บทที่ 1

บทนำ

เอนไซม์ไลเปส หรือ อีกชื่อหนึ่งคือ glycerol ester hydrolase หรือ acylglycerol hydrolase (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล พบว่าไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ 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) นอกจากนี้ไลเปสยังทำให้อาหารสุนัขรสชาติดีขึ้น และช่วยขจัดเศษเนื้อและเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบก่อนจะนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์หนังด้วย (Posorske, 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 ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย (Yamane, 1987)

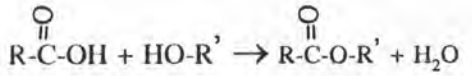
การทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane, 1987) คือ

1) ไฮโดรไลซ์เอสเทอร์

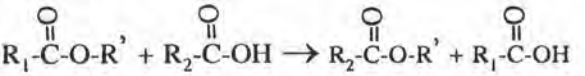
$$R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}O\text{=}R' + H_2O \rightarrow R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}OH + HO\text{-}R'$$

2) สังเคราะห์เอสเทอร์

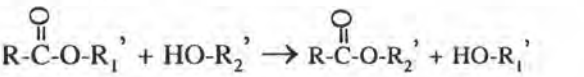


3) ทรานเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งแบ่งได้เป็น

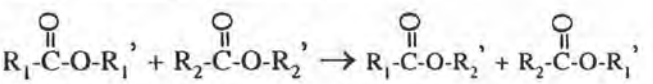
3.1) Acidolysis



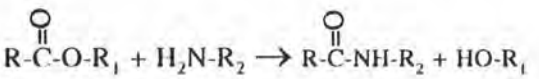
3.2) Alcoholysis



3.3) Ester exchange (interesterification)



3.4) Aminolysis



ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไลเปสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญ (growth phase) ที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลาย 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 ซึ่งสภาพขณะนั้นสับสเตรทที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว (Suzuki และคณะ, 1988)

นอกจากช่วงการเจริญแล้วสูตรอาหารซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ 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 บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์เช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ, 1973) แต่ *Alcaligenes sp.* ต้องการโซเดียมไนเตรตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kokusho และคณะ, 1982) นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้วแร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยจะพบว่า K_2HPO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ 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

พิพิธภัณฑ์ สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 *Bacilus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) และ *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima และคณะ, 1994)

ในทำนองเดียวกันจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมี optimum temperature ต่างกัน บางชนิดมี optimum temperature ที่อุณหภูมิสูงเช่น *Bacillus sp.* มี optimum temperature ที่ 60^{0}ซ

(Sugihara และคณะ, 1991) บางชนิดมี optimum temperature ที่อุณหภูมิปานกลางเช่น *Aspergillus oryzae* มี optimum temperature ที่ 30^{0}ซ (Toida และคณะ, 1995)

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างนอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วยเช่น ไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 จะคงตัวอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 5 ถึง 9 ที่อุณหภูมิ 45^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชม.และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60^{0}ซ นาน 20 ชม.เอนไซม์ก็ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ (Omar และคณะ, 1987) ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* AK102 คงตัวในช่วงความเป็นกรดด่าง 4 ถึง 10 แต่จะคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50^{0}ซ นาน 1 ชม. (Kojima และคณะ, 1994) ส่วนไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* จะคงตัวในช่วงความเป็นกรดด่าง 6 ถึง 9 ที่ 25^{0}ซ นาน 18 ชม. และจะคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30^{0}ซ นาน 3 ชม. จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าไลเปสแต่ละชนิดจะคงตัวในช่วงอุณหภูมิที่ไม่กว้างนัก แต่จะมีความคงทนในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้าง

2) แคลเซียมไอออน

จากการศึกษาไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamaheinna, 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

ความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทำงานของไลเปสจึงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไอออนจะสามารถช่วยให้ไลเปสจากจุลินทรีย์ทำงานได้มากขึ้นก็ต่อเมื่อใน reaction mixture มีการสะสมกรดโอเลอิค เพราะกรดโอเลอิคจะทำหน้าที่กระตุ้นให้แคลเซียมไอออนทำงาน แคลเซียมไอออนนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวกที่เป็น higher fatty acid เท่านั้น ถ้าสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก lower fatty acid พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน สรุปว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นในบางกรณีเท่านั้น การที่แคลเซียมไอออนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้นั้น ไม่ได้ขึ้นกับความคงตัวของเอนไซม์ ไม่ได้ขึ้นกับการขจัด (remove) กรดไขมันออกจากระบบของปฏิกิริยา รวมทั้งไม่ได้ขึ้นกับการเปลี่ยนรูปเป็นเกลือแคลเซียมด้วย แต่จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ emulsion state ของ reaction mixture ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เนื่องมาจากการทำงานของเกลือแคลเซียมที่มาจากการกระตุ้นของกรดไขมัน (Tsujisaka และคณะ, 1972)

Wang และคณะ (1988)ได้สรุปถึงสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการคือ

1. แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ทำให้ทำงานได้ดีขึ้น

2. แคลเซียมไอออนเพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของไลเปสที่ interface oil/water

3. แคลเซียมไอออนช่วยขจัดกรดไขมันออกจาก 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 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.1 เปอร์เซนต์จะยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Linfield และคณะ, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่า detergent บางชนิด เช่น Triton X-100, Lubrol PX, β-octylglucoside และ CHAPS ไม่ทำให้ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* เสียแอคติวิตี แต่ cetyltrimethylammonium bromide และ SDS จะยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Stuer และคณะ, 1986)

4) Physical state ของสับสเตรท (oil/water interface)

ไลเปสจะทำงานย่อยสับสเตรทก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปอีมัลชัน (oil/water interface) และไลเปสถูกดูดซึมระหว่าง oil-water interface เนื่องจากสภาพสับสเตรทต้องอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ

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

5) ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท

Macrae (1983) แบ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

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

2. ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง1และ3บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน, 1,2 (2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว (unstable) ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และในพวก rhizopus อีกหลาย species

3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ 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 ขณะที่ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะจะไม่มีการ 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°ซ เป็นเวลา 20 ชม. และจะคงตัวที่ pH ดังกล่าวที่ 4°ซ เป็นเวลา 5 วัน LAV ที่บริสุทธิ์จะทนความร้อนได้สูง แต่จะไม่มีผลต่อการทนความร้อนของไลเปสจาก *Phycomyces niten* LAV จะสามารถกระตุ้นไลเปสจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น ไลเปสจาก *Phycomyces niten*, *Chromobacterium viscosum* และ *Geotrichum candidum* ส่วนกลไกการทำงานของ LAV นั้นเชื่อว่าเป็นเพราะกรดโอเลอิคซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการทำงานของไลเปสนั้นจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ เนื่องจากกรดโอเลอิคจะทำให้ pH ลดลง แต่ถ้ามี LAV ในระบบ LAV จะดูดซับ (adsorb) กรดโอเลอิคไว้ 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 inosital (PI) ที่สร้างโดย *Candida paralipolytica* ที่อยู่ทั้งในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์ตัวเดียวกันได้ พบว่าที่ pH 8.2 phospholipid ทั้ง 3 ชนิด สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ 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 สายพันธุ์ต่างๆให้บริสุทธิ์เท่าที่ผ่านมาทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ 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%) และมีกรดโอเลอิค(16%) และกรดลิโนเลอิค(15%) รวมอยู่ด้วย (SBP Board of Consultants & Engineers, 1985) ดังนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* นี้จึงควรจะย่อย fish oil ได้ด้วย และยังมีรายงานว่าพบเชื้อ *Pseudomonas* ที่ผลิตไลเปสได้ในส่วน hindgut ของกุ้ง (Dempsey และ Kitting, 1987) แสดงว่า

ไลเปสจาก *Pseudomonas* มีส่วนช่วยในการย่อยไขมันเพื่อให้กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ดังนั้นถ้ามีการเติมไลเปสลงไปในอาหารของกุ้งก็น่าจะช่วยให้กุ้งได้รับกรดไขมันเพิ่มขึ้นและโตเร็วขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง

เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญในแง่ใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวข้างต้น การศึกษาหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสชนิดที่ต้องการในปริมาณสูง หรือเพื่อค้นหาเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น หรือเหมาะสมมากขึ้นในการใช้งานแต่ละด้านจึงเป็นงานวิจัยที่นอกจากจะมีความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจในการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานแล้ว ยังอาจเกิดศักยภาพการนำไปประยุกต์ใช้ได้ โครงงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้ คือ

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

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ไลเปสจาก Pseudomonas สายพันธุ์ต่างๆให้บริสุทธิ์

เชื้อ	ชนิดของไลเปส	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
Pseudomonas fragi	alkaline lipase	-Ultrafiltration,dialysis.lyophilization -$(NH_4)_2SO_4$-fractionation -DEAE-Sephadex	Mencher และ Alford (1967)
Pseudomonad	alkaline lipase	-Sephadex G-100 -Sephadex G-200	Lawrence, Fryer และ Reiter (1967)
P. aeruginosa	-	-Ultrafiltration -CHAPS solubilization -IEF	Stuer, Jaeger และ Winkler (1986)
Pseudomonas sp. Strain ATCC 21808	-	-Ultrafiltration -Q-Sepharose -Octyl-Sepharose	Kordel และคณะ (1991)
P. aeruginosa EF2	-	-Ultrafiltration -Mono-Q -Superose	Gilbert, Cornish และ Jones (1991)

เชื้อ	ชนิดของไลเปส	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
P. cepacia	acidic lipase	-Arcinol treatment -Macro-Prep methyl HIC -Sephacryl S-100HR	Sukihara และคณะ (1992)
P. fluorescens AK102	alkaline lipase	-$(NH_4)_2SO_4$-precipitate -DEAE-Toyopearl -Phenyl-Toyopearl	Kojima, Yokoe และ Mase (1994)
P. fragi CRDA 323	alkaline lipase	-Acid precipitate -$(NH_4)_2SO_4$-precipitate	Pabai, Kermasha และ Morin (1995)