วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลของการวัด activity ของไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิกพบว่า มี activity ในกากรำและใน whole homogenate มาก ส่วนactivityใน supernatant มีน้อยมาก การที่พบ activity ใน supernatant น้อยอาจจะเนื่องจากเหตุผลสามประการ ประการแรก activity ในsupernatant มีน้อยเพราะว่าใช้ substrate น้อยเกินไปเนื่องจากการทดลองโดยวิธีนี้ใช้ปริมาตรของ reaction mixture ได้เพียง 3 มิลลิลิตรและมี substrate เพียง 1 มิลลิลิตรของอีมัลชั่นของน้ำมันมะกอก (3%v / v) เมื่อเทียบกับปริมาณ substrate ที่ใช้โดยวิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรต จะมีปริมาณน้อยกว่าถึง 11 เท่า และน้อยกว่าวิธีใช้เครื่องมือ pH - stat ถึง 47 เท่า จึงอาจจะทำให้ activity ที่เกิดขึ้นน้อยเกินไปจนมองเห็นไม่ชัดในการทดลองด้วยเครื่องมือวาร์เบิก 1 ชั่วโมง ประการที่สอง เครื่องมือวาร์เบิกมี sensitivity ต่ำกว่าเครื่องมือ pH - stat (ซึ่งจะกล่าวในตอนต่อไป) ประมาณ 4 เท่า จึงอาจจะไม่พบ activity ของไลเปสใน supernatant ประการที่สามอาจเป็นไปได้ว่าไลเปสถูกสกัดออกมาอยู่ใน supernatant น้อย

ส่วน activity ที่วัดได้ในกากรำหรือใน whole homogenate มากนั้นอาจจะเป็นเพราะมีไลเปสมากหรืออาจจะมีสารบางชนิดในกากรำซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ได้แก๊สออกมา ซึ่งจะเห็นได้ว่าในตอนแรกจะมี activity สูงมากแล้วลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีต่อ ๆ มา

เอนไซม์เมื่อ incubate เป็นเวลานาน ๆ จะเสีย activity ไปเรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ถูก inactivate ไปบางส่วนด้วยความร้อนและ pH ที่ทดลอง หรืออาจจะเนื่องจาก substrateลดลงหรือ product ที่เกิดขึ้น inhibit การไฮโดรไลส์ของ substrateโดยเอนไซม์ ดังนั้นจากการ

incubate นาน 5 ชั่วโมงโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรต (รูปที่ 4) จึงทำให้ activity ของไลเปสเริ่มลดลงเมื่อincubation time มากกว่า 3 ชั่วโมง ในการวัด activity ของ enzyme จึงนิยมวัด initial velocity เพื่อขจัดปัญหาดังกล่าว อย่างไรก็ดีวิธีวัด activity ของไลเปสโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรตมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้ง่ายเพราะวิธีทดลองมีหลายขั้น เช่นในตอนสกัดกรดไขมันอิสระ การระเหยเอาน้ำมันปิโตรเลียมออกและที่สำคัญอีกตอนหนึ่งคือการไตเตรต โดยเหตุที่น้ำมันที่ใช้เป็น substrateมีน้อยมาก (0.3 มิลลิลิตร) ดังนั้นหลังจากได้ระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วจะมีน้ำมันติดที่ก้นหลอดเพียงเป็นฟิล์มบาง ๆ เท่านั้น อีกประการหนึ่ง การไตเตรตได้ผลไม่ค่อย reproducible ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าเมื่อใช้เครื่อง pH - meter ไปได้ 2 - 3 วันจะเริ่มมีน้ำมันมาเกาะที่ผิวของglass electrode ทำให้เข็มของ pH - meter แกว่งไปมาไม่คงที่จึงต้องเปลี่ยน electrode ใหม่ หรือมิฉะนั้นก็ต้องเตรียม electrode อันนั้นใหม่โดยล้างด้วยอะซีโตนแล้วแช่ในกรดเกลือ และบัฟเฟอร์ตามลำดับ ทำให้การทดลองเสียเวลามากและไม่แน่ใจในความถูกต้องของเครื่องมือ

การวัด activity ของไลเปสโดยใช้เครื่องมือ pH - stat นับว่าได้ผลดีมากกว่าการทดลองทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแล้ว เพราะใช้เวลาในการทดลองน้อยกว่ามากทำให้การทดลองก้าวหน้ารวดเร็วขึ้น และอีกประการหนึ่งทำให้แน่ใจได้ว่า activity ที่ได้นั้นเกิดขึ้นที่pH นั้นจริง ๆ กราฟที่บันทึกได้จากการไตเตรตเป็นเส้นตรงตลอดเวลาที่ทดลองและ activity ที่เกิดเป็นปฏิภาคตรงกับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ผลการทดลองในครั้งนี้ส่วนใหญ่จึงเป็นการทดลองจากเครื่อง pH - stat

การสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ มักจะกระทำโดยวิธีบดหรือโฮโมจีไนส์ให้เซลแตกเพื่อจะให้เอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลถูกสกัดออกมามากที่สุด ในการสกัดไลเปสจากรำก็พบว่าการโฮโมจีไนส์ช่วยให้ไลเปสออกมาจากรำได้เร็วกว่าการแช่น้ำเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับการทดลองของไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) แต่ไม่ปรากฏว่าการแช่โฮโมจีเนตไว้นาน ๆ มีผลในการสกัดไลเปสเพิ่มขึ้น

เอนไซม์มักจะมีความทนทานต่อความร้อนได้ดีขึ้นเมื่ออยู่รวมกับ substrate Ory et al (1962) ได้ทดลองหาความเสถียรของไลเปสจากเมล็ดละหุ่งโดยสกัดออกมาปนกับ endogenous substrate แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าไลเปสทนต่อความร้อนได้สูงกว่าไลเปสจากแหล่งเดียวกันแต่สกัดเอา substrate ออกเสียก่อน สำหรับไลเปสในรำข้าวนั้นแม้จะมิได้ทดลองโดยตรงเกี่ยวกับความเสถียรเมื่ออยู่รวมกับ substrate แต่พอจะสังเกตจากการทดลองให้ความร้อนกับรำ (ดูรูปที่13) ได้ว่าแม้จะให้ความร้อนสูงถึง 90 องศาเซ็นติเกรด 6 ชั่วโมง การเกิดกรดไขมันอิสระก็ยังคงมีเพิ่มขึ้นตลอดเวลาที่เก็บรำ

ไลเปสที่สกัดจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนมีความทนทานต่อความร้อนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับไลเปสที่สกัดจากเมล็ดละหุ่งที่ได้สกัดเอา endogenous substrate ออกแล้ว ไลเปสที่ได้จากรำเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิของห้อง (ประมาณ 30 องศาเซ็นติเกรด) 1 ชั่วโมงแทบจะไม่เสีย activity ไปเลย ถ้าจะให้เสีย activity ไป 95 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 1 ชั่วโมงจะต้องแช่ไว้ที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซ็นติเกรด แต่ถ้าแช่ไลเปสจากเมล็ดละหุ่งที่ไม่มี substrate ไว้ที่อุณหภูมิของห้อง 1 ชั่วโมง จะเสีย activity ไปถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Houlé, 1953)

Dinella et al (1960) ได้ศึกษาถึงความเสถียรของไลเปสจากลำไส้ที่ pH ต่าง ๆ พบว่าไลเปสจะเสีย activity ไปในเวลา 10 นาที ที่ pH ต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 10 ซึ่งนับว่ามีความทนทานต่อ pH ไม่มากนัก ไลเปสจากรำข้าวมีความทนทานต่อ pH ในช่วงที่กว้างกว่าไลเปสในลำไส้ จากการแช่เอนไซม์นี้ไว้ที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ pH 2 ถึง 13 พบว่าไลเปสเสถียรมากระหว่าง pH ตั้งแต่ 5 ถึง 9 ถ้าจะให้เสีย activity ไปหมดจะต้องแช่ไว้ที่ pH 2 หรือ pH 13 เป็นเวลา 10 และ 20 นาที ตามลำดับ ส่วนในด้าน activity ของไลเปสที่ได้จากรำเมื่อใช้อีมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็น substrate นั้น พบว่ามีค่า V มากกว่าวิธีของไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510)ถึง 67 เท่า และมีค่า Km มากกว่าประมาณ 2 เท่า (ค่า Km ของการทดลองครั้งนี้เท่ากับ 3.88×10^{-2} โมลาร์ ส่วนของไพเราะ ทิพยทัศน์ เท่ากับ 1.7×10^{-2} โมลาร์) อย่างไรก็ดีค่า Km ของการทดลองทั้งสองวิธีนี้ไม่น่าจะนำมาเปรียบเทียบกันเนื่องจากวิธีในการทดลองแตกต่างกันมาก ค่า Km ที่ได้จึงอาจจะต่างกันเนื่องจาก pH อุณหภูมิ ขนาดและสภาพของอีมัลชั่น เป็นต้น

Optimum pH ของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิด ชนิดของ substrate และบัฟเฟอร์ที่ใช้ (Fruton and Simmonds,1958) ไลเปสที่ได้จากสัตว์ส่วนมากมี optimum pH ค่อนไปทางด่าง ส่วนไลเปสจากพืชมักจะมี optimum pH ค่อนไปทางกรด เช่นไลเปสจากลำไส้เล็กเท่ากับ 9.0 (Dinella et al,1960) จากพลาสมา เท่ากับ 8.1 (Basky et al,1963) เมื่อใช้อีมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็น substrate ไลเปสจากตับอ่อนมี optimum pH เพิ่มขึ้นจาก 7.0 -8.3 เมื่อทดลองกับ substrate ที่มีความยาว chain ของกรดไขมันเพิ่มขึ้น (Dier, 1965) ไลเปสจากเมล็ดละหุ่งมี optimum pH ที่ 4.3 (Ory et al,1962) ไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) ได้ทดลองหาผลของ pH ต่อไลเปสจากรำพบว่ามี optimum pH ระหว่าง pH 6-7 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในการทดลองหา activity ของไลเปสครั้งนี้ตั้งแต่ pH 3.0 - 10.0 ปรากฏว่าไม่พบ activity ของไลเปสเลยในช่วง pH 3.0 - 7.25 ไลเปสจะเริ่มมี

activity ตั้งแต่ pH 7.3 และมี optimum pH ประมาณ 8.5 ซึ่งเท่ากับไลเปสในน้ำนมโคจากการทดลองของ Downey and Andrews (1965)

Sizer (1943) ได้ทดลองหา activation energy(A) ของไลเปสจากตับอ่อนโดยใช้ substrate ต่าง ๆ พบว่ามีค่าประมาณ 7800 cal/mole Brady and Higgins(1967) ทดลองหาค่า A ของไลเปสจาก adipose tissue, เนื้อเยื่อจากปอดและกล้ามเนื้อหัวใจได้ค่า 19100, 18900 และ 13500 cal/mole ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่จากแหล่งต่างกันจะมีค่า A ไม่เท่ากัน ในการทดลองครั้งนี้พบว่าค่า A เท่ากับ 7020 cal/mole ซึ่งนับว่าใกล้เคียงกับไลเปสจากตับอ่อน แสดงว่าไลเปสในรำข้าวต้องการพลังงานในการทำให้เกิดการไฮโดรไลส์ของเอสเทอใกล้เคียงกับไลเปสในตับอ่อน

Brady and Higgins (1967), Korn (1955) แสดงให้เห็นว่าถ้าความเข้มข้นของ NaCl หรือ KCl ใน incubation mixture มีค่าสูง (เช่น 1M) จะทำให้ activity ของไลเปสลดลง Warren et al (1966) ได้ทดลองดูผลของเกลือชนิดต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์เป็นกลางต่อไลเปสจากต้นอ่อนของข้าวสาลี พบว่าการเสีย activity ของไลเปสเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มของ effectiveness ของ anion คือ

$$SCN^- > ClO_4^- > I^- > Br^- > Cl^- > CH_3COO^-$$

ในการทดลองเกี่ยวกับผลของไอออนบางชนิดต่อไลเปสในรำก็พบว่าเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้ activity ของไลเปสลดลงแม้จะใช้ $CaCl_2$ (ซึ่งเป็น activator ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ)ก็มีผลเช่นเดียวกัน Gjessing and Clement(1959) ได้ทดลองเกี่ยวกับผลของ ionic strength ต่อเอนไซม์ในตับอ่อนโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ใน incubation mixture ก็พบว่าทำให้ activity ของไลเปสลดลง จึงสรุปว่าเมื่อ ionic strength เพิ่มขึ้นจะทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลงหรือไปทำลาย tertiary structure ของ macromolecules

ทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลง bivalent ionsบางชนิดเช่น Ca^{++}, Mg^{++} ที่ความเข้มข้นไม่สูงมากเกินไปมีผลในการเร่งปฏิกริยาของไลเปส ในรำเช่นเดียวกับไลเปสจากแหล่งอื่น ๆ เช่นจากการทดลองของ Wood (1959) การที่แคลเซียมทำให้ปฏิกริยาเกิดเร็วขึ้นนั้นอาจจะไม่ใช่มันไปเกี่ยวข้องกับเอนไซม์โดยตรง แต่มันไปตกตะกอนของกรดไขมันอิสระที่เกิดในปฏิกริยา จึงทำให้สมดุลย์ของปฏิกริยาเอนเอียงไปในทางการแตกตัวของไขมัน

การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนเพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นั้นได้ทำกันมาเป็นเวลานานแล้ว ในการนำมาใช้ตกตะกอนของไลเปสในรำพบว่าไลเปสจะปนกันตะกอนโปรตีนที่ตกลงมาในทุก ๆ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ จึงไม่สามารถแยกไลเปสออกมาจากโปรตีนอื่น ๆ โดยที่จะให้ได้ yield และความบริสุทธิ์สูง การที่ไลเปสออกมากับโปรตีนที่ตกตะกอนทุก ๆ ความเข้มข้นของเกลืออาจจะเป็นไปได้ว่าไลเปสรวมตัวกับโปรตีนที่มีในรำข้าวเป็น micelles เช่นเดียวกับ tributyrinase ในน้ำนม (Downey and Andrews,1965) อีกประการหนึ่งอาจจะเป็นเพราะมีไลเปสอยู่หลายชนิดในรำซึ่งอาจจะแยกออกมาเป็นตัว ๆ ได้โดยวิธีอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล

จากผลของการแยกโปรตีนโดยวิธี gel - filtration ทำให้เห็นได้ชัดเจนว่าแยกไลเปสออกมาได้ 2 peaks ดังนั้นจะมีไลเปสในรำอย่างน้อย 2 ชนิด ถ้าจำแนกออกโดยอาศัยขนาดของโมเลกุล อย่างไรก็ดีไลเปสที่แยกออกมาได้นี้ตัวที่อยู่ใน peak แรกอาจจะเป็น aggregated formของเอนไซม์ใน peak หลังก็ได้ หลักฐานของปรากฏการณ์แบบนี้อาจจะเป็นแบบเดียวกับไลเปสในตับอ่อนซึ่งพบว่ามีเพียงชนิดเดียวแต่เมื่อสกัดออกมาโดยวิธีต่างกันจะแยกออกมาได้เป็นไลเปสที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากและน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Gelotte, 1964;Desnuelle,1961) ปัญหาในการทดลองแยกไลเปสโดยวิธี gel - filtration ที่อาจจะเกิดขึ้นได้อีกประการหนึ่งคือไลเปสมีคุณสมบัติในการดูดซับ (adsorptive property)

ทำให้ไอเปสผ่านคอลัมน์ช้าลงและทำให้ recovery yield ลดลง ตัวอย่าง เช่นการแยกไอเปสจากน้ำนม เป็นต้น (Downey and Andrews, 1965) แต่ในการทดลองเกี่ยวกับไอเปสในรำไม่พบว่าเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวและ recovery yield จากการทดลองมีถึง 95 เปอร์เซ็นต์

โดยเหตุที่ไอเปสและเอสเทอเรสมักจะพบอยู่ในแหล่งเดียวกัน specificity ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดก็ยังคงเป็นที่สงสัยกันอยู่ วิธีหนึ่งในการที่จะแก้ข้อสงสัยให้หมดไปก็คือพยายามแยกเอนไซม์ทั้งสองออกจากกัน จากการลองหา activity ของเอสเทอเรสโดยใช้ β - naphthyl acetate เป็น substrate พบว่าเอสเทอเรสออกมาระหว่าง peak แรกและ peak หลังของไอเปส และมีเพียง peak เดียว (ปรีดา อัมประเสริฐ, 2513) แต่ activity ส่วนใหญ่ของเอสเทอเรสก็ยังมีปนอยู่ใน peak หลังของไอเปส จากคุณสมบัติในการผ่านคอลัมน์และคุณสมบัติอื่น ๆ ของเอนไซม์ทั้งสองในรำก็พอจะกล่าวได้ว่าเป็นเอนไซม์คนละชนิด

เอนไซม์เป็นสารประกอบพวกโปรตีนจึงถูกทำให้เสียสภาพ (denature) ได้โดยใช้ความร้อน กรด หรือด่าง ดังนั้นการอบรำก็ดี การแช่รำในกรดก็ดี ย่อมทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในรำนับว่ามีความทนทานต่อความร้อนได้สูงพอประมาณ West and Cruz (1933) อบรำที่ 100 องศาเซ็นติเกรด 6 ชั่วโมง ก็ยังพบว่ามีการเพิ่มของกรดไขมันอิสระเมื่อเก็บรำไว้ ในการทดลองครั้งนี้ก็ได้ผลแบบเดียวกัน กล่าวคือเมื่ออบรำที่ 90 องศาเซ็นติเกรดเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับรำที่แช่กรดแล้วทำให้แห้งก็พบว่ายังคงมีการเพิ่มของกรดไขมันอิสระตลอดระยะเวลาที่เก็บไว้ ส่วนรำที่แช่น้ำแล้วอบนั้นมีผลในการลดอัตราการเกิดกรดไขมันอิสระในรำได้ดีกว่าการอบเพียงอย่างเดียวเนื่องด้วยเหตุผลสองประการ ประการแรก น้ำไปละลายเอาเอนไซม์บางส่วนออกมาทำให้เอนไซม์ที่จะหลืออยู่ในรำน้อยลง ประการที่สอง เอนไซม์จะเสียสภาพได้ง่ายยิ่งขึ้นเมื่อมีน้ำปนอยู่ สำหรับการแช่รำในกรดนั้นแม้จะใช้กรดที่มีความเข้มข้นเพียง 1×10^{-4} โมลาร์ (กรดก่ำมะถัน) ก็มีผลในการระงับการ

เกิดกรดไขมันอิสระดีกว่าวิธีอื่น ๆ ที่ทดลองอย่างเห็นได้ชัด การที่การแช่รำในกรดมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่ายนั้นอาจจะเกิดจากการที่เอนไซม์ไวต่อการสูญเสีย activity ที่ pH เป็นกรด หรืออีกประการหนึ่งที่ช่วยในการส่งเสริมให้เอนไซม์เสียสภาพมากขึ้นก็คือความร้อนที่ใช้ในการอบทำให้น้ำระเหยไป จึงทำให้กรดที่มีอยู่ในรำเข้มข้นขึ้นกว่าเดิมมากเป็นผลให้เอนไซม์เสียสภาพมากขึ้น กรดไขมันอิสระจึงแทบไม่เกิดขึ้นเลยจากการเก็บรำไว้ถึง 30 วัน

จากการทดลองทั้งหมดที่ได้ทำมานี้ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์พอสมควรทั้งในทางอุตสาหกรรมและทางวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นไปตามจุดมุ่งหมายที่ได้วางไว้ เช่นเรื่องการระงับการเกิดกรดไขมันอิสระในรำ การหาคุณสมบัติทาง kinetics และการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ เป็นต้น สำหรับการระงับการเกิดกรดไขมันอิสระด้วยกรดนั้น ถ้าจะนำไปประยุกต์ในทางอุตสาหกรรมอาจจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับการทำให้รำแห้ง แต่การทำให้รำแห้งอาจจะเปลี่ยนแปลงเครื่องมือเป็น dryer แบบเดียวกับการทำข้าวแห้ง หรืออีกวิธีหนึ่งที่น่าจะกระทำคือพ่นแก๊ส SO_3 เข้าไปในรำแทนการแช่กรดกำมะถัน ส่วนในทางวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์นั้น อาจจะศึกษาเพิ่มเติมได้อีกทางด้านตัวนำมาปฏิกิริยาตลอดจนพยายามทำให้ไลเปสแต่ละชนิดที่แยกมาได้นั้นให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น หา specificity ต่อ substrate ของแต่ละตัว หรืออาจจะไปไกลถึงการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์ดังกล่าว