3. ผลการทดลอง

3.1 การสกัดเอสเทอเรสจากรำ

3.1.1 ผลของการแช่รำในน้ำและการ homogenization

ได้ทดลองสกัดเอสเทอเรสออกจากรำโดยการนำรำไปแช่ในน้ำและทำให้เป็น 25 % suspension (w/v) ที่ 4° ซ เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-24ชั่วโมง ในการทดลองเดียวกันนี้ได้ทดลอง homogenize suspension ของรำที่เข้มข้นเท่ากันที่ 4° ซ 1 นาที ด้วย Waring blender ก่อนที่จะนำไปแช่ในห้องเดียวกัน จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า เอสเทอเรสสกัดออกจากรำได้ง่ายมาก แช่รำในน้ำเป็นเวลา 20 นาทีก็สามารถสกัดเอนไซม์ได้มากที่สุด ถ้ายิ่งแช่นานเกิน 20 นาที จะทำให้ได้เอนไซม์น้อยลง homogenization ช่วยในการสกัดได้เพียงเล็กน้อยเมื่อใช้เวลาแช่เท่า ๆ กัน เช่น แช่ 20 นาที การ homogenization จะสกัดได้เพิ่มขึ้นอีกประมาณ 3เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จึงเตรียมเอสเทอเรสโดยแช่รำในน้ำให้เป็น25 % suspension (w/v) ที่ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 1

ผลของการแช่น้ำและการ homogenization ในการสกัดเอสเทอเรสจากรำ

เวลาที่ homogenize (นาที)	เวลาที่แช่รำที่ 4° ซ (ชั่วโมง)	Esterase activity (unit)	% activity
0	0	0.346	94
0	1/6	0.367	100
0	1/3	0.367	100
0	1	0.340	93
0	6	0.341	93
0	24	0.340	93
1	1/6	0.370	101
1	1/3	0.377	103
1	1	0.363	99
1	6	0.365	100

3.1.2 ผลของการแช่ร่ำใน buffer ที่ pH ต่าง ๆ

การสกัดเอสเทอเรสโดยการแช่ร่ำใน buffer ซึ่งทำให้เป็น 25 % suspension (w / v) ที่ 4° ซ นาน 20 นาที ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 ปรากฏว่าเมื่อแช่ร่ำใน buffer ที่ pH 8.0 จะสกัดเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด คือ มากกว่าเมื่อแช่ที่ pH 7.0, 7.5 และ 9.0 ประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าเมื่อแช่ในน้ำประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ pH 10.0 จะสกัดเอนไซม์ออกมาได้น้อยที่สุดซึ่งน้อยกว่าเมื่อแช่ที่ pH 8.0 ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่ร่ำที่ pH 6.0 จะสกัดเอนไซม์ออกมาได้พอ ๆ กับการแช่ในน้ำ อย่างไรก็ดีเนื่องจากการแช่ใน buffer ไม่ได้ช่วยในการสกัดเอนไซม์ให้ได้มากขึ้นเท่าไรนักทั้งมีวิธีการยุ่งยากและยาวขึ้น ในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงใช้วิธีสกัดด้วยน้ำแทนดังกล่าวใน 3.1.1

ตารางที่ 2

ผลของการแช่ร่ำในน้ำกับใน buffer ที่ pH ต่าง ๆ ในการสกัดเอสเทอเรสออกจากรำ

Buffer ที่ใช้สกัดเอสเทอเรสออกจากรำ	pH ที่แช่รำ	Esterase activity (unit)	%activity
น้ำ	6.5	0.244	100
phosphate buffer(0.01M.)	6.0	0.248	102
"	7.0	0.282	115
"	7.5	0.281	115
"	8.0	0.287	118
"	9.0	0.276	113
tris. buffer (0.01 M.)	10.0	0.067	27

3.2 การศึกษาเอนไซม์เอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude esterase)

3.2.1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส

ในการทดลองวัด activity ของเอสเทอเรสได้ใช้ความเข้มข้นของ substrate ตั้งแต่ 0 ถึง 0.75×10^{-3} M ไม่สามารถทำการทดลองที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้ได้เนื่องจากเตรียม substrate เข้มข้นที่สุดได้เพียง 0.81×10^{-3} M การวัด activity ได้วัดที่ pH 7.8 ที่อุณหภูมิของห้อง (ประมาณ 29 °ซ) ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นของ substrate ระหว่าง 0 ถึง 0.30×10^{-3} M activity ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นค่อนข้างเร็ว และที่ 0.55×10^{-3} M. ก็เริ่มเข้าเขต optimum substrate concentration ในการทดลองต่อ ๆ ไป จึงเลือกทำที่ความเข้มข้นของ substrate 0.65×10^{-3}M

ในรูปที่ 2 แสดงการหา Km โดย Lineweaver and Burk's plot เป็นการ plot ระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{s}$ และจากกราฟจะได้

intercept $= \frac{1}{V} = 2.0$ unit^{-1}

จะได้ $V = 0.50$ unit

และ slope $= \frac{Km}{V} = 0.45$

ดังนั้น Michaelis-Menten Constant (Km) $= 0.22 \times 10^{-3}$ M

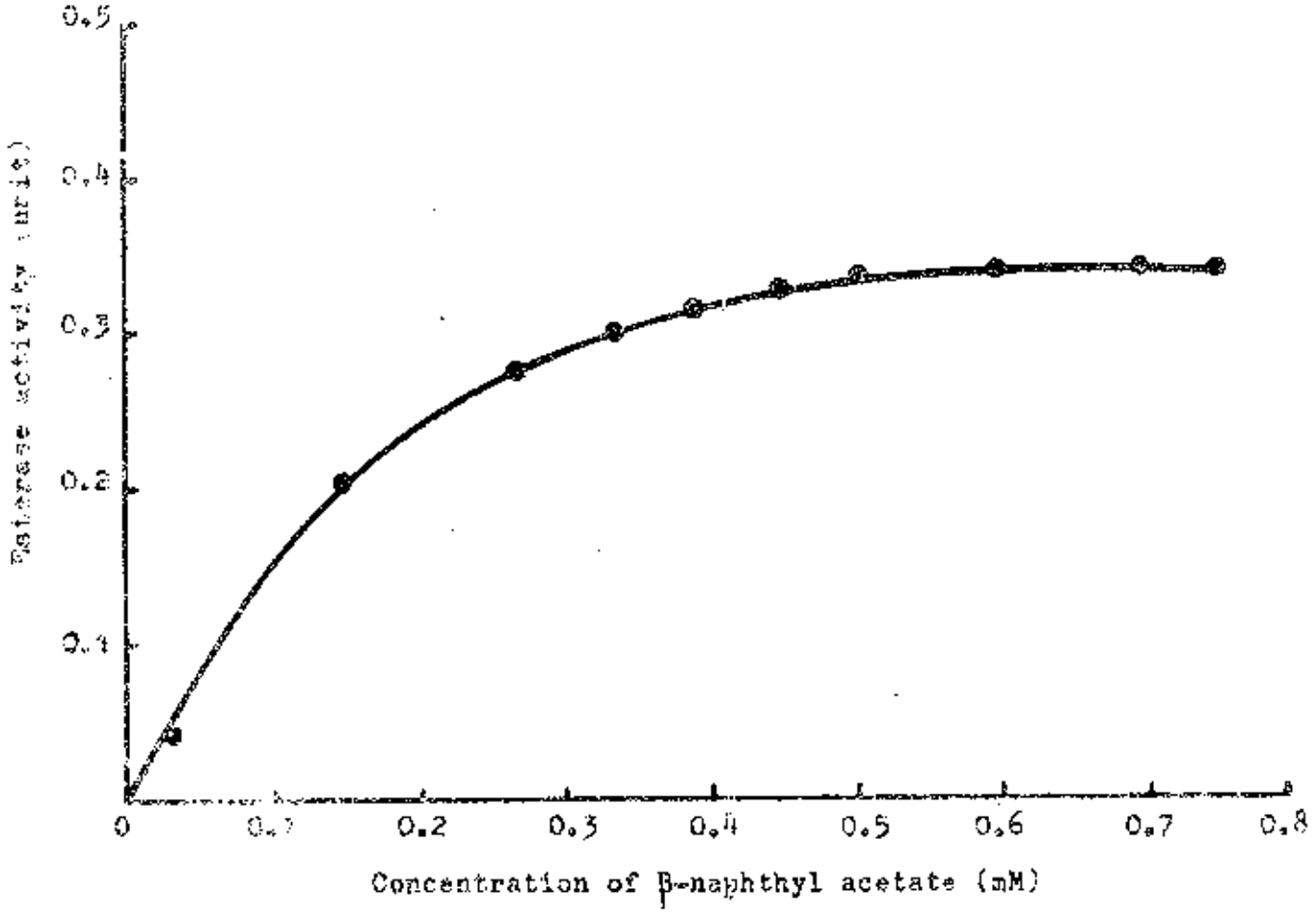
3.2.2 ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส

ได้ทำการทดลองวัด activity ของเอสเทอเรสที่ pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.5 โดยใช้ความเข้มข้นของ substrate 0.65×10^{-3} M. และวัดที่อุณหภูมิของห้อง ผลการทดลองในรูปที่ 3 ปรากฏว่าที่ pH 5.0 activity ไม่มีเลย แต่ activity นี้จะเพิ่มตาม pH ไปจนถึง pH 7.4 และที่ pH 7.6-8.0 จะมี activity สูงที่สุด pH ตั้งแต่ 8.0 ขึ้นไป activity จะเริ่มลดลง ในรูปเดียวกัน

001690

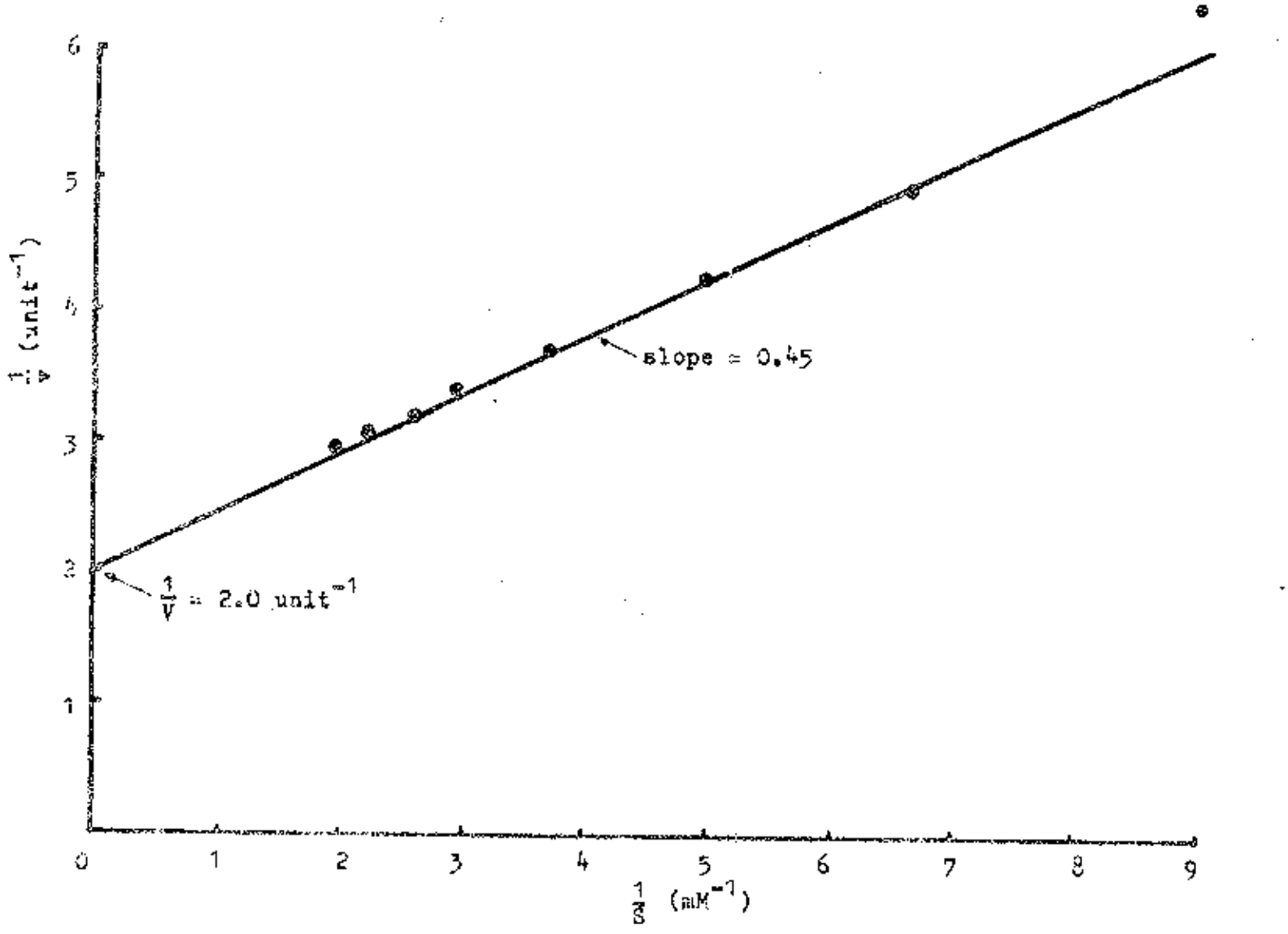
รูปที่ 1

ผลของความเข้มข้นของsubstrate ต่อ activity ของเอนไซม์ (crude enzyme)



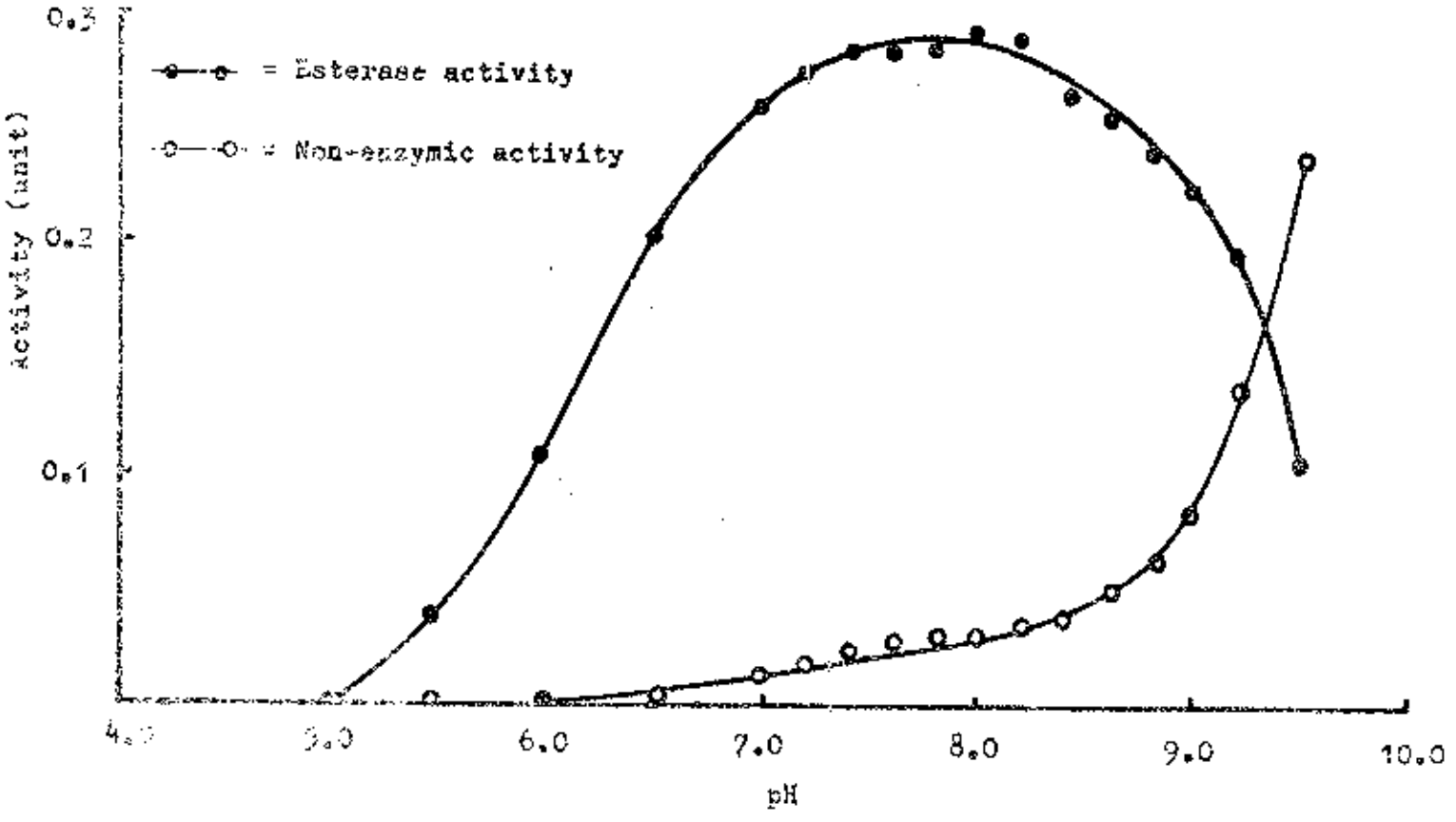
รูปที่ 2

แสดงความหา Km ของเอนไซม์ที่ใช้ (crude enzyme) โดยใช้ Lineweaver and Burk's Plot



รูปที่ 3

[illegible]pH กับactivity ของเอนไซม์[illegible](crude enzyme)



นี้ จะเห็นว่าที่ pH ต่ำกว่า 6.0 non - enzymic activity จะถือได้ว่าไม่มีเลย แต่จะเพิ่มขึ้นช้า ๆ จนถึง pH 8.0 จากนี้จะเพิ่มขึ้นเร็วมาก non - enzymic activity นี้ได้นำไปหักออกจาก total activity เพื่อให้ได้ esterase activity ทุกครั้ง ในการวัด activity ของเอนไซม์ในการทดลองต่าง ๆ จึงวัดที่ pH 7.8 ซึ่งอยู่ในช่วง optimum pH และมี non - enzymic activity ไม่สูงนัก

3.2.3 <u>ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอสเทอเรส</u>

ได้ทดลองวัด activity ของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 20° ถึง 50° ซ ที่ pH 7.8 และความเข้มข้นของ substrate 0.65×10^{-3} M ไม่สามารถวัดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20° ซ ได้ เพราะว่า substrate จะตกผลึกลงมาและจับที่ electrode จากผลการทดลองในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่า 20° ซ activity จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ไปจนถึง optimum temperature ระหว่าง 33-35° ซ และถ้าเพิ่มอุณหภูมิมากกว่านี้ activity จะตกลงอย่างรวดเร็ว จน activity แทบจะเป็นศูนย์ที่อุณหภูมิ 50° ซ เนื่องจาก optimum activity ที่ 35° ซ สูงกว่าเมื่อวัดที่อุณหภูมิของห้อง (29° ซ) ประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้น ในการทดลองต่อ ๆ ไป จึงวัด activity ของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิของห้องเพราะสะดวกมากกว่า

ในรูปที่ 5 แสดง Arrhenius plot ซึ่งเป็นการ plot ระหว่าง log activity กับ $\frac{1}{T}$ และได้เส้นตรงดีพอสมควร

จากกราฟจะได้

$$\text{slope} = 1.137 \times 10^{3} = \frac{A}{2.303R}$$

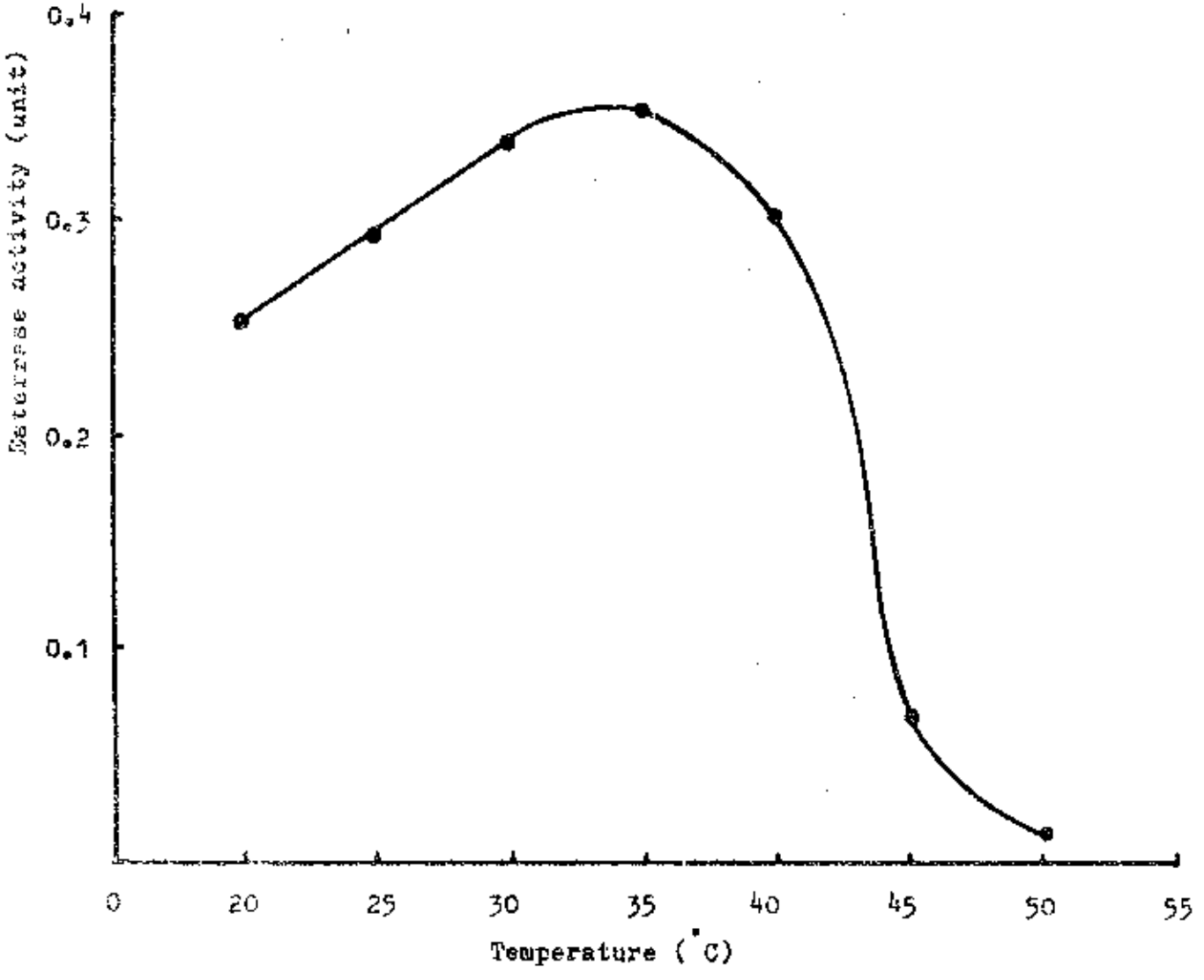
A = activation energy

R = gas constant = 1.987 cal /deg /mole

ดังนั้นจะได้ว่า activation energy = 5207 cal /mole

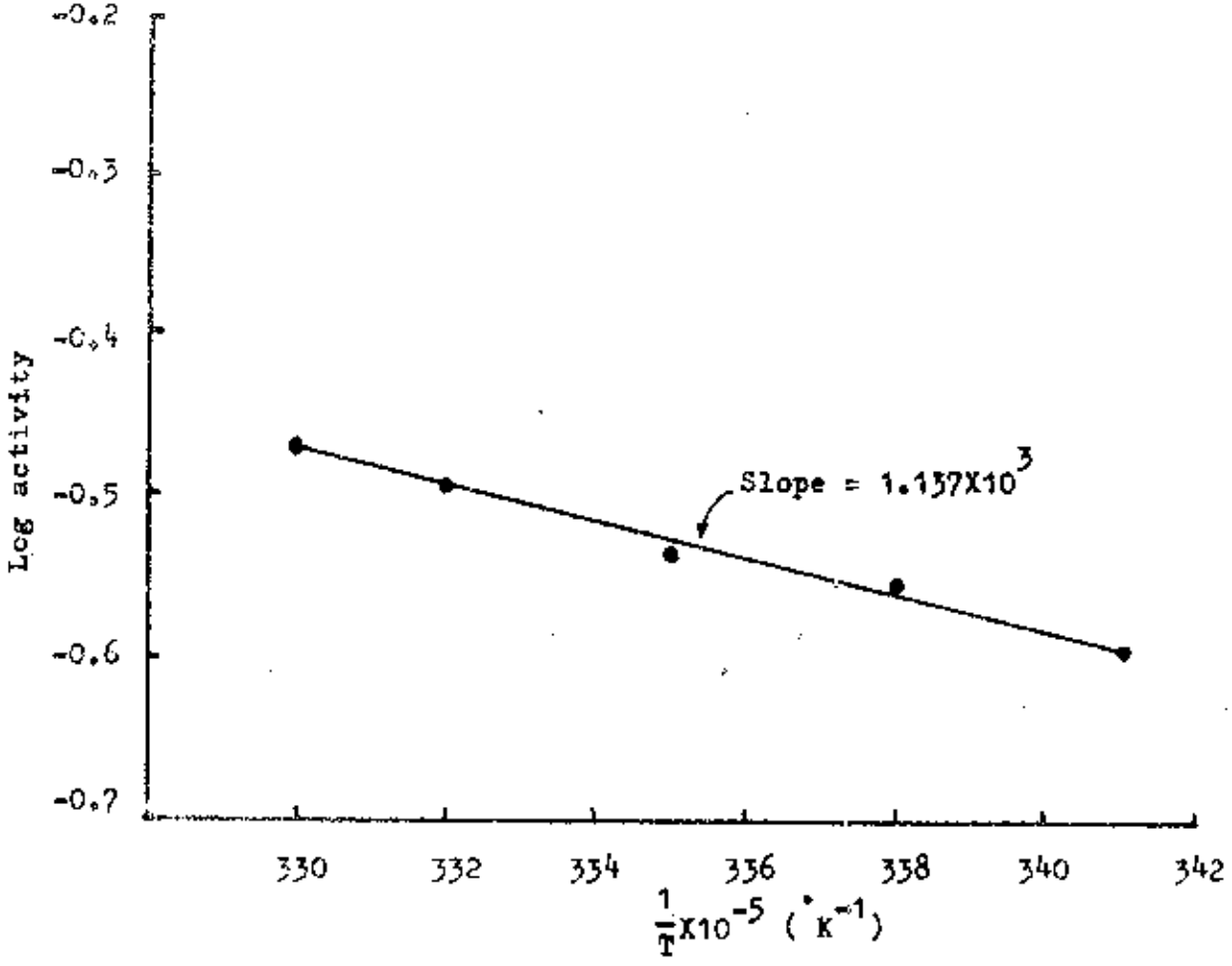
รูปที่ 4

ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอนไซม์ (crude enzyme)



รูปที่ 5

แสดง Arrhenius plot ของการ hydrolysis of β-naphthyl acetate โดยเอนไซม์ (crude enzyme)



3.2.4 การสูญเสีย activity ของเอสเทอเรสเมื่อเก็บไว้ที่ -20 °ซ

ได้นำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดร่ำด้วยน้ำ (crude enzyme) มาแบ่งใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดสนิทหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20 °ซ ต่อจากนั้นจึงนำเอนไซม์นั้นไปวัด activity เมื่อเก็บไว้นานเป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 10 วันจนถึง 3 เดือน จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า เอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์(crude esterase) จะเสีย activity ไปค่อนข้างยาก ถ้าเก็บไว้ที่ -20 °ซ เช่น เมื่อเก็บไว้ 1 เดือนจะเสีย activity ไปประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และถ้าเก็บไว้ 3 เดือนจะเสียactivity ไปประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3

แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ -20 °ซ

ระยะเวลาที่เก็บเอนไซม์ไว้ (วัน)	Esterase activity (unit)	% loss of activity
0	0.341	0
10	0.334	2
20	0.327	4
30	0.324	5
60	0.283	17
90	0.273	20

3.3 การทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ (Purification of Esterase)

3.3.1 ผลของ ammonium sulfate fractionation

ในการทำ ammonium sulfate fractionation ครั้งแรกได้ทดลองทำ fraction ละ 10 % saturation ก่อน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า fraction ที่ 20-30 % saturation มี specific activity สูงที่สุดซึ่งสูงกว่า crude enzyme ประมาณ 3.7 เท่า ส่วน fraction ที่รองลงมาได้แก่ 30-40 % และ 40-50 % saturation ตามลำดับ ในการทดลองครั้งต่อมาจึงแบ่งทำ fractionation เป็น 0-20 %, 20-45 %, 45-60 % และ 60-100 % saturation ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าที่ fraction 20-45 % saturation จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.8 เท่า และมี yield 75 % ดังนั้นในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป จึงใช้ fraction 20-45 % saturation ไปผ่าน Sephadex G-100

3.3.1.1 ผลของ ammonium sulfate ต่อการวัด activity ของเอสเทอเรส

หลังจากการทำ ammonium sulfate fractionation แล้ว เมื่อนำเอาเอนไซม์ไปวัด activity จะมี ammonium sulfate ติดไปอยู่ใน reaction mixture อย่างมากที่สุดประมาณ 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยคิดจาก fraction 60-100 % saturation จึงจำเป็นจะต้องหาว่า ammonium sulfate มีผลต่อ activity ของเอสเทอเรสหรือไม่ จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่า ammonium sulfate มีผลในการเพิ่ม activity ของเอสเทอเรส เช่น 0.02 % ammonium sulfate จะไปเพิ่ม activity ของเอสเทอเรสประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ fraction ที่จะนำเอาไปใช้ต่อไปคือ 20-45 % saturation ซึ่งจะมี ammonium sulfate ติดมาอยู่ใน reaction mixture ประมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะไปเพิ่ม activity ของเอนไซม์ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ จึงถือได้ว่า ammonium sulfate ที่ติดมากับเอนไซม์หลังจากการทำ ammonium sulfate fractionation มีผลต่อการวัด activity ของเอสเทอเรสน้อยมาก

ตารางที่ 4

ผลของ ammonium sulfate fractionation เมื่อทำ fractionat

10 % saturation

Preparation	Volume (ml.)	Esterase activity (units/ml.)	Protein วัดโดยวิธีของ Lowry(mg./ml.)	Specific activity (unit/mg. protein)	Total activity (units)	Purification (folds)	%yield
crude enzyme	120	1.276	7.232	0.176	153	1	100
0-10 %	25	0.040	0.666	0.060	1	0.3	0.6
10-20%	25	0.121	1.531	0.079	3	0.4	2
20-30%	200	0.380	0.570	0.666	76	3.7	49
30-40%	100	0.464	1.532	0.303	46.4	1.7	30
40-50%	25	0.484	5.762	0.084	12.1	0.4	8
50-60%	25	0.084	3.818	0.022	2.1	0.1	1.4
60-100%	25	0.035	2.188	0.016	0.8	0.1	0.5

ตารางที่ 5

ผลของ ammonium sulfate fractionation

Preparation	Volume (ml.)	Esterase activity (units/ ml.)	Protein ที่ได้จากวิธีของ Lowry (mg./ml.)	Specific activity (unit/ mg.protein)	Total activity (units)	purification) (folds)	%yield
crude enzyme	130	1.224	7.248	0.169	159	1	100
0 - 20 %	25	0.173	2.470	0.070	4.3	0.4	3
20- 45 %	500	0.234	0.770	0.304	117	1.8	75
45- 60 %	25	0.126	5.478	0.023	3.2	0.1	2
60-100 %	25	0.047	2.611	0.018	1.2	0.1	1

ตารางที่ 6

ผลของ ammonium sulfate ต่อการวัด activity ของเอสเทอเรส

ความเข้มข้นของ ammonium sulfate(%w/v)	Esterase activity(unit)	% activity
0	0.330	100
0.001	0.339	103
0.003	0.339	103
0.010	0.339	103
0.020	0.358	108
0.050	0.374	113
0.100	0.369	112

3.3.1.2 ผลของการ dialysis หลังจากการทำ ammonium sulfate fractionation

จาก fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก ammonium sulfate fractionation แล้วนำไป dialyse ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 17 และ 30 ชั่วโมงที่ 4 °ซ โดยได้เปลี่ยนน้ำ 4 และ 7 ครั้ง ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่า การทำ dialysis จะทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลงไปมาก และถ้ายิ่งเพิ่มเวลาในการ dialysis activity ก็ยิ่งลดลง เช่น fraction ที่ 20-30 % saturation เมื่อ dialyse 17 ชั่วโมง activity ลดลงประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อ dialyse 30 ชั่วโมง จะลดลงถึง 42 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหลังจากการทำ ammonium sulfate fractionation แล้วจึงไม่เหมาะที่จะทำ dialysis ต่อไป

3.3.2 ผลของ Gel-filtration

ในการที่จะทำให้ได้เอสเทอเรสที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จึงได้นำ ammonium sulfate fractionation ของ fraction ที่20-45 % saturation ไปผ่าน Sephadex G-100 เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ และมี percent yield พอสมควร จึงได้ทดลองหาปริมาตรและความเข้มข้นของ crude enzyme ที่จะใช้ผ่าน Sephadex G-100 column ได้ทดลองใช้ crude enzyme 10 มิลลิลิตรซึ่งมีโปรตีนเข้มข้นประมาณ8มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าได้ความบริสุทธิ์เป็น 7 เท่า และ percent yield ประมาณ48 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ปริมาณ 20 มิลลิลิตรผ่าน Sephadex G-100 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 จะเห็นว่าได้ความบริสุทธิ์เป็น 8.7 เท่า ได้ yield ประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ และได้ recovery yield 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดย Gel-filtration ทุกครั้ง จึงใช้ปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากันครั้งหลังนี้

ในการทดลองได้ใช้ Sephadex column ยาว 45 เซ็นติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซ็นติเมตร มี 0.20 M โซเดียมคลอไรด์เป็น eluant และใช้ flow rate 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บ fraction ละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 72 fractions แล้วเอาแต่

ละ fraction ไปวัด activity ของเอสเทอเรสตามวิธี 2.4 วัดabsorbance ที่ 280 nm โดยใช้ spectrophotometer (ของบริษัท Unicam, Model SP-500) และหาปริมาณของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry et al (1951) ผลการทดลองแสดงในรูปที่6 และ ตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า fraction ทั้งหมดที่เก็บไว้ทั้ง 72 fractions จะมี activity ของเอสเทอเรส เริ่มตั้งแต่ fraction number ที่ 10 ถึง 26 โดยมี activity สูงสุดอยู่ที่ fraction number 19 และหลังจาก fraction number ที่ 26 จะไม่พบ activity ของเอนไซม์อีกเลย การวัดโปรตีนโดยวิธีวัด absorbance ที่ 280 nm ปรากฏว่าได้ 2 peaks โดยมีจุดยอดของ peak อยู่ที่ fraction number ที่ 11 และ 35 แต่การหาปริมาณของโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry et al (1951) ได้ peak ของโปรตีนทั้งหมด 5 peaks ซึ่งมีจุดยอดของ peak อยู่ที่ fraction number 21, 29, 35 และ 40 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ peak ของโปรตีนกับของ absorbance จะเห็นได้ว่า 2 peaks แรกของโปรตีนไม่สัมพันธ์กับ absorbance เลย ส่วน 3 peaks หลังของโปรตีนสัมพันธ์กับ absorbance เล็กน้อย

ตารางที่ 7

ผลของการ dialysis ของ fraction ที่ได้จาก ammonium sulfate fractination

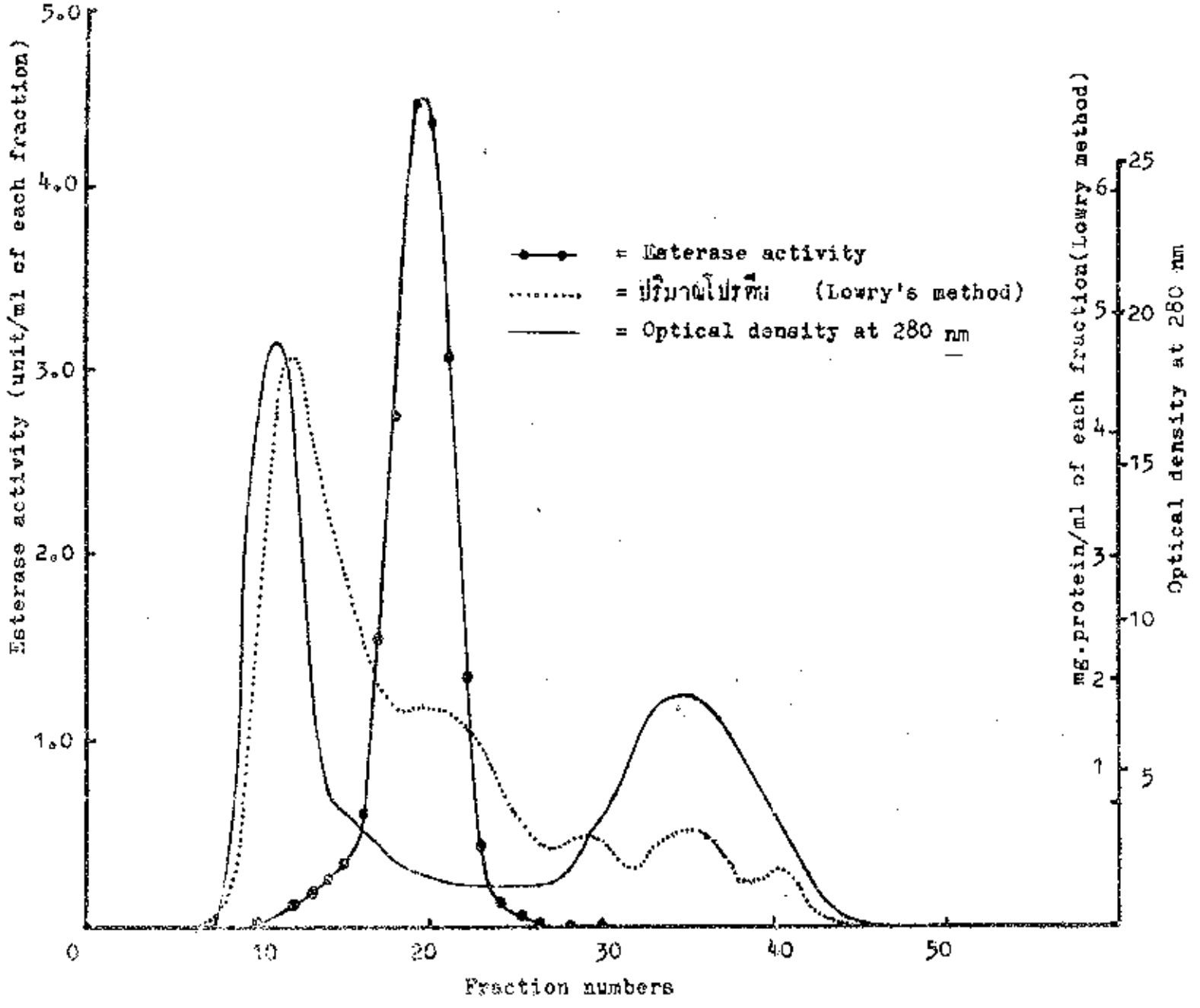
fraction (% saturation)	% loss of activity	
	17 hrs.dialysis	30 hrs. dialysis
0 - 10	32	49
10 - 20	35	58
20 - 30	11	42
30 - 40	3	42
40 - 50	36	75
50 - 60	5	25

ตารางที่ 8

ผลของการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ammonium sulfate fractionation และ gel-filtration

Preparation	Volume (ml.)	Esterase activity (Units/ ml.)	Protein วัดโดยวิธีของ Lowry (mg./ml.)	Specific activity (units/ mg.protein)	Total activity (units)	Purification (folds)	%yield
crude enzyme	100	1.265	7.200	0.175	126	1	100
20-45 %sat^{n}	20	4.795	16.54	0.290	96	1.7	76
fraction number 17-22	30	2.566	1.684	1.523	77	8.7	61

รูปที่ 6 ผลของ gel filtration เมื่อใช้สารละลายที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (20-45%sat^{n}) 20 มิลลิลิตร ใช้ 0.2M NaCl เป็น eluant, flow rate 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บ fractions ละ 5 มิลลิลิตร



3.4 การศึกษาเอนไซม์เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100

3.4.1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอสเทอเรส

ได้นำเอาเอนไซม์เอสเทอเรสที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 ซึ่งได้ความบริสุทธิ์เพิ่มจากเดิมประมาณ 8.7 เท่า มาศึกษาผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อ activity ของเอนไซม์ โดยวัด activity ที่ pH 7.8 และอุณหภูมิของห้องใช้ความเข้มข้นของ substrate ตั้งแต่ 0 ถึง 0.75 x 10^{-3} M จากรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของ substrate ประมาณ 0.60 x 10^{-3} M จึงเริ่มเข้าเขต optimum substrate concentration

รูปที่ 8 แสดง Lineweaver and Burk's plot (1934) ซึ่งเป็นการ plot ระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{S}$ ปรากฏว่าได้เส้นตรงดีพอสมควร

จากกราฟจะได้ค่า

intercept = $\frac{1}{V}$ = 2.8 $unit^{-1}$

จะได้ V = 0.35 unit

และ slope = $\frac{Km}{V}$ = 0.475

จากนี้คำนวณได้ว่า

Michaelis-Menten constant (Km) = 0.16 x 10^{-3} M

3.4.2 ผลของ pH ต่อ activity ของเอสเทอเรส

ได้ทดลองวัด activity ของเอนไซม์เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 ที่ pH ต่าง ๆ กันตั้งแต่ pH 5.0 ถึง 9.0 ที่อุณหภูมิของห้อง โดยใช้ความเข้มข้นของ substrate 0.65 x 10^{-3} M. จากรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่า ที่ pH 5.0 เอนไซม์จะไม่มี activity เลย แต่ activity จะเพิ่มขึ้น

เมื่อ pH สูงขึ้น จนกระทั่งถึง pH ประมาณ 7.2 ถึง 7.8 activity จะมากที่สุด pH ตั้งแต่ 8.0 ขึ้นไป activity จะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วน non-enzymic activity เหมือนกับในผลการทดลองใน 3.2.2 ในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงวัด activity ของเอนไซม์ที่ pH 7.8 ซึ่งอยู่ในช่วง optimum pH และมี non-enzymic activity ไม่สูงนัก

3.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของเอสเทอเรส

ในการทดลองนี้ได้ใส่ reaction mixture ซึ่งมีความเข้มข้นของ substrate 0.65×10^{-3} M. และอย่างอื่นครบทุกอย่างยกเว้นเอนไซม์ลงใน reaction flask ซึ่งแช่อยู่ภายใน Water Jacketed Vessel ของเครื่องมือ pH-Stat อีกที่หนึ่ง และมีน้ำที่มีอุณหภูมิที่ต้องการหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา และรอประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของ reaction mixture เท่ากับอุณหภูมิที่ต้องการ ครั้นแล้วจึงเริ่มวัด activity ของเอนไซม์ที่ pH 7.8 ได้ทำการทดลองตั้งแต่อุณหภูมิ 20° ถึง 50° ซ ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20° ซ substrate จะตกผลึกลงมาและจับที่ electrode จากรูปที่ 10 จะเห็นว่าอุณหภูมิตั้งแต่ 20° ถึง 30° ซ activity จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ แต่หลังจาก 30° ซ ขึ้นไปแล้ว activity จะลดลงอย่างรวดเร็ว เอสเทอเรสจะมี activity มากที่สุดที่ 30° ซ ซึ่งสูงกว่าเมื่อวัดที่อุณหภูมิของห้องประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไปทุกครั้งจึงวัดที่อุณหภูมิของห้อง

ในรูปที่ 11 Arrhenius plot ซึ่งเป็นการ plot ระหว่าง log activity กับ $\frac{1}{T}$ ปรากฏว่าได้เป็นเส้นตรงดีพอสมควร

จากกราฟจะได้

$$\text{slope} = 1.136 \times 10^{3} = \frac{A}{2.303R}$$

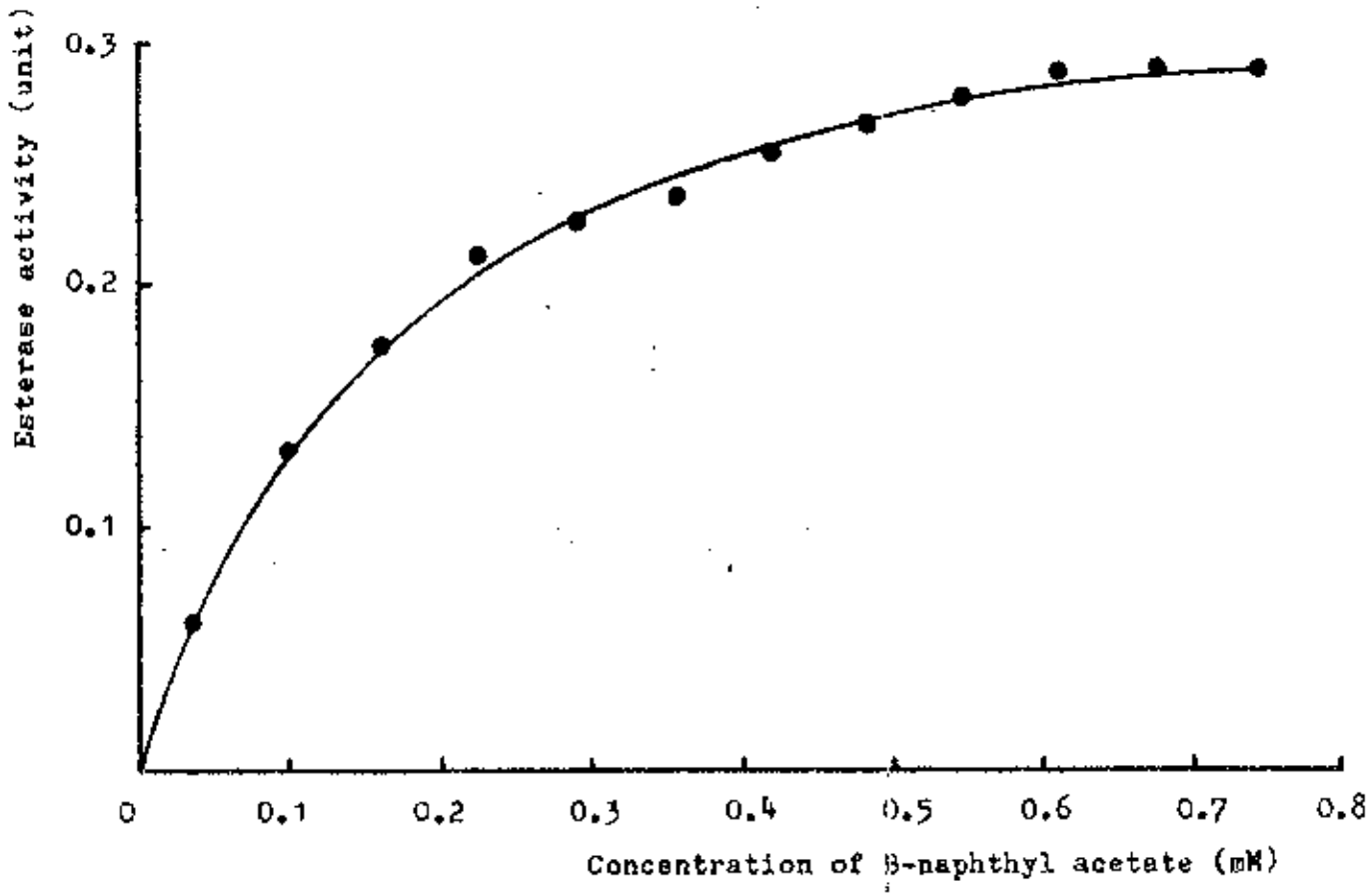
A = activation energy

R = gas constant = 1.987 cal /deg /mole

ดังนั้นจะได้ค่า activation energy = 5203 cal./mole

รูปที่ 7

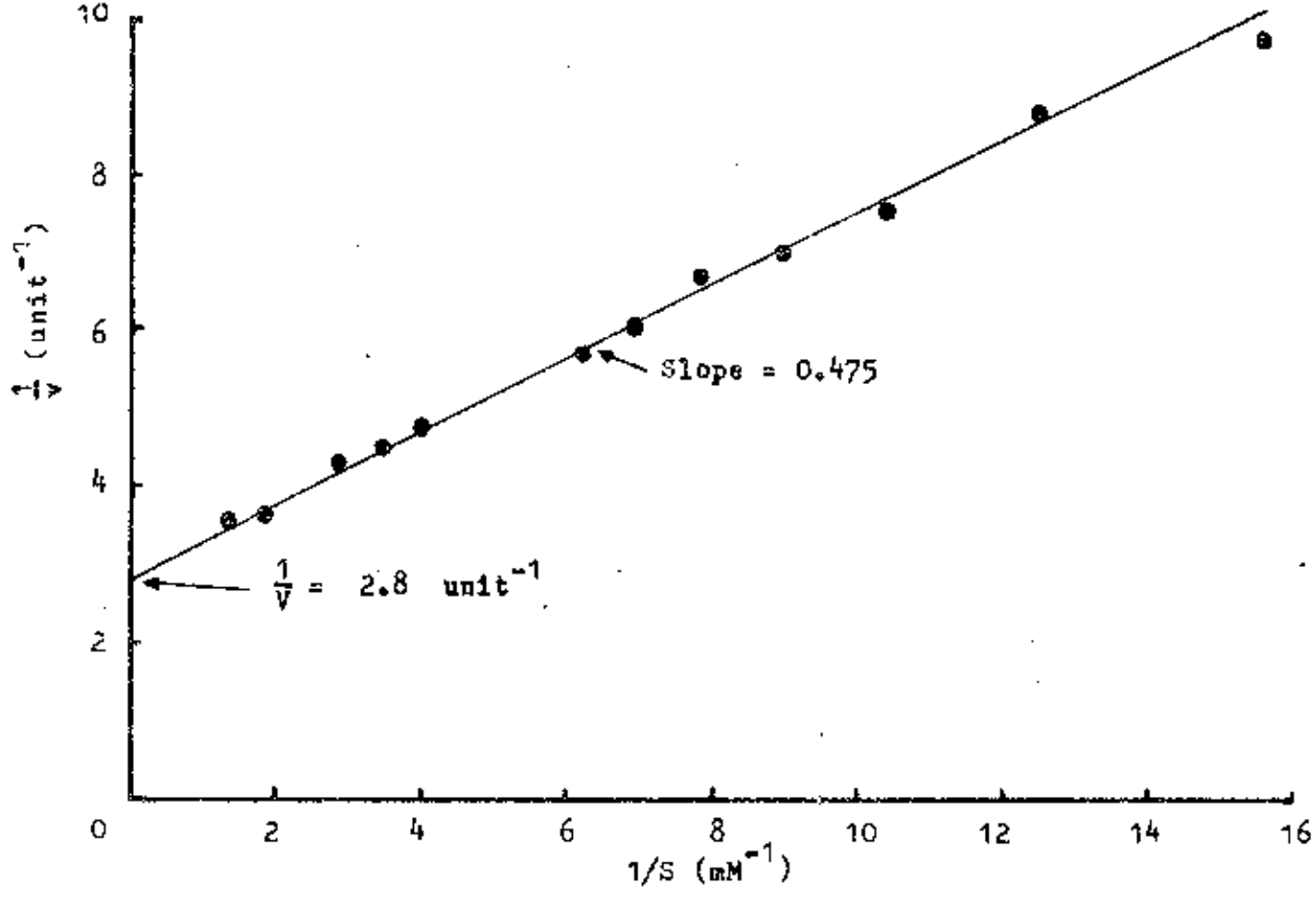
ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100



รูปที่ 8

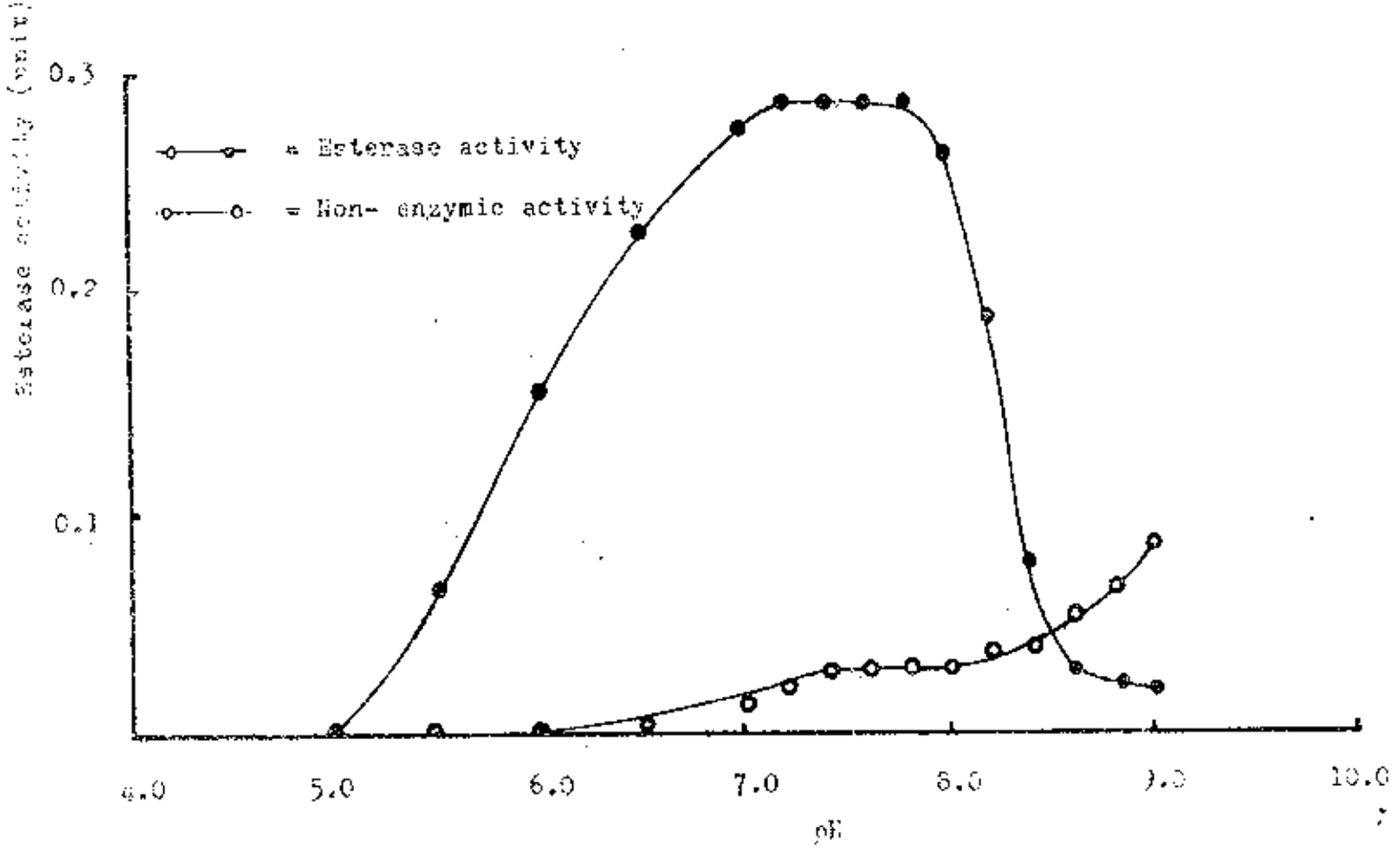
แสดงการหา Km ของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100

โดยใช้ Lineweaver and Burk's Plot



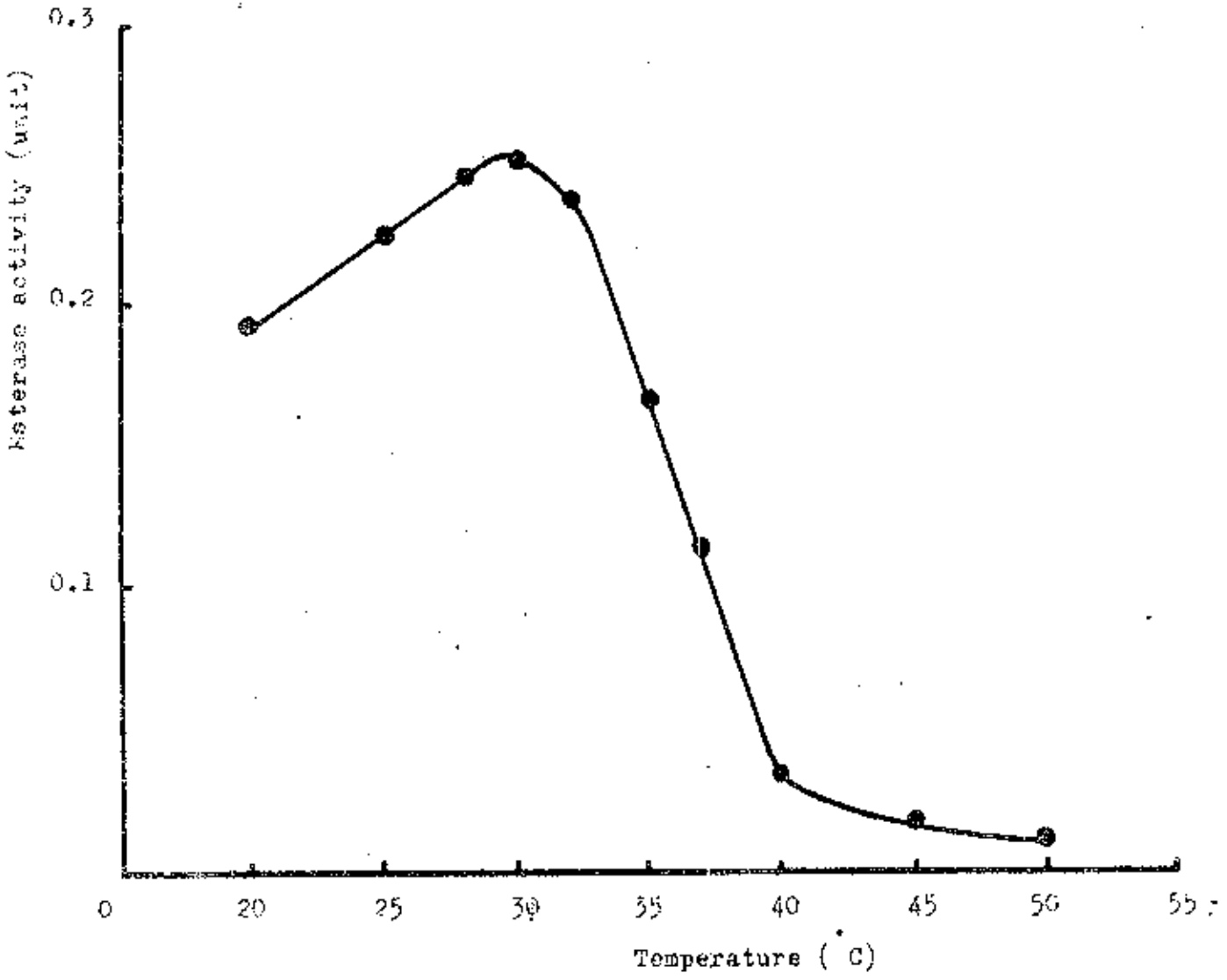
รูปที่ 9

แสดง pH ที่เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100



รูปที่ 10

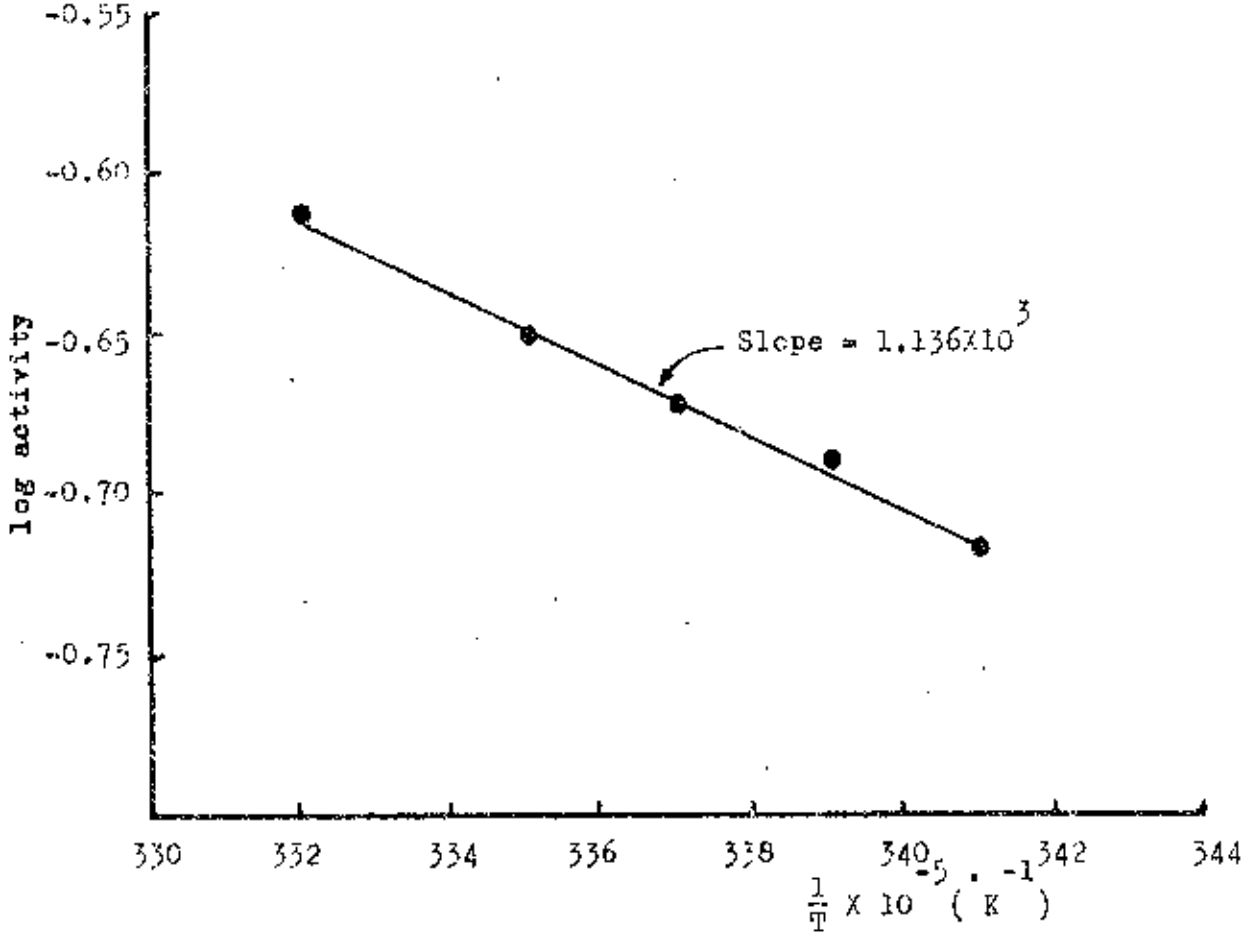
ผลของอุณหภูมิต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G- 100



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11

แสดง Arrhenius plot ของการ hydrolysis of β-naphthyl acetate
โดยเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100



3.4.4 ความเสถียร (stability) ของเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิสูง ๆ

ได้ใช้เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 ครั้งละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน incubator bath ซึ่งตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้ (ระหว่าง 40° - 60°ซ) ต่อจากนั้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันระหว่าง 2-60 นาที จึงนำเอาเอนไซม์ที่แช่ไว้นี้ไปวัด activity ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่าเอสเทอเรสถูก inactivate โดยความร้อนง่ายมาก เช่น ที่ 50°ซ เอนไซม์จะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ในเวลา 30 นาที แต่ถ้าให้ความร้อนที่ 60°ซ จะใช้เวลาเพียง 2 นาทีเท่านั้น

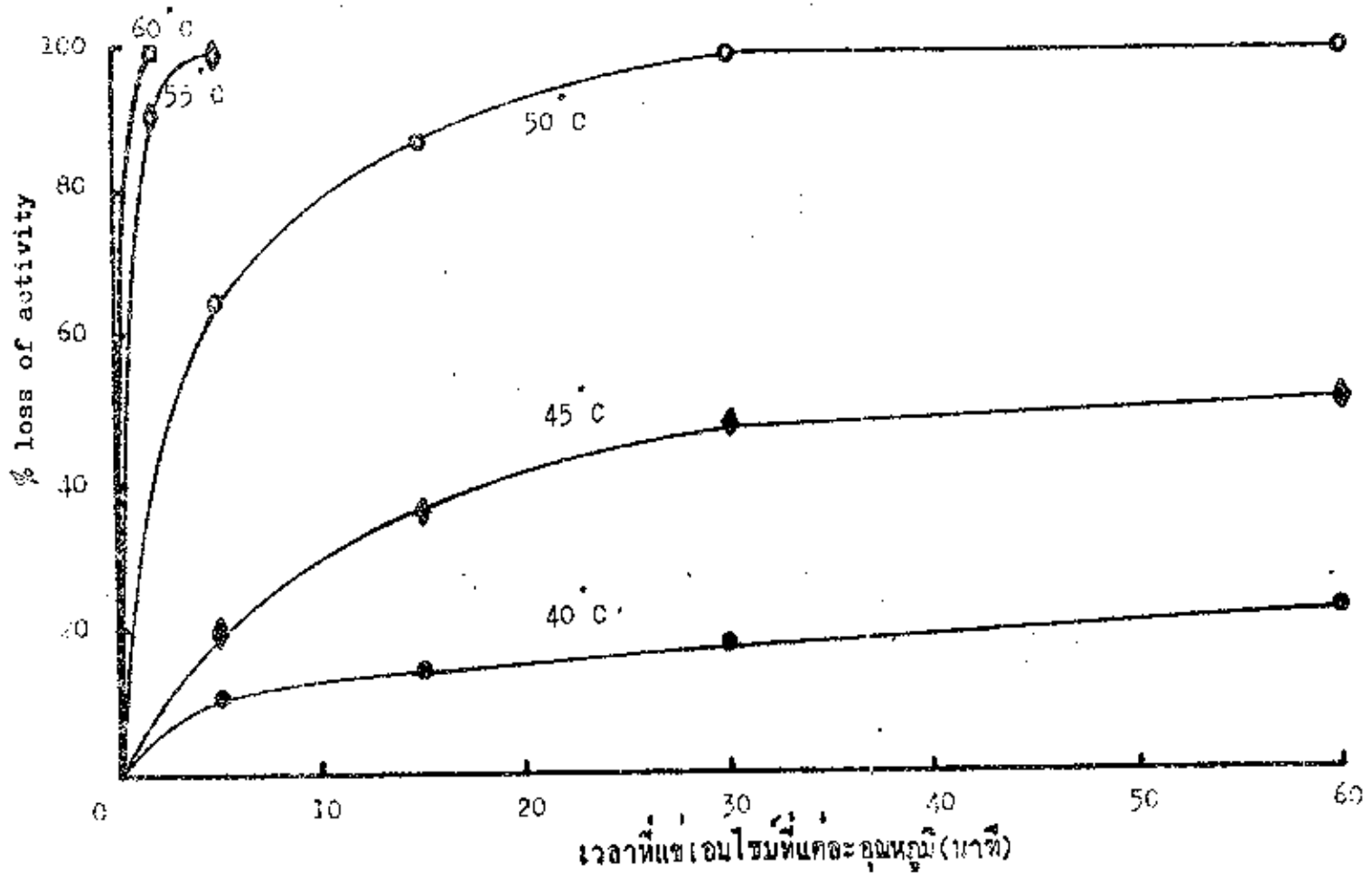
3.4.5 ความเสถียร (stability) ของเอสเทอเรสที่ pH ต่าง ๆ

ได้ทดลองนำเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G -100 มาแช่ในกรดและด่างที่ pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 2.0 ถึง 11.0 ที่อุณหภูมิของห้อง โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดเกลือที่เข้มข้น 0.1-0.5 M ใส่ลงไปในสารละลายของเอนไซม์เพื่อให้ได้ pH ตามต้องการ ต่อจากนั้นจึงปิเปตต์เอนไซม์ออกมาที่เวลาต่าง ๆ กัน ปรับ pHให้เป็น 7.8 แล้ววัด activity สำหรับ control ได้เติมน้ำลงไปแทนกรดหรือด่างในจำนวนที่เท่ากัน แล้วจึงนำไปวัด activity ในทำนองเดียวกันจะเห็นได้จากในรูปที่ 13 ว่า เอสเทอเรสเสีย activity ได้ง่ายที่ pH ต่ำ ๆ หรือสูงมาก ๆเช่น เมื่อแช่ที่ pH 4.0 นาน 10 นาที จะเสีย activity ไปถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และที่ pH 2.0 จะเสียสภาพของเอนไซม์ไปภายใน 5 นาทีเท่านั้น เมื่อเพิ่ม pH ขึ้นเรื่อย ๆ การเสีย activity จะลดลง และเอสเทอเรสมีความเสถียรมากที่สุดที่ pH 7.0-8.0ถ้า pH สูงกว่านี้การเสีย activity ของเอนไซม์จะมากขึ้น อีกตาม pH ที่เพิ่มขึ้น เช่น แช่ไว้ที่ pH 11.0 จะเสีย activity ไปถึง 97 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 5 นาที

ในการศึกษาความเสถียรของเอสเทอเรสที่ pH ต่าง ๆ ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมว่า substrate จะมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์หรือไม่ (Dixon & Webb, 1964) โดยแช่เอนไซม์ซึ่งมี substrate รวมอยู่ด้วย ไว้ที่ pH ต่ำ ๆ หรือสูง ๆ

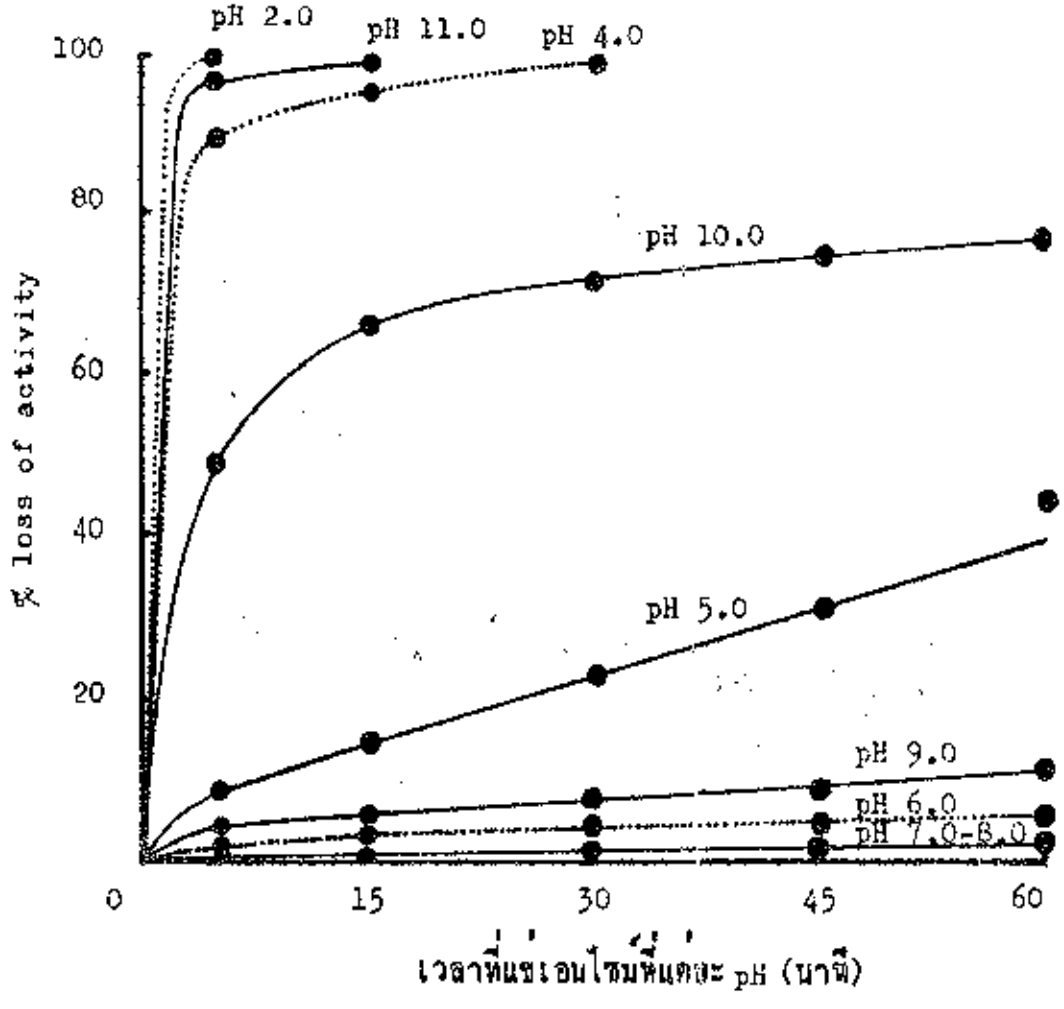
รูปที่ 12

ผลการสูญเสียสภาพของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน



รูปที่ 13

ผลการสูญเสีย esterase activity เมื่อแช่ใน NaOH(0.1-0.5 M)
หรือ HCl(0.1-0.5 M) ที่ pH ต่างๆกันและที่อุณหภูมิของห้อง (28°C)

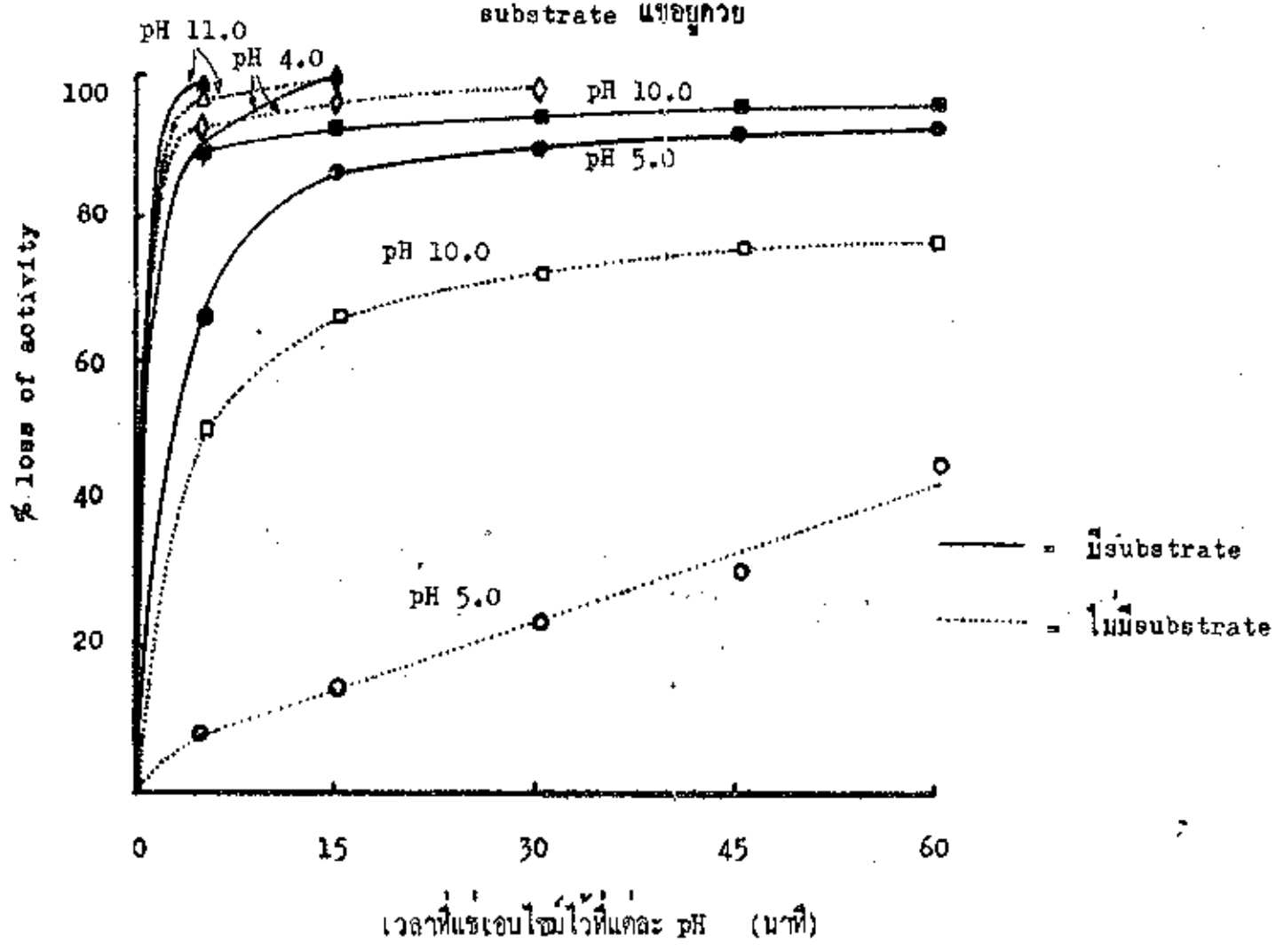


เพื่อจะเปรียบเทียบดูการเสีย activity ของเอนไซม์ระหว่างการแช่เอนไซม์อย่างเดียวกับการแช่เอนไซม์รวมกับ substrate ได้ทดลองแช่เอนไซม์ซึ่งมี substrate อยู่ 0.65×10^{-3} M โซเดียมคลอไรด์ 0.15M และเมทิลแอลกอฮอล์ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ไว้ที่ pH 4.0, 5.0, 10.0 และ 11.0 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิของห้อง ที่เวลาต่าง ๆ กันจึงปิเปตต์ออกมาโดยให้มีปริมาณของเอนไซม์เท่ากับที่ทำ control แล้วใส่ลงไปใน reaction mixture ตามปกติเพื่อวัด activity ของเอนไซม์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 จะเห็นว่าที่ pH 4.0กับ 11.0 การแช่ทั้ง 2 วิธี มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่การแช่เอนไซม์ที่มี substrate อยู่ด้วยที่ pH 5.0 และ 10.0 จะทำให้เอนไซม์นั้นเสีย activity ไปมากกว่าเอนไซม์ที่แช่ไว้โดยไม่มี substrate รวมอยู่ด้วย

3.4.6 <u>การสูญเสีย activity ของเอสเทอเรสเมื่อเก็บไว้ที่ -20° ซ</u>

เอนไซม์เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่งได้จากการรวม fraction number 17-22 จาก Sephadex column และมีความบริสุทธิ์ประมาณ 8.7 เท่า นำมาแบ่งใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดสนิท หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20° ซ ต่อจากนั้นจึงนำเอนไซม์ไปวัด activity เมื่อเก็บไว้นานเป็นเวลาต่าง ๆ กัน จนถึง 3 เดือน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าเอสเทอเรสจะเสีย activity ไปมากเมื่อเก็บไว้นาน ๆ เช่น เมื่อเก็บไว้ 1 เดือน จะเสีย activity ไปประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บไว้ 3 เดือนจะเสีย activity ไปประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 4 เปรียบเทียบการสูญเสีย esterase activity เมื่อแช่ใน pH ต่างๆกันที่อุณหภูมิของห้อง(29°C) เมื่อมี substrate กับเมื่อไม่มี substrate แช่อยู่ด้วย



ตารางที่ 9

แสดงการสูญเสียของเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ -20 °ซ

ระยะเวลาที่เก็บเอนไซม์ไว้ (วัน)	Esterase activity(unit)	%loss of activity
0	0.305	0
10	0.253	17
20	0.216	29
30	0.167	45
60	0.122	60
70	0.100	67
90	0.076	75

3.4.7 ผลของตัวห้ามปฏิกริยาต่อเอสเทอเรส

ได้ทำการทดลองเพื่อดูว่าตัวห้ามปฏิกริยาของเอนไซม์มีผลอย่างไรต่อเอสเทอเรสในตารางที่ 10 จะเห็นว่า Iodoacetamide, mercuric chloride, sodium arsenite และ β-naphthol เป็นตัวห้ามปฏิกริยาของเอสเทอเรสได้ดี Iodoacetic acid, pot. fluoride, pot. iodide, calcium chloride และ magnesium chloride สามารถห้ามปฏิกริยาได้บาง ส่วน sodium acetate ไม่สามารถห้ามปฏิกริยาของเอสเทอเรสได้

3.4.8 ผลของ substrate บางชนิดต่อเอนไซม์เอสเทอเรส

ได้ทดลองศึกษา substrate บางชนิดซึ่งแตกต่างไปจาก β-naphthyl acetate ได้แก่ p-nitrophenyl acetate, n-propyl gallate และ triacetin การเตรียมสารละลายของ substrate เหล่านี้เตรียมเหมือนกับ β-naphthyl acetate ยกเว้น triacetin

ซึ่งจะละลายน้ำได้ดี ส่วนใน reaction mixture จะมีส่วนประกอบเหมือนกันคือมี substrate 0.65×10^{-3} M. โซเดียมคลอไรด์ 0.15 M เมทิลแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซ็นต์ และมีเอนไซม์อยู่ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate ของเอสเทอเรส จะทำให้เอนไซม์มี activity มากที่สุดในจำนวน substrate ทั้งหมด 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมี activity มากกว่าเมื่อใช้ β-naphthyl acetate เป็น substrate ประมาณ 3 เท่า ส่วน n-propyl gallate และ triacetin ไม่ปรากฏว่าเป็น substrate ของเอสเทอเรสได้เลย

3.4.8.1 <u>ผลของความเข้มข้นของ p-nitrophenyl acetate ต่อเอสเทอเรส</u>

ได้ทดลองใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate ของเอสเทอเรสแทน β-naphthyl acetate ซึ่งได้ใช้มาตลอดทุกการทดลอง จากรูปที่ 15 จะเห็นได้ว่า ลักษณะของ curve ที่ได้คล้ายกับเมื่อใช้ β-naphthyl acetate เป็น substrate แต่ความเข้มข้นของ p-nitrophenyl acetate ประมาณ 0.75×10^{-3} M จึงเริ่มเข้าเขต optimum substrate concentration

รูปที่ 16 แสดง Lineweaver and Burk's plot ซึ่งเป็นการ plot ระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{S}$ ปรากฏว่าได้เส้นตรงดีพอสมควร

จากกราฟจะได้

intercept $= \frac{1}{V} = 1.50 \text{ unit}^{-1}$

จะได้ $V = 0.66$ unit

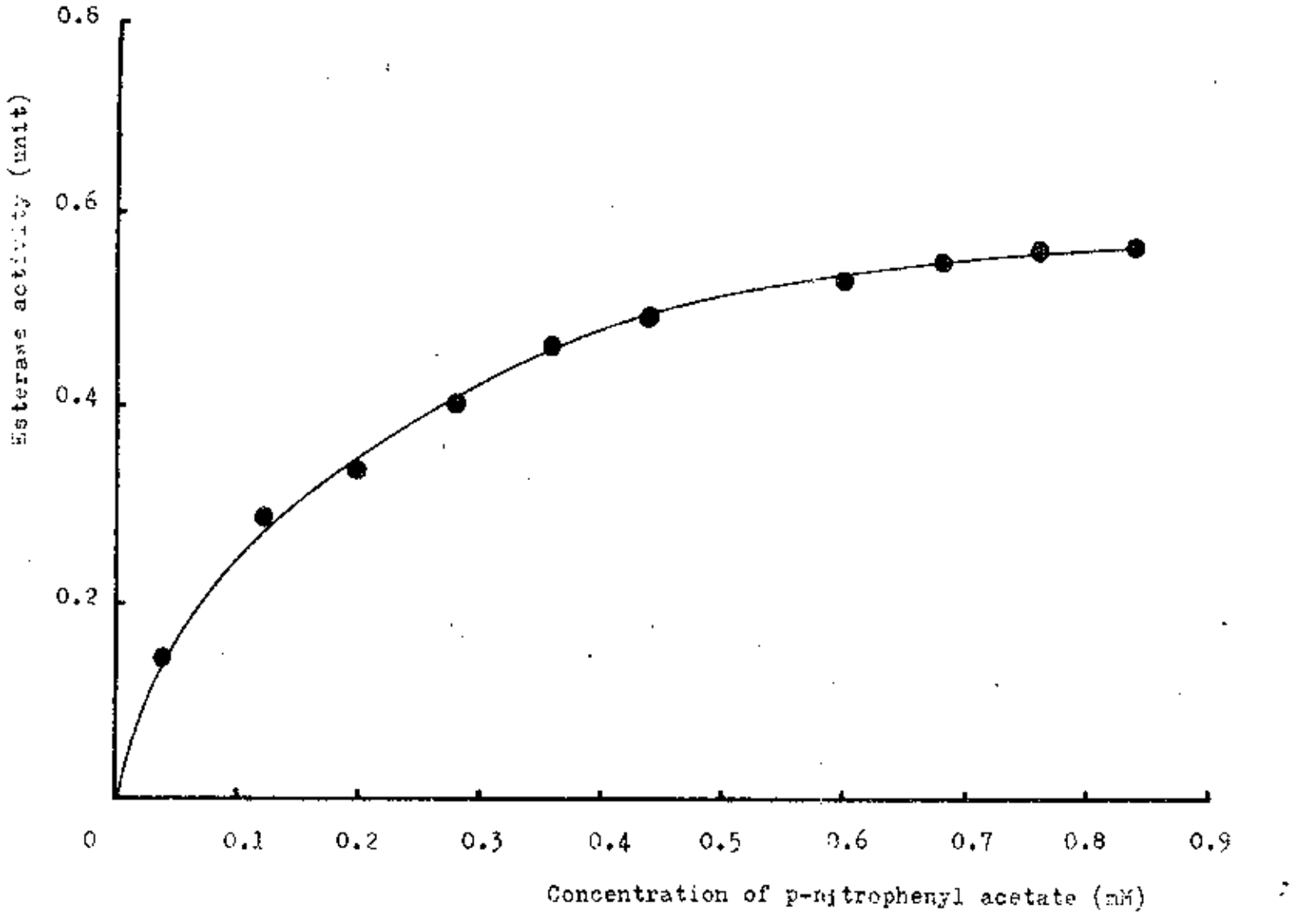
และ slope $= \frac{Km}{V} = 0.22$

ดังนั้น Michaelis-Menten constant (Km) $= 0.15 \times 10^{-3}$ M

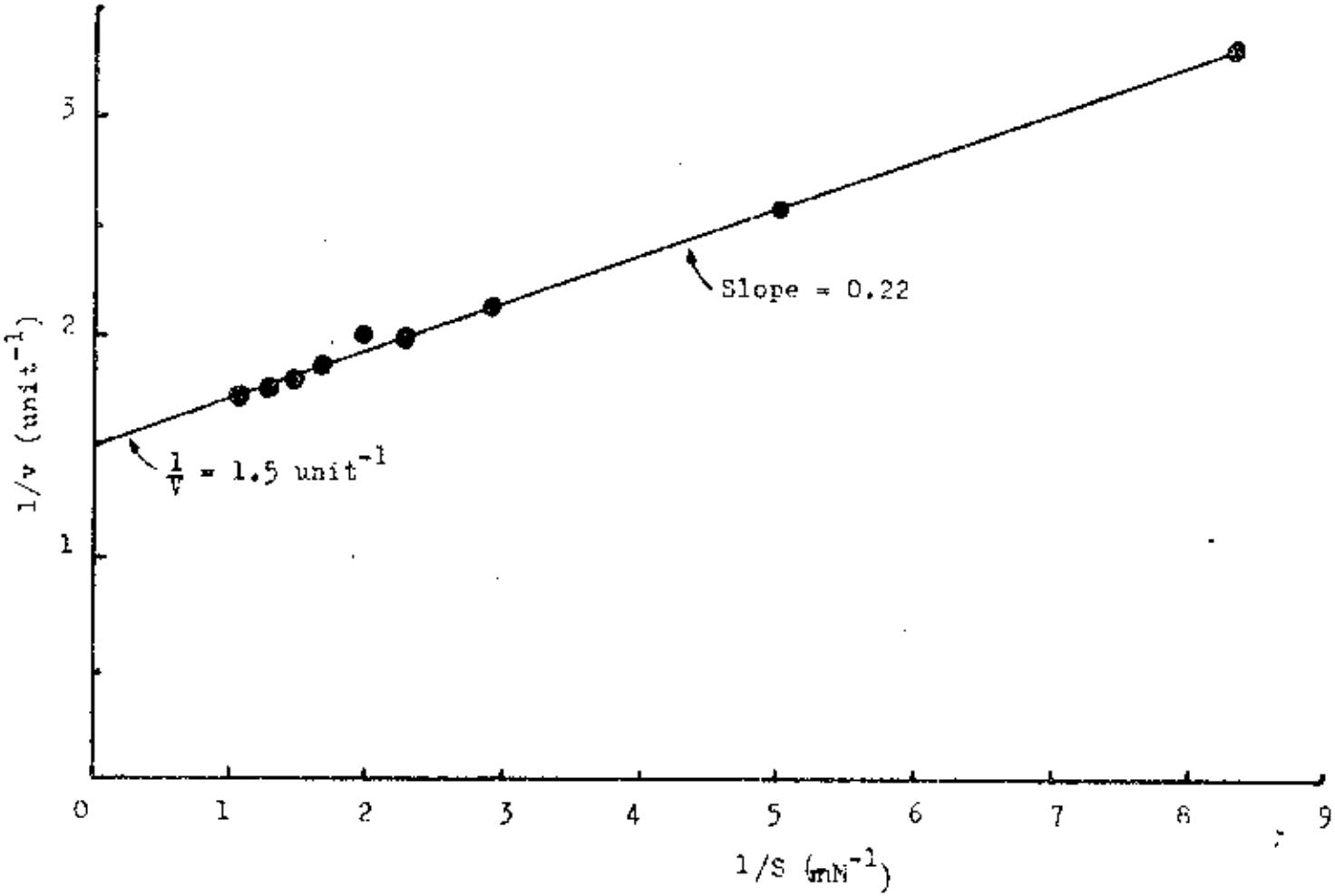
ค่า Km ที่ได้มีใกล้เคียงกับเมื่อใช้ β-naphthylacetate เป็น substrate คือเมื่อใช้ β-naphthyl acetate เป็น substrate จะได้ค่า Km เท่ากับ 0.16×10^{-3} M (ดู 3.4.1)

รูปที่15

ผลของความเข้มข้นของp-nitrophenyl acetate ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยผ่านSephadex G-100



รูปที่ 16 แสดงการหา Km ของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100 โดยใช้ Lineweaver and Burk's Plot เมื่อใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate

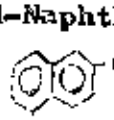


ตารางที่ 10

แสดงผลของตัวห้ามเอนไซม์ต่อเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยการผ่าน Sephadex G-100

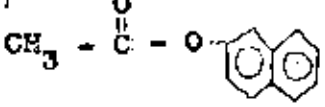
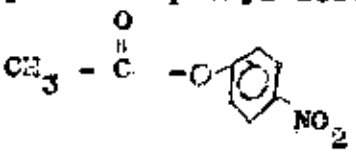
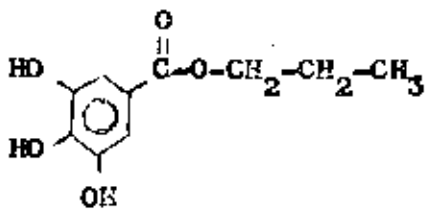
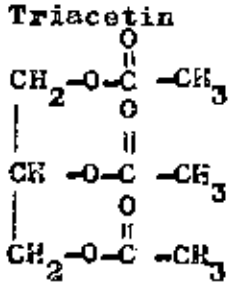
สารที่ทดลอง	ความเข้มข้น (M)	% inhibition
Iodoacetic acid	0.075	0
(ICH_2COOH)	0.150	7
Iodoacetamide	0.007	10
(ICH_2CONH_2)	0.008	23
	0.013	89
	0.100	95
Mercuric chloride	0.40×10^{-6}	75
($HgCl_2$)	2.0×10^{-6}	85
	2.0×10^{-5}	92
	3.33×10^{-4}	95
	2.00×10^{-3}	100
Sodium Arsenite	6.60×10^{-5}	1
($NaAsO_2$)	2.0×10^{-4}	37
	6.0×10^{-4}	53
	1.0×10^{-3}	71
	2.0×10^{-3}	83
Pot.fluoride	2.5×10^{-4}	17
(KF)	8.3×10^{-4}	30
	2.5×10^{-3}	48
	2.5×10^{-2}	80
	0.25	95

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สารที่ทดลอง	ความเข้มข้น (M)	% inhibition
Pot. iodide (KI)	0.020	0
	0.066	3
	0.100	4
	0.200	31
Cal. chloride ($CaCl_2$)	1.00×10^{-6}	0
	1.00×10^{-5}	3
	1.00×10^{-3}	6
	0.01	10
	0.10	50
	0.15	73
	0.20	95
Mag. chloride ($MgCl_2$)	0.0001	0
	0.001	6
	0.033	19
	0.066	26
	0.100	50
	0.120	69
	0.200	89
β-Naphthol 	0.1×10^{-4}	7
	1.0×10^{-4}	26
	1.0×10^{-3}	40
	3.3×10^{-3}	74
Sod. acetate (CH_3COONa)	0.10	0

ตารางที่ 11

แสดงผลของ substrate บางชนิด ต่อเอสเทอเรส

Substrate ที่ใช้	Esterase activity (unit)
β - Naphthyl acetate 	0.258
p - Nitrophenyl acetate 	0.865
n - Propyl gallate 	0
Triacetin 	0

วิจารณ์ผลการทดลอง

Andrews (1965) ได้ทำเอสเทอเรสจาก wheat-germ ให้บริสุทธิ์โดยวิธี gel-filtration โดยให้ผ่าน Sephadex G-100 column (50cm.x 2.4cm.diam.) ใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 M เป็น eluant flow rate 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ปรากฏว่าแยกเอสