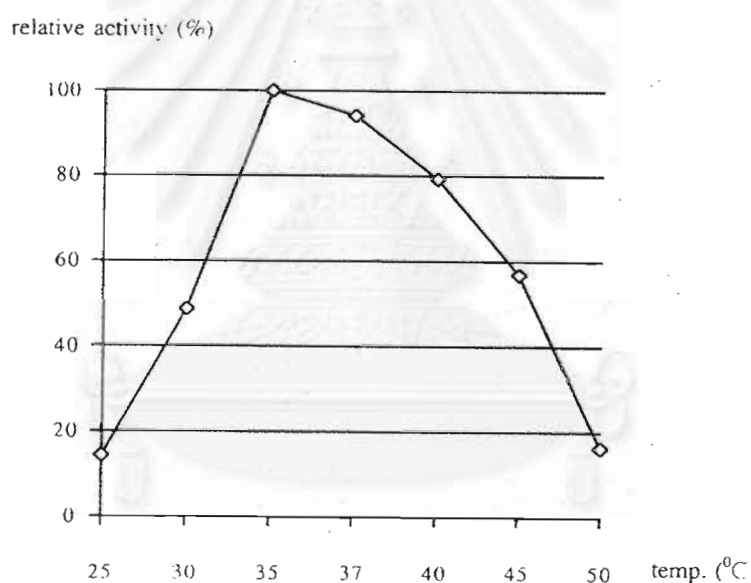


รูปที่ 8 เปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 19 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับด่างที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีฟรุกโตสเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนที่ pH 7.0 และอุณหภูมิต่างๆกัน

4.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme

4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude lipase

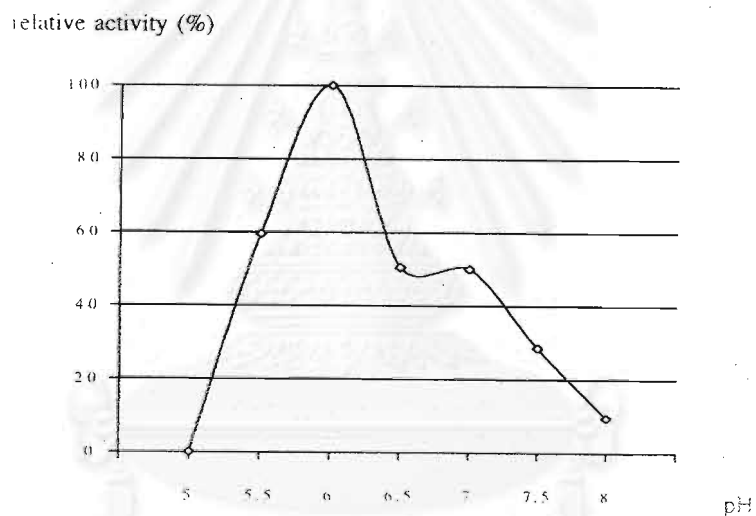
จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude lipase ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 40, 45 และ 50^oซ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35^oซ



รูปที่ 9 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50^oซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของ crude lipase

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



รูปที่ 10 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของ crude lipase วัดแอกติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่ อุณหภูมิ 37°ซ ตามวิธีการทดลอง ในข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลการเตรียมเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่มี 2 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตส 250 มล. ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 °C เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมินี้ให้แอกติวิตีรวมของไลเปสสูงที่สุด ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อสูงสุดที่เวลา 32 ชม. และผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ 24 ชม. ดังนั้นในการทดลองที่ต้องเตรียมเอนไซม์ปริมาณมากๆ จึงเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. จำนวน 16 ขวด เก็บเอนไซม์ที่เวลา 24 ชม. หลังจากเลี้ยงเชื้อ จะเตรียมสารละลาย crude เอนไซม์ได้ประมาณ 4 ลิตร สารละลายนี้มีแอกติวิตีของไลเปส 24.2 หน่วย/มล. และปริมาณโปรตีน 48.36 ไมโครกรัม/มล.

4.4 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำ crude เอนไซม์จากข้อ 3.4.3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้ผลดังนี้

4.4.1 ผลการทำ crude เอนไซม์ให้เข้มข้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

เมื่อ crude เอนไซม์ผ่านการกรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันปริมาณโปรตีนรวมจะลดลงเหลือประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่เดิม แอกติวิตีรวมก็ลดลงเหลือ 74 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์(% yield) ที่ได้มีค่า 74 เปอร์เซ็นต์ แต่สารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ไม่มีแอกติวิตีจำเพาะสูงชันประมาณ 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 พีก (peak) โดยโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนในพีกแรกซึ่งมีแอกติวิตีของไลเปส

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

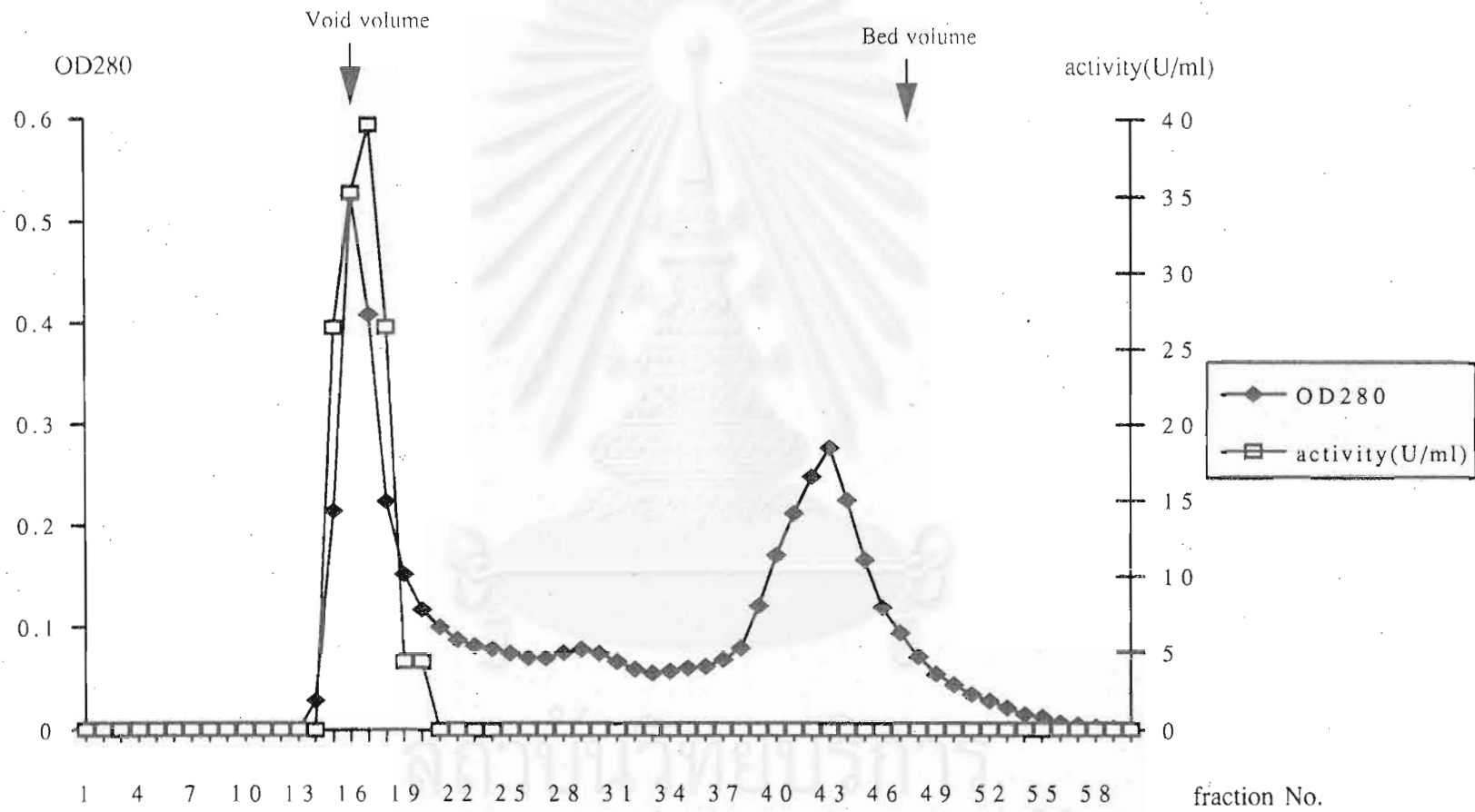
เมื่อนำพืชที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยเซฟาเดกซ์ จี-100 มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผ่านวิธีอุตสาหกรรม ผลการทดลองได้ดังรูปที่ 12



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

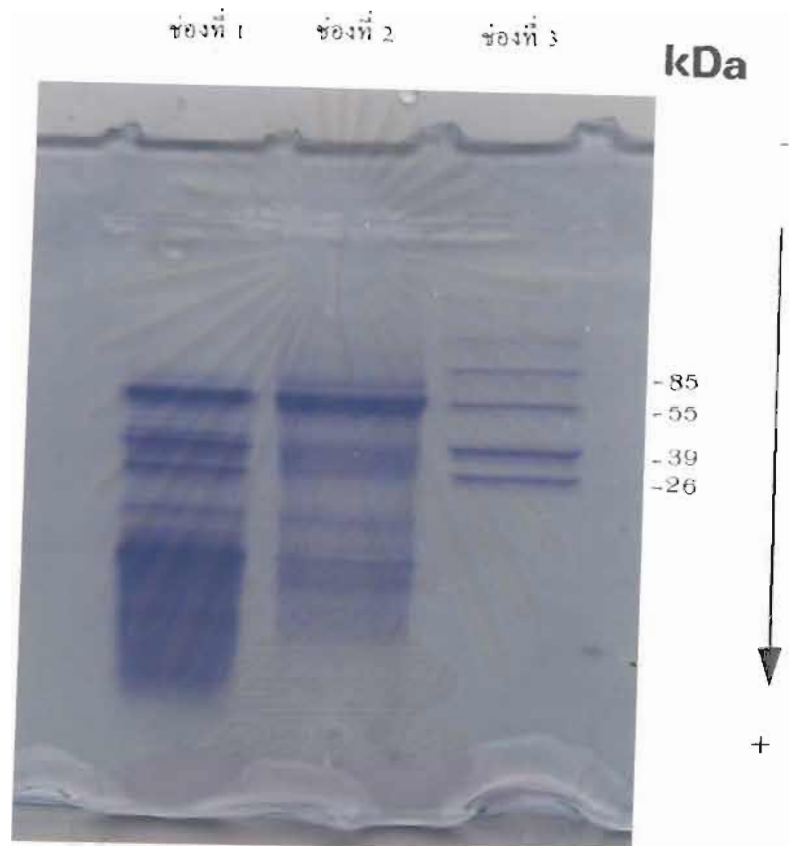
รูปที่ 11 รูปแบบการแยกและทำไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100
บรรจุเอ็นไซม์เข้มข้นจากอูลตราฟิลเตรชันลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100
ขนาด 2.0x55 ซม. ะด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 อัตรา
การไหล 20 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล.(วิธีทดลองข้อ 3.7.2)
โดยคอลัมน์นี้มี $V_0=80$ มล. และมี $V_t=172.79$ มล.

สถาบันวิทยบริการ
าลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2 ผลการแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์(โดยผลที่แสดงเป็นผลการทดลองเฉลี่ย
จากการทดลอง 2 ครั้ง)

ขั้นตอน	แอกติวิตีรวม (หน่วย)	โปรตีนรวม (มก.)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	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 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำอนไซม์ไฮโดรไลสให้บริสุทธิ์
 โดย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน
 ช่องที่ 1 เอนไซม์เข้มข้น(จากอุตสาหกรรม)แอกติวิตี 70 หน่วย
 (โปรตีน 40ไมโครกรัม)
 ช่องที่ 2 ไฮโดรไลสบริสุทธิ์บางส่วน(จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100) แอกติวิตี 140 หน่วย
 (โปรตีน 30 ไมโครกรัม)
 ช่องที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน(ชนิดละ 2 ไมโครกรัม)

1. F-6-P kinase(MW 85,204)
2. Glutamate dehydrogenase(MW 55,502)
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 และหาค่าด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตั้งวิธีทดลองในข้อ 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)

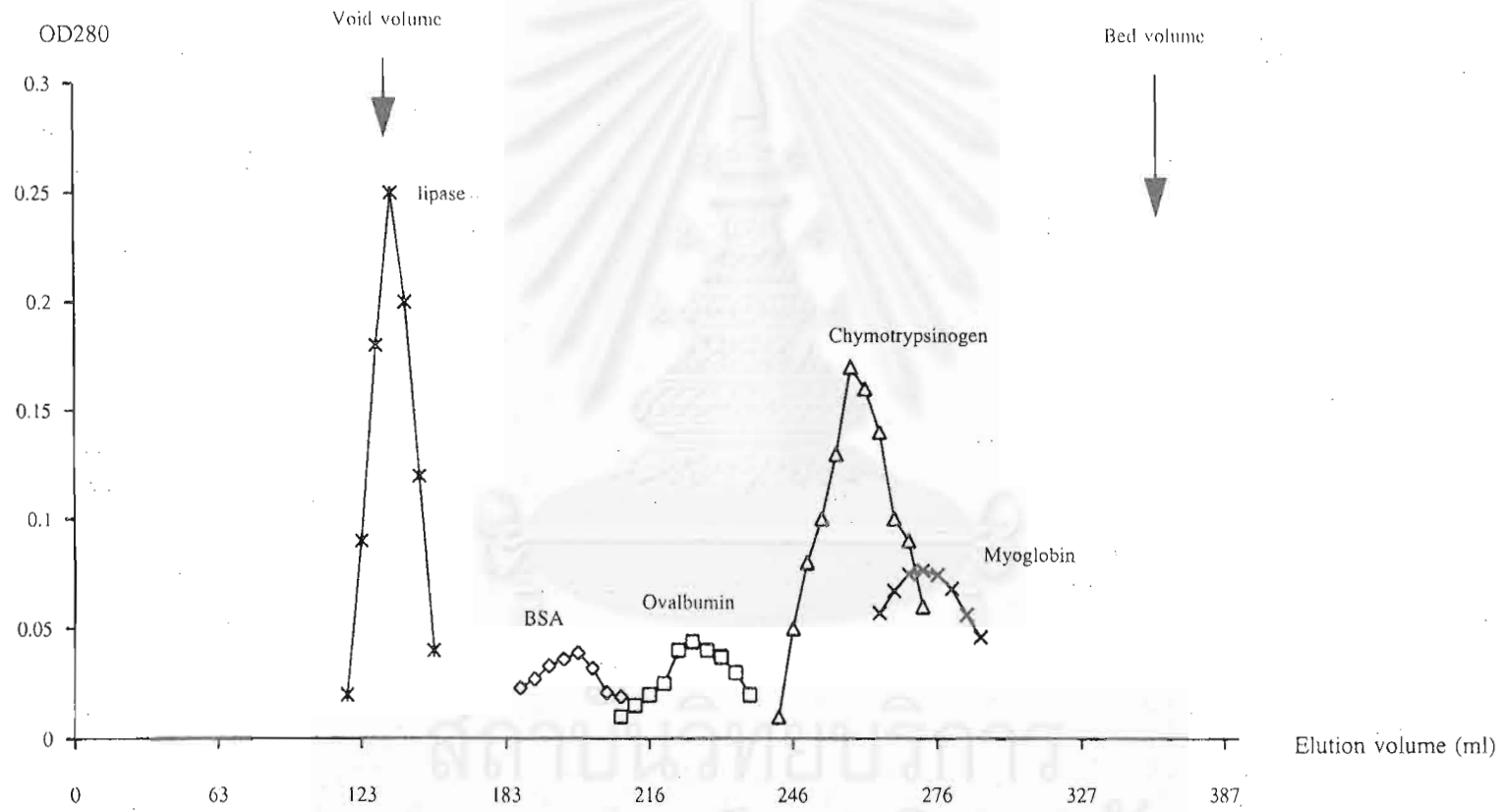
4.5.2 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วย เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

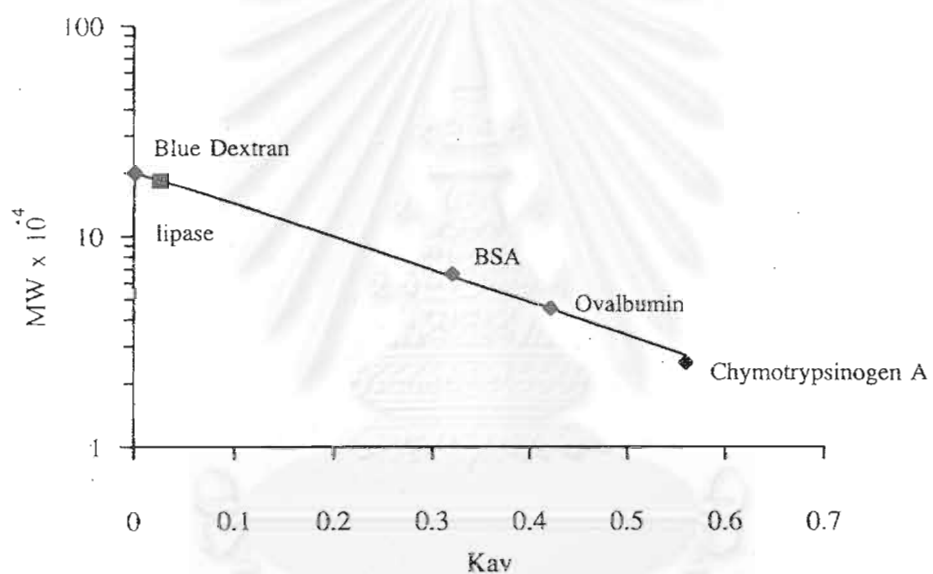
นำสารละลายไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยวิธีเอสดีเอสควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน ผลการทดลอง(รูปที่ 12) พบว่าโปรตีนมาตรฐาน Fructose-6-phosphate kinase, Glutamate dehydrogenase, Aldolase และ Triose phosphate isomerase จะมีการเคลื่อนที่ในแผ่นเอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล ซึ่งแสดงโดยค่า relative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

รูปที่ 13 รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

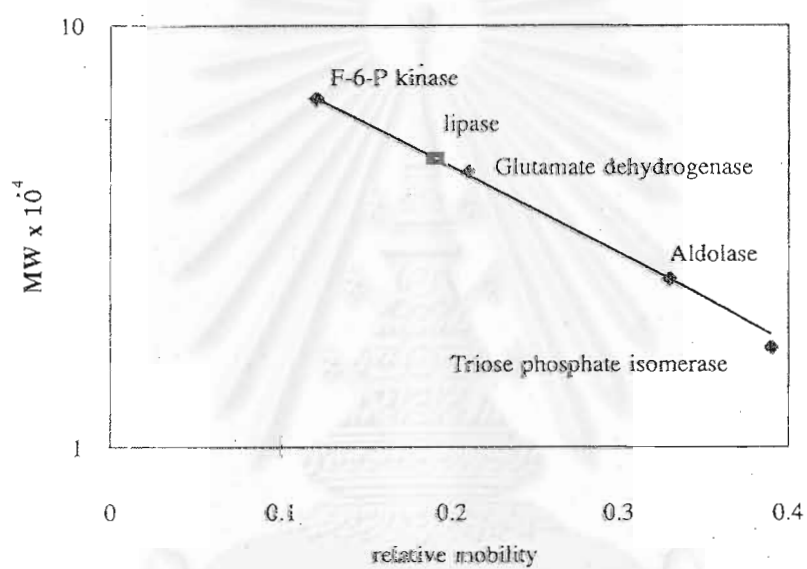
การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐานและไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อหา
น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150(ขนาด 2.3x90 ซม.)
ตามวิธีทดลองในข้อ 3.9 โดยชะคอลัมน์ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0
เข้มข้น 0.05 โมลาร์ อัตราการไหล 24 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. โดย
คอลัมน์นี้มี $V_0=126$ มล., $V_r=374$ มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ตามวิธีทดลองข้อ 3.9

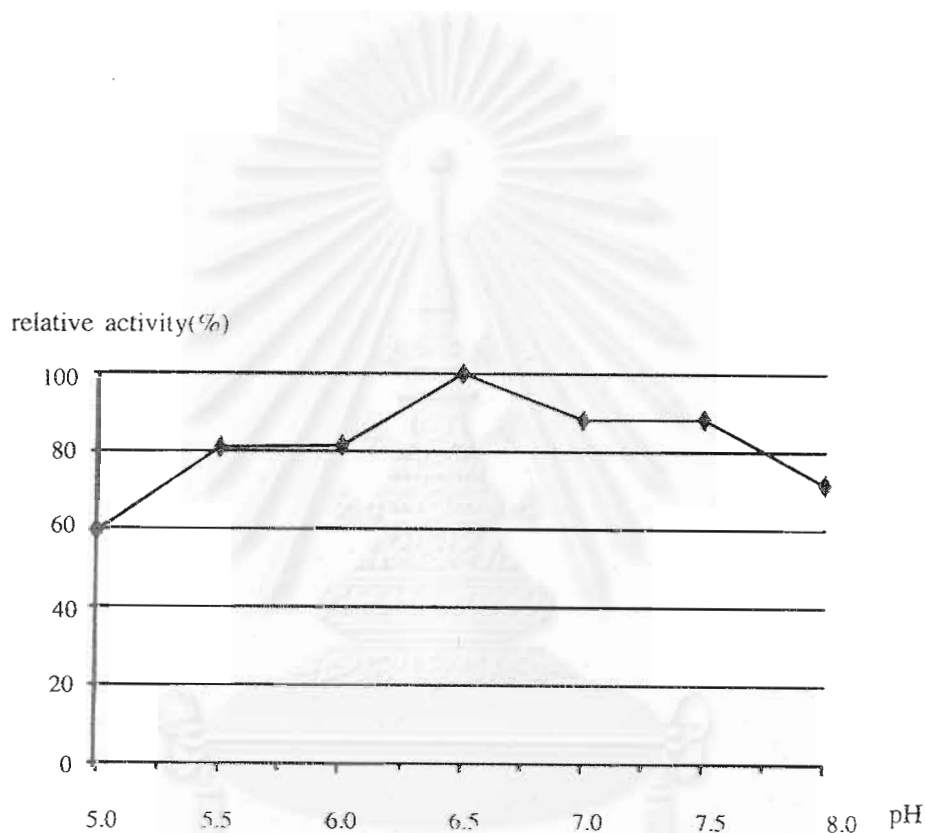


รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเข็มหลักโดย SDS-PAGE

4.5.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อแอกติวิตีของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่ pH

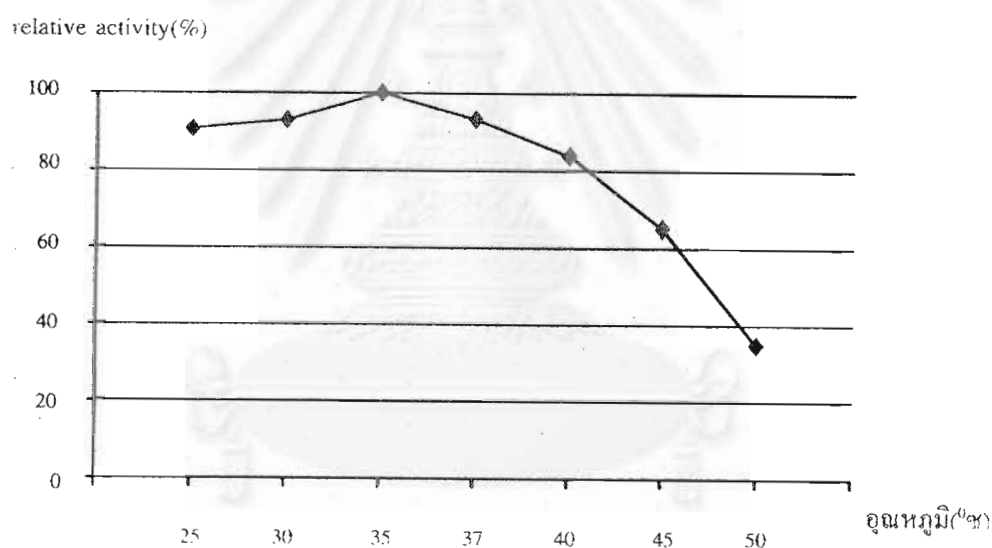
5-8 พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.5



รูปที่ 16 แสดงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน วัดแอกติวิตีที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 ที่อุณหภูมิ 37° ซตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

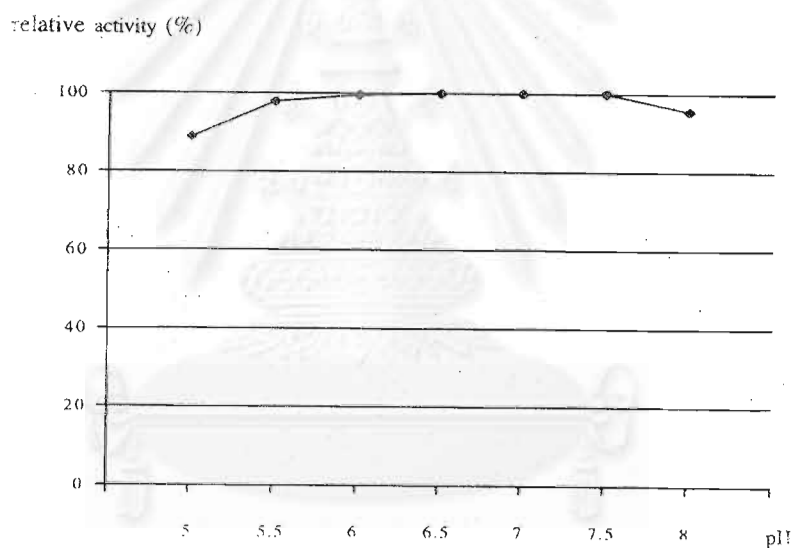
จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน ที่อุณหภูมิ 25-50^oซ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35^oซ



รูปที่ 17 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50^oซ ที่ pH 6.0 ตามวิธีทดลองข้อ 3.5 โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในหลอดควบคุมเป็น 30 หน่วยซึ่งคิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.5 ผลการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

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

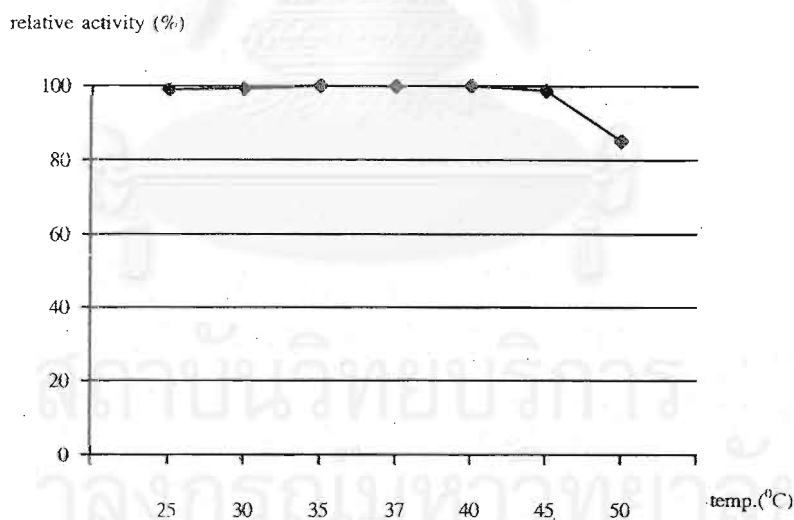


รูปที่ 18 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสเมื่อบ่มเอนไซม์ 30 หน่วย ที่อุณหภูมิ 37°C ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ที่มี pH ต่างๆตั้งแต่ 5-8 เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอกติวิตีที่ pH 6.0

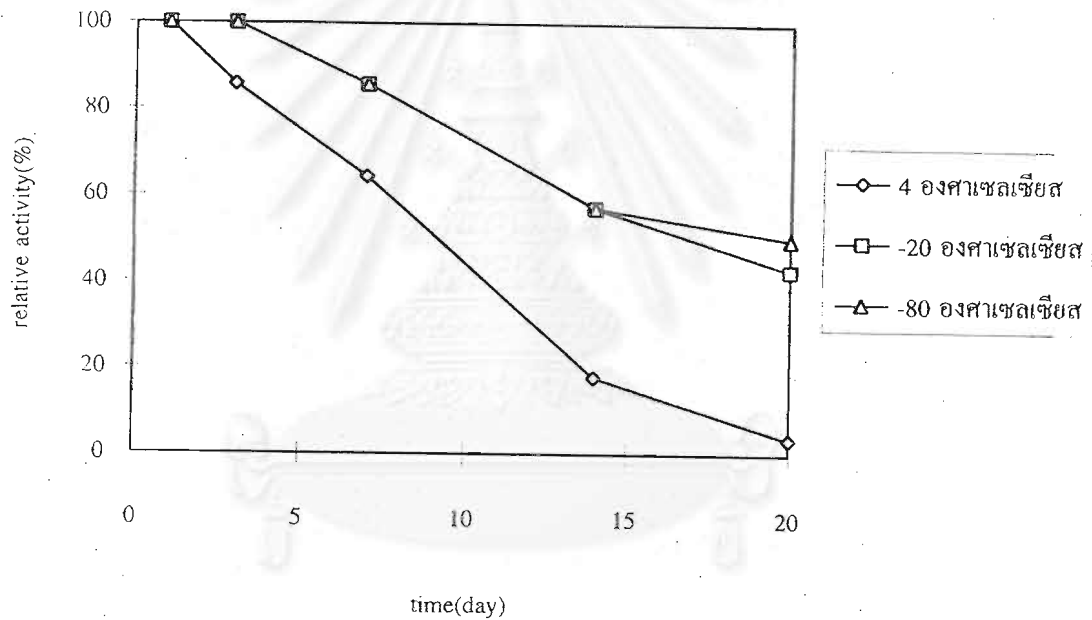
4.5.6 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิ 25-50⁰ซ พบว่าไลเปสจะมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 25-45⁰ซ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาว พบว่าเอนไซม์ที่เก็บในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะไม่สูญเสียแอกติวิตีเลยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 และ -80⁰ซเป็นเวลา 3 วัน แต่จะสูญเสียแอกติวิตีไป 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ 20 วัน ในขณะที่เอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4⁰ซ จะเสียแอกติวิตีเกือบหมดเมื่อเก็บไว้ 20 วัน



รูปที่ 19 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสเมื่ออบมเอนไซม์ 30 หน่วยในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50⁰ซ นาน 30 นาที วัดแอกติวิตีที่ pH 6.0



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

4.5.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บาง

ส่วน

จากการศึกษาพบว่า Mn^{2+} และ Fe^{2+} สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ทั้งหมดและเกือบทั้งหมดตามลำดับ ส่วน Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ , EDTA และ SDS ยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้บ้าง แต่ Ca^{2+} ช่วยให้แอกติวิตีของเอนไซม์ดีขึ้น ส่วน K^+ อาจเป็นตัวกระตุ้นแอกติวิตีของไลเปส

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

สารเคมีที่ทดสอบ	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (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 ผลการศึกษาการย่อยสลายสเตรทธรรมชาติบางชนิดของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการทดลองพบว่าไลเปสที่เตรียมได้ย่อยน้ำมันได้หลายชนิด โดยย่อยน้ำมันมะกอกได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น แต่ไม่สามารถย่อยน้ำมันละหุ่งได้

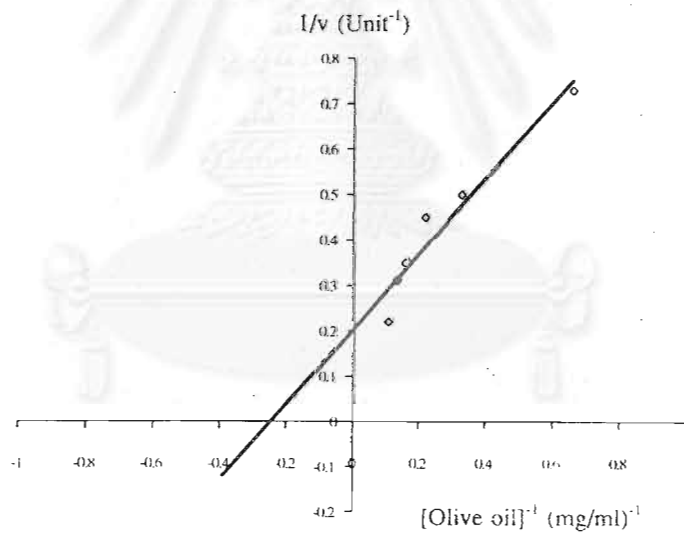
ตารางที่ 4 แสดงผลการย่อยสลายสเตรทธรรมชาติบางชนิด โดยปริมาณแอนไซม์ในหลอดควบคุม เป็น 30 หน่วยซึ่งเท่ากับ relative activity 100 เปอร์เซ็นต์

สับสเตรท	relative hydrolysis(%)
น้ำมันมะกอก	100
น้ำมันข้าวโพด	57.14
น้ำมันละหุ่ง	0
น้ำมันถั่วเหลือง	14.29
ไตรบิวทีริน (tributylin)	57.14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.9 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเมื่อเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกต่างๆกัน(ภาคผนวกที่ 3) จะสามารถหาค่าความเร็วเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นต่างๆของสับสเตรทได้ และเมื่อนำค่าที่ได้มาพลอตแบบ Lineweaver-Burk plot จะสามารถหาค่า K_m ได้เท่ากับ 4.09 มก./มล. และหาค่า V_{max} ได้เท่ากับ 4.92 หน่วย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ไลเปสทำการวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิ 37°C pH 7.0 กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกในเวลา 1 นาที ในภาวะที่ทำหารทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1. สภาพที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

จากการวิเคราะห์เอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีรายงานไว้ พบว่าเอนไซม์ไลเปสผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสใน *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

จากผลการเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และให้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน พบว่าเชื้อจะสังเคราะห์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเริ่มผลิตไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 10 ชม. และให้แอกติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงไปได้ 19 ชม. ส่วนเปปโตนและ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อเจริญได้ดีกว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แต่ไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปส นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อให้ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนการเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกับเมื่อให้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่การผลิตไลเปสจะต่ำกว่ามาก จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่ามีแนวโน้มว่าเชื้อ *P. aeruginosa* จะใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.13 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ด้วยกัน จะพบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แต่ละชนิดจะมีผลต่อการเจริญใกล้เคียงกันแต่

มีผลต่อการผลิตไลเปสต่างกัน โดย NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อเจริญเติบโตไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปส ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่มี NH_4^+ เป็นองค์ประกอบนั้นจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปสของเชื้อต่างกันไปคาดว่ามันขึ้นอยู่กับหมู่ที่เป็นองค์ประกอบ โดยพบว่าถ้าเป็นหมู่ SO_4^{2-} การผลิตไลเปสจะสูง ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อไม่มากแต่มีผลต่อการผลิตไลเปสมาก

เมื่อพิจารณาผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.13 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรในระหว่างการเจริญอยู่ที่ประมาณ 1.6 และผลิตไลเปสได้ปานกลาง เมื่อให้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเจริญของเชื้อต่ำและการผลิตไลเปสก็ต่ำด้วย ซึ่งตรงกับที่มีรายงานว่ากลูโคสจะไปกดคืน(repress)การผลิตไลเปสในเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Mates และ Sudakevitz, 1972) และใน *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไป และปรากฏการณ์เดียวกันนี้ก็พบในเชื้อ *Rhizopus japonicus* และ *Candida parolipolytica* (Macrae, 1983) เมื่อให้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเจริญของเชื้อจะต่ำมากแต่การผลิตไลเปสจะสูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับกรณีให้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่เชื้อใช้ฟรุกโตสได้ไม่ดีเท่ากลูโคสและน้ำมันมะกอกโดยสังเกตจากช่วง lag phase ของการเจริญของเชื้อจะยาวเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟรุกโตสและความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อถูกเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรปรับต่ำ(minimum medium plate)ที่มีน้ำมันมะกอกมาก่อนดังนั้นเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในอาหารเป็นฟรุกโตสเชื้อจึงมีช่วงที่ปรับตัวจึงมีช่วง lag period ยาวมาก

ในการเจริญในขณะที่เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำมันมะกอกเชื้อจะเข้าสู่ log phase ทันที และเมื่อเชื้อใช้ ฟรุคโตสได้ช้าเนื่องจาก carrier protien ที่ membrane มีความสามารถในการลำเลียงฟรุคโตสได้ช้ากว่ากลูโคสและกรดไขมัน และการทำงานของ hexokinase ในวิถีไกลโคไลซิสต่อกลูโคสสูงกว่าต่อฟรุคโตส 20 เท่า (Stryer, 1988) ทำให้การเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่มี ฟรุคโตสมีช่วง lag period ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสการเจริญของเชื้อจะเข้าสู่ log phase ทันที การที่ฟรุคโตสกระตุ้นให้เกิดการผลิตไลเปสได้สูงนั้นอาจเนื่องจากเชื้อใช้ฟรุคโตสได้ช้ากว่าน้ำมันมะกอกและกลูโคส ทำให้ภายในเซลล์ที่เลี้ยงในฟรุคโตสมีปริมาณ acetyl CoA และ citrate ต่ำกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำมันมะกอกและกลูโคส จึงกระตุ้นการหลั่งไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้นทำให้ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ในอาหารที่มีฟรุคโตสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น จากผลการทดลองจะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนก็เป็น growth limiting factor ด้วยเนื่องจากมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตไลเปส

จากผลการทดลองให้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับน้ำมันมะกอกและฟรุคโตสกับน้ำมันมะกอก พบว่าการเจริญของเชื้อไม่ต่างกันนักและไม่ต่างจากเมื่อให้น้ำมันมะกอกอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน แต่การผลิตไลเปสในอาหารที่มีกลูโคสผสมกับน้ำมันมะกอกจะต่ำอย่างเห็นได้ชัดซึ่งยืนยันข้อสรุปที่ว่ากลูโคสยับยั้งการผลิตไลเปส ส่วนการผลิตไลเปสของเชื้อในอาหารที่มีฟรุคโตสผสมกับน้ำมันมะกอกจะใกล้เคียงกับเมื่อให้น้ำมันมะกอกอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเกินไปทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปสเนื่องจากมีอาหารมากเกินไป

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มีฟรุคโตสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าฟรุคโตสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงสุด แต่เมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไลเปสจะลดลงและไม่ผลิตตามลำดับ อาจเป็นเพราะฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่ำจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้น้อยส่งผลให้ปริมาณของ acetyl CoA และ citrate ในเซลล์ต่ำไปด้วยซึ่งเป็นสัญญาณให้เกิด fatty acid degradation เพื่อผลิตพลังงานและ carbon skeleton แก่เซลล์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์และใช้ในการเจริญ ดังนั้นการให้ฟรุกโตสความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวจึงเป็นการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบ fatty acid degradation ในทางตรงกันข้ามถ้าหากความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารสูงฟรุกโตสจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้มากทำให้ acetyl CoA และ citrate ในเซลล์สูงด้วยเป็นสัญญาณให้เกิด fatty acid synthesis และยับยั้งการผลิตไลเปส (Stryer, 1988) นอกจากนี้ในกรณีที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสต่ำไลเปสยังกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับคาร์โบไฮเดรตได้ โดยมีรายงานว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* กระตุ้นการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลูโคสและฟรุกโตสได้ และยังพบว่าเกิดการเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสกับกรดโอเลอิกสูงกว่าการเกิดเอสเทอร์ระหว่างกลูโคสกับกรดโอเลอิก 2 เท่า (Seino และคณะ, 1984) ดังนั้นถ้าเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสกับกรดไขมันขึ้นจะทำให้กรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยของไลเปสถูกดึงออกจากระบบเพื่อไปสร้างเป็นเอสเทอร์จึงเป็นการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสให้สร้างกรดไขมันเพิ่มขึ้น และในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์อาจเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการเกิดเอสเทอร์จึงกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้สูงที่สุด

จากผลการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไลเปส พบว่าเชื้อเจริญและให้แอกติวิตีรวมได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดี แต่

เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45°ซ และ 33°ซ เชื้อเจริญได้ไม่ดีแสดงว่าทั้งสองอุณหภูมิไม่เหมาะต่อการ
ทำงานของเซลล์เพราะอุณหภูมิสูงและต่ำเกินไปตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่า สารอาหารทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน และ
สภาวะในการเลี้ยงมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการ
เลี้ยง *P. aeruginosa* คือในอาหารสูตรปรับค่าที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เข้มข้น 0.13 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่ง
ไนโตรเจน และมีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37°ซ ซึ่งการเลี้ยง
เชื้อในอาหารสูตรปรับค่าจะทำให้ต้นทุนการเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ซับซ้อน
และ crude enzyme ที่ได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า

เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ crude เอนไซม์ในด้านอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม
ต่อการทำงานของ crude เอนไซม์ พบว่า crude เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 35°ซ
แต่ crude เอนไซม์มีโปรตีนอื่นปะปนอยู่ด้วยซึ่งอาจมีผลต่อค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ
ทำงานของ crude เอนไซม์ที่หาได้

5.2. การทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* บริสุทธิ์

เมื่อนำ crude เอนไซม์จากเชื้อ *P. aeruginosa* มาทำให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากการกำจัดโปรตีน
ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันและทำให้ crude เอนไซม์เข้มข้นขึ้นไปพร้อมๆกันโดย
การกรองด้วย Ultrafiltration unit และใช้แผ่นกรองขนาด YM10 ซึ่งคัดกรองโมเลกุลขนาดใหญ่
กว่า 10,000 ดาลตันได้ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.54 เท่าและมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่า
กับ 74 เปอร์เซ็นต์ และวิธีนี้จะช่วยกำจัดโปรตีนที่ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 80

เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลาย crude เอนไซม์ จากนั้นนำโปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสไปแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

การทำเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีมีรายงานไว้มากมายซึ่งมีทั้งใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ เจลฟิลเตรชันและ Hydrophobic Interaction Chromatography ตัวอย่างเช่นการใช้คอลัมน์ DEAE-Sephadex แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) การใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ *Pseudomonas* (Lawrence, Fryer และ Reiter, 1967) และ การใช้ Phenyl-Toyopearl แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Mase, 1994) ในการทดลองนี้ทำให้ไลเปสจาก *P. aeruginosa* บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่ไลเปสออกได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่บรรจุลงในคอลัมน์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.92 เท่า และได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 44.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอนไซม์ส่วนนี้ไปแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบโปรตีนแถบเข้มมาก 1 แถบและมีแถบจางๆ 3 แถบ จึงทดลองนำไลเปสที่ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-100 ไปแยกด้วยคอลัมน์ Hydrophobic Interaction Chromatography เพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น โดยในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B ผลการทดลอง(ไม่ได้รายงานไว้)พบว่า เมื่อบรรจุเอนไซม์ลงในคอลัมน์และชะด้วย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี gradient ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เพิ่มขึ้นจาก 1.7 จนถึง 0 โมลาร์ ไม่พบว่ามีไลเปสถูกชะออกจากคอลัมน์ และเมื่อทดลองชะคอลัมน์ด้วย Ethylene glycol ความเข้มข้น 10, 55, 60, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ก็พบว่าไม่สามารถชะไลเปสออกจากคอลัมน์ได้ จึงสรุปว่าคอลัมน์นี้ไม่เหมาะในการใช้แยกไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจเนื่องมาจากเกิด hydrophobic interaction ที่

แข็งแรงระหว่างเอนไซม์กับหมู่ phenyl ของเจลจนไม่สามารถชะออกได้ (Lesuisse, Schanck และ Colson, 1993) ดังนั้นในการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จึงกระทำจนถึงขั้นตอนที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งทำให้เอนไซม์ไลเปสที่แยกได้บริสุทธิ์บางส่วน อย่างไรก็ตามถ้าต้องการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์มากขึ้นอาจแก้ปัญหาโดยการใช้คอลัมน์ Butyl Sepharose แทนซึ่ง Hydrophobic Interaction ระหว่างเอนไซม์กับหมู่ butyl จะแข็งแรงน้อยกว่า Hydrophobic Interaction ระหว่างเอนไซม์กับหมู่ phenyl ดังนั้นการที่จะชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ Butyl Sepharose จึงน่าจะง่ายกว่า เหมือนกรณีของไลเปสจาก *Bacillus subtilis* 168 ไม่สามารถชะออกจากคอลัมน์ Octyl Sepharose ได้แต่เมื่อเปลี่ยนไปใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose จะสามารถชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ได้ (Lesuisse, Schanck และ Colson, 1993)

5.3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* ที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งใช้คอลัมน์ Sephadex G-150 และมีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสคาดว่าแถบนี้คือแถบที่เข้มที่สุดเพียงแถบเดียวและเมื่อใช้แอกติวิตีใกล้เคียงกันใน ultrafiltration fraction และ gel filtration fraction ความเข้มของแถบล่างก็ใกล้เคียงกันด้วยดังรูปที่ 12 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย(subunit)โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน เนื่องจากเมื่อแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีโปรตีนแถบเข้มมากเพียงแถบเดียวและน้ำหนักโมเลกุลที่หาโดยวิธีเจลฟิลเตรชันก็มีค่าเป็น 3 เท่าของน้ำหนักโมเลกุลที่หาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

ดังนั้นไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนจึงมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ซึ่งเป็น single subunit protein มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (Stuer, Jaeger และ Winkler, 1986) รวมทั้งไลเปสจาก *P. aeruginosa* EF2 ซึ่งเป็น single subunit protein มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิสเช่นกัน แต่ไลเปสจาก *P. aeruginosa* EF2 สามารถเกิด aggregation ระหว่างกันได้ (Gilbert, Cornish และ Jones, 1991) และยังมีรายงานว่าไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808 เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธีโพลีอะครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิสซึ่งประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000 คาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (Kordel และคณะ, 1991) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่เป็นโปรตีนขนาดใหญ่นี้ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่หาได้ในการทดลองนี้ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย(subunit)โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน หรืออาจเป็น single subunit protein แต่สามารถเกิด aggregation ระหว่างกันหลังการทำอุลตราฟิลเตรชันทำให้ น้ำหนักโมเลกุลที่หาด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันใหญ่มาก

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา(รูปที่ 16) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* สามารถทำงานได้ดีเมื่อมีน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทในช่วง pH 5.5-7.5 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 แต่ที่ pH 5 และ 8 ก็ยังมีแอกติวิตีเหลืออยู่ค่อนข้างมากคือ 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งต่างกับใน crude เอนไซม์ที่ไลเปสจะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 (รูปที่ 10) ที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเพราะใน crude เอนไซม์มีโปรตีนปนอยู่หลายชนิดและอาจมี activator หรือ

inhibitor ของไลเปสรวมอยู่ด้วยทำให้ช่วง pH ในการทำงานของไลเปสใน crude เอนไซม์แคบกว่าช่วง pH ในการทำงานของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน สำหรับผลการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความเสถียร(รูปที่ 17)พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความเสถียรในช่วง pH 5-8 โดยมีความเสถียรมากที่สุดในช่วง pH ที่เป็นกลางคือ 6.0-7.5 รูปแบบความเสถียรในช่วง pH เช่นนี้คล้ายกับที่มีรายงานในไลเปสจาก *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) และจากข้างต้นจะเห็นได้ว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความคงทนในช่วง pH ที่กว้าง เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์พบว่าทั้ง crude เอนไซม์และไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35⁰ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสจาก *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) ด้วยเช่นกัน สำหรับผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรพบว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 25-45⁰ซ ซึ่งรูปแบบความเสถียรในช่วงอุณหภูมิเช่นนี้คล้ายกับที่มีรายงานใน *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Mase, 1994) และจากผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ไลเปสในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 พบว่าไลเปสจะคงตัวที่อุณหภูมิ 4⁰ซ นาน 1 วันจากนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเรื่อยๆจนเหลือประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 20 ส่วนที่อุณหภูมิ -20 และ -80⁰ซไลเปสจะคงตัวนาน 3 วันจากนั้นแอกติวิตีจะลดลงจนเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 20 ดังนั้นอุณหภูมิที่ควรใช้ในการเก็บเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 คือที่ -20 และ -80⁰ซ แต่การเก็บเอนไซม์ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อนำไปศึกษาลักษณะเฉพาะต่อไปในการทดลองนี้ใช้วิธี lyophilization แล้วเก็บในรูปผงที่อุณหภูมิ -20⁰ซ วิธีนี้ทำให้สามารถเก็บเอนไซม์ได้นานอย่างน้อย 1 เดือนโดยไม่สูญเสียแอกติวิตี

จากผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนพบว่า Mn^{2+} สามารถยับยั้งแอกติวิตีของไลเปสได้ทั้งหมดซึ่งต่างจากที่มีรายงานในไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) และ *P. fragi* 22.39B (Nishio และคณะ, 1987) ซึ่ง Mn^{2+} จะยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์เพียงบางส่วน และมีรายงานว่าไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) และ *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Mase, 1994) ไม่ถูกยับยั้งโดย Mn^{2+} Fe^{2+} สามารถยับยั้งแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนได้เกือบทั้งหมด ซึ่งตรงกับที่มีรายงานใน *P. aeruginosa* (Nadkarni, 1971) และ *P. fragi* 22.39B (Nishio และคณะ, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่า K^+ อาจช่วยกระตุ้นแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเช่นเดียวกับที่เกิดในไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) ส่วน Ca^{2+} พบว่าช่วยกระตุ้นแอกติวิตีของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ได้เช่นเดียวกับไลเปสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ ตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* (Nadkarni, 1971), *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) และ *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) เป็นต้น จากการศึกษาผลของ EDTA และ SDS ต่อแอกติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนพบว่าทั้ง EDTA และ SDS สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้บางส่วน การที่แอกติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งจาก EDTA แสดงว่าเอนไซม์อาจมี metal cofactor อยู่ใน active site หรืออาจเป็น metalloenzyme นั้นเอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nadkarni ในปี 1971 และ Muderhwa และคณะในปี 1985 และจากผลการทดลองแสดงว่าแคลเซียมไอออนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มการทำงานของไลเปสได้ และจากการที่เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้เมื่อมี SDS ซึ่งเป็น detergent ชนิดหนึ่งแสดงว่าไลเปสที่เตรียมได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้

จากผลการศึกษาการย่อยสลายสัณฐานวิทยาของไลเปสจาก *P. aeruginosa* พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยน้ำมันได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก, น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันถั่วเหลือง โดยสามารถย่อยน้ำมันมะกอกได้ดีที่สุด ย่อยน้ำมันข้าวโพดได้รองลงมา และย่อยน้ำมันถั่วเหลืองได้เล็กน้อยแต่ไม่สามารถย่อยน้ำมันละหุ่งได้เลย และเมื่อพิจารณาสัดส่วนของการไฮโดรไลซ์น้ำมัน(ตารางที่ 4) ร่วมกับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ใช้เป็นสัณฐานวิทยา(ตารางที่ 5) และโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันเหล่านั้น(ตารางที่ 6) พบว่าการไฮโดรไลซ์ของไลเปสมีแนวโน้มว่าจะขึ้นกับโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของสัณฐานวิทยาเนื่องจากกรดไขมันเหล่านั้นประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอมและมีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 เหมือนกัน แต่ต่างกันที่จำนวนพันธะคู่และหมู่ที่เป็นองค์ประกอบ จากผลการทดลองพบว่าไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (กรดโอเลอิก) แต่ถ้าโครงสร้างของกรดไขมันเปลี่ยนไปเนื่องจากมีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 เพิ่มเข้ามา (กรดลิโนเลอิก) ความสามารถในการย่อยจะลดลงและถ้ากรดไขมันนั้นมีหมู่ -OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 (กรดริซิโนเลอิก) ไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนจะไม่สามารถย่อยได้ จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ยังสามารถย่อยไตรบิวทีรินซึ่งประกอบด้วย butyric acid (C_4) ได้ด้วยแสดงว่าเอนไซม์สามารถย่อยได้ทั้งกรดไขมันสายสั้นและสายยาว

จากรายงานของ Omar และคณะ(1987)พบว่าไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 สามารถย่อยน้ำมันธรรมชาติแต่ละชนิดได้ต่างกัน โดยเมื่อให้การย่อยน้ำมันมะกอกคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์จะพบว่าการย่อยน้ำมันข้าวโพด, น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันละหุ่งเป็น 179, 134 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับแนวโน้มในการย่อยน้ำมันธรรมชาติของไลเปสจาก *P.*

aeruginosa ที่ใช้ในการทดลองนี้ตั้งข้อมูลข้างต้น แสดงว่าไลเปสจากแต่ละแหล่งก็จะมีความสามารถในการย่อยน้ำมันต่างกันไป

ตารางที่ 5 แสดงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้

	กรดโอเลอิก	กรดลิโนเลอิก	กรดริซิโนเลอิก
น้ำมันมะกอก	83.5	4	-
น้ำมันข้าวโพด	19-49	34-62	-
น้ำมันถั่วเหลือง	26	49	-
น้ำมันละหุ่ง	7	3	87

ตารางที่ 6 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท

กรดโอเลอิก	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
กรดลิโนเลอิก	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
กรดริซิโนเลอิก	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

จากผลการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ, pH 7.0 ต่อสับสเตรทคือน้ำมันมะกอกจะได้ค่า Km เท่ากับ 4.09 มก./มล. และได้ Vmax เท่ากับ 4.92 หน่วย ดังแสดงในตารางที่ 7 ร่วมกับค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas*

ที่มีรายงานไว้ แต่เนื่องจากไขมันคนละชนิดจะมีอีมีลชันต่างกันจึงทำให้จำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface ไม่เท่ากัน และอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface และพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท (Brockerhoff และ Jensen, 1974) จึงเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากเชื้อแต่ละชนิด

ตารางที่ 7 แสดงค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* ที่ได้จากการทดลองและที่มีรายงาน

เชื้อ	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. fragi</i> CRDA 323
Km (มก./มล.)	4.09	0.27	0.70
Vmax (หน่วย/นาที)	4.92	-	0.97×10^{-3}
สับสเตรท	น้ำมันมะกอก	ไตรบิวทิรีน	butter fat
เอกสารอ้างอิง	จากการทดลอง	Mencher และ Alford, 1967	Pabai, Kermasha และ Morin, 1995

ผลการทดลองโดยสรุปพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* จะผลิตไลเปสที่สามารถย่อยได้ทั้งกรดไขมันสายสั้นและสายยาวโดยความสามารถในการย่อยน้ำมันแต่ละชนิดจะต่างกัน ไปขึ้นกับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเป็นสิ่งสำคัญ จากข้อมูลนี้ทำให้สังเกตเห็นว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* สามารถนำไปใช้ในขบวนการ Interesterification เพื่อเพิ่มมูลค่าของเอสเทอร์ที่เตรียมได้โดยการแลกเปลี่ยนกรดไขมันที่จับกับกลีเซอรอลเพื่อสร้างเป็นเอสเทอร์ชนิดใหม่

จากที่ได้ศึกษามาทั้งหมดเป็นการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของไลเปสจาก *P. aeruginosa* เพื่อเป็นข้อมูลในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ต่อไป เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* นี้พบในส่วน

ตะกอนของบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งโดยธรรมชาติกุ้งจะหากินบริเวณก้นบ่อด้วยการจับอาหารที่เป็นของแข็ง ที่ตกลงไปอยู่ก้นบ่อกิน และอาหารของกุ้งก็มี fish oil ซึ่งประกอบด้วย unsaturated fatty acid(C₁₈ ขึ้นไป)เป็นองค์ประกอบหลัก(38%) และมีกรดโอเลอิก(16%) และกรดลิโนเลอิก(15%) รวมอยู่ด้วย (SBP Board of Consultants & Engineers, 1985) ดังนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* นี้จึงควรจะย่อย fish oil ได้ด้วย และยังมีรายงานว่าพบเชื้อ *Pseudomonas* ที่ผลิตไลเปสได้ในส่วน hindgut ของกุ้ง (Dempsey และ Kitting, 1987) แสดงว่าไลเปสจาก *Pseudomonas* มีส่วนช่วยในการย่อยไขมันเพื่อให้กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ดังนั้นถ้ามีการเติมไลเปสลงไปในอาหารของกุ้งก็น่าจะช่วยให้กุ้งได้รับกรดไขมันเพิ่มขึ้นและโตเร็วขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง และยังสามารถใช้เชื้อ *P. aeruginosa* นี้ในการกำจัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ด้วยเพื่อช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง นอกจากนั้นอาจนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่ดังที่มีรายงานว่าในญี่ปุ่นมีการใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เพื่อไฮโดรไลซ์น้ำมันสำหรับการผลิตสบู่ เนื่องจากการใช้เอนไซม์ในการกระตุ้นปฏิกิริยาจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นและสี ดีกว่าการทำให้ไขมันแตกตัว (fat splitting)และยังลดต้นทุนการผลิตด้วย (Macrae, 1983) เนื่องจากการย่อยไขมันโดยไลเปสเป็นกระบวนการที่ประหยัดพลังงาน เพราะปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติจึงไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของซีโรไมด์กลูทเช่น highly unsaturated fatty acid (macrae, 1983) ทำให้สามารถนำไปใช้ในการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ที่มี polyunsaturated fatty acid ที่มีราคาแพงและไม่คงตัว (sensitive) ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร(nutrition)และยา (Godtfredsen, 1990)

เอกสารอ้างอิง

- ทนง ภักรัชพันธ์, "เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร", มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2522.
- Arnold, R.G., Shahani, R.M. and Dwivedi, B.K. "Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products" J. Dairy Sci., 58(8), 1127-1143, 1975
- Bollag, D.M. and Edelstein, S. "Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions" Protein Methods, New York: Wiley-Liss Inc., 95-142, 1991
- Bradford, M.M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976
- Brockhoff, H. and Jensen, R.G. "Kinetics of Lipolysis" Lipolytic Enzymes, New York: Academic Press Inc., 10-24, 1974
- De Moraes, J. and Chandan, R.C. "Factors Influencing the Production and Activity of a *Streptococcus thermophilus* Lipase" J. Food Sci., 47, 1579-1583, 1982
- Dempsey, A.C. and Kitting, C.L. "Characteristics of A Bacteria Isolated from Penaeid Shrimp" Crustaceana, 52(1), 90-94, 1987
- Gilbert, E.J., Cornish, A. and Jones, C.W. "Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2" J. Gen. Microbiology., 137, 2223-2229, 1991

- Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W. "Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2" J. Gen. Microbiol., 137, 2215-2221, 1991
- Godtfredsen, S.E., In W.M. Fogarty and C.T. Kelly. "Microbial Lipases" Microbial Enzymes and Biotechnology, 2ed., 255-274, 1990
- Kim, H.K., Sung, M.H., Kim, H.M. and Oh, T.K. "Occurrence of Thermostable Lipase in Thermophilic *Bacillus* Sp. Strain 398" Biosci. Biotech. Biochem., 58(6), 961-962, 1994
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y. and Morita, Y. "Purification, Characterization, and Crystallization of Two Types of Lipase from *Rhizopus niveus*" Biosci. Biotech. Biochem., 58(6), 1007-1012, 1994
- Kohr, H.T., Tan, N.H. and Chua, C.L. "Lipase-catalyzed Hydrolysis of Palm Oil" J. Amer. Oil Chem. Soc., 63(4), 538-540, 1986
- Kojima, Y., Yokoe, M. and Mase, T. "Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102" Biosci. Biotech. Biochem., 58(9), 1564-1568, 1994
- Kokusho, Y., Machida, H. and Iwasaki, S. "Studies on Alkaline Lipase: Isolation and Identification of Lipase Producing Microorganisms" Agric. Biol. Chem., 46(5), 1159-1164, 1982
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. and Schmid, R.D. "Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data" J. Bacteriology., 173(15), 4836-4841, 1991

- Lawrence, R.C., Fryer, T.F. and Reiter, B. "The Production and Characterization of Lipases from a Micrococcus and a Pseudomonad" J. Gen. Microbiol., 48, 401-418, 1967
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme" Eur. J. Biochem., 216, 155-160, 1993
- Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serota, S. and Robert, A. "Lipid-Lipase Interactions. I. Fat Splitting with Lipase from *Candida rugosa*" JAQCS., 61(6), 1067-1071, 1984
- Macrae, A.R., In William M. Fogarty. "Extracellular Microbial Lipase" Microbial enzyme and biotechnology., London and Newyork; Applied Science Publishers, 1983.
- Mates, A. and Sudakevitz, D. "Production of Lipase by *Staphylococcus aureus* under Various Growth Conditions" J. appl. Bact., 36, 219-226, 1973
- Mencher, J.R. and Alford, J.A. "Purification and Characterization of the Lipase of *Pseudomonas fragi*" J. Gen. Microbiol., 48, 317-328, 1967
- Muderhwa, J.M., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J. and Galzy, P. "Purification and Properties of the Lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerr" JAQCS., 62(6), 1031-1036, 1985
- Nadkarni, S.R. "Studies on Bacterial Lipase, Part II, Studies of the Characteristics of Partially Purified Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*" Enzymologia, 40, 302-313, 1971
- Nishio, T., Chikano, T. and Kamimura, M. "Purification and Some Properties of Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B" Agric. Biol. Chem., 51(1), 181-186, 1987

- Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. "The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase" Agr. Biol. Chem., 45(1), 185-189, 1981
- Omar, I.C., Hayashi, M. and Nagai, S. "Purification and Some Properties of a Thermostable Lipase from *Humicola lanuginosa* No.3" Agr. Biol. Chem., 51(1), 37-45, 1987
- Pabai, F., Kermasha, S. and Morin, A. "Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat" Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 42-51, 1995
- Posorske, L.H. "Industrial-scale application of enzyme to fats and oils industry" J. Amer. Oil Soc., 61(11), 1758-1760, 1984
- Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T. and Inamasu, S. "Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters of Fatty Acid (I) Esterification of Sucrose, Glucose, Fructose and Sorbitol" JAOCS, 61(11), 1761-1765, 1984
- Shahani, K.M., In G. Reed (ed.). "Lipase and esterases" Enzymes in Food Processing. 2d ed., Newyork; Academic Press, 1975
- Stryer, L. "Entry of Fructose and Galactose into Glycolysis" Biochemistry, 3ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1988
- Stuer, W., Jaeger, K.E. and Winkler, U.K. "Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*" J. Bacteriology., 168(3), 1070-1074, 1986
- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. "Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp." J. Biochem., 109, 211-216, 1991

- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. "Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*" J. Biochem., 112, 598-603, 1992
- Sugiura, T., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. "Detection of Lipase-inhibiting Substance in *Candida paraliopolitica* and Inhibition by Phospholipids of *Candida paraliopolitica* Lipase" Agric. Biol. Chem., 39(1), 51-56, 1975
- Suzuki, M., Yamamoto, H. and Mizugaki, M. "Purification and General Properties of a Metal-Insensitive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400" J. Biochem., 100, 1207-1213, 1986
- Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T. and Shimizu, S. "Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*" Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 417-422, 1988
- Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K. and Sekiguchi, J. "Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus oryzae*" Biosci. Biotech. Biochem., 59(7), 1199-1203, 1995
- Tsujiisaka, Y., Iwai, M. and Tominaga, Y. "A Comparative Study on Some Properties of Fungal Lipases" In Proc. 4th IFS: Ferment. Technol. Today, 315-320, 1972
- Uyeda, M., Hirotsu, M., Itonaga, M., Urata, S., Susuki, K. and Shibata, M. "Purification and Properties of Lipase Activator Produced by *Streptomyces* sp. Strain No. BR-1381" Agr. Biol. Chem., 47(12), 2739-2746, 1983

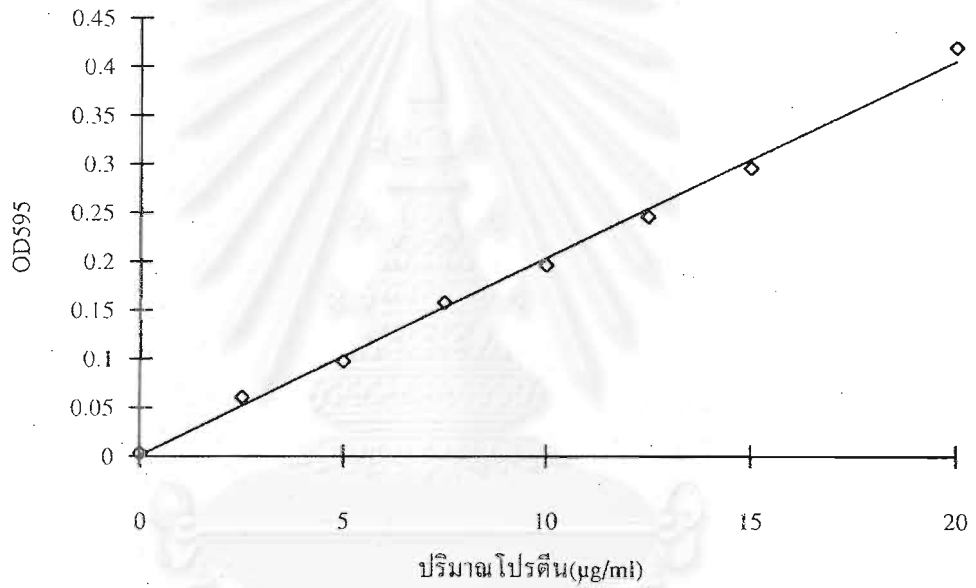
- Wang, Y.J., Sheu, J.Y., Wang, F.F. and Shaw, J.F. "Lipase-Catalyzed Oil Hydrolysis in the Absence of Added Emulsifier" Biotech. and Bioeng., 31, 628-633, 1988
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. "Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganism, Cultural Condition and Some Properties of Crude Enzyme" Agric. Biol. Chem., 41(8), 1353-1358, 1977
- Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M. and Sugiura, M. "Production and Properties of Lipase from A Newly Isolated Chromobacterium" Agric. Biol. Chem., 37(5), 999-1005, 1973
- Yamane, T. "Enzyme Technology for The Lipids Industry: An Engineering Overview" J. Amer. Oil Chem. Soc., 64(2), 1657-1661, 1987



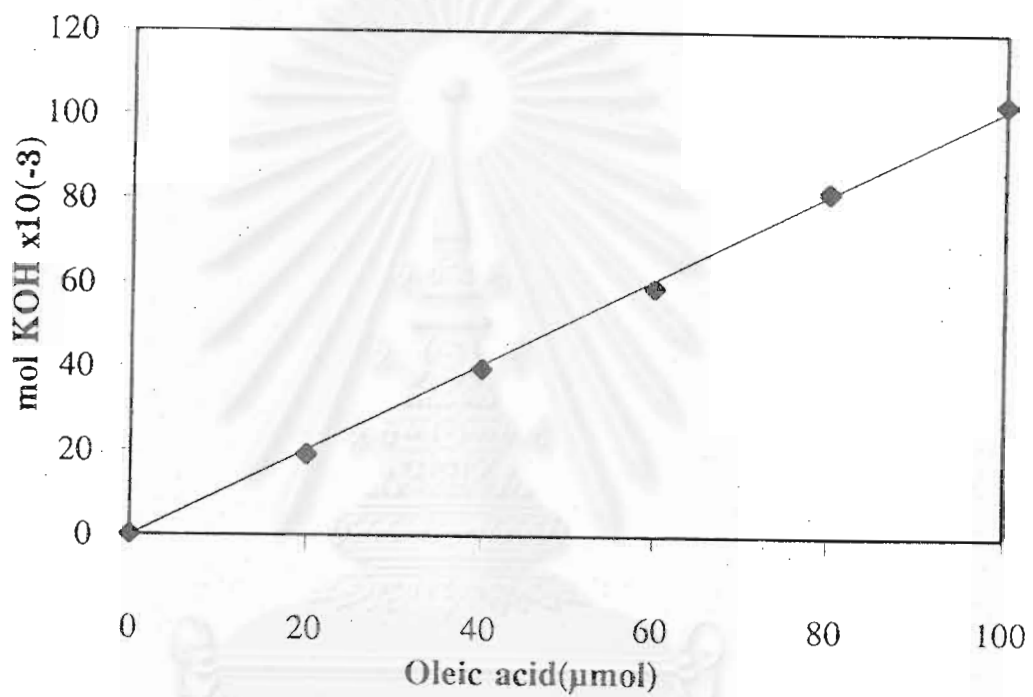
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

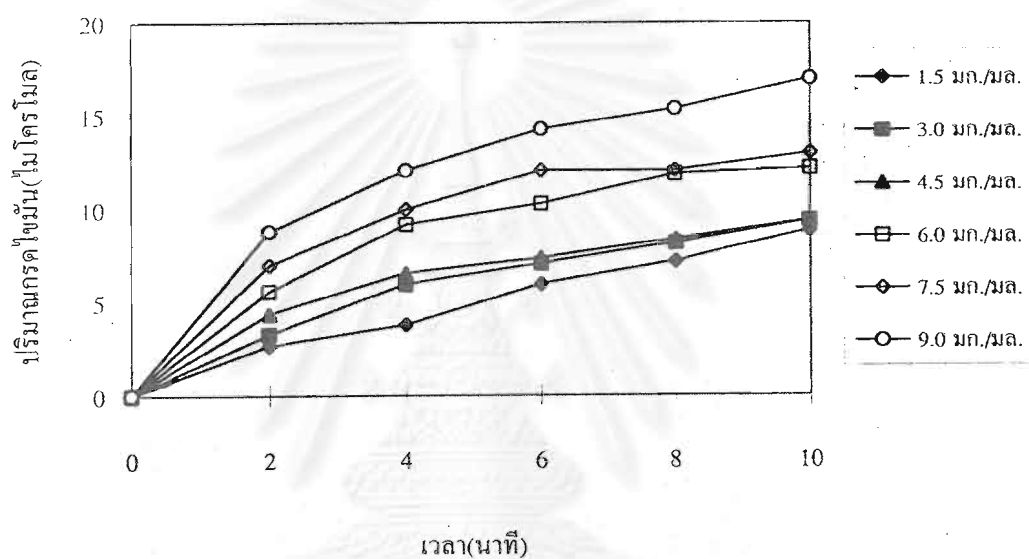


ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด.
แปรความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานคือ BSA ในช่วง
0-20 ไมโครกรัม(รายละเอียดวิธีทดลองตามข้อ 3.6)



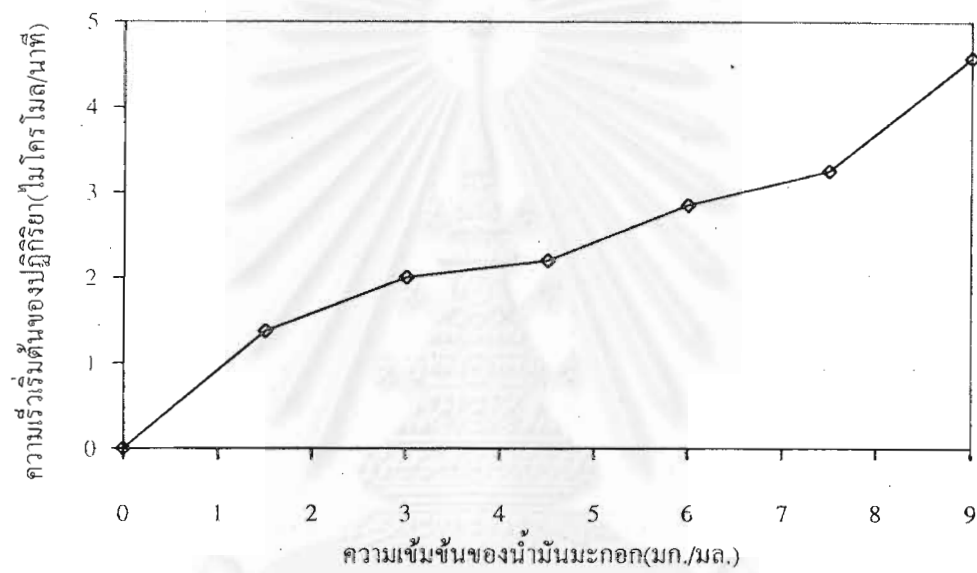
ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก แปรผันปริมาณความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครโมล ซึ่งเมื่อหาความชันของกราฟได้เท่ากับ 1.02×10^{-3}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 3 แสดงผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้น้ำมันมะกอกความเข้มข้นต่างๆกันเป็นสับสเตรท ดังวิธีทดลองข้อ 3.9.8

าลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 4 แสดงผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อความเร็วก่อนเริ่มของปฏิกิริยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย