บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1. สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

จากการวิเคราะห์เอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีรายงานไว้ พบว่าเอนไซม์ไลเปสผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสใน *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

จากผลการเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีน้ำมันมะกอกเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน และให้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่าเชื้อจะสังเคราะห์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเริ่มผลิตไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ 10 ชม.และให้แอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงไปได้ 19 ชม. ส่วนเปปโตนและ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อเจริญได้ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ แต่ไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปส นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อให้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนการเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกับเมื่อให้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่การผลิตไลเปสจะต่ำกว่ามาก จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่ามีแนวโน้มว่าเชื้อ *P. aeruginosa* จะใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.13 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ด้วยกัน จะพบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แต่ละชนิดจะมีผลต่อการเจริญใกล้เคียงกันแต่

มีผลต่อการผลิตไลเปสต่างกัน โดย $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อเจริญดีแต่ไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปส ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่มี NH_4^+ เป็นองค์ประกอบนั้นจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปสของเชื้อต่างกันไปคาดว่าขึ้นอยู่กับหมู่ที่เป็นองค์ประกอบ โดยพบว่าถ้าเป็นหมู่ SO_4^{2-} การผลิตไลเปสจะสูง ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อไม่มากแต่มีผลต่อการผลิตไลเปสมาก

เมื่อพิจารณาผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรในระยะการเจริญคงที่ประมาณ 1.6 และผลิตไลเปสได้ปานกลาง เมื่อให้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเจริญของเชื้อต่ำและการผลิตไลเปสก็ต่ำด้วย ซึ่งตรงกับที่มีรายงานว่ากลูโคสจะไปกดดัน(repress)การผลิตไลเปสในเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Mates และ Sudakevitz, 1972)และใน *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Geotricum candidum* จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไป และปรากฏการณ์เดียวกันนี้ก็พบในเชื้อ *Rhizopus japonicus* และ *Candida parolipolytica* (Macrae, 1983) เมื่อให้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเจริญของเชื้อจะต่ำมากแต่การผลิตไลเปสจะสูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับการให้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่เชื้อใช้ฟรุกโตสได้ไม่ดีเท่ากลูโคสและน้ำมันมะกอกโดยสังเกตจากช่วง lag phase ของการเจริญของเชื้อจะยาวเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟรุกโตสและความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อถูกเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรปรับต่ำ(minimum medium plate)ที่มีน้ำมันมะกอกมาก่อนดังนั้นเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในอาหารเป็นฟรุกโตสเชื้อจึงมีช่วงที่ปรับตัวจึงมีช่วง lag period ยาวมาก

ในการเจริญในขณะที่เมื่อเลี้ยงโดยให้น้ำมันมะกอกเชื้อจะเข้าสู่ log phase ทันที และเมื่อเชื้อใช้ฟรุกโตสได้ช้าเนื่องจาก carrier protien ที่ membrane มีความสามารถในการลำเลียงฟรุกโตสได้ช้ากว่ากลูโคสและกรดไขมัน และการทำงานของ hexokinase ในวิถีไกลโคไลซีสต่อกลูโคสสูงกว่าต่อฟรุกโตส 20 เท่า (Stryer, 1988) ทำให้การเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟรุกโตสมีช่วง lag period ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสการเจริญของเชื้อจะเข้าสู่ log phase ทันที การที่ฟรุกโตสกระตุ้นให้เกิดการผลิตไลเปสได้สูงนั้นอาจเนื่องจากเชื้อใช้ฟรุกโตสได้ช้ากว่าน้ำมันมะกอกและกลูโคส ทำให้ภายในเซลล์ที่เลี้ยงในฟรุกโตสมีปริมาณ acetyl CoA และ citrate ต่ำกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำมันมะกอกและกลูโคส จึงกระตุ้นการหลั่งไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้นทำให้ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ในอาหารที่มีฟรุกโตสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น จากผลการทดลองจะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนก็เป็น growth limiting factor ด้วยเนื่องจากมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตไลเปส

จากผลการทดลองให้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสกับน้ำมันมะกอกและฟรุกโตสกับน้ำมันมะกอก พบว่าการเจริญของเชื้อไม่ต่างกันนักและไม่ต่างจากเมื่อให้น้ำมันมะกอกอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน แต่การผลิตไลเปสในอาหารที่มีกลูโคสผสมกับน้ำมันมะกอกจะต่ำอย่างเห็นได้ชัดซึ่งยืนยันข้อสรุปที่ว่ากลูโคสยับยั้งการผลิตไลเปส ส่วนการผลิตไลเปสของเชื้อในอาหารที่มีฟรุกโตสผสมกับน้ำมันมะกอกจะใกล้เคียงกับเมื่อให้น้ำมันมะกอกอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเกินไปทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตไลเปสเนื่องจากมีอาหารมากเกินไป

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟรุกโตสความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงสุด แต่เมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 2.5 และ 3 เปอร์เซนต์ การผลิตไลเปสจะลดลงและไม่ผลิตตามลำดับ อาจเป็นเพราะฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่ำจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีสได้น้อยส่งผลให้ปริมาณของ acetyl CoA และ citrate ในเซลล์ต่ำไปด้วยซึ่งเป็นสัญญาณให้เกิด fatty acid degradation เพื่อผลิตพลังงานและ carbon skeleton แก่เซลล์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์และใช้ในการเจริญ ดังนั้นการให้ฟรุกโตสความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวจึงเป็นการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบ fatty acid degradation ในทางตรงกันข้ามถ้าหากความเข้มข้นของฟรุกโตสในอาหารสูงฟรุกโตสจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีสได้มากทำให้ acetyl CoA และ citrate ในเซลล์สูงด้วยเป็นสัญญาณให้เกิด fatty acid synthesis และยับยั้งการผลิตไลเปส (Stryer, 1988) นอกจากนี้ในกรณีที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสต่ำไลเปสยังกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับคาร์โบไฮเดรตได้ โดยมีรายงานว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* กระตุ้นการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลูโคสและฟรุกโตสได้ และยังพบว่าการเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสกับกรดโอเลอิคสูงกว่าการเกิดเอสเทอร์ระหว่างกลูโคสกับกรดโอเลอิค 2 เท่า (Seino และคณะ, 1984) ดังนั้นถ้าเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสกับกรดไขมันขึ้นจะทำให้กรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยของไลเปสถูกดึงออกจากระบบเพื่อไปสร้างเป็นเอสเทอร์จึงเป็นการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสให้สร้างกรดไขมันเพิ่มขึ้น และในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์อาจเป็นสัดส่วนที่พอเหมาะในการเกิดเอสเทอร์จึงกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้สูงที่สุด

จากผลการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไลเปส พบว่าเชื้อเจริญและให้แอคติวิตีรวมได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37°ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดี แต่

เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45°ซ และ 33°ซ เชื้อเจริญได้ไม่ดีแสดงว่าทั้งสองอุณหภูมิไม่เหมาะต่อการทำงานของเซลล์เพราะอุณหภูมิสูงและต่ำเกินไปตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่า สารอาหารทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน และสภาวะในการเลี้ยงมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยง *P. aeruginosa* คือในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เข้มข้น 0.13 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีฟรุกโตสเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37°ซ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำจะทำให้ต้นทุนการเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ซับซ้อน และ crude enzyme ที่ได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า

เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ crude เอนไซม์ในด้านอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude เอนไซม์ พบว่า crude เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 35°ซ แต่ crude เอนไซม์มีโปรตีนอื่นปะปนอยู่ด้วยซึ่งอาจมีผลต่อค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของ crude เอนไซม์ที่หาได้

5.2. การทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* บริสุทธิ์

เมื่อนำ crude เอนไซม์จากเชื้อ *P. aeruginosa* มาทำให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากการกำจัดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันและทำให้ crude เอนไซม์เข้มข้นขึ้นไปพร้อมๆกันโดยการกรองด้วย Ultrafiltration unit และใช้แผ่นกรองขนาด YM10 ซึ่งคัดกรองโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 10,000 ดาลตันได้ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.54 เท่าและมีเปอร์เซนต์ผลผลิตเท่ากับ 74 เปอร์เซนต์ และวิธีนี้จะช่วยกำจัดโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 80

เปอร์เซนต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลาย crude เอนไซม์ จากนั้นนำโปรตีนที่มีแอคติวิตี่ของเอนไซม์ไลเปสไปแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

การทำเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีมีรายงานไว้มากมายซึ่งมีทั้งใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ เจลฟิลเตรชันและ Hydrophobic Interaction Chromatography ตัวอย่างเช่นการใช้คอลัมน์ DEAE-Sephadex แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) การใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ Pseudomonas (Lawrence, Fryer และ Reiter, 1967) และการใช้ Phenyl-Toyopearl แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Mase, 1994) ในการทดลองนี้ทำให้ไลเปสจาก *P. aeruginosa* บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่ไลเปสออกได้ประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของโปรตีนที่บรรจุลงในคอลัมน์ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.92 เท่าและได้เปอร์เซนต์ผลผลิต 44.42 เปอร์เซนต์ เมื่อนำเอนไซม์ส่วนนี้ไปแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส พบโปรตีนแถบเข้มมาก 1 แถบและมีแถบจางๆ 3 แถบ จึงทดลองนำไลเปสที่ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-100 ไปแยกด้วยคอลัมน์ Hydrophobic Interaction Chromatography เพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น โดยในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B ผลการทดลอง(ไม่ได้รายงานไว้)พบว่า เมื่อบรรจุเอนไซม์ลงในคอลัมน์และชะด้วย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี gradient ของ $(NH_4)_2SO_4$ เข้มข้นจาก 1.7 จนถึง 0 โมลาร์ ไม่พบว่ามีไลเปสถูกชะออกจากคอลัมน์ และเมื่อทดลองชะคอลัมน์ด้วย Ethylene glycol ความเข้มข้น 10, 55, 60, 80 และ 90 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ก็พบว่าไม่สามารถชะไลเปสออกจากคอลัมน์ได้ จึงสรุปว่าคอลัมน์นี้ไม่เหมาะในการใช้แยกไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจเนื่องจากเกิด hydrophobic interaction ที่

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

5.3. <u>การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* ที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน</u>

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งใช้คอลัมน์ Sephadex G-150 และมีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีสคาดว่าแถบนี้คือแถบที่เข้มที่สุดเพียงแถบเดียวและเมื่อใช้แอคติวิตีใกล้เคียงกันใน ultrafiltration fraction และ gel filtration fraction ความเข้มของแถบดังกล่าวก็ใกล้เคียงกันด้วยดังรูปที่ 12 จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย(subunit)โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน เนื่องจากเมื่อแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส พบว่ามีโปรตีนแถบเข้มมากเพียงแถบเดียวและน้ำหนักโมเลกุลที่หาโดยวิธีเจลฟิลเตรชันก็มีค่าเป็น 3 เท่าของน้ำหนักโมเลกุลที่หาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส

ดังนั้นไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนจึงมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ซึ่งเป็น single subunit protein มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส (Stuer, Jaeger และ Winkler, 1986) รวมทั้งไลเปสจาก *P. aeruginosa* EF2 ซึ่งเป็น single subunit protein มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีสเช่นกัน แต่ไลเปสจาก *P. aeruginosa* EF2 สามารถเกิด aggregation ระหว่างกันได้ (Gilbert, Cornish และ Jones, 1991) และยังมีรายงานว่าไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* Strain ATCC 21808 เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีสซึ่งประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000 ดาลตันเมื่อหาโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส (Kordel และคณะ, 1991) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ดังกล่าวใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนที่หาได้ในการทดลองนี้ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* อาจเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย(subunit)โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน หรืออาจเป็น single subunit protein แต่สามารถเกิด aggregation ระหว่างกันหลังการทำอุลตราฟิลเตรชันทำให้น้ำหนักโมเลกุลที่หาด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันใหญ่มาก

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

inhibitor ของไลเปสรวมอยู่ด้วยทำให้ช่วง pH ในการทำงานของไลเปสใน crude เอนไซม์แคบกว่าช่วง pH ในการทำงานของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน สำหรับผลการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความเสถียร(รูปที่ 17)พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความเสถียรในช่วง pH 5-8 โดยมีความเสถียรมากที่สุดในช่วง pH ที่เป็นกลางคือ 6.0-7.5 รูปแบบความเสถียรในช่วง pH เช่นนี้คล้ายกับที่มีรายงานในไลเปสจาก *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) และจากข้างต้นจะเห็นได้ว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความคงทนในช่วง pH ที่กว้าง เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์พบว่าทั้ง crude เอนไซม์และไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสจาก *P. fragi* (Mencher และ Alford, 1967) ด้วยเช่นกัน สำหรับผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรพบว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 25-45^{0}ซ ซึ่งรูปแบบความเสถียรในช่วงอุณหภูมิเช่นนี้คล้ายกับที่มีรายงานใน *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Mase, 1994) และจากผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ไลเปสในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 พบว่าไลเปสจะคงตัวที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ นาน 1 วันจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเรื่อยๆจนเหลือประมาณ 4 เปอร์เซนต์ในวันที่ 20 ส่วนที่อุณหภูมิ -20 และ -80^{0}ซไลเปสจะคงตัวนาน 3 วันจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงจนเหลือประมาณ 50 เปอร์เซนต์ในวันที่ 20 ดังนั้นอุณหภูมิที่ควรใช้ในการเก็บเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 คือที่ -20 และ -80^{0}ซ แต่การเก็บเอนไซม์ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพื่อนำไปศึกษาลักษณะเฉพาะต่อไปในการทดลองนี้ใช้วิธี lyophilization แล้วเก็บในรูปผงที่อุณหภูมิ -20^{0}ซ วิธีนี้ทำให้สามารถเก็บเอนไซม์ได้นานอย่างน้อย 1 เดือนโดยไม่สูญเสียแอคติวิตี

จากผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนและตัวยับยั้งบางชนิดต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนพบว่า Mn^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้ทั้งหมดซึ่งต่างจากที่มีรายงานในไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) และ *P. fragi* 22.39B (Nishio และคณะ, 1987) ซึ่ง Mn^{2+} จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงบางส่วน และมีรายงานว่าไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) และ *P. fluorescens* AK102 (Kojima, Yokoe และ Masc, 1994) ไม่ถูกยับยั้งโดย Mn^{2+} Fe^{2+}สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนได้เกือบทั้งหมด ซึ่งตรงกับที่มีรายงานใน *P. aeruginosa* (Nadkarni, 1971) และ และ *P. fragi* 22.39B (Nishio และคณะ, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่า K^{+} อาจช่วยกระตุ้นแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนเช่นเดียวกับที่เกิดในไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) ส่วน Ca^{2+} พบว่าช่วยกระตุ้นแอคติวิตีของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ได้เช่นเดียวกับไลเปสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ ตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* (Nadkarni, 1971), *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และคณะ, 1985) และ *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) เป็นต้น จากการศึกษาผลของ EDTA และ SDS ต่อแอคติวิตีของไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนพบว่าทั้ง EDTA และ SDS สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้บางส่วน การที่แอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งจาก EDTA แสดงว่าเอนไซม์อาจมี metal cofactor อยู่ใน active site หรืออาจเป็น metalloenzyme นั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nadkarni ในปี 1971 และ Muderhwa และคณะในปี 1985 และจากผลการทดลองแสดงว่าแคลเซียมไอออนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มการทำงานของไลเปสได้ และจากการที่เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้เมื่อมี SDS ซึ่งเป็น detergent ชนิดหนึ่งแสดงว่าไลเปสที่เตรียมได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้

จากผลการศึกษาการย่อยสับสเตรทธรรมชาติบางชนิดของไลเปสจาก *P. aeruginosa* พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยน้ำมันได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก, น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันถั่วเหลือง โดยสามารถย่อยน้ำมันมะกอกได้ดีที่สุด ย่อยน้ำมันข้าวโพดได้รองลงมา และย่อยน้ำมันถั่วเหลืองได้เล็กน้อยแต่ไม่สามารถย่อยน้ำมันละหุ่งได้เลย และเมื่อพิจารณาสัดส่วนของการไฮโดรไลซ์น้ำมัน(ตารางที่ 4) ร่วมกับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท(ตารางที่ 5) และโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันเหล่านั้น (ตารางที่ 6) พบว่าการไฮโดรไลซ์ของไลเปสมีแนวโน้มว่าจะขึ้นกับโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของสับสเตรทเนื่องจากกรดไขมันเหล่านั้นประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอมและมีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 เหมือนกัน แต่ต่างกันที่จำนวนพันธะคู่และหมู่ที่เป็นองค์ประกอบ จากผลการทดลองพบว่าไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (กรดโอเลอิค) แต่ถ้าโครงสร้างของกรดไขมันเปลี่ยนไปเนื่องจากมีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 เพิ่มเข้ามา (กรดลิโนเลอิค) ความสามารถในการย่อยจะลดลงและถ้ากรดไขมันนั้นมีหมู่ -OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 (กรดริซิโนเลอิค) ไลเปสบริสุทธิ์บางส่วนจะไม่สามารถย่อยได้ จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ยังสามารถย่อยไตรบิวทิรินซึ่งประกอบด้วย butyric acid (C_4) ได้ด้วยแสดงว่าเอนไซม์สามารถย่อยได้ทั้งกรดไขมันสายสั้นและสายยาว

