บทที่ 1

บทนำ

ไลเปส หรือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (EC 3.1.1.3) คือ เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ซึ่งอาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยานี้ได้ โดยไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain aliphatic acid) กับกลีเซอรอล โดยในระยะเริ่มแรกนั้นผลิตไลเปสได้จากเมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง (Arnold และคณะ,1967) พบในอวัยวะของสัตว์ ได้แก่ ตับอ่อน และ ของเหลวภายในเซลล์ เช่น ในน้ำนม (Shahani ,1975) แต่อย่างไรก็ตามไลเปสจากจุลชีพมีข้อดีเหนือกว่าไลเปสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วและเลี้ยงได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทั้งวิธีผ่าเหล่า และวิธีทางพันธุวิศวกรรม (Fogarty และคณะ,1990) ในปัจจุบันนี้มีการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นในทางอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ โดยมีการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น อุตสาหกรรมทางอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารหมักเพราะไลเปสจะทำหน้าที่ผลิตกลิ่นและรสให้อาหารชนิดนั้น ๆ มีกลิ่นและรสเฉพาะตัวทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีการเติมไลเปส ลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น การทำเนยแข็ง, เค้ก และช็อคโกแล็ต (Arnold และคณะ,1975) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังมีการนำแอลคาไลน์ไลเปสไปใช้ในการผลิตผงซักฟอก (Tatara และคณะ, 1975 , Fuji และคณะ, 1986) ส่วนแอซิดิคไลเปสก็มีการนำไปใช้ในหลายทางด้วยกันดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 1 (Godtfredsen, 1990)

ตารางที่ 1 แสดงการนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรม	ปฏิกิริยา	ผลิตภัณฑ์
นม	ไฮโดรไลซิสของ ไขมันนม	สารแต่งกลิ่น
	บ่มเนยแข็ง	เนยแข็ง
	ปรับปรุงไขมันในเนยเหลว	เนยเหลว
เค้กและขนมอบ	ปรับปรุงกลิ่น รสชาติ และ	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ
เครื่องดื่ม	เพิ่มอายุของเครื่องดื่ม	เครื่องดื่ม
น้ำสลัด	พัฒนากลิ่น ปรับปรุงคุณ	น้ำสลัด, มายองเนส, ขนม
	ภาพ	หวานที่ตีให้ขึ้นฟู
อาหารสุขภาพ	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น	อาหารสุขภาพ
เนื้อสัตว์และปลา	ปรับปรุงกลิ่น และแยก	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และ
	ไขมันออก	ปลา
ไขมันและน้ำมัน	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น	เนย(เหลว)เทียม, ไขมัน
	ไฮโดรไลซิส	จากเมล็ดโกโก้, กรดไขมัน
		และกลีเซอรอล
สารเคมี	การสังเคราะห์	สารเคมี
เวชภัณฑ์	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น	ไขมันที่จำเพาะบางชนิด,
	ไฮโดรไลซิส	ยาช่วยในการย่อย
เครื่องสำอาง	การสังเคราะห์	อิมัลซิฟายเออร์, สารให้
		ความชุ่มชื้น
เครื่องหนัง	ไฮโดรไลซิส	เครื่องหนัง
กระดาษ	ไฮโดรไลซิส	กระดาษ
ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด	ไฮโดรไลซิส	สารลดแรงตึงผิวในผลิต
		ภัณฑ์ทำความสะอาด

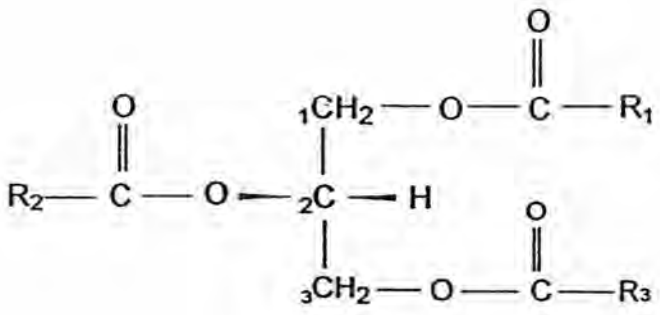
ที่มา : Godtfredsen 1990

ไลเปสจากจุลชีพสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยแบ่งตามความจำเพาะ ต่อซับสเตรทได้เป็น

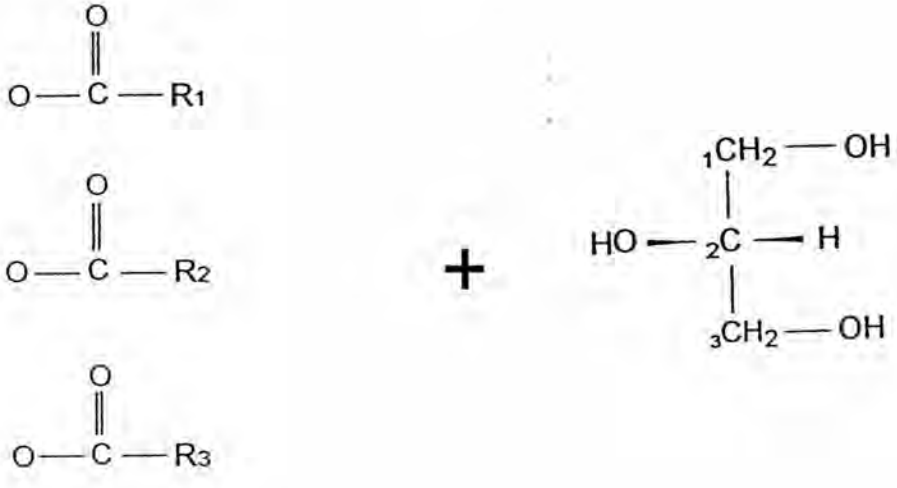
1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารกึ่งกลาง (Intermediate) ในปฏิกิริยาตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแสดงกลไกของการเกิดปฏิกิริยาในภาพที่ 1 (Macrae, 1983)

2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ และ 2 โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ และ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ไม่คงตัวถ้ามีการบ่มเป็นเวลานานพอจะเกิดขบวนการเอซิลไมเกรชัน (acyl migration) ทำให้ได้ 2 โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger, Mucor javanicus, Rhizopus spp.* เป็นต้น แสดงกลไกของปฏิกิริยาในภาพที่ 2

3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C8-C14) และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C14 เป็นต้นไป) อัตราการไฮโดรไลส์กรดไขมันชนิดต่าง ๆ ของไลเปสแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่นไลเปสจาก *Candida paralipolytica* สามารถไฮโดรไลส์ไตรคาไพริน (tricaprylin, C10) ได้เร็วมาก แต่ไฮโดรไลส์พวกเมธิลบิวทีเรท (methyl butyrate; C4:0); เมธิลคาโพรเอท (methyl caproate: C8:0) และ โมโนโอลิอีน (monoolein) ได้ค่อนข้างช้า แสดงว่าไลเปสจาก *Candida paralipolytica* นี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากกว่าขนาดสั้นและขนาดยาว ส่วนไลเปสจาก *Geotichum candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis-9 double bond) แต่ถ้ามีพันธะคู่มากกว่าหนึ่ง อัตราการไฮโดรไลส์จะลดลง จากความจำเพาะของไลเปสจาก *Geotichum candidum* บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Macrae, 1983)



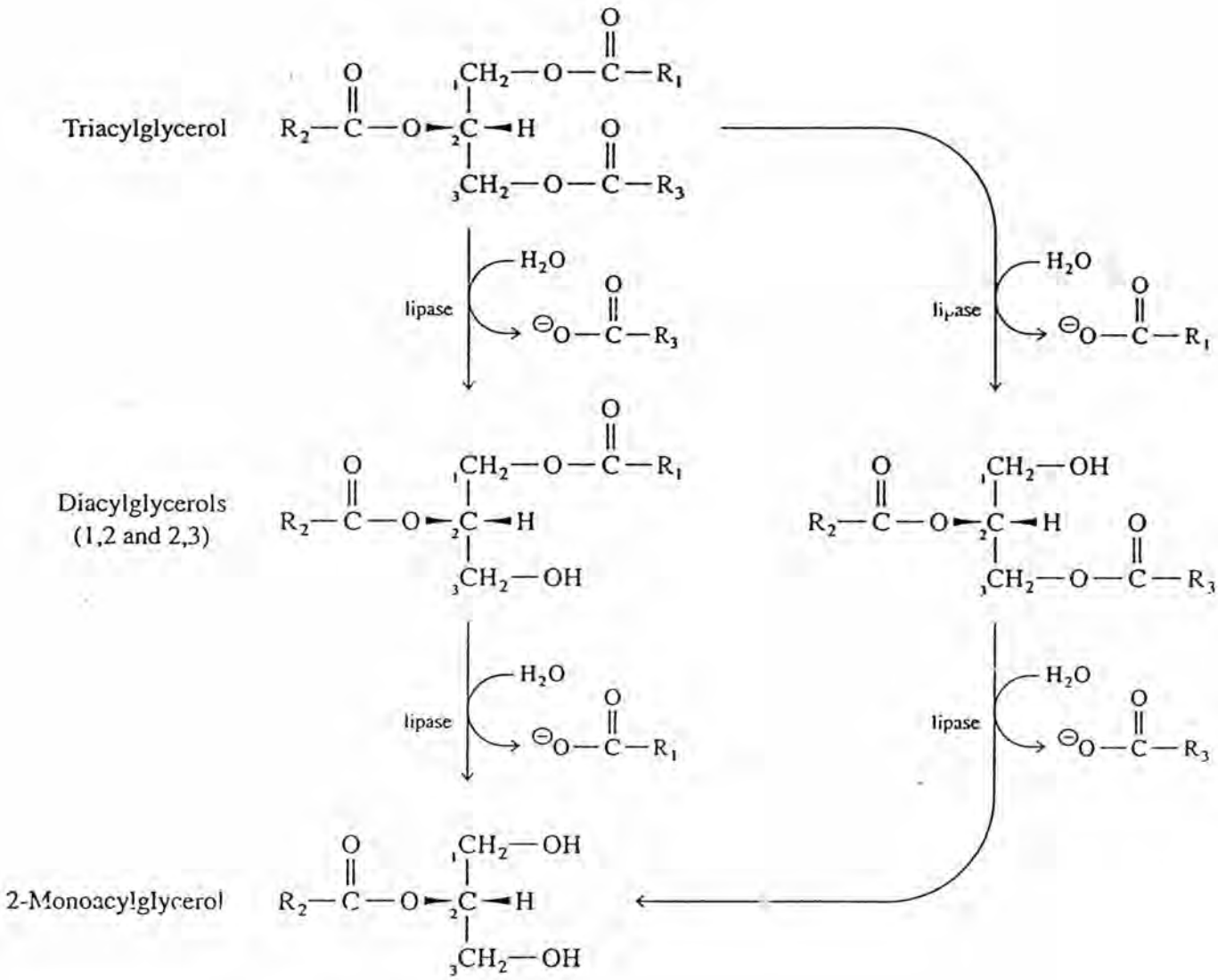
ไตรกลีเซอไรด์



กรดไขมัน กลีเซอรอล

ภาพที่ 1 แสดงไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Horton, 1992



ภาพที่ 2 แสดงไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ที่มา: Horton,1992

อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) ได้แบ่งไลเปสออกเป็น 2 กลุ่ม เท่านั้น คือพวกที่มีสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ของไตรกลีเซอไรด์ โดยกล่าวว่าการที่อัตราเร็วของการไฮโดรไลซิสจะสูงขึ้นหรือไม่นั้นเป็นผลมาจากทั้งซับสเตรทและปัจจัยหลายปัจจัย เช่นชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในรูปของแข็งหรือของเหลว และอัตราการกวนกับซับสเตรท รวมทั้งความสามารถในการละลายของไตรกลีเซอไรด์ที่มีคาร์บอนจำนวนน้อย เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่สามารถกล่าวว่าไลเปสมีความจำเพาะต่อกรดไขมันโดยแท้จริง Yamane (1987) ยังกล่าวอีกว่าไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่ควรจะถูกแบ่งแยกออกจากกันโดยเด็ดขาด เนื่องจากไลเปสพวกที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ คือ ไลเปสที่มีความสามารถในการไฮโดรไลส์ได้น้อยกว่านั่นเอง ส่วน Okumura และคณะ (1981) พบว่าไลเปสพวกที่มีความจำเพาะจะมีการเกิดปฏิกิริยาผันกลับของไฮโดรไลซิส ระหว่างที่มีการไฮโดรไลส์ เกิดขึ้น ขณะที่ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะนั้นจะไม่มีการเกิดปฏิกิริยาผันกลับของการเกิดการไฮโดรไลซิสทำให้เกิดการไฮโดรไลส์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้ไลเปสพวกที่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายซับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

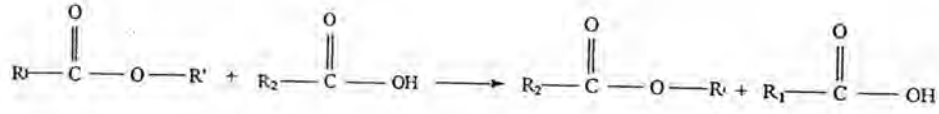
ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane,1987) คือ ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis), การสังเคราะห์ของเอสเทอร์ (Synthesis of ester)และทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะประกอบไปด้วยปฏิกิริยาย่อยอีก 4 ปฏิกิริยา คือ แอลกอฮอไลซิส (Alcoholysis), แอซิโดไลซิส (Acidolysis), เอสเทอร์เอกเซนจ์ (Ester exchange) หรือ อินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (Interesterification) และอะมิโนไลซิส (Aminolysis) ดังแสดงในภาพที่ 3 (Yamane, 1987)

1. Hydrolysis of ester

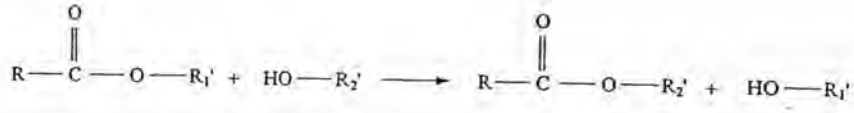
2. Synthesis of ester

3. Transesterification

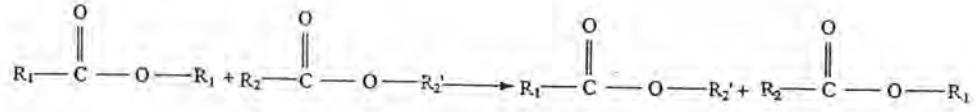
3.1 Acidolysis



3.2 Alcoholysis



3.3 Ester exchange (interesterification)



3.4 Aminolysis

<u>ภาพที่ 3</u> แสดงความสามารถในการทำงานของไลเปส

ที่มา: Yamane, 1987

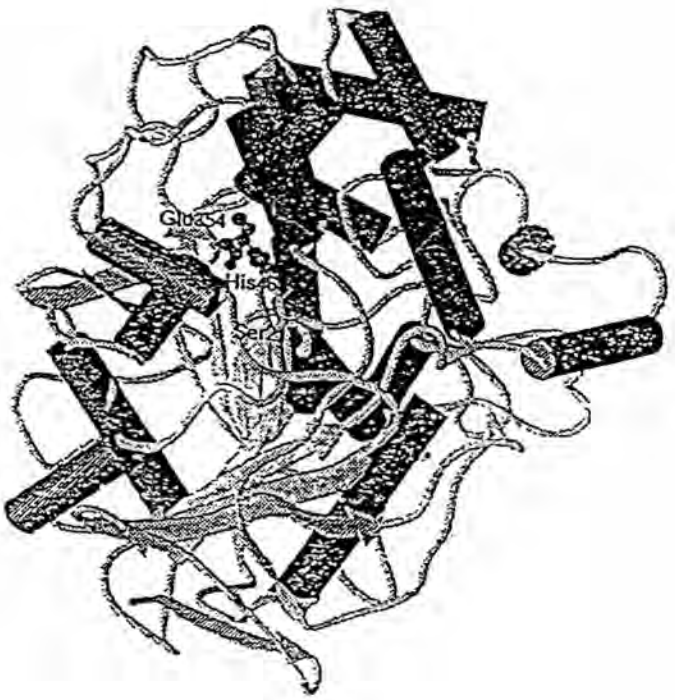
เอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะเอสเทอร์ได้นั้นนอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายเอสเทอร์ได้ คือ เอสเทอเรส โดยที่เอสเทอเรสจะหมายถึงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลิก แอซิด เอสเทอร์ ได้ทุกชนิด ดังนั้นเอสเทอเรสจะรวมถึงแปปติเดส เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน และปาเปน รวมทั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเอสเทอร์ ในเพคติน เช่น เพคตินเมธิลเอสเทอเรส (E.C.3.1.1.11) ด้วย (Shahani, 1975) แต่อย่างไรก็ตามไลเปสมีความแตกต่างจากเอสเทอเรสคือไลเปสจะทำปฏิกิริยากับซับสเตรทที่อยู่ในสภาพไม่ละลาย (insoluble or heterogeneous substrate) ในขณะที่เอสเทอเรสจะทำปฏิกิริยากับซับสเตรทที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลาย (Christel, 1995)

<u>การสร้างเอนไซม์</u>

การสร้างไลเปสของจุลินทรีย์จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อโดยการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase or logarithmic phase) เช่น *Bacillus subtilis 168* (Lesuisse และคณะ, 1993) *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ ,1986) จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบทวีคูณ (young culture during the logarithmic phase) เช่น *Pseudomonas* และ *Micrococcus* (Lawrence, 1967) และจุลินทรีย์บางพวกจะผลิตเอนไซม์ในช่วงแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) เช่น *Bacillus sp.* (Gowland และ คณะ ,1987) โดยที่ Suzuki และคณะ (1988) พบว่าในการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นมักจะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร (semi-starved) และถูกปล่อยออกมาในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณเนื่องจากขณะนั้นซับสเตรทที่สำคัญเริ่มจะขาดแคลนแล้ว โดย Derewenda (1994) กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลชีพโดยทั่วไปเป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นจากเส้นเปปไทด์ที่ม้วนตัวเป็นโครงสร้างแบบผสม α/β โดยส่วนกลางของโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยโครงสร้างแบบแผ่น แบบผสมจำนวน 11 แผ่น ที่ขนานกันโดยมีแผ่น β ขนาดเล็ก 3 แผ่น ตั้งฉากกับแผ่น β ขนาดใหญ่ ที่ตรงกลางของโมเลกุลและแต่ละปลายของแผ่น β แผ่นใหญ่ จะมีส่วนของเปปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบเฮลิกซ์ ซึ่งจะอยู่ในลักษณะขนานกับแผ่น β และมีลูป (loop) สั้นที่ก่อให้เกิดลิป (lip) ที่บริเวณใกล้ ๆ ปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนและตลอดโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยเฮลิกซ์ จำนวน 16 อัน นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปสมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มซีรีนโปรตีเอส กับ โครีนเอสเทอเรสโดยกลุ่มเอนไซม์ทั้งสามมีบริเวณที่เรียกว่า catalytic triad ซึ่งประกอบด้วย Asp(Glu)-His-Ser จากการศึกษาส่วนที่เหมือนกันและต่างกันของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของ ยีนไลเปส ยีนซีรีนโปรติเอส และ ยีนเอสเทอเรส ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามกลุ่มอาจพัฒนามาจากโปรตีนชนิดเดียวกันและลำดับของกรดอะมิโนรอบๆ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ catalytic triad มีความคล้ายคลึงกันมากในเอนไซม์ทั้งสามชนิด

การสร้างเอนไซม์ของ *Bacillus sp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ จากการศึกษาของ Steinmetz (1976) พบว่าจากการศึกษา *Bacillus subtilis 168* สายพันธ์ BCL 1002 จากการผ่าเหล่า 2 ครั้งทำให้การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสและไลเปสลดลง He และคณะ (1991) กล่าวว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยให้เวลาจนกระทั่ง ยีนโปรตีเอสลดลงจะทำให้อัตราการผลิตไลเปสสูงขึ้นแต่อย่างไรก็ตาม *Bacillus subtilis* ทั้งสายพันธุ์ BCL 1002 และ BCL 1009 ให้ไลเปสสูงสุดในช่วงของการเจริญแบบทวีคูณและลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการเจริญแบบ คงที่ Steinmetz (1976) พบว่า *Bacillus subtilis 168* สายพันธุ์ 1033 เมื่อทำการผ่าเหล่าด้วย SacUh32 แล้วให้เอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า ในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไลเปส

ที่มา: Dorwonda, 1994

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

จากรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกเชื้อและหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสแตกต่างกัน ซึ่งทุกสูตรประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่างกันจุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เช่น *Bacillus sp.* ต้องการเปปโตนเพียงชนิดเดียว (Sugihara, 1991) ขณะที่ *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิด คือ แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และกากถั่วเหลือง (soybean meal) (Omar,1987)

Pal และคณะ (1978) พบว่าในการวิจัยระดับขวดเขย่าของ *Aspergillus niger* ต้องการน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะให้เอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่น ๆ

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์เช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ, 1973) แต่ *Alcaligenes spp.* ต้องการโซเดียมไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Kokusho และคณะ, 1982)

อิทธิพลของไตรกลีเซอไรด์

บทบาทของไตรกลีเซอไรด์ที่มีต่อการผลิตไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันมาก Omar และคณะ (1987) พบว่าเชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้ผลิตได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะไตรกลีเซอไรด์จะทำหน้าที่กระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้สูงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kosuki และ Kamibayashi (1971) และ Suzuki และคณะ (1988) ซึ่งพบว่าถ้าเติมไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้มากกว่าการไม่เติมไตรกลีเซอไรด์เลย แต่ Watanabe และคณะ (1977) รายงานว่าไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas fragi*

อิทธิพลของแคลเซียมไอออน

จากการศึกษาพบว่า ไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderwa และ Ratamahenina, 1985) เชื้อรา *Humicola lanuginosa NO. 3* (Omar และคณะ ,1985) พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ จะสามารถช่วยให้ไลเปสทำงานได้ดียิ่งขึ้นซึ่ง Shahani (1975) ได้อธิบายว่ากรดไขมันซึ่งเป็นผลิตผลมาจากการทำงานของไลเปสจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออนเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (soluble calcium soap) แล้วตกตะกอนออกไป Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมติฐานความเป็นไปได้ของการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการ คือ 1) แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ ทำให้ทำงานได้ดีขึ้น 2) แคลเซียมไอออน เพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน และ 3) แคลเซียมไอออนช่วยขจัดกรดไขมันออกจากพื้นที่ผิวสัมผัส ระหว่างน้ำและน้ำมันทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้นอย่างไรก็ตาม Kohr และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* ขณะที่ Suzuki และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonicus NR400* Wang และคณะ (1988) พบว่าถ้าตรวจหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ไตรบิวทีรีนและน้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรทโดยไม่มีการเติมอีมัลซิฟายเออร์เลย แต่มีการกวนอย่างแรงพบว่าแคลเซียมไอออนจะไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสในซับสเตรทเหล่านี้เลย ปรากฏการณ์นี้อธิบายได้ว่ากรดบิวทีริค จากไตรบิวทีรีนสามารถละลายน้ำได้อยู่ แล้ว และกรดโอลิอิคจากน้ำมันมะกอกจะถูกขจัดออกจากพื้นผิวสัมผัสจากการกวนอย่างแรง จึงไม่ต้องอาศัยแคลเซียมไอออนในการวัดแอคติวิตีการทำงานของเอนไซม์

อิทธิพลไอออนของโลหะ

Lesuisse (1993) ได้รายงานไว้ว่าการที่ไอออนของโลหะมีอิทธิพลต่อการทำงานของไลเปสนั้นอธิบายได้ว่าอาจจะเนื่องมาจากทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการละลายและความเป็นประจุ (ionized) ของกรดไขมันที่โมเลกุลของเอนไซม์ Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Mn^{2+} จะไปรบกวนตำแหน่งที่เข้าทำงานของเอนไซม์โดยตรง ซึ่งจะพบไลเปสจาก *Bacillus subtilis 168* จะถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด ส่วนไลเปสจาก *R. japonicus NR400* เป็นไลเปสที่ทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} และ Sn^{2+} (Suzuki, 1986) แต่ไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) ทนต่อ Co^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} และ Zn^{2+} (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) อย่างไรก็ตาม Yamaguchi และคณะ , 1973 พบว่าไอออนของโลหะบางชนิดสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของ

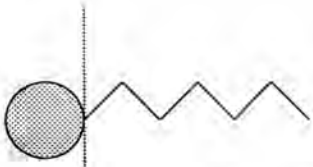
ไลเปสบางชนิดได้ เช่น Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} และ Li^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ได้

อิทธิพลจากอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลทั้งต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ โดยไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะทำงานที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแตกต่างกัน ซึ่งจากสมบัตินี้ทำให้สามารถคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะกับวัตถุประสงค์ของงานแต่ละชนิดได้ (Yamane, 1987)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการในการสร้างเอนไซม์นั้น นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีอีกปัจจัยหนึ่ง คือ พื้นที่ผิวของการสัมผัสกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไลเปสและการเพิ่มผิวสัมผัสนี้จึงต้องทำให้เกิดเป็นอิมัลชั่นโดยจะต้องมีตัวช่วยทำให้เกิดเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเราเรียกว่า สารลดแรงตึงผิว (surfactant) โดย มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบตัวทำละลาย และส่วนที่ไม่ชอบตัวทำละลาย ส่วนหนึ่งจะเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) อีกส่วนเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่ออยู่ในสารละลายโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว จะสะสมอยู่บริเวณผิว (surface) ของตัวทำละลายและส่งผลให้เกิดการลดแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ค่าแรงตึงผิว (surface tension) มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (dyne) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่ประจันกันได้ เช่น ลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และระหว่างของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของสารที่ประจันกันนี้เรียกว่า ค่า interfacial tension

โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวแสดงดังภาพที่ 5 ส่วนหัว (head group) คือส่วนที่ชอบน้ำ และไม่ชอบไขมันมีสมบัติมีขั้ว ส่วนหาง (tail group) คือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ แต่ชอบไขมัน และมีสมบัติไม่มีขั้ว



กลุ่มหัว (head group) มีสมบัติชอบน้ำ(hydrophilic) และไม่ชอบไขมัน (lipophobic)

กลุ่มหาง (tail group) มีสมบัติชอบไขมัน (lipophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)

ภาพที่ 5 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิว (surfactant)

ที่มา : Davis และ Rideal, 1961

สารลดแรงตึงผิว แบ่งได้ 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

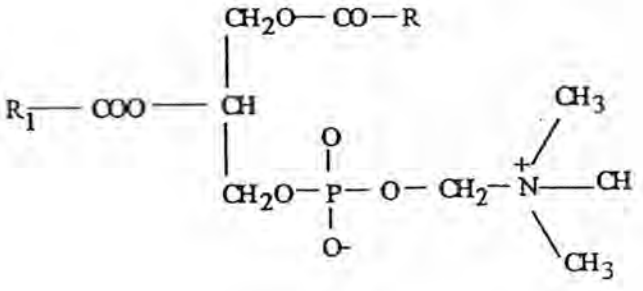
1. สารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ (natural surfactant)

สารลดแรงตึงผิวสามารถพบได้ในธรรมชาติ ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ฟอสโฟลิปิดนี้จะทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวในเยื่อหุ้มเซลล์

ในน้ำนมไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ แต่มีจำนวนน้อยที่อยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด และ ไดกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยให้อิมัลชั่นในน้ำนมเสถียร ในระหว่างกระบวนการย่อย อาหารจำพวกไขมันจะถูกทำให้เป็นอิมัลชั่น โดยฟอสโฟลิปิด หรือโมโนกลีเซอไรด์ จากนั้นเอนไซม์ไลเปส (lipase) จากตับอ่อนจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ ที่อยู่ในรูปของอิมัลชั่นน้ำมันในน้ำ (oil/water) อิมัลชั่นนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดไขมันอิสระโมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งทั้งสองเป็นสารลดแรงตึงผิวที่แรง และสามารถเกิดไมเซลล์ร่วมกับเกลือน้ำดี ได้เป็นไขมันที่ละลายง่าย (solubilised fat) ที่จำเป็นซึ่งสามารถผ่านผนังลำไส้ได้ เกลือน้ำดี ซึ่งสารลดแรงตึงผิวนี้จะผลิตขึ้นในตับและนำไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี สารลดแรงตึงผิว ที่พบในระบบเลือด ได้แก่ ซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารก่ออิมัลชั่นที่ดี และยังมีสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติอื่น ๆ เช่น อคาเซีย (acacia), เจลาติน (gelatin), ลาโนลิน (lanolin), ขี้ผึ้ง (beewax), และ เลซิติน (lecithin) เป็นต้น (Clint, 1992)

ได้มีการนำเลซิตินมาใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์สำหรับทำอิมัลชั่นในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งมีส่วนที่สัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดและพฤติกรรมของเลซิตินในสภาพอิมัลชั่น ในการเตรียมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง จะมีส่วนประกอบของเลซิตินจากถั่วเหลืองตั้งแต่

0.5 – 3 % w/w อิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง มีการปรับปรุงขนาดหยดน้ำมันและเพิ่มความคงตัว โดยเติม 1 % NaCl ซึ่งมีประจุเป็น ลบ ทำให้มีผลโดยตรงต่อผิวของไขมันทำให้พื้นผิวมีการบวม โดยเกลือของกรด เกิดการลดประสิทธิภาพลง เป็นผลให้มีความเสถียรมากขึ้น



ภาพที่ 6 โครงสร้างของ phosphatidylcholine (lecithin)
ที่มา : Attwood และ Florence, 1983

2. สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Synthesis surfactant)

การดำเนินกิจการและกระบวนการต่าง ๆ ทั้งในบ้านเรือนและในโรงงานอุตสาหกรรมต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากปิโตรเลียมเช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน อัลคิลฟีนอล หรือผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ และไขมัน กรดไขมัน และอัลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ดีที่สุด คือ ดีเทอร์เจนท์ (detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาด โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นสารลดแรงตึงผิว สบู่เป็นดีเทอร์เจนท์ที่มีมาแต่สมัยโรมัน ในตอนแรกสบู่ถูกผลิตขึ้นภายในครัวเรือน ต่อมาเมื่ออุตสาหกรรมขนสัตว์ได้เจริญเติบโตขึ้นเป็นผลให้มีโรงงานผลิตสบู่เพื่อเป็นการค้าขึ้นในศตวรรษที่ 13 แม้ว่าสบู่ยังคงมีมูลค่ามากและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นแต่ก็ยังมีการแนะนำสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ขึ้น ในปี 1940 เป็นการเริ่มต้นของวิวัฒนาการของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ทั้งในบ้านเรือน และโรงงานอุตสาหกรรม ปัจจุบันทั่วโลกได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวประมาณ 1,000,000 ตันต่อปี ซึ่งนอกจากใช้ในบ้านเรือนแล้ว ในอุตสาหกรรมใหญ่ ๆ ก็มีการใช้สารลดแรงตึงผิวเช่น อุตสาหกรรมการฟอกย้อม เส้นใย ถลุงแร่ น้ำมัน ยาฆ่าแมลง ยา พลาสติก (Clint, 1992)

เนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้มากในอุตสาหกรรม ดังนั้นในการผลิตไลเปสเพื่อใช้งานนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนมากจะเป็นแบบ extracellular ซึ่งจะถูกขับออกมานอกเยื่อหุ้มเซลล์และอยู่ในส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทำให้บริสุทธิ์นั้นมักจะประสบปัญหาโดยจะทำให้ได้ผลผลิตต่ำกว่าที่ควรจะได้ซึ่งขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ มีดังนี้

1. แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
2. ทำน้ำเลี้ยงเชื้อให้เข้มข้น
3. ทำการแยกให้บริสุทธิ์
4. ทำเอนไซม์ให้เข้มข้น

และขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นี้เองเป็นขั้นตอนที่น่าสนใจควรนำมาพัฒนาและปรับปรุง เพื่อลดต้นทุนในการผลิตลงได้ อย่างไรก็ตามได้มีศึกษากันมากมายเกี่ยวกับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ แต่ก็ล้วนเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน หรือไม่ก็เป็นขั้นตอนที่ไม่จำเพาะต่อไลเปส เช่นการตกตะกอนด้วยเกลือ, การกรองด้วยเจล และ วิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) (Rehn และ Reed, 1987)

กระบวนการทางชีวภาพเมื่อได้ทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจจะใช้วิธีการกรองหรือการเหวี่ยงปั่นตกตะกอน เพื่อให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกตัวเซลล์ออกนั้นจะถูกทำให้เข้มข้นโดยการใช้ ultrafiltration ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม หรือ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธานอล , อะซีโตน และ บิวธานอล เป็นต้น ขั้นตอนการทำให้เข้มข้นขึ้นนั้นเป็นขั้นตอนต้นก่อนที่จะแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ Sugihara และคณะ (1991) ได้ศึกษาว่าไลเปสชนิด thermostable lipase จาก *Bacillus sp.* สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 7762 เท่า และพบไลเปสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ 9 % ซึ่งในการทำให้บริสุทธิ์นั้นจะรวมทั้งการแยกโดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว ล้างด้วย arcinol และใช้คอลัมน์โครมาโตรกราฟฟี่ชนิด DEAE-Sephadex A-50, Toyopearl HW-55F และ Butyl Toyopearl 650 M แยกไลเปสให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าได้ไลเปสเป็นโปรตีนชนิด monomeric มี น้ำหนักโมเลกุล 22000 มี pI คือ 5.1

วิธีการตกตะกอนมักถูกเลือกมาใช้เป็นวิธีแรกในการทำให้บริสุทธิ์ สารส่วนมากที่นำมาใช้ในการตกตะกอนโปรตีน มีดังนี้ เกลือต่าง ๆ , ตัวทำละลายอินทรีย์, สารโพลิเมอร์ที่เป็นอินทรียสาร และ สารอิเล็กโตไลส์ต่าง ๆ ซึ่งสารโพลิเมอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนมาก คือ พวกโพลีเอธิลลีน-ไกคอล (polyethylene glycol ; PEG) โดย PEG มีคุณสมบัติ คือเป็นโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ และไม่สามารถสลายตัวได้ตามธรรมชาติ (Donald และ คณะ, 1981)

ได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการแยกเอนไซม์และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีแนวใหม่เพื่อปรับปรุงข้อบกพร่องจากวิธีดั้งเดิม ดังนี้ (Taipa, 1992)

1. Liquid – Liquid Extraction

   1.1 Revesed micellar system ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวสกัดโปรตีนออกมา วิธีนี้มีขั้นตอนที่ง่ายและต้องการแค่ สองขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นพื้นฐานของการเกิด reversed micelles ของโปรตีนที่ละลายในวัฏภาคสารละลายซึ่งมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก ขั้นที่สองเป็นการแยกโปรตีนที่ถูกสกัดแล้วให้ออก มาในวัฏภาคสารละลายใหม่ โดยเปลี่ยนพันธะกริยาระหว่างโปรตีนกับ reversed micellar system

   1.2 Agueous two phase systems ส่วนมากมักใช้ polyethyleneglycol / dextran systems ซึ่งใช้กันอย่างมากในการผลิตขนาดใหญ่ หรือใช้ PEG กับ Salt systems โดย Menge และ Schmid (1989) , Queiroz (1991) ได้มีการพัฒนาระบบนี้เพื่อแยกบริสุทธิ์ไลเปส จาก *Mucor miehei* ใช้ PEG และ phosphate โดยมี 3 ปัจจัยที่ต่างกัน คือ น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ,ความเข้มข้นทั้งหมดของฟอสเฟต และ PEG และ pH

2. Membrane process

   เป็นการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่านและทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของไลเปสเพิ่มขึ้น ได้มีการใช้แยกไลเปสของ *Pseudomonas fluorescens* โดยใช้ capillar membrane 2 ชนิด คือ polyacrylonitryle (PAN) และ polysulphone (PS) มีการเลือกผ่านเฉพาะน้ำหนักโมเลกุล 10,000 และเส้นผ่านศูนย์กลาง ขนาด 1.1 มิลลิเมตร

3. Immunopurification

   มีประสิทธิภาพสูงสามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ตั้งแต่ 1,000 – 10,000 เท่าในขั้นตอนเดียว แต่เป็นวิธีที่แพงที่สุด มักใช้ในการผลิต monoclonal antibody เช่น การเตรียมไลเปสจากตับหนู โดยผ่านการคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีชนิด heparin sepharose และมาทำให้บริสุทธิ์โดย immunoadsorbent column chromatography (Twu และคณะ, 1984)

จากวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกศึกษาวิธี Liquid – Liquid Extraction ชนิด Aqueous two phase systems ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

คุณสมบัติพื้นฐานของ aqueous – two phase systems

Aqueous – two phase systems เกิดขึ้นเนื่องจากการไม่สามารถรวมตัวกันได้ของโพลิเมอร์ สองชนิด (เช่น PEG กับ Dextran) หรือระหว่างโพลิเมอร์ชนิดหนึ่งกับเกลือ (เช่น โพแทสเซียม ฟอสเฟต) ซึ่งจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารนั้นด้วย จากคุณสมบัตินี้จึงนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการแยกโปรตีนบางส่วนซึ่งระบบนี้จะเหมาะสมสำหรับเอนไซม์มากกว่าการแยกโดยใช้น้ำและสารอินทรีย์ที่จะทำลาย และเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลของเอนไซม์ได้ และในการทดลองขนาดเล็กนี้สามารถปรับระบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนบางส่วนและนำมาสู่การขยายการผลิตตามขนาดที่ต้องการได้โดยตรง (Albertsson, 1971) และเมื่อมีสัดส่วนของน้ำสูงพอ (ประมาณ 65-90 %) ที่จะทำให้เกิดการแยกชั้นของโปรตีนเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงลงของแรงตึงผิวระหว่าง 2 วัฏภาค ซึ่งจะขึ้นกับความเหมาะสมของแต่ละระบบ Albertsson ได้ทำการทดลองในหลาย ๆ ระบบ ตัวอย่างเช่น ส่วนผสมของ 10 %PEG 4000 กับ 13 %โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH = 7.7) และ น้ำ 77 %ซึ่งจะได้เป็น สอง ส่วน ซึ่งส่วนบนจะมี PEG 24 % , ฟอสเฟต 6 % และ น้ำ 70 % ส่วนชั้นล่างจะมี PEG 1.3 % , ฟอสเฟต 17 % และ น้ำ 81 % ซึ่งสัดส่วนปริมาตรของส่วนบนและส่วนล่างจะประมาณ 0.8

เมื่อชีวโมเลกุลถูกแทนที่ใน Aqueous – two phase systems จะเกิดการแยกส่วนและสัมประสิทธิ์การแยกส่วน (อัตราส่วนของสารที่ต้องการในวัฏภาคส่วนบนต่อวัฏภาคส่วนล่าง) ซึ่งเป็นผลจากคุณสมบัติของพันธะต่าง ๆ เช่น van der waals, hydrogen, ionic และ hydrophobic ของชีวโมเลกุลกับวัฏภาครอบๆ โดยน้ำมีผลกระทบต่อวัฏภาคทั้งสอง ดังภาพที่ 7 โปรตีนชนิด hydrophobic จะถูกสกัดออกจาก ส่วนบนซึ่งมี PEG มากกว่าส่วนอื่นในระบบ และในทางกลับกันกับพวกกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นแบบ hydrophilic ก็จะถูกแยกออกมาอยู่ในส่วนล่าง แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ยังมีปัจจัยอื่นที่ยังมีผลกระทบต่อระบบ ดังต่อไปนี้ (Hustedt และคณะ, 1985)

1. ชนิดของโพลิเมอร์
2. น้ำหนักโมเลกุล และ การกระจายตัวของโพลิเมอร์
3. ความยาวของ tie-line (ความเข้มข้นของแต่ละส่วนในระบบ)
4. ชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่เติมลงไป
5. pH
6. อุณหภูมิ

Albertsson และคณะ 1990 ได้คำนวณค่าคงตัวโดยใช้สูตร

$$\text{Log } K = \text{Log } K^{\circ} + \text{Log } K_{el} + \text{Log } K_{hfob} + \text{Log } K_{biosp} + \text{Log } K_{size} + \text{Log } K_{conf}$$

ซึ่ง el = electric

hfob = hydrophobic

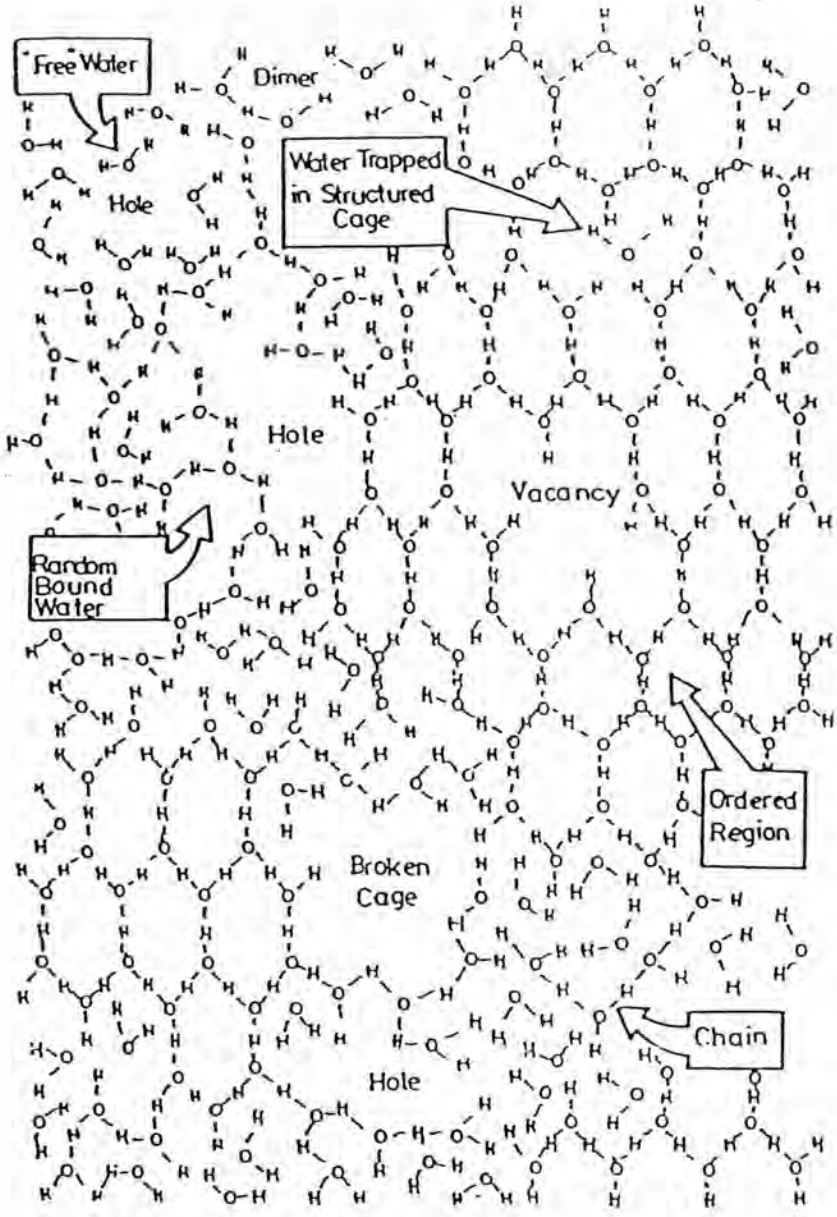
biosp = biospecific

size = size – dependent

conf = conformational

K° = รวมปัจจัยทั้งหมด (all other factors)

มีเอนไซม์จำนวนมาก เช่น fumarase, aspartase, B-galactosidase และ dehydrolase เป็นต้น มีการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ aqueous two phase systems (Hustedt และคณะ, 1985) ให้ผลผลิตมากกว่า 90 % และแยกเอาโปรตีนปนเปื้อนออกได้ดี



ภาพที่ 7 แสดงถึงโครงสร้างของน้ำที่มีผลกระทบต่อวัฏภาคทั้งสอง

Boris ,1995

ในการศึกษาส่วนมากใช้ PEG / dextran systems ในขณะที่การผลิตขนาดใหญ่ใช้ PEG / salt system และพบว่ามีประโยชน์ในการแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ (Hustedt และคณะ, 1985) เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการพัฒนาและนำมาปรับปรุงเพื่อแยกไลเปส (Menge and Schmid, 1989) โดยแยกไลเปสจาก *Mucor miehei* โดยใช้ PEG และ phosphate โดยมีตัวแปร 3 ชนิด คือ น้ำหนักโมเลกุลของ PEG , ความเข้มข้นของ phosphate และ PEG (มีผลคือความยาวที่แตกต่างกันของ tie-line) , pH PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีรูปแบบ tie line ที่ยาวกว่า จะแยกไลเปสจาก *Mucor miehei* อยู่ในวัฏภาคส่วนบนจากโปรตีนทั้งหมดและสามารถแยกบริสุทธิ์ไลเปสได้ 69 % และได้ผลผลิตมากกว่า 80 % ภายในเวลา 1 ชั่วโมง

จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas cepacia* มีไลเปสที่ถูกทำให้เข้มข้นโดยผ่าน crossflow filtration ได้ไลเปส มี แอคติวิตี 80 % และสกัดด้วย Liquid-liquid extraction ใช้ 10 % PEG 6000 และ 10 % Dextran มี purification factor 7.7 นำส่วนวัฏภาคของ PEG มาใช้ ion-exchange column (Q-Sepharose) ได้ผลถึง 30 % และได้ค่า purification factor 55 (Dunhaupt และคณะ, 1991)

Queiroz และคณะ (1991) ใช้ aqueous two phase polymer เลือก PEG กับโปแตสเซียมฟอสเฟตเพื่อทำบริสุทธิ์บางส่วนของไลเปสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Chromobacterium viscosum* พบไลเปสทั้งสองชนิด คือ lipase A และ lipase B โดยมีมวลโมเลกุล 120,000 และ 30,000 ตามลำดับ มีค่า pI 3.7 และ 7.3 ตามลำดับ ไลเปสทั้งสองชนิดถูกแยกอยู่ในส่วน PEG (low density phase) เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรโฟบิก กับกลุ่มเอทธิลลีนของโพลีเมอร์ ผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG, pH, ionic strength และ ชนิดของเกลือที่เติมไปในระบบ ทำให้เกิดผลต่อปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ได้โปรตีนลดลง รวมทั้งแอคติวิตี และ purification factor ส่วนอิทธิพลของ pH จะให้ purification factor จาก 1.9 เป็น 2.4 เมื่อเพิ่ม pH จาก 6.3 เป็น 8.5 ที่ pH 8.5 ทำให้ไลเปสทั้งสองชนิดเป็นขั้ว ลบ จึงทำให้ละลายเพิ่มขึ้นในชั้น PEG จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าแยกบริสุทธิ์ไลเปสได้ 2.8 เท่า และได้ 50 % จากโปรตีนทั้งหมดโดยเติม NaCl 0.5 M ต่อมา Queiroz และคณะ (1995) ได้ทำการค้นคว้าต่อไปโดยทดลองใช้ PEG ที่หลากหลาย และพบว่าสภาวะที่ดีที่สุด ในการทดลองนี้ คือ ใช้ PEG 400 ที่ pH 8.5 และ NaCl 0.25 M จะทำให้เพิ่ม specific activity ได้ 3 เท่า และวัด lipolytic activity เท่ากับ 146 %

ดังนั้นเมื่อสารเคมีสองชนิดที่แตกต่างกัน เช่น โพลิเมอร์หนึ่งชนิดกับเกลือที่จำเพาะ เช่น PEG และโซเดียมฟอสเฟต) หรือ โพลิเมอร์ ทั้งสองชนิด (เช่น dextran และ PEG) เป็นส่วนผสมที่มี

ความเข้มข้นที่แน่นอนในสารละลาย, สารละลายจะเกิดการแยกออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกจะมีความเข้มข้นของ โพลิเมอร์สูง และส่วนที่สองจะมีความเข้มข้นของโพลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งสูงหรือความเข้มข้นของเกลือสูง โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายในทั้งสองส่วน ชนิดของโพลิเมอร์ที่มีการนำมาใช้ในการแยกดังตารางที่ 2 และยังมีโพลิเมอร์ชนิดใหม่ ๆ ที่กำลังทำการศึกษาอยู่

ตารางที่ 2 แสดง polymer systems ที่สามารถทำให้เกิดการแยกชั้นของสารละลายได้

Component 1	Component 2
1. Nonionic polymer (P)	Nonionic polymer (Q) - Water
Polypropylene glycol	Methoxypolyethylene glycol
	Polyethylene glycol
	Polyvinyl alcohol
	Hydroxypropyldextran
	Dextran
	Polyvinyl alcohol
Polyethylene glycol	Polyvinylpyrrolidone
	Dextran
	Arabinogalactan
	Hydroxypropyl strach
	Ficoll
	Methylcellulose
Polyvinyl alcohol	Hydroxypropyldextran
	Dextran
	Methylcellulose
Polyvinylpyrrolidone	Maltodextrin
	Dextran
Methylcellulose	Hydroxypropyldextran
	Dextran
Ethylhydroxyethylcellulose	Dextran

Component 1	Component 2
Hydroxypropyldextran	Dextran
Ficoll	Dextran
2.Polyelectrolyte (P)	Nonionic polymer (Q) – Water
Na dextran sulfate	Polypropylene glycol
	Methoxypolyethylene glycol NaCl
	Polyethylene glycol NaCl
	Polyvinyl alcohol NaCl
	Polyvinylpyrrolidone NaCl
	Methylcellulose NaCl
	Ethylhydroxyethylcellulose NaCl
	Hydroxypropyldextran NaCl
	Dextran NaCl
	Polypropylene glycol NaCl
DEAE dextran HCL	Polyethylene glycol Li2 SO4
	Polyvinyl alcohol
	Methylcellulose
Casein	Dextran
	Pectin
	Ficoll
	Amilopectin
Na carboxymethyldextran	Methoxypolyethylene glycol NaCl
	Polyethylene glycol NaCl
	Polyvinyl alcohol NaCl
	Polyvinylpyrrolidone NaCl
	Methoxypolyethylene glycol NaCl
	Ethylhydroxyethylcellulose NaCl
	Hydroxypropyldextran NaCl

Component 1	Component 2
Na carboxymethylcellulose	Polypropylene glycol NaCl
	Methoxypolyethylene glycol NaCl
	Polyethylene glycol NaCl
	Polyvinyl alcohol NaCl
	Polyvinylpyrrolidone NaCl
	Methoxypolyethylene glycol NaCl
	Ethylhydroxyethylcellulose NaCl
	Hydroxypropyldextran NaCl
3. Polyelectrolyte (P)	Polyelectrolyte (Q) - Water
Na dextran sulfate	Na carboxymethyldextran
	DEAE dextran HCl NaCl
	Na carboxymethylcellulose
Na carboxymethyldextran	Na carboxymethylcellulose
Casein	Sodium alginate, 0.1M NaCl
	Na carboxymethylcellulose, 0.1 M NaOH
Ovalbumin (pH 6.6)	Soybean globulins
	Ovalbumin thermotropic aggregrates
	Casein
4. Polymer (P)	Low Molecular Weight Compnent (Q) – water
Polypropylene glycol	Potassium phosphate
	Glycerol
Methoxypolyethylene glycol	Potassium phosphate
Polyethylene glycol	Inorganic salts, เช่น K^+, Na^+, Li^+, $(NH_4)^+$, $(PO_4)^{3-}$, $(SO_4)^{2-}$ เป็นต้น
	Glucose, maltose, cellulose, iso-maltose,

Component 1	Component 2
Polyethylene glycol	maltotriose, iso-maltotriose, B-cyclodextrin
Polyvinylpyrrolidone	Butylcellosolve
	Potassium phosphate
Polyvinyl alcohol	Butylcellosolve
Dextran	Butylcellosolve
	Propyl alcohol, Iso-propyl alcohol
Na dextran sulfate	Sodium chloride ($0^{o}C$)

ที่มา : Boris,1995

ในปัจจุบันไลเปสเป็นที่ต้องการของทางภาคอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น เช่นในอุตสาหกรรมทางอาหารใช้บ่มเนยแข็ง, หมักแตงกวา, กะหล่ำปลี และผักต่างๆ, การถนอมอาหารประเภทเนื้อ, ใช้ย่อยไขมันส่วนเกินออกจากอาหารประเภทปลา, ปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของอาหารให้มีลักษณะเฉพาะตัวเพื่อเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากขึ้น

ความต้องการเอนไซม์เช่น โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดได้เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ดี ความต้องการนั้นก็ได้ลดลง เนื่องจากเกิดอุบัติเหตุขึ้นในโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดในประเทศอังกฤษเมื่อปี ค.ศ. 1969 ซึ่งส่งผลให้คนงานหลายคนที่สูดฝุ่นผงเอนไซม์เข้มข้นเข้าไปเกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจ และสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากโปรติเอส จากเหตุการณ์นี้จึงทำให้ไลเปสมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และมีการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการค้า เช่น ได้มีการเติมไลเปสลงในน้ำยาดัดผมเพื่อให้ผมดัดคงอยู่ได้นานถาวรยิ่งขึ้น และเติมลงในยาทาเฉพาะที่สำหรับบาดแผล โดยผสมร่วมกับไฮยาลูโรนิเดส และไธโอมิวเคส และยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสียซึ่งเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกต้องเผชิญอยู่ ดังนั้นจึงได้มีแนวความคิดที่จะสร้างไลเปสจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีข้อดีต่างจากไลเปสที่ผลิตได้จากแหล่งอื่นๆ คือจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วในเวลาที่ไม่นาน และยังง่ายต่อการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเป็นตัวกระตุ้น ทำให้สร้างไลเปสได้มากขึ้น รวมทั้งยังสามารถปรับปรุงพันธุกรรมโดยวิธีต่างๆ ได้ และในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้สร้างไลเปสนั้นมีปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อ, สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งต้องให้มีความเหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ด้วย ในการสร้างไลเปสนั้นจำเป็นต้องมีน้ำมันเป็นตัวกระตุ้น ซึ่งเชื้อจะสามารถสร้างไลเปส

ได้นั้นก็ต้องสัมผัสกับน้ำมัน ได้มีการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อสัมผัสกับน้ำมันเพิ่มมากขึ้น จึงได้ทำการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปอิมัลชั่น ซึ่งจำเป็นต้องมีสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยให้เกิดเป็นอิมัลชั่นได้ และในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้เลซิตินเป็นสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและยังมีราคาถูก (ชนิดมีความบริสุทธิ์ต่ำ) ซึ่งเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำมันได้มากขึ้น ก็คาดหวังว่าจะผลิตไลเปสได้มากขึ้นเช่นกัน ส่วนในขั้นตอนการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้น ได้เลือกใช้วิธี aqueous two phase systems เนื่องจากวิธีในการทำไลเปสให้บริสุทธิ์มีหลายวิธี แต่มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ซึ่งวิธี aqueous two phase systems นั้นจะแยกไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนเท่านั้น แต่ก็สามารถแยกได้ดีในระดับหนึ่ง จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้แยกเอนไซม์ชนิดต่างๆ มีขั้นตอนการทำที่สะดวกและไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่เฉพาะ และที่สำคัญมีราคาต้นทุนที่ต่ำ จึงเหมาะในการใช้ผลิตไลเปสเพื่อนำเข้าสู่อุตสาหกรรมต่างๆ ที่ไม่ต้องการความบริสุทธิ์ของไลเปสสูงๆ แต่ต้องการไลเปสเพื่อใช้ในงานอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในอุตสาหกรรมต่างๆ เหล่านี้ได้