

๒. ของการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับเอสเทอร์

๑. ผลของการแช่และ การ homogenization ในการสกัดเอสเทอร์จากรำ

ได้ทดลองสกัดเอโนไมด์เอสเทอร์ออกจากรำข้าวที่เพิ่งสีใหม่ ๆ โดยการแช่เฉย ๆ และโดยการ homogenization ด้วย waring blender และ homogenato นั้นไว้ ระยะเวลาทดลองต่าง ๆ กัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ๑ จะเห็นว่า เอโนไมด์เอสเทอร์นี้ สกัดจากรำได้ง่าย เพียงแช่รำในน้ำสัก ๒๐ นาที ก็จะได้สกัดเอโนไมด์เกือบหมด การ homogenization ไม่ช่วยให้สกัดได้เข้มข้นกว่าเมื่อแช่รำเฉย ๆ มากนัก ว่าถ้า homogenize นานเกิน ๕ นาที ยิ่งจะทำให้ได้เอโนไมด์น้อยลงเสียอีก อีกประการหนึ่ง supernatant ที่ได้ออกจากการสกัดเอโนไมด์ โดยวิธี homogenization นั้น เป็น emulsion ซึ่งไม่เหมาะต่อการวัด enzyme activity โดยการวัด optical density ด้วยหลอดคังกลาว เอโนไมด์ที่ใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไปทุกครั้ง จึงเตรียมโดยการแช่รำเฉย ๆ

จากตารางที่ ๒ จะเห็นว่า การแช่สกัดเอโนไมด์จากรำนั้น ถ้าใช้เวลาการแช่รำเกิน ๑๓ นาทีขึ้นไป ก็จะได้เอโนไมด์ออกมาเกือบหมดแล้ว ตารางที่ ๓ แสดงว่า การแช่รำไว้เพียง ๑๕ นาที ก็จะได้สกัดเอสเทอร์ออกมาได้ถึง ๘๓% ทั้งนี้ในการสกัดเอสเทอร์ เพื่อการทดลองต่อ ๆ ไปนั้น จึงสกัดด้วยน้ำเพียงครั้งเดียว โดยใช้เวลานานเข้าประมาณ ๒๐ นาที

ส่วนรำข้าวเก่าและรำข้าวใหม่นั้น ปรากฏว่า ให้เอโนไมด์เอสเทอร์ปริมาณทัดเทียมกัน (รูปที่ ๑) ในรูปเดียวกันนั้นแสดงด้วยว่า ในการสกัดถ้าใช้รำเปอร์เซ็นต์สูง ก็จะได้เอโนไมด์มากเป็นส่วนเกินเป็นเส้นตรง

ตารางที่ ๑

แสดงผลของการ homogenize การบดขำ ในการสกัดเอสเตอเรส ออกจากขำ

| เวลาที่ homogenize<br>(นาที) | เวลาที่แช่ที่ ๔°C.<br>(ชั่วโมง) | Esterase activity |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| ๐                            | ๐                               | ๐.๒๐๕             |
| ๐                            | ๑๕                              | ๐.๒๔๐             |
| ๐                            | ๑                               | ๐.๒๔๐             |
| ๐                            | ๕                               | ๐.๒๕๐             |
| ๑                            | ๐                               | ๐.๒๐๐             |
| ๑                            | ๑๐                              | ๐.๒๑๐             |
| ๑                            | ๑๕                              | ๐.๒๑๐             |
| ๕                            | ๐                               | ๐.๒๐๐             |
| ๕                            | ๑๐                              | ๐.๒๑๐             |
| ๕                            | ๑๕                              | ๐.๒๖๐             |
| ๑๕                           | ๐                               | ๐.๒๔๐             |
| ๑๕                           | ๑๐                              | ๐.๒๓๐             |
| ๑๕                           | ๑๕                              | ๐.๒๓๐             |
| ๑๕                           | ๐                               | ๐.๒๖๐             |
| ๑๕                           | ๑๐                              | ๐.๒๖๐             |
| ๑๕                           | ๑๕                              | ๐.๒๖๐             |
| ๑๕                           | ๕                               | ๐.๒๔๐             |
| ๑๕                           | ๑๐                              | ๐.๒๖๐             |
| ๑๕                           | ๑๕                              | ๐.๑๓๐             |

ตารางที่ ๒

แสดงปริมาณเอสเทอร์ที่สกัดได้จากการแฉะที่เวลาต่าง ๆ กัน

| เวลาแฉะ<br>(นาที) | Esterase activity<br>จาก ๑๐ % suspension | Esterase activity<br>จาก ๓๐ % suspension |
|-------------------|--|--|
| ๐                 | ๐.๑๐๐                                    | ๐.๓๑๐                                    |
| ๑๓                | ๐.๑๗๐                                    | ๐.๓๖๐                                    |
| ๒๕                | ๐.๑๖๐                                    | ๐.๓๗๐                                    |
| ๔๐                | ๐.๑๕๐                                    | ๐.๓๘๐                                    |
| ๖๐                | ๐.๑๕๐                                    | ๐.๔๐๐                                    |

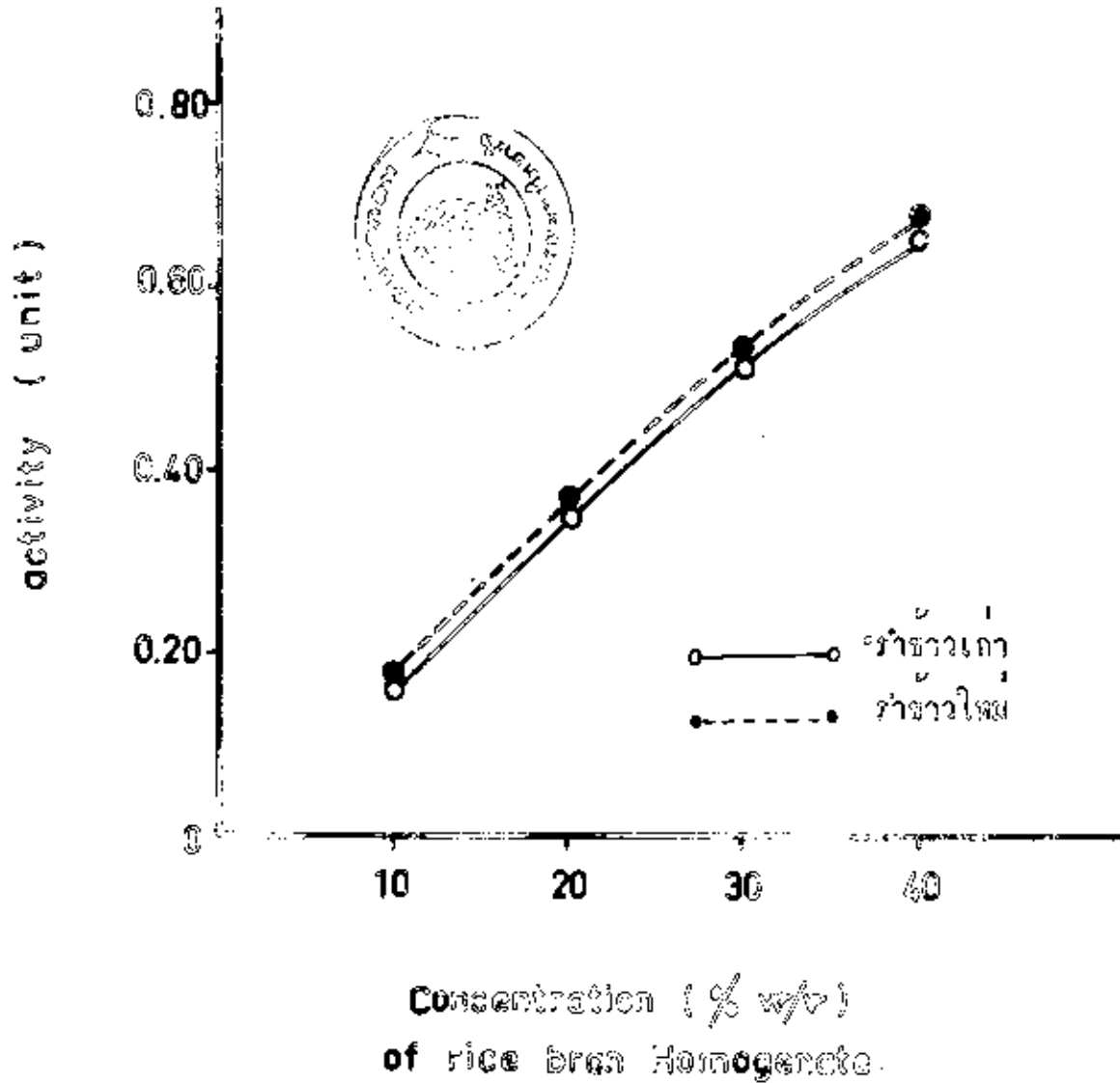
ตารางที่ ๓

แสดงปริมาณเอสเทอร์จากกราฟโดยใช้น้ำสกัดหลาย ๆ ครั้ง

| การสกัดครั้งที่ | Esterase activity | % Activity |
|-----------------|-------------------|------------|
| ๑               | ๐.๒๒๐             | ๘๓         |
| ๒               | ๐.๐๘๐             | ๑๓         |
| ๓               | ๐.๐๐๕             | ๔          |

หมายเหตุ ใ้ร่าวน ๒๐ % ร่าที่ไม่ homogenize จะสกัดได้ supernatant  
 ใ้ส่ ส่วนร่าที่ homogenize ใ้ supernatant ุ้เห็นน้่าน เนื่องจาก  
 ใ้มันถูก emulsify

รูปที่ ๑ แสดง activity ของเอนไซม์เพอโรซิเดสที่สกัดจาก  
รำข้าวเก่าและรำข้าวใหม่ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



๒. ความเสถียร(Stability) ของเอสเทอร์สพู่หนุมิจ่าง ๆ

ผลในตารางที่ ๔ แสดงว่า เอสเทอร์สพู่หนุมิจากการแยกน้ำ กัด หรือยังอยู่ในน้ำขาวกัด ปรากฏว่ามีความเสถียรมาก ถ้าเก็บไว้ในอุณหภูมิสูง ๆ (-๒๐°ซ.) activity จะลดลงเล็กน้อยเท่านั้นในเวลา ๒ เดือน แต่ในน้ำขาวที่ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (ประมาณ ๓๐°ซ.) จะทำให้เอนไซม์ย่อยลงไปมากภายในระยะเวลาเก็บเท่า ๆ กัน

ในการทดลองให้ความร้อนแก่เอนไซม์เอสเทอร์สพู่หนุมิจากการแยกน้ำ กัด ระยะเวลาต่าง ๆ กัน แสดงอยู่ในรูปที่ ๒ ซึ่งปรากฏว่า เอนไซม์เอสเทอร์สพู่หนุมิจากการแยกน้ำ กัดความรอนมาก แคลอุณหภูมิจาก ๕๐°ซ. ๒๐ นาที จะทำให้เอนไซม์เสียไป ๕๐ % และจะเสี่ยสภาพของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ เมื่อให้ความร้อน ๖๐°ซ. ๒๐ นาที

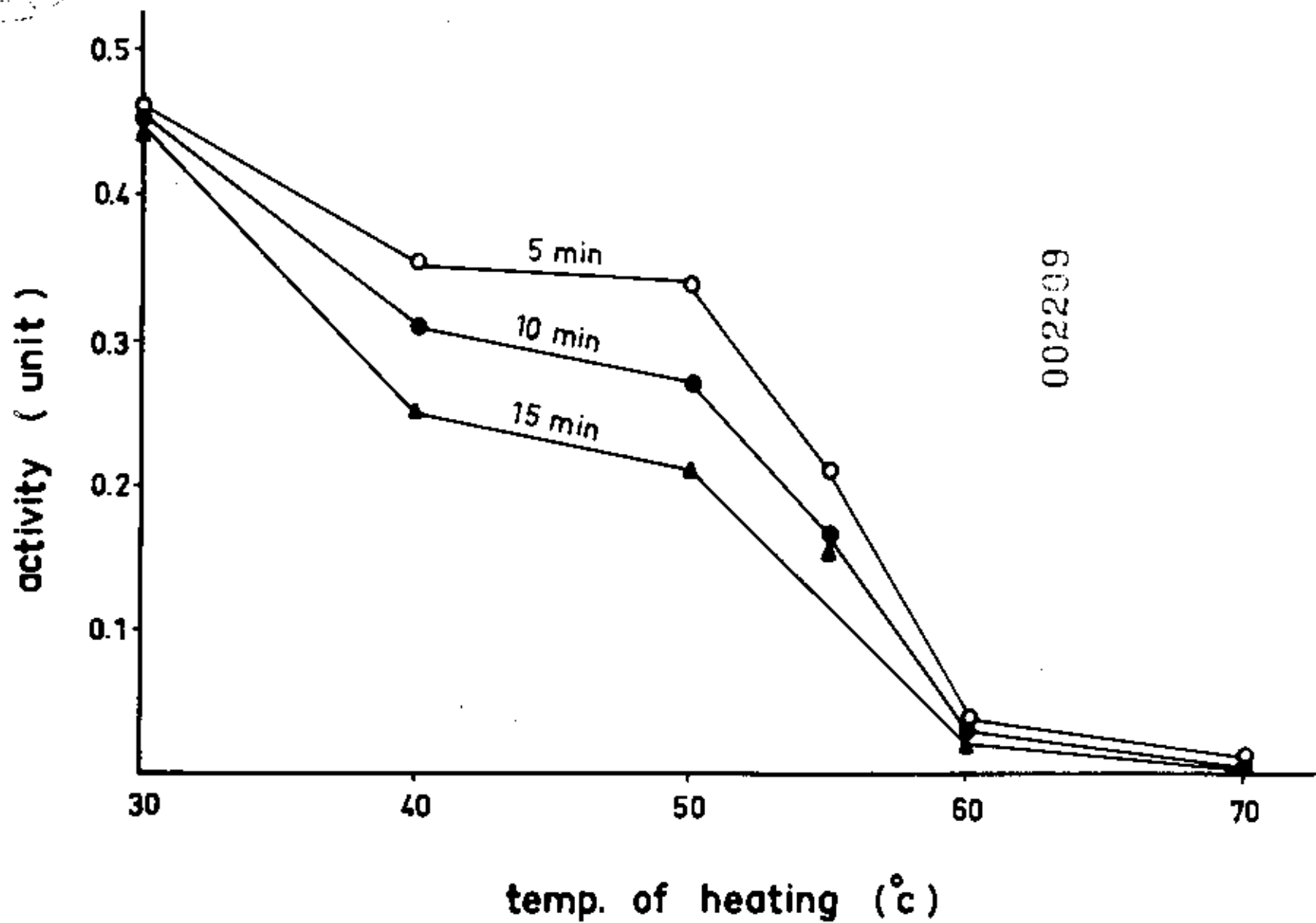
ตารางที่ ๔

แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ในสภาพต่าง ๆ กัน

| ระยะเวลา<br>ที่เก็บเอนไซม์<br>(เดือน) | ใน supernate<br>ที่เก็บไว้ที่ - ๒๐°ซ. |               | ในน้ำที่เก็บ<br>ไว้ที่ - ๒๐°ซ. |               | ในน้ำที่เก็บไว้<br>ที่ ๓๐°ซ. |               |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
|                                       | activity                              | %<br>decrease | activity                       | %<br>decrease | activity                     | %<br>decrease |
| ๐                                     | ๐.๕๕๐                                 | ๐             | ๐.๕๕๐                          | ๐             | ๐.๕๕๐                        | ๐             |
| ๑                                     | ๐.๕๓๐                                 | ๔             | ๐.๕๓๐                          | ๐             | ๐.๔๕๐                        | ๑๘            |
| ๒                                     | ๐.๕๑๐                                 | ๘             | ๐.๕๑๐                          | ๕             | ๐.๓๓๐                        | ๔๐            |
| ๔.๕                                   | -                                     | -             | ๐.๔๔๐                          | ๑๓            | ๐                            | ๑๐๐           |
| ๖.๕                                   | ๐.๔๒๐                                 | ๒๔            | -                              | -             | -                            | -             |



รูปที่ ๕ แสดงความเสถียรของเอสเทอร์ที่ได้จากพืชมังคุด ในเวลาต่าง ๆ กัน



002209

### ๓. ผลของ pH ต่อเอสเทอร์

ที่ pH ต่างกัน p-Nitrophenol (สารที่ได้จากการไฮโดรไลซิสของเอสเทอร์) จะมีค่า optical density ต่างกัน (ดูรูปที่ ๓) ซึ่งของ p-Nitrophenol จะจางมาก ถ้า pH น้อยกว่า ๖ และจะเข้มมาก ถ้า pH มากกว่า ๘ จึงทำให้การศึกษารสของ pH ต่อเอสเทอร์โดยวิธีนี้ ทำได้เฉพาะช่วง pH ๖ - ๘ เท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำ p-Nitrophenol curve เพื่อได้แก่ค่า optical density ที่อ่านได้จากปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริง ที่เนื่องมาจากเอนไซม์เอสเทอร์เท่านั้น

ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอร์ (ที่แก้ไขแล้วดังข้างบน) แสดงในรูปที่ ๔ ซึ่งเป็นแบบตัวอย่างจากการทดลองมากกว่า ๕ ครั้ง จะเห็นว่าที่ pH ต่าง ๆ เช่น pH ๕.๕ activity ของเอสเทอร์จะน้อย และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น สูงที่สุดที่ pH ประมาณ ๗.๖ - ๘.๐ ซึ่ง optimum pH ของเอสเทอร์ก็อยู่ใน range นี้ แต่ไม่เป็นที่ชัดเจนนัก เพราะไม่สามารถศึกษาได้เกิน pH ๘ ดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาระยะการทดลองส่วนมาก จึงใช้ pH ๗.๕ - ๗.๖ เป็น pH ที่ทำการทดลอง

ในการศึกษารสของ pH ต่อเอสเทอร์นี้ ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเอสเทอร์ในสภาพของ pH ต่าง ๆ กันด้วยโดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้ ไปแช่ในสารละลาย buffer ซึ่งมี pH ต่าง ๆ กัน (ระหว่าง pH ๓ - ๑๐) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ภายในเวลา ๖๐ นาที) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำเอนไซม์นี้ไปวัด activity ของเอสเทอร์ที่ pH ๗.๖ ทั้งนี้ได้ทำ control ไปด้วยทุกครั้ง (control ก็เอนไซม์ที่สกัดได้ ซึ่งปกติมี pH ประมาณ ๖.๖ - ๖.๘ เมื่อนำลงไปแช่ใน buffer) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยระยะเวลาเท่ากับ ที่ทำการทดลองกับเอนไซม์ที่แช่ใน buffer)

ผลการเสีย activity เนื่องจากการแช่ buffer ที่ pH ต่าง ๆ กัน เมื่อเทียบกับ control ของมันแล้ว แสดงในรูปที่ ๕ จะเห็นว่า เอสเทอร์

เสีย activity ใตมากที่สุดที่ pH ค่า ๆ เช่นเมื่อ pH = ๓ เพียง ๑๐ นาที จะเสีย activity ไปถึง ๖๐ % ถ้า pH เพิ่มขึ้น การเสีย activity ก็จะลดลงตามลำดับ และจะเสียน้อยที่สุดประมาณ pH ๖ - ๗ แต่ถ้า pH สูงกว่านี้ จะเสีย activity ไปเล็กน้อย คือประมาณ ๑๐ % ถ้าอยู่ใน buffer pH ๘ หรือ ๑๐ นาน ๑๐ นาที

#### ๔. ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอร์เรส

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอร์เรส ซึ่งได้จากการทดลอง ๔ ครั้ง แสดงเป็นแบบตัวอย่าง ในรูปที่ ๖ จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นประมาณ  $4 \mu\text{mole} / \text{tube}$  ( $0.733 \text{ mM}$ .)

activity ของเอสเทอร์เรส ก็เริ่มเข้าเขต optimum concentration แต่เนื่องจาก p-Nitrophenyl acetate ละลายในน้ำได้น้อย ศึกษาได้เต็มที่สูงสุดแค่  $0.3 \text{ mM}$ . เท่านั้น จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาผลของความเข้มข้นของ substrate สูงกว่านี้ได้

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

$$\begin{aligned} \text{intercept} &= \frac{1}{V} &= 4.7 \\ \text{slope} &= \frac{K_m}{V} &= 2.5 \end{aligned}$$

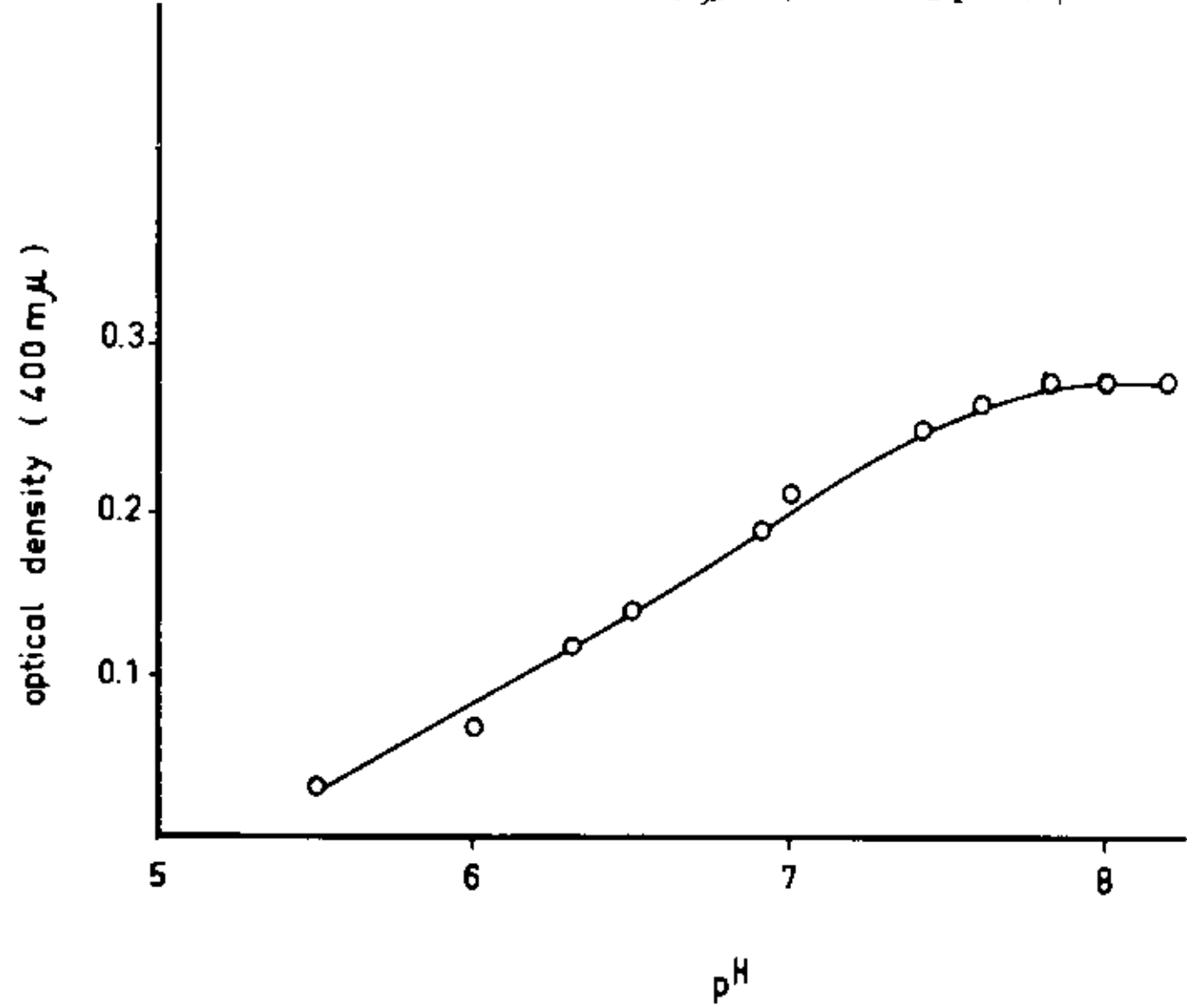
จากนี้คำนวณได้ว่า

$$\begin{aligned} \text{Michaelis - Menten Constant (K}_m\text{)} \\ &= 5.2 \times 10^{-5} \text{ M} \end{aligned}$$

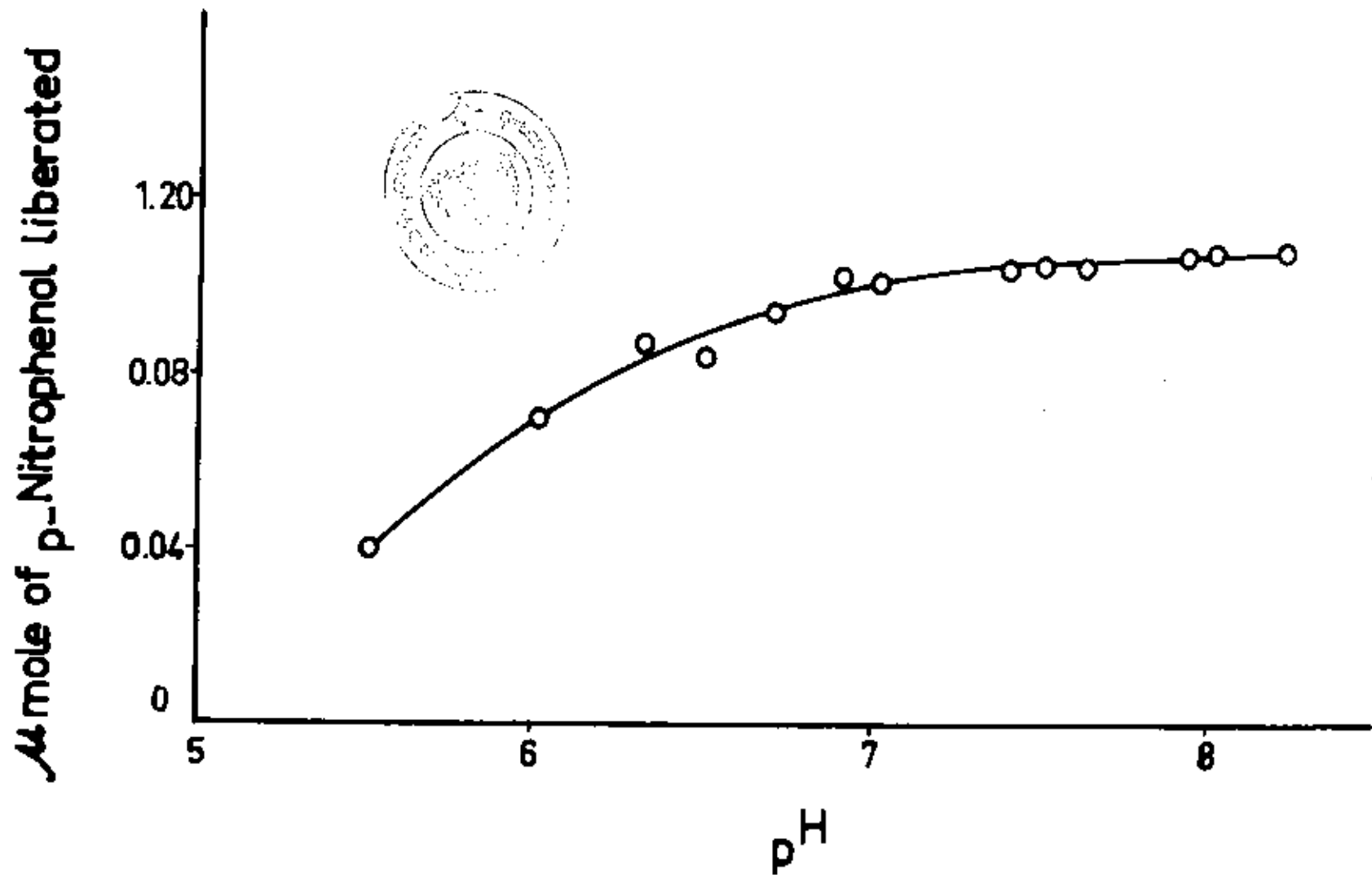


รูปที่ ๓ p Nitrophenol Curve

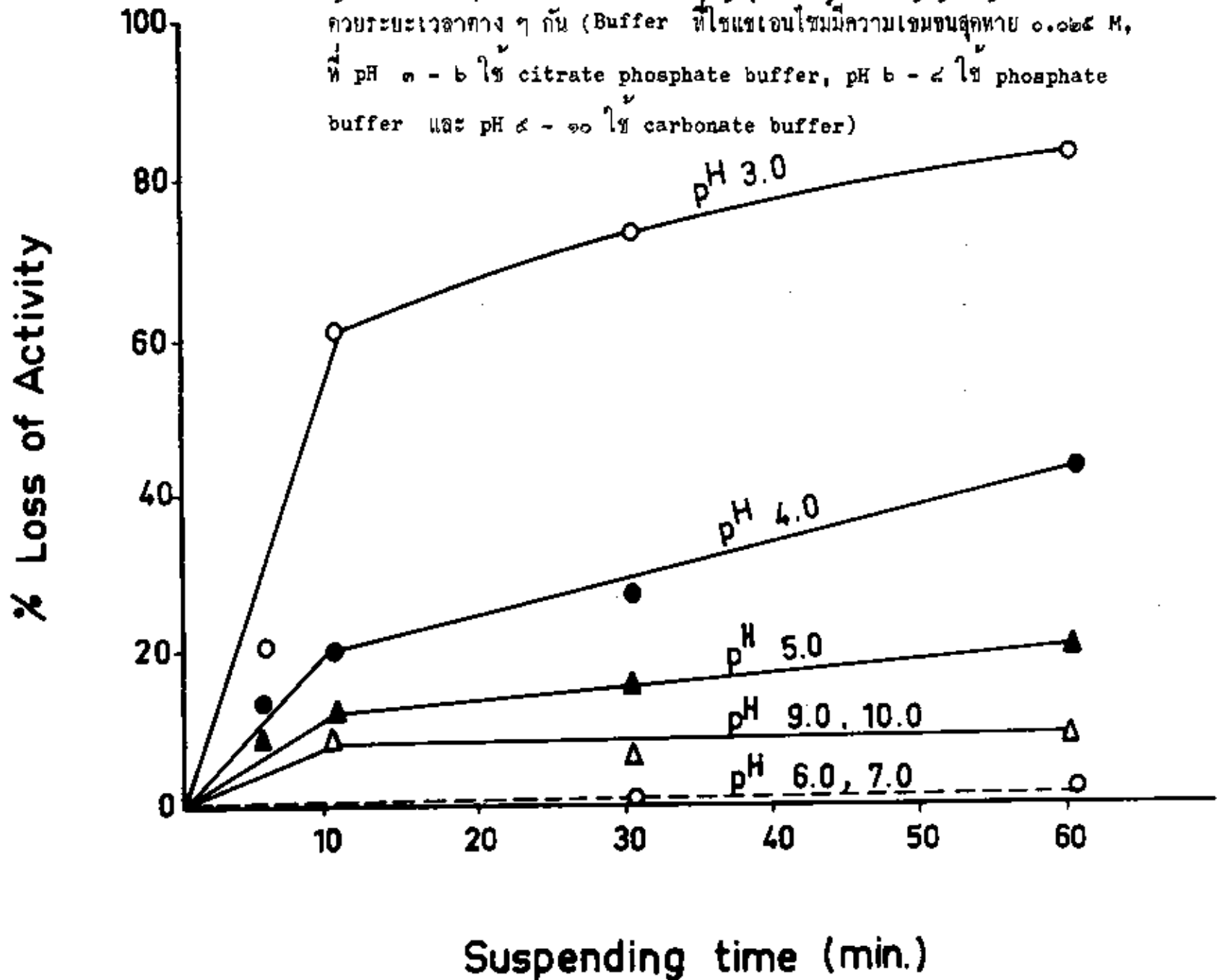
แสดงความสัมพันธ์ของ optical density ที่ 400 มิลลิเมตร  
ของ p- Nitrophenol เข้มข้น ๐.๐๕  $\mu$ mole/tube กับ pH ต่าง ๆ กัน



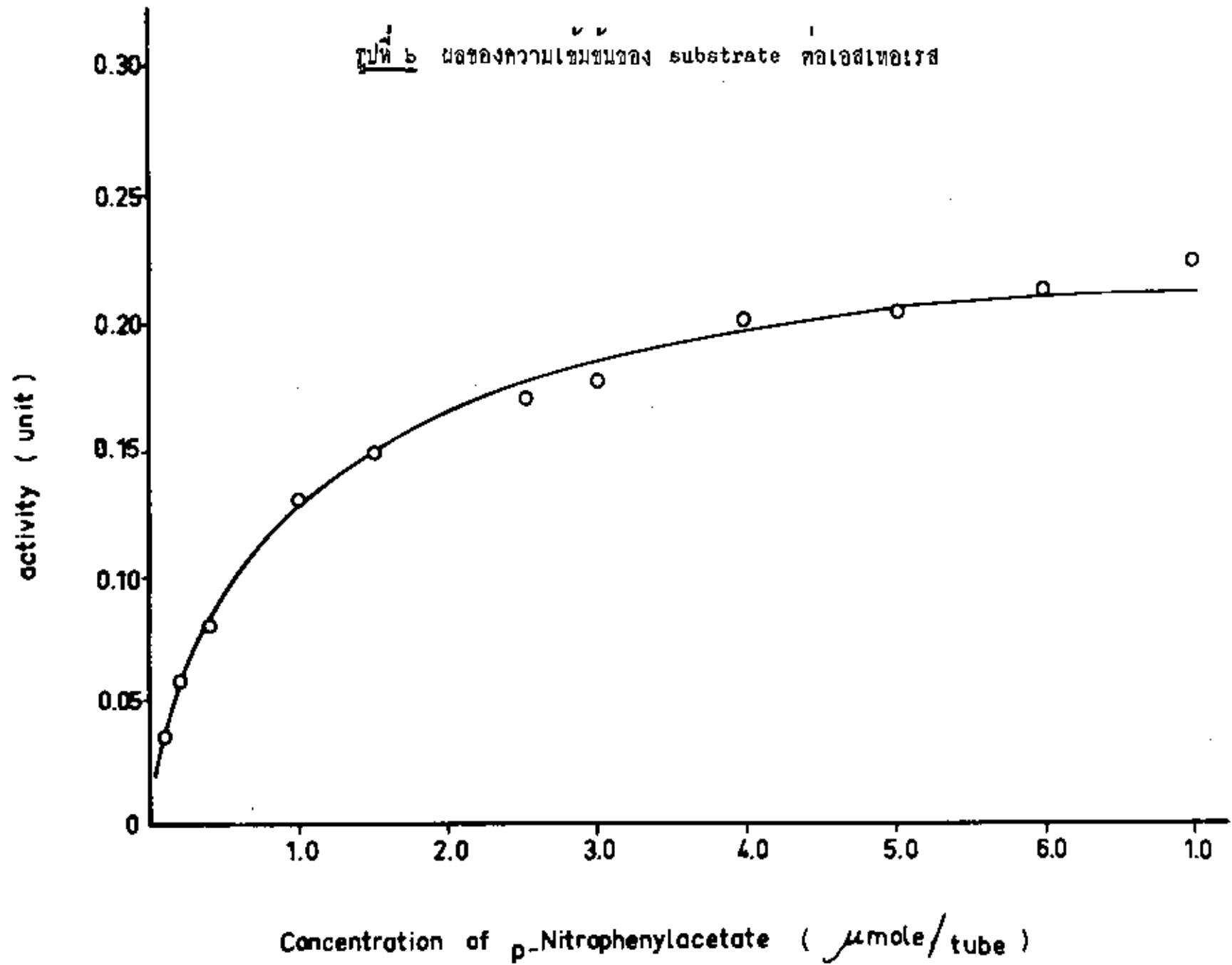
รูปที่ ๔ แสดงผลของ pH ต่อเอสเทอเรส



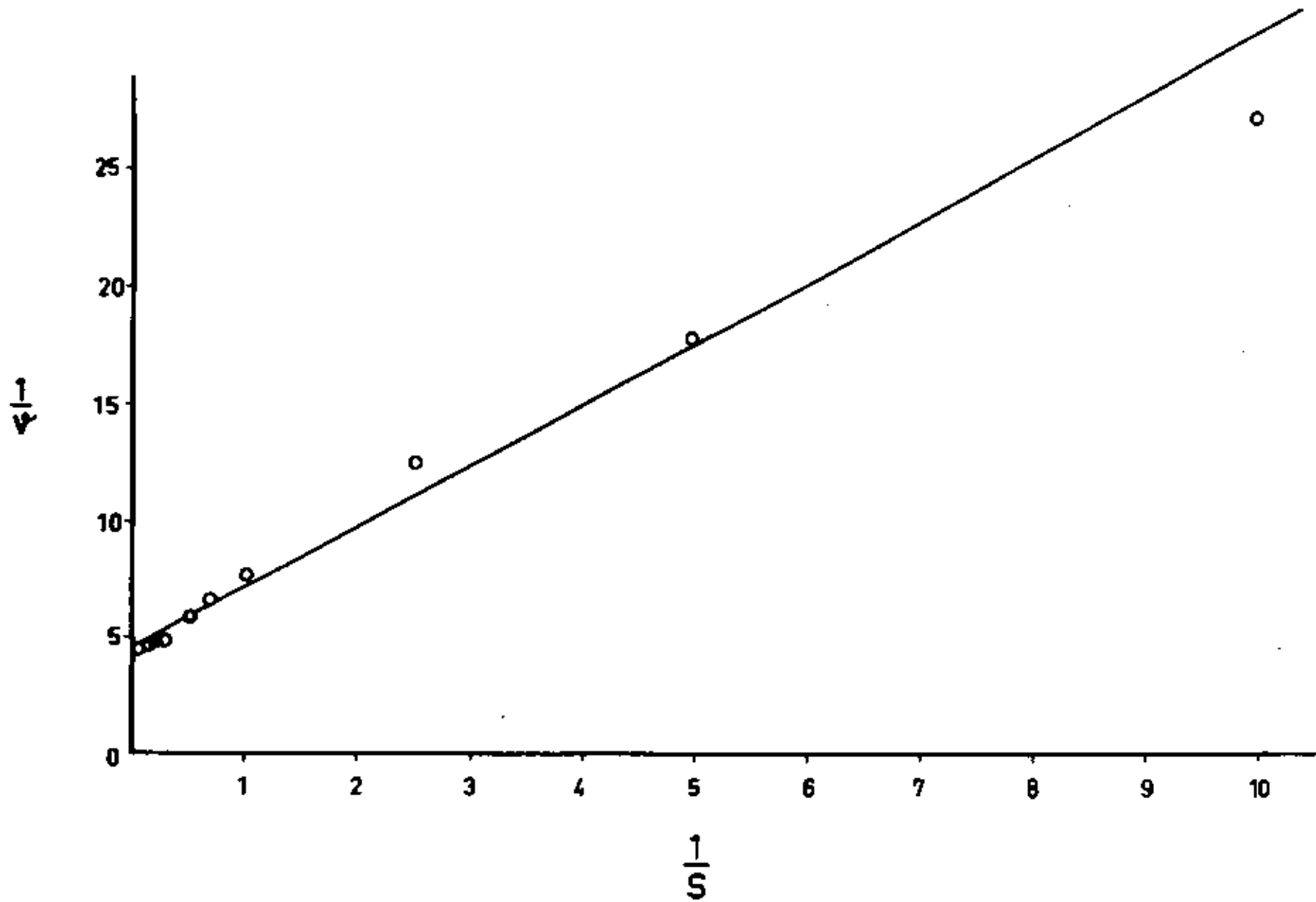
รูปที่ ๕ แสดงการเสีย esterase activity เมื่อแช่ใน buffer pH ต่าง ๆ กัน  
 ควบระยะเวลาต่าง ๆ กัน (Buffer ที่ใช้แต่เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้าย ๐.๐๒๕ M,  
 ที่ pH ๓ - ๖ ใช้ citrate phosphate buffer, pH ๖ - ๘ ใช้ phosphate  
 buffer และ pH ๘ - ๑๐ ใช้ carbonate buffer)



รูปที่ ๖ ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอนไซม์



รูปที่ ๘ แสดงการหา  $K_m$  ของเอนไซม์โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot





๘. ผลของตัวห้ามปฏิกิริยา

ได้ศึกษาผลของตัวห้ามปฏิกิริยาต่าง ๆ ต่อเอสเทอร์ในน้ำ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ๕ ปรากฏว่า p- Nitrobenzoic acid, iodoacetamide, mercuric chloride และ sodium arsenite สามารถห้ามปฏิกิริยาได้คือ Iodoacetic acid, potassium thiocyanate, potassium fluoride และ potassium iodide สามารถห้ามปฏิกิริยาได้บ้าง แต่ไม่สิ้นก และ sodium sulfate, sodium cyanide, calcium chloride และ magnesium chloride ไม่มีผลต่อ activity ของเอสเทอร์เลย

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

ในรูปที่ ๔ นั้น สำหรับกราฟที่แสดงถึง activity ของเอสเทอร์ เมื่อไม่มีตัวห้ามปฏิกิริยา

$$\begin{aligned} \text{intercept} &= \frac{1}{V} &= 2.75 \\ \text{slope} &= \frac{K_m}{V} &= 1.35 \\ \text{คำนวณค่า } K_m & &= 0.49 \mu\text{mole} \\ & \text{หรือ} &= 4.9 \times 10^{-5} \text{ M} \end{aligned}$$

(ค่า  $K_m$  ที่คำนวณได้นี้ ปรากฏว่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ในหน้า ๑๘)

แต่ในกราฟที่ใส่ตัวห้ามปฏิกิริยาไปด้วย

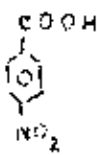
$$\text{intercept} = \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) = 4.5$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibitor Constant (K}_i) &= 0.03 \mu\text{mole} \\ &= 0.3 \times 10^{-5} \text{ M} \end{aligned}$$

ซึ่งจากกราฟพบว่า iodoacetamide เป็น noncompetitive inhibitor

ตารางที่ ๕

แสดงผลของตัวความเข้มข้นไฮดรอกซีอะซิเตอิก

| สารที่ทดสอบ   | ความเข้มข้น<br>(millimole / tube) | % Inhibition |
|---|-----------------------------------|--------------|
| p- Nitrobenzoic acid<br> | ๐.๐๐๐๒                            | ๓            |
|   | ๐.๐๐๐๕                            | ๑๑           |
|   | ๐.๐๐๐๘                            | ๒๓           |
|   | ๐.๐๐๑                             | ๒๖           |
| Iodoacetic acid<br>(ICH <sub>2</sub> COOH)  | ๐.๑๐                              | ๐            |
|   | ๐.๒๕                              | ๖            |
|   | ๐.๕๐                              | ๑๘           |
|   | ๑.๐๐                              | ๒๓           |
| Iodoacetamide<br>(ICH <sub>2</sub> COONH <sub>2</sub> )   | ๐.๐๐๐๑                            | ๑๑           |
|   | ๐.๐๐๑                             | ๒๓           |
|   | ๐.๑๐                              | ๔๔           |
|   | ๐.๑๐                              | ๖๕           |
|   | ๐.๒๐                              | ๗๗           |
|   | ๐.๓๐                              | ๘๓           |
|   | ๐.๕๐                              | ๙๔           |
| Mercuric chloride<br>(HgCl <sub>2</sub> )   | ๐.๐๐๐๐๑                           | ๓            |
|   | ๐.๐๐๐๑                            | ๒๓           |
|   | ๐.๐๐๑                             | ๓๕           |
|   | ๐.๐๐๒                             | ๕๖           |
|   | ๐.๐๐๕                             | ๕๖           |

| สารประกอบ                                    | ความเข้มข้น<br>(millimole / tube)         | % Inhibition              |
|--|---|---------------------------|
| Sodium arsenite<br>( $\text{NaAsO}_2$ )      | 0.0009<br>0.009<br>0.09<br>0.925<br>0.050 | 0<br>10<br>15<br>25<br>25 |
| Pot. thiocyanate<br>( $\text{KCNS}$ )        | 0.20<br>0.50                              | 0<br>10                   |
| Pot. fluoride<br>( $\text{KF}$ )             | 0.005<br>0.05<br>0.50<br>0.55             | 5<br>15<br>15<br>20       |
| Pot. iodide<br>( $\text{KI}$ )               | 0.20<br>2.00                              | 0<br>15                   |
| Sod. sulfate<br>( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) | 0.50                                      | 0                         |
| Sod. cyanide<br>( $\text{NaCN}$ )            | 0.50                                      | 0                         |
| Calcium chloride<br>( $\text{CaCl}_2$ )      | 0.00005<br>0.0005<br>0.005                | 0<br>0<br>0               |
| Magnesium chloride<br>( $\text{MgCl}_2$ )    | 0.005<br>0.05                             | 0<br>0                    |

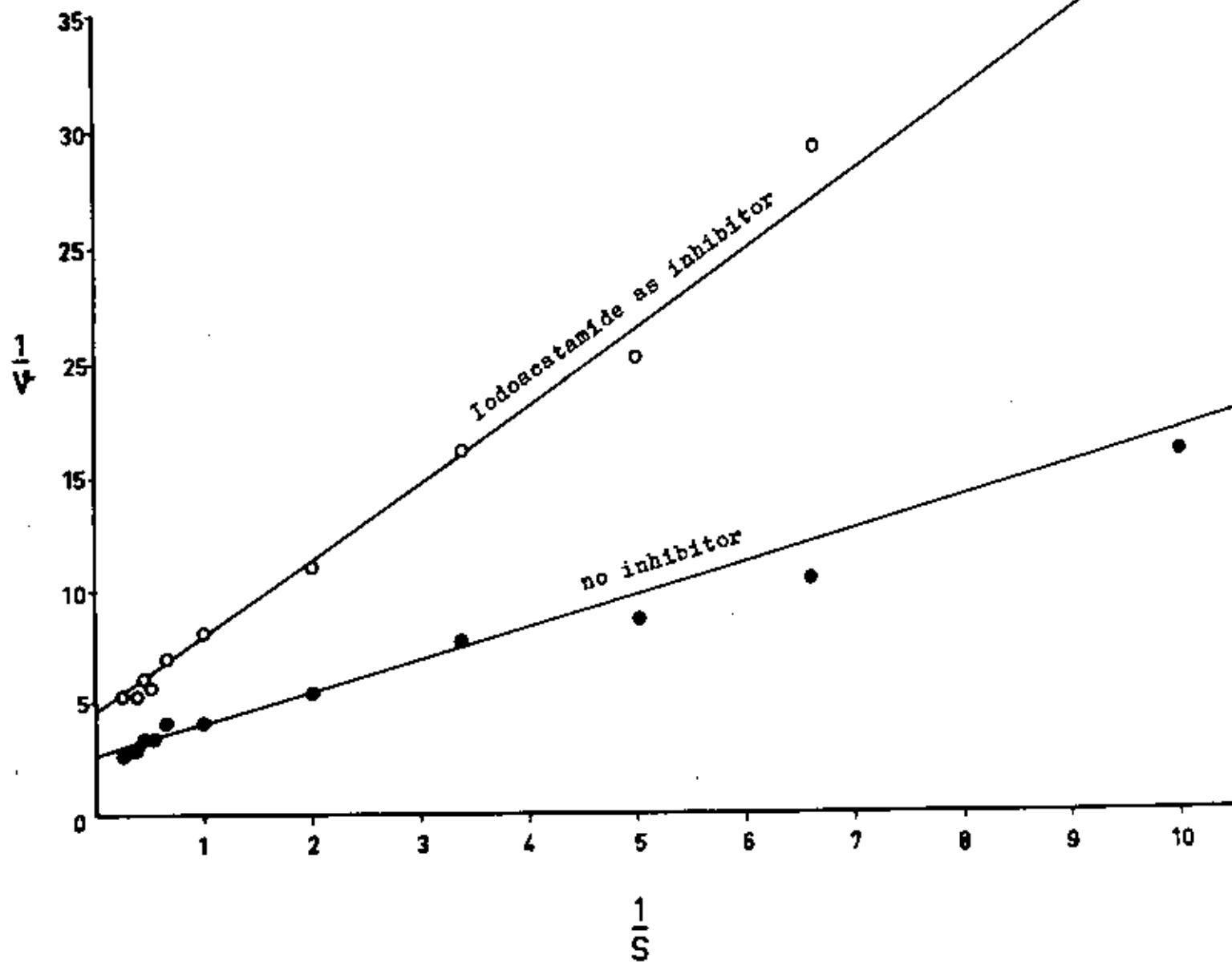


หมายเหตุ

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

๒. แคลเซียมคลอไรด์ และ แมกนีเซียมคลอไรด์ ตกตะกอนกับ phosphate buffer ที่ความเข้มข้นเกิน ๐.๐๐๑ และ ๐.๐๑ โมลาร์ตามลำดับ จึงไม่สามารถศึกษาผลของสารทั้งสองได้มากกว่านี้ เมื่อต้องเปลี่ยนจาก phosphate buffer มาเป็น ๐.๐๓ โมลาร์ของ Tris. buffer pH ๗.๖ แทน (๐.๐๖๕ โมลาร์ของ phosphate buffer จะให้ activity ของไฮโดรเจนไอออน เท่ากับ ๐.๐๓ โมลาร์ของ Tris. buffer) ทำให้สามารถศึกษาผลของแคลเซียม และแมกนีเซียมไอออน ได้มากขึ้นเล็กน้อย แต่ก็ยังคงไม่ทำให้ activity ของไฮโดรเจนไอออนเปลี่ยนแปลงอยู่แน่นอน

รูปที่ ๔ แสดงการหา  $K_i$  ของเอสเทอร์เมื่อมี iodoacetamide เป็นตัวห้ามปฏิกิริยาโดยใช้ Lineweaver and Burk's plot



## การศึกษเกี่ยวกับไลเปส

### ๑. สภาพต่าง ๆ ในการสกัดไลเปสจากรำ

ในการศึกษาเพื่อหาสภาพที่ดีที่สุด ในการสกัดไลเปสจากรำนั้น ได้ลองใช้น้ำ, phosphate buffer pH ต่าง ๆ และ ๐.๕% sodium chloride เป็นตัวสกัด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ ๒ ซึ่งจะเห็นได้ว่า น้ำเป็นตัวสกัดเอนไซม์ที่ดีที่สุด, phosphate buffer สกัดเอนไซม์ได้น้อยกว่าเล็กน้อย และใน pH กลาง ๆ จะสกัดได้ดีกว่า pH ที่เป็นกรดหรือด่าง แต่ถ้าใช้ ๐.๕% sodium chloride จะได้ activity น้อยที่สุด คือเพียง ๓๕% ของเมื่อใช้น้ำเป็นตัวสกัด

ส่วนในตารางที่ ๓ แสดงผลการศึกษานผลของการ homogenization และการแช่น้ำเฉย ๆ จะเห็นว่า การเอารำแช่น้ำที่ ๔๖°ซ. แล้วเป็นคีสวีกเลย จะได้ไลเปสออกมาประมาณครึ่งเดียวเท่านั้น แม้จะแช่นานถึง ๑๘ ชั่วโมงก็ได้ activity เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย การ homogenization จะช่วยให้สกัดเอนไซม์ออกมาได้มากขึ้น แต่ไม่สูงสุดเพราะการแช่ homogenate ที่ได้นั้นไว้ ๑๘ ชั่วโมง จะให้ activity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีก แต่ถ้าแช่นานเกินกว่านี้ activity จะกลับลดลง

ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับไลเปส จึงเตรียมเอนไซม์โดย homogenize รำ ในน้ำจน ๓๐% (w/v) ๕ นาที แล้วจะแช่ไว้ที่ ๔๖°ซ. ๑๘ ชั่วโมง จึงกลย่นำมาวัด activity เอนไซม์ในแก้วที่ - ๒๐°ซ. ทำไว้เพียงภายใน ๑ อาทิตย์

### ๒. ผลของ pH ต่อไลเปส

ได้ศึกษาวัด activity ของไลเปสระหว่าง pH ๓ - ๑๐ จากการทดลอง ๓ ครั้ง ได้ผลแสดงในรูปที่ ๔ optimum pH ของไลเปสอยู่ประมาณ ๖.๐ - ๗.๐ และ activity จะน้อยลงถ้า pH ต่ำกว่า ๕ หรือเกินกว่า ๘

ตารางที่ ๖

ผลของการสกัดไลเปสด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ  
(ใช้ ๒๐ % รัวไรท์ ๔"x. ๑๔ ชั่วโมง)

| ของเหลวที่สกัด                | Lipase activity<br>(mEq. NaOH X 10 <sup>-3</sup> ) | % Activity |
|-------------------------------|--|------------|
| น้ำ                           | ๖.๕๐   | ๑๐๐        |
| ๐.๐๕ M Phosphate Buffer pH๖   | ๕.๖๕   | ๘๘         |
| ๐.๐๕ M Phosphate Buffer pH๗   | ๕.๕๑   | ๘๖         |
| ๐.๐๕ M Phosphate Buffer pH๗.๕ | ๕.๕๑   | ๘๖         |
| ๐.๐๕ M Phosphate Buffer pH๘   | ๕.๖๑   | ๘๗         |
| ๐.๕ % NaCl                    | ๕.๗๖   | ๘๙         |

ตารางที่ ๗

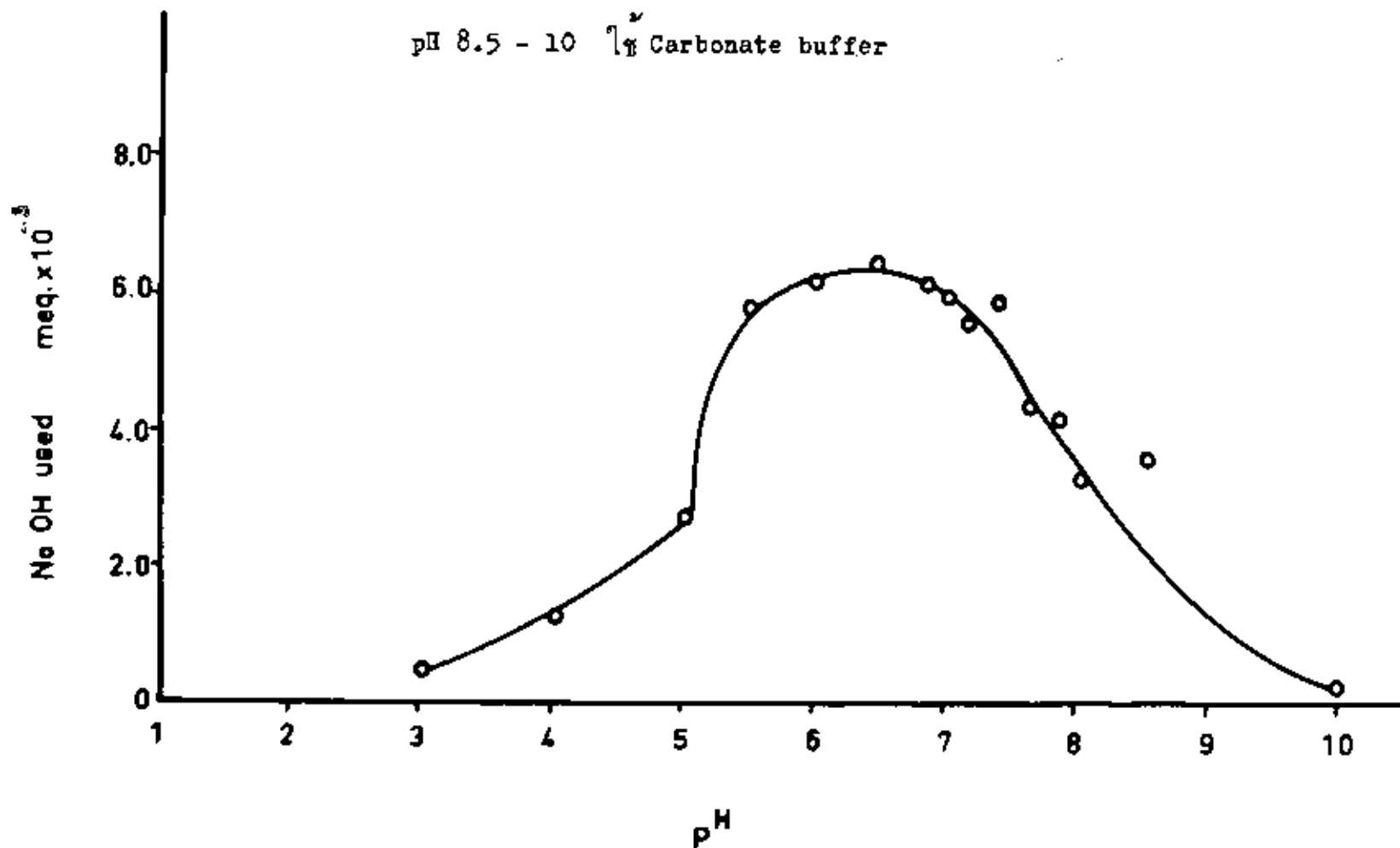
แสดงผลของการ homogenization และการแช่

ในการสกัดไลเปสจากนม

| เวลาที่ homogenize<br>(นาที) | เวลาที่แช่ที่ ๕"x.<br>(ชั่วโมง) | Lipase activity<br>(mEq. NaOH X 10 <sup>-3</sup> ) |
|------------------------------|---------------------------------|--|
| ๐                            | ๐                               | ๖.๖๘   |
| ๐                            | ๑๕                              | ๗.๒๓   |
| ๕                            | ๐                               | ๕.๕๕   |
| ๕                            | ๑๕                              | ๑๖.๓๖  |
| ๕                            | ๔๕                              | ๑๖.๐๖  |
| ๕                            | ๙๐                              | ๐  |

รูปที่ ๔ แสดงผลของ pH ต่อไลเปส

- pH 3 - 5.5 ใช้ Citrate - Phosphate buffer  
 pH 6 - 8.0 ใช้ Phosphate buffer  
 pH 8.5 - 10 ใช้ Carbonate buffer



๓. ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส

จากรูปที่ ๑๑ พบว่า optimum substrate concentration ของไลเปสเริ่มตั้งแต่ ๑.๖๖ % (v/v) ของ olive oil emulsion เนื่องจากการเตรียม emulsion ของ substrate โดยวิธีนี้ไม่สามารถเตรียมให้มีความเข้มข้นเกิน ๓ % (v/v) ได้ เพราะว่าจะมีน้ำมันบางส่วนถูก emulsify ในนมค จึงไม่สามารถศึกษาผลของความเข้มข้นเกินกว่าที่ผ่านแล้วได้

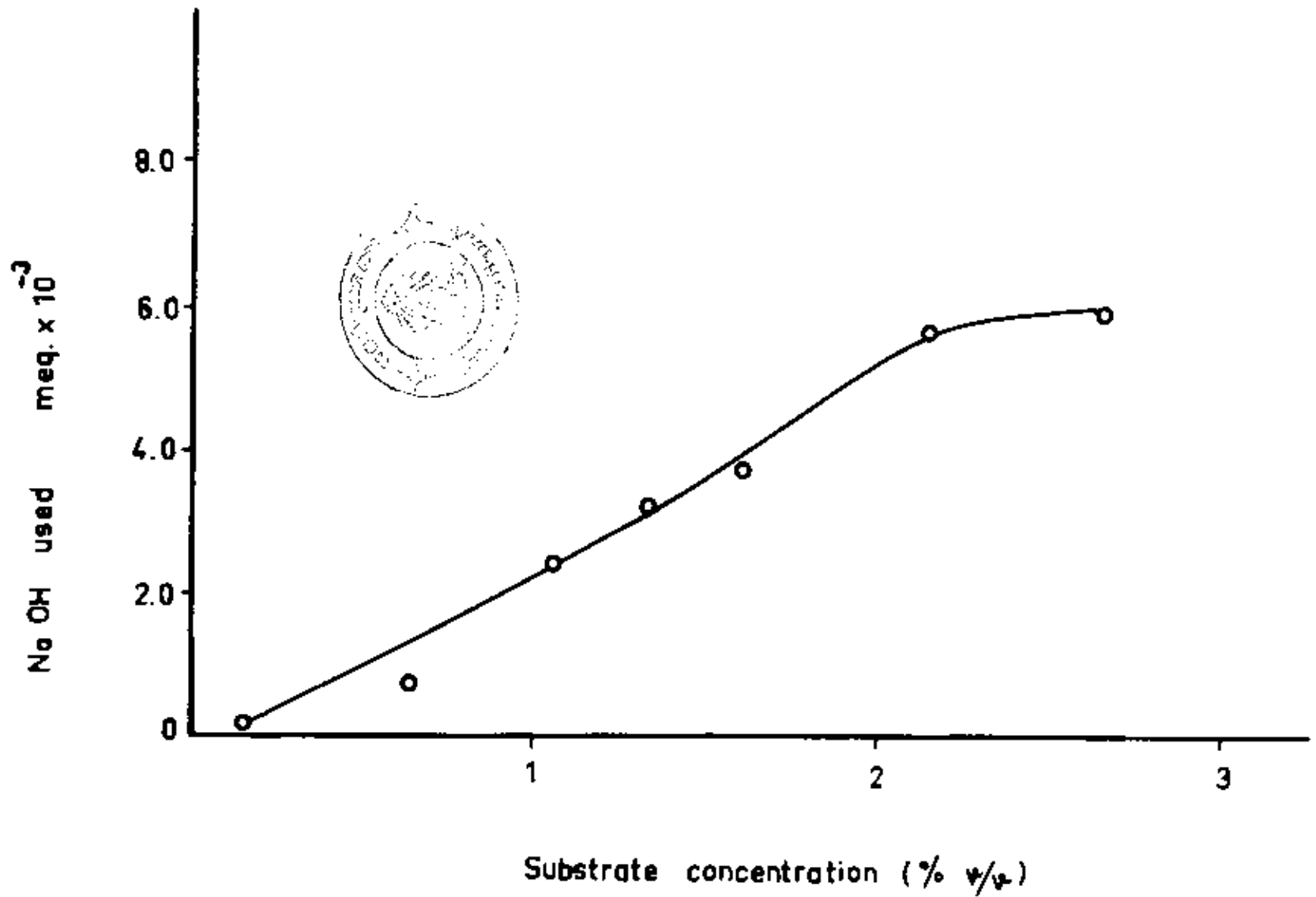
จาก Lineweaver and Burk's Plot (๑๙๓๔) ในรูปที่ ๑๑ นั้น เส้นตรงที่ไม่คั่นตามเส้นที่ลากขึ้นกราว ๆ ในรูปที่ ๑๑ พบว่า

$$\begin{aligned} \text{intercept} &= \frac{1}{V} &= 1.5 \\ \text{slope} &= \frac{K_m}{V} &= 0.25 \end{aligned}$$

จากนั้นคำนวณได้ว่า

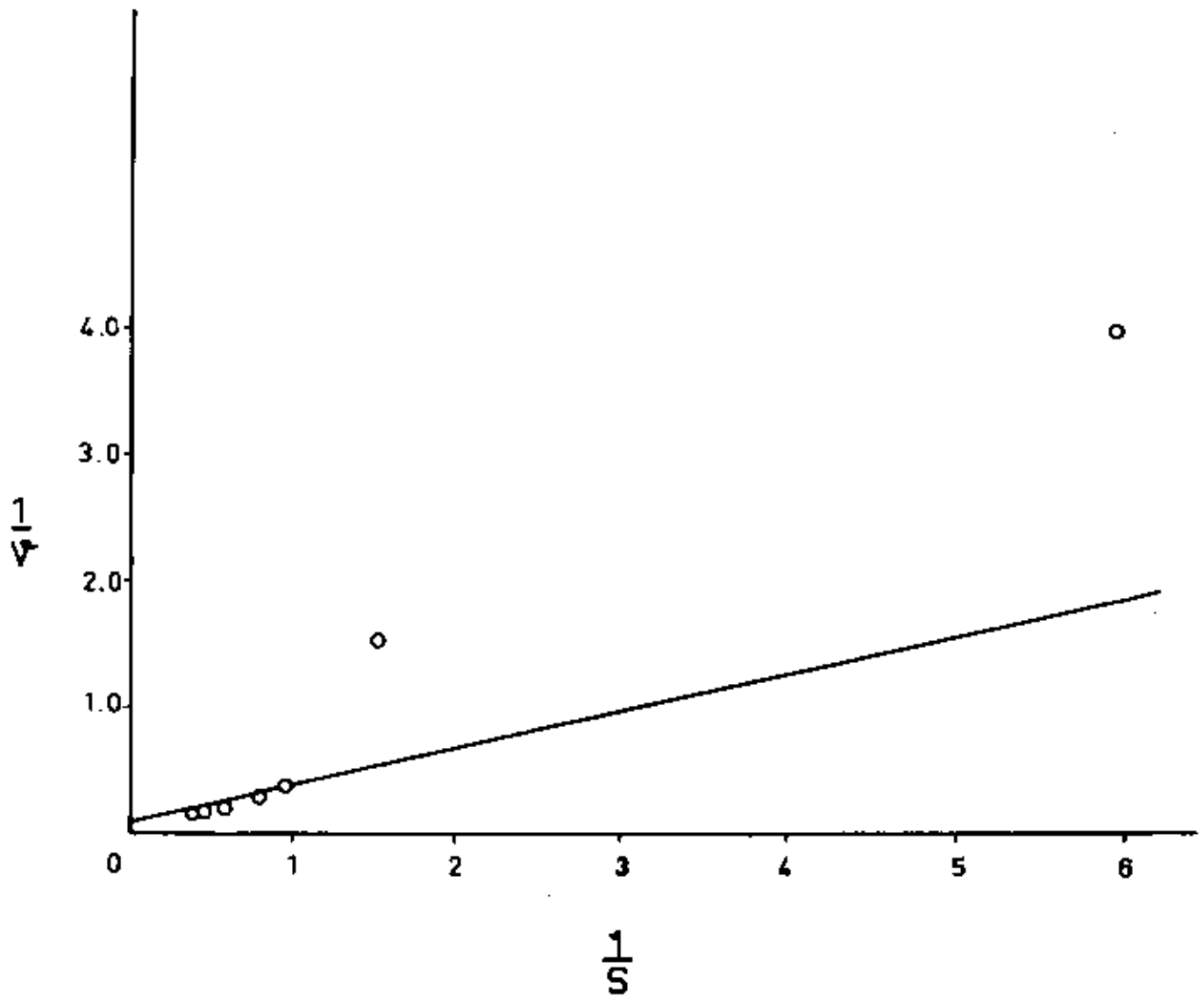
$$\begin{aligned} \text{Michaelis - Menten Constant (K}_m\text{)} & \\ &= 0.16 \end{aligned}$$

รูปที่ ๑๐ แสดงผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส



รูปที่ ๑๑ แสดงการหาค่า ของไลเนียร์ โคลโร

Lineweaver and Burk's plot





## ๔. ผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกิริยา

ได้ศึกษาผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกิริยาของไลเปส ๔ ตัว ผลแสดง  
ในตารางที่ ๔ จะเห็นได้ว่า ผลของไฮดรอกไซด์สามารถเร่งปฏิกิริยาของไลเปสได้  
คือที่ความเข้มข้น ๐.๐๖ โมลาร์ activity จะเพิ่มขึ้นถึง ๑๖๔ % แต่เมกนีเซียม  
ไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ไม่มีผลต่อความเร็วของปฏิกิริยา ส่วน iodo -  
acetamide และ mercuric chloride สามารถลดปฏิกิริยาของไลเปสได้

### ตารางที่ ๔

#### แสดงผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกิริยาของไลเปส

| สารที่ใช้         | ความเข้มข้น<br>(โมลาร์) | Lipase activity<br>(mEq. NaOH X 10 <sup>-3</sup> ) | % Activity |
|-------------------|-------------------------|--|------------|
| Calcium chloride  | ๐.๐๐๐๑                  | ๒.๓๘   | ๑๐๐        |
|                   | ๐.๐๐๕                   | ๓.๘๐   | ๑๖๑        |
|                   | ๐.๐๑                    | ๓.๕๖   | ๑๖๓        |
|                   | ๐.๐๖                    | ๔.๕๘   | ๑๖๔        |
|                   | ๐.๐๔                    | ๖.๕๖   | ๒๓๘        |
|                   | ๐.๐๖                    | ๖.๐๖   | ๑๘๐        |
| Mag. chloride     | ๐.๐๐๐๑                  | ๒.๓๘   | ๑๐๐        |
|                   | ๐.๐๖                    | ๒.๓๘   | ๑๐๐        |
| Iodoacetamide     | ๐.๐๑                    | ๑.๓๘   | ๕๐         |
|                   | ๐.๐๖                    | ๑.๓๘   | ๕๐         |
| Mercuric chloride | ๐.๐๐๐๑                  | ๒.๓๘   | ๘๘         |
| Control           | -                       | ๒.๘๐   | ๑๐๐        |