บทที่ 1

บทนำ

เอนไซม์ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบของ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (EC 3.1.1.3) ซึ่งชื่อตามระบบนี้จะมีความหมายรวมถึง โมโนกลีเซอริเดสและบางครั้งก็มีความหมายถึงเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันด้วย(Jensen, 1970) ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยในระยะเริ่มแรกนั้นผลิตไลเปสได้จากเมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง (Arnold และคณะ, 1967) พบในอวัยวะของสัตว์ ได้แก่ ตับอ่อน และ ของเหลวภายในเซลล์ เช่น ในน้ำนม (Shahani ,1975) แต่อย่างไรก็ตามไลเปสจากจุลชีพมีข้อดีเหนือกว่าไลเปสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่า นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทั้งวิธีผ่าเหล่า และวิธีทางพันธุวิศวกรรม (Fogarty และคณะ ,1990) ในปัจจุบันนี้มีการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นในทางอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ โดยมีการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารหมัก เพราะไลเปสจะทำหน้าที่ผลิตกลิ่นและรสให้อาหารชนิดนั้นๆมีกลิ่นและรสเฉพาะตัวทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีการเติมไลเปส ลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น การทำเนยแข็ง , เค้ก และช็อกโกแล็ต เป็นต้น (Arnold และคณะ ,1975) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังมีการนำแอลคาไลน์ไลเปสไปใช้ในการผลิตผงซักฟอก (Tatara และคณะ ,1975 , Fuji และคณะ,1986) ส่วนแอซิดิคไลเปสก็มีการนำไปใช้ในหลายทางด้วยกันดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 1(Godfredsen,1990)

ไลเปสจากจุลชีพสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ โดยแบ่งตามความจำเพาะต่อซับเสตรทได้เป็น

1 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารกึ่งกลาง(Intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea* , *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแสดงกลไกของการเกิดปฏิกิริยาในภาพที่ 1 (Macrae,1983)

2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3)ไดกลีเซอไรด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1 แสดงการนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

Industry	Effect	Product
Dairy food	Hydrolysis of milk fat	Flavour agents
	Cheese ripening	Cheese
	Modification of butter fat	Butter
Bakery food	Flavour improvement and shelf life prolongation	Bakery products
Beverages	Improved aroma	Beverages
Food dressing	Quality improvement	Mayonnaise, dressings and whippings
Health food	Transesterification	Health food
Meat and fish	Flavour development and fat removal	Meat and fish products
Fat and oils	Transesterification	margarine Cocoa butter,
	Hydrolysis	Fatty acids, glycerol, mono and diglycerides
Chemical	Enantioselectivity	Chiral building blocks and chemicals
	Synthesis	Chemicals
Pharmaceutical	Transesterification	Specialty lipids
	Hydrolysis	Digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifiers, moisturing agents
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper products
Cleaning	Hydrolysis	Removal of cleaning surfactant reagent

ที่มา : Godtfredsen 1990

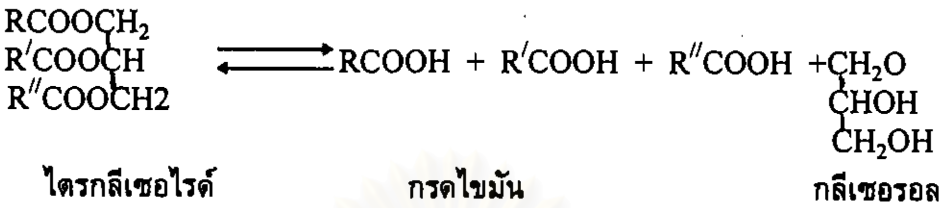
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ 2 โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1,2(2,3) ไดกลีเซอไรด์และ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ไม่คงตัวถ้ามีการบ่มเป็นเวลานานพอจะเกิดขบวนการเอซิลไมเกรชัน(acyl migration)ทำให้ได้ 2โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger* , *Mucor javanicus* , *Rhizopus spp.* เป็นต้น แสดงกลไกของปฏิกิริยาในภาพที่ 1 (Macrae,1983)

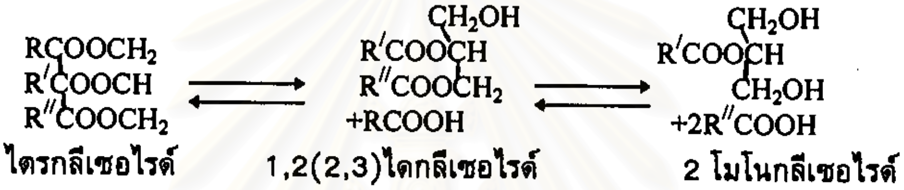
3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C_8) บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C_8-C_{14}) และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว(ตั้งแต่ C_{14} เป็นต้นไป) อัตราการไฮโดรไลส์กรดไขมันชนิดต่าง ๆของไลเปสแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่นไลเปสจาก *Candida paralipolytica* สามารถไฮโดรไลส์ไตรคาไพริน (tricaprylin,C_{10})ได้เร็วมาก แต่ไฮโดรไลส์พวกเมธิลบิวทีเรท (methyl butyrate ; $C_{4:0}$); เมธิลคาโพรเอท (methyl caproate ; $C_{8:0}$) และโมโนโอลิอีน (monoolein) ได้ค่อนข้างช้า แสดงว่าไลเปสจาก *Candida paralipolytica* นี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากกว่าขนาดสั้นและขนาดยาว ส่วนไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis-9 double bond) แต่ถ้ามีพันธะคู่มากกว่า หนึ่ง อัตราการไฮโดรไลส์จะลดลง จากความจำเพาะของไลเปสจาก *Geotrichum candidum* บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Macrae,1983)

อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) ได้แบ่งไลเปสออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือพวกที่มีสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ของไตรกลีเซอไรด์และพวกที่มีสมบัติไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ โดยกล่าวว่าการที่อัตราเร็วของการไฮโดรไลซิสจะสูงขึ้นหรือไม่นั้นเป็นผลมาจากทั้งซับเสตรทและปัจจัยหลายปัจจัย เช่นชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในรูปของแข็งหรือของเหลว ขนาดของอีมัลชั่นและอัตราการกวนกับซับเสตรท รวมทั้งความสามารถในการละลายของไตรกลีเซอไรด์ที่มีคาร์บอนจำนวนน้อย เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่สามารถกล่าวว่าไลเปสมีความจำเพาะต่อกรดไขมันโดยแท้จริง Yamane (1987) ยังกล่าวอีกว่าไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่ควรจะถูกแบ่งแยกออกจากกันโดยเด็ดขาด เนื่องจากไลเปสพวกที่จำเพาะต่อตำแหน่ง1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ คือ ไลเปสที่มีความสามารถในการไฮโดรไลส์ได้น้อยกว่านั่นเอง ส่วน Okumura และคณะ (1981) พบว่าไลเปสพวกที่มีความจำเพาะจะมีการเกิดปฏิกิริยาผันกลับของไฮโดรไลซิสระหว่างที่มีการไฮโดรไลส์ เกิดขึ้น ขณะที่ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะนั้นจะไม่มีการเกิดปฏิกิริยาผันกลับของการเกิดการไฮโดรไลซิสทำให้เกิดการไฮโดรไลส์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายซับเสตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



2. ไลเปสมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



ภาพที่ 1 แสดงชนิดของไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์
ที่มา : Macrae ,1983

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

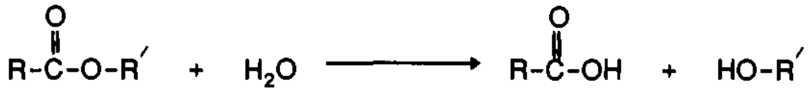
ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane,1987) คือ ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis), การสังเคราะห์ของเอสเทอร์ (Synthesis of ester) และทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะประกอบไปด้วยปฏิกิริยาย่อยอีก 4 ปฏิกิริยาคือ แอลกอฮอไลซิส (Alcoholysis) , แอซิโดไลซิส (Acidolysis) , เอสเทอร์เอกเชนจ์ (Ester exchange) หรือ อินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (Interesterification) และอะมิโนไลซิส (Aminolysis) ดังแสดงในภาพที่ 2 (Yamane , 1987)

เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้นั้นนอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายเอสเทอร์ได้คือ เอนไซม์เอสเทอเรส โดยที่เอสเทอเรสจะหมายถึงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลิก แอซิด เอสเทอร์ ได้ทุกชนิด ดังนั้นเอสเทอเรสจะรวมถึงเอนไซม์เปปติเดส เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน และปาเปน รวมทั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเอสเทอร์ ในเพคติน เช่น เพคตินเมธิลเอสเทอเรส (E.C.3.1.1.11) ด้วย (Shahani,1975)แต่อย่างไรก็ตามไลเปสมีความแตกต่างจากเอสเทอเรสคือไลเปสจะทำปฏิกิริยากับซับเสตรทที่อยู่ในสภาพไม่ละลาย (insoluble or heterogeneous substrate) ในขณะที่เอสเทอเรสจะทำปฏิกิริยากับซับเสตรทที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลาย (Christel,1995)

<u>การสร้างเอนไซม์</u>

การสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจุลินทรีย์จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ โดยการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (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)และ จุลินทรีย์บางพวกจะผลิตเอนไซม์ในช่วงแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) เช่น *Bacillus sp.* (Gowlaud และคณะ, 1987) โดยที่ Suzuki และคณะ(1988) พบว่าในการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นมักจะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร (semi-starved) และถูกปล่อยออกมาในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณเนื่องจากขณะนั้นซับสเตรทที่สำคัญเริ่มจะขาดแคลนแล้ว โดย Derewenda (1994) กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลชีพโดยทั่วไปเป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นจากเส้นเปปไทด์ที่ม้วนตัวเป็นโครงสร้างแบบผสมα/β โดยส่วนกลางของโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยโครงสร้างแบบแผ่น แบบผสมจำนวน 11 แผ่น ที่ขนานกันโดยมีแผ่น β ขนาดเล็ก 3 แผ่น ตั้งฉากกับแผ่นβขนาด

<u>1. Hydrolysis of ester</u>



<u>2. Synthesis of ester</u>

<u>3. Transesterification</u>

3.1. Acidolysis

3.2. Alcoholysis

3.3. Ester exchange (interesterification)

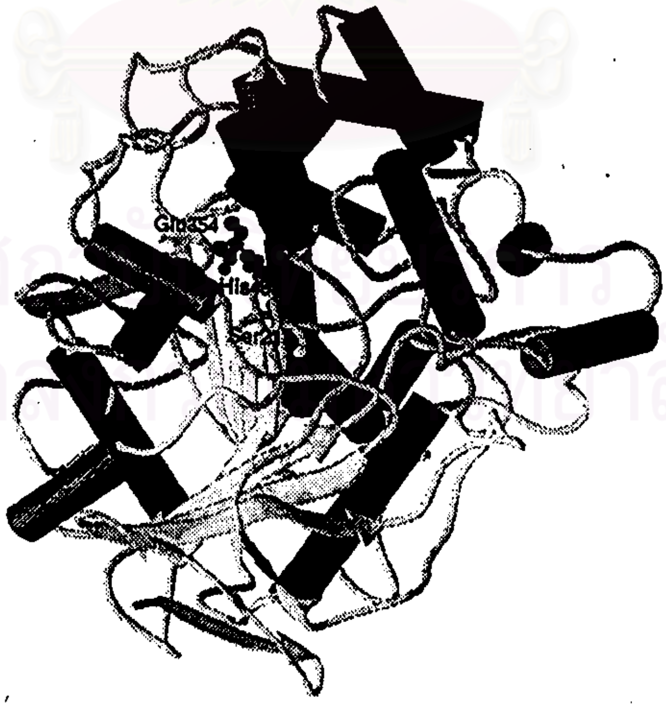
3.4. Aminolysis

ภาพที่ 2 แสดงความสามารถในการทำงานของไลเปส
ที่มา: Yamane (1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใหญ่ ที่ตรงกลางของโมเลกุลและแต่ละปลายของแผ่น β แผ่นใหญ่จะมีส่วนของเปปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบเฮลิกซ์ ซึ่งจะอยู่ในลักษณะขนานกับแผ่น β และมีลูป(loop) สั้นที่ก่อให้เกิดลิป (lip) ที่บริเวณใกล้ๆปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนและตลอดโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยเฮลิกซ์จำนวน 16 อัน นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปสมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสกับเอนไซม์โครีนเอสเทอเรสโดยกลุ่มเอนไซม์ทั้งสามมีบริเวณที่เรียกว่า catalytic triad ซึ่งประกอบด้วย Asp(Glu)-His-Ser จากการศึกษาส่วนที่เหมือนกันและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนไลเปส ยีนซีรีนโปรตีเอสและ ยีนเอสเทอเรส ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามกลุ่มอาจพัฒนามาจากโปรตีนชนิดเดียวกันและลำดับของกรดอะมิโนรอบๆกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ catalytic triad มีความคล้ายคลึงกันมากในเอนไซม์ทั้งสามชนิด

การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus sp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ จากการศึกษาของ Steinmetz (1976) พบว่าจากการศึกษา *Baciilus subtilis* 168 สายพันธ์ BCL1002 จากการทำการฝาเหล่า 2 ครั้งทำให้การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสและไลเปสลดลง He และคณะ (1991) กล่าวว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยให้เวลาจนกระทั่ง ยีนโปรตีเอสลดลงจะทำให้อัตราการผลิตไลเปสสูงขึ้นแต่อย่างไรก็ตาม *Bacillus subtilis* ทั้งสายพันธุ์ BCL1002 และ BCL1009 ให้ไลเปสสูงสุดในช่วงของการเจริญแบบทวีคูณและลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการเจริญแบบ คงที่ Steinmetz (1976) พบว่า *Bacillus subtilis* 168 สายพันธุ์ 1033เมื่อทำการผ่าเหล่าด้วย Sac^{Uh32}แล้วให้เอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่าในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ



<u>ภาพที่ 3</u> แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Derwenda (1994)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

จากรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกเชื้อและหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสแตกต่างกันดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งทุกสูตรจะประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

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

Pal และคณะ.(1978) พบว่าในการวิจัยระดับขวดเขย่าของ *Aspergillus niger* ต้องการน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะให้เอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆ

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

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

อิทธิพลของไตรกลีเซอไรด์

บทบาทของไตรกลีเซอไรด์ที่มีต่อการผลิตไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันมาก Omar และคณะ (1987) พบว่าเชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะไตรกลีเซอไรด์จะทำหน้าที่กระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้สูงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kosuki และ Kamibayashi (1971) และ Suzuki และคณะ(1988) ซึ่งพบว่าถ้าเติมไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้มากกว่าการไม่เติมไตรกลีเซอไรด์เลย แต่ Watanabe และคณะ(1977) รายงานว่าไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* ในตารางที่ 3 แสดงถึงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปส

<u>ตารางที่ 2</u> แสดงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์หลายชนิด

ชื่อเชื้อ	ชนิดของไลเปส	สูตรอาหาร	ที่มา
Alcaligenes sp.	Alkaline lipase	1%$NaNO_3$, 0.5% polyoxyethylene alkylester , 1 mMFe^{2+}, 1%Sodium citrate, 1%fructose	Kokusho (1982)
P. nitroreducens. nov.var.	Alkaline lipase	2% soybean meal ,2% soluble starch,1.5%K_2HPO_4, 0.1%$(NH_4)_2CO_3$,0.1%$MgSO_4$.$7H_2O$ Silicone KB 68-1F 0.5%, pH8.3-8.5	Watanabe (1973)
Chromobacterium viscosum	Neutral lipase	2% soluble starch ,2%soybean meal ,1%olive oil ,0.2%K_2HPO_4 ,0.1%urea, 0.1%$MgSO_4.7H_2O$, 0.5%$CaCO_3$,pH 7.0	Omar,1987
Bacillus sp.	Acidic lipase	3%peptone , 1%yeast extract 0.5%NaCl ,1% olive oil ,pH 7.0	Sugihara (1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปส

species	Fermentation	Activity (EU.ml^{-1})	Assay Conditions	Reference
Staphylococcus aureus	Shake-flask Shake-flask	4.5 17.0	olive oil ,37°C pH 8.0, Tributyrin, 37°C, pH8.0	Vadehra and Harmon,1969 Mates and Sudakewitz, 1973
C .viscosium var. *paralipolyticum*	30Lfermenter	10.8	Lard oil 40°C, pH 7.0	Abe. et al. , 1970
Micrococcus caseolyticyus	Shake-flask	15.0	olive oil,40°C pH9.5	Jonson and Synge,1974
Bacillus licheniformis	Shake-flask	6.0	olive oil 45° C pH8.5	Jonson and Synge,1974

ที่มา : H.J Rehm and G Reed ,1987

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>อิทธิพลของแคลเซียมไอออน</u>

จากการศึกษาจะพบว่า ไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderwa และ Ratamahenina,1985) เชื้อรา *Humicola lanuginosa* NO.3 (Omarและคณะ ,1985) พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ จะสามารถช่วยให้ไลเปสทำงานได้ดียิ่งขึ้นซึ่ง Shahani (1975) ได้อธิบายว่ากรดไขมันซึ่งเป็นผลิตผลจากการทำงานของไลเปสจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออนเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (soluble calcium soap) แล้วตกตะกอนออกไป Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมติฐานความเป็นไปได้ของการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการคือ 1) แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง(conformation) ของเอนไซม์ ทำให้ทำงานดีขึ้น 2) แคลเซียมไอออน เพิ่มการดูดซึม (adsorption)ของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน และ 3) แคลเซียมไอออนช่วยขจัดกรดไขมันออกจากพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม Kohr และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa*_ขณะที่ Suzuki และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonicus* NR400 Wang และคณะ (1988) พบว่าถ้าตรวจหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ไตรบิวทีรินและน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทโดยไม่มีการเติมอีมัลซิฟายเออร์เลย แต่มีการกวนอย่างแรงพบว่าแคลเซียมไอออน จะไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสในสับสเตรทเหล่านี้เลย ปรากฏการณ์นี้อธิบายได้ว่ากรดบิวทีริค จากไตรบิวทีรินสามารถละลายน้ำได้อยู่แล้วและกรดโอลีอิกจากน้ำมันมะกอกจะถูกขจัดออกจากพื้นผิวสัมผัสจากการกวนอย่างแรง จึงไม่ต้องอาศัยแคลเซียมไอออนในการวัดแอคติวิตีการทำงานของเอนไซม์

<u>อิทธิพลของไอออนโลหะ</u>

Lesuisse (1993) ได้รายงานไว้ว่าการที่ไอออนของโลหะมีอิทธิพลต่อการทำงานของไลเปสนั้นอธิบายได้ว่าอาจจะเนื่องมาจากทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการละลายและความเป็นประจุ (ionized) ของกรดไขมันที่โมเลกุลของเอนไซม์ Zn^{2+},Cu^{2+}, และ Mn^{2+} จะไปรบกวนตำแหน่งที่เข้าทำงานของเอนไซม์โดยตรง ซึ่งจะพบไลเปสจาก *Baciilus subtilis* 168 จะถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด ส่วนไลเปสจาก *R. japonicus* NR400 เป็นไลเปสที่ทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{2+},Cu^{2+},Ni^{2+} และ Sn^{2+} (Suzuki ,1986) แต่ ไลเปสจาก *Candida* deformans (Zach) ทนต่อ Co^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+}, และ Zn^{2+} (Muderhwa และ Ratamahenina,1985) อย่างไรก็ตาม Yamaguchi และคณะ ,1973 พบว่าไอออนของโลหะบางชนิดสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสบางชนิดได้ เช่น Mg^{2+},Mn^{2+},Na^{2+} และ Li^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium Viscosum*ได้

อิทธิพลจากอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลทั้งต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ โดยไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะทำงานที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ซึ่งจากสมบัตินี้ทำให้สามารถคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะกับวัตถุประสงค์ของงานแต่ละชนิดได้ (Yamane ,1987)

การพัฒนาการผลิตและการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ไลเปส

จากที่กล่าวมาแล้วไลเปสเป็นเอนไซม์ที่นำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆทาง เช่นในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมัก และการนำไปผลิตกรดไขมัน เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตและรักษาสภาพไม่ให้เกิดการสลายตัวของสารที่ไม่ต้องการ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ามีความต้องการมากขึ้นแต่ความสามารถในการผลิตไลเปสยังอยู่ในระดับที่กำลังพัฒนา (Forgaty และคณะ ,1990) เมื่อเทียบกับ โปรตีเอสและอะไมเลส เนื่องจากมีข้อจำกัดมากมายในการศึกษา เช่น พบว่ามีเชื้อหลายชนิดที่ให้ไลเปสแต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ให้เอนไซม์ในปริมาณสูง จึงได้มีการค้นคว้าวิจัย ในการที่จะเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น

Dempsey (1987) พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้เอนไซม์ไลเปสจากส่วนต่างๆของกุ้ง เช่น *Flavobacterium* , *Moraxella* และ *Alcaligenes* ซึ่งพบได้ทั้งในส่วนที่เป็น ของเหลวในตัวกุ้ง กะเพาะอาหารและ hindgut ของส่วนทางเดินอาหารของกุ้ง

เปรมสุดา (2539) ได้คัดเลือกเชื้อหลายชนิดจากบ่อกุ้งในประเทศไทย และพบว่ามีเชื้อบางชนิดที่ให้เอนไซม์ไลเปส จึงได้นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบ (screening test) มาแล้วว่าเหมาะสมที่สุดมาทำการวิจัยต่อ เนื่องจากการที่จะนำไลเปสไปใช้ให้ถึงระดับอุตสาหกรรมนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาถึง ภาวะที่เอนไซม์ทำงานสูงที่สุด การหาทางเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น นอกจากนี้การเลือกวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์มีความสำคัญโดยจะช่วยให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ แหล่งวัตถุดิบที่พิจารณาเป็นวัตถุดิบที่แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แล้วมีราคาถูกมีจำนวนมากตลอดเวลาไม่มีข้อจำกัดทางฤดูกาล ได้แก่น้ำมันพืชที่ผลิตได้ในประเทศ กากเมล็ดถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันซึ่งโดยปกติแล้วจะนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ถ้าสามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่มีราคาสูงจะเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาภาวะเหมาะสมในการทำงาน ของเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในเมืองไทย โดยหาวัตถุดิบราคาถูกที่พบในประเทศที่เหมาะสมมาใช้เป็นต้นตอไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งการตกตะกอนเอนไซม์เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพของเอนไซม์ให้สูงขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้ถึงระดับอุตสาหกรรมต่อไป

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงถึงสภาพความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม ของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภท

Manufacturer	Enzyme name	Microbial source	pH optimum	Temperature (°C) optimum
Amano Pharmaceutical	Lipase-AP	*Aspergillus spp.*	6.5	37
Amano Pharmaceutical	Lipase-MAP	*Mucor spp.*	7.0	37
Meito Sango	Lipase-MY	*Candida cylindracea*	6.5	37
Nagase	Lipase-Saiken	*Rhizopus spp.*	7.0	40
Rohm and Haas	Lipase B	*Aspergillus niger*	6.0	47.5
Wallerstein	Lipase 3500	*Aspergillus oryzae*	6.25	30
Tanabe Seiyaku	Lipase RH	*Rhizopus delemar*	5.6	45

ที่มา: Seitz (1974)