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

aeruginosa ที่ใช้ในการทดลองนี้ดังข้อมูลข้างต้น แสดงว่าไลเปสจากแต่ละแหล่งก็จะมีความสามารถในการย่อยน้ำมันต่างกันไป

ตารางที่ 5 แสดงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทดลองนี้

	กรดโอเลอิค	กรดลิโนเลอิค	กรดริซิโนเลอิค
น้ำมันมะกอก	83.5	4	-
น้ำมันข้าวโพด	19-49	34-62	-
น้ำมันถั่วเหลือง	26	49	-
น้ำมันละหุ่ง	7	3	87

ตารางที่ 6 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท

กรดโอเลอิค	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
กรดลิโนเลอิค	$CH_3(CH_2)_4CH=CH\text{-}CH_2\text{-}CH=CH(CH_2)_7COOH$
กรดริซิโนเลอิค	$CH_3(CH_2)_5CH(OH)CH_2\text{-}CH=CH(CH_2)_7COOH$

จากผลการศึกษาจลนศาสตร์ของไลเปสจาก *P. aeruginosa* ที่อุณหภูมิ 37^0ซ, pH 7.0 ต่อสับสเตรทคือน้ำมันมะกอกจะได้ค่า Km เท่ากับ 4.09 มก./มล. และได้ Vmax เท่ากับ 4.92 หน่วย ดังแสดงในตารางที่ 7 ร่วมกับค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas*

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

ตารางที่ 7 แสดงค่า Km และ Vmax ของไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* ที่ได้จากผลการทดลองและที่มีรายงาน

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

ผลการทดลองโดยสรุปพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* จะผลิตไลเปสที่สามารถย่อยได้ทั้งกรดไขมันสายสั้นและสายยาวโดยความสามารถในการย่อยน้ำมันแต่ละชนิดจะต่างกันไปขึ้นกับชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเป็นสิ่งสำคัญ จากข้อมูลนี้ทำให้เล็งเห็นว่าไลเปสจาก *P. aeruginosa* สามารถนำไปใช้ในขบวนการ Interesterification เพื่อเพิ่มมูลค่าของเอสเทอร์ที่เตรียมได้โดยการแลกเปลี่ยนกรดไขมันที่จับกับกลีเซอรอลเพื่อสร้างเป็นเอสเทอร์ชนิดใหม่

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

ตะกอนของบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งโดยธรรมชาติกุ้งจะหากินบริเวณก้นบ่อด้วยการจับอาหารที่เป็นของแข็งที่ตกลงไปอยู่ก้นบ่อกิน 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) แสดงว่าไลเปสจาก *Pseudomonas* มีส่วนช่วยในการย่อยไขมันเพื่อให้กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ดังนั้นถ้ามีการเติมไลเปสลงไปในอาหารของกุ้งก็น่าจะช่วยให้กุ้งได้รับกรดไขมันเพิ่มขึ้นและโตเร็วขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง และยังสามารถใช้เชื้อ *P. aeruginosa* นี้ในการกำจัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ด้วยเพื่อช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้ง นอกจากนั้นอาจนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่ดังที่มีรายงานว่าในญี่ปุ่นมีการใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracae* เพื่อไฮโดรไลซ์น้ำมันสำหรับการผลิตสบู่ เนื่องจากการใช้เอนไซม์ในการกระตุ้นปฏิกิริยาจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นและสี ดีกว่าการทำให้ไขมันแตกตัว (fat splitting)และยังลดต้นทุนการผลิตด้วย (Macrae, 1983) เนื่องจากการย่อยไขมันโดยไลเปสเป็นกระบวนการที่ประหยัดพลังงาน เพราะปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติจึงไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของชีวโมเลกุลเช่น highly unsaturated fatty acid (macrae, 1983) ทำให้สามารถนำไปใช้ในการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ที่มี polyunsaturated fatty acid ที่มีราคาแพงและไม่คงตัว (sensitive) ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร(nutrition)และยา (Godtfredsen, 1990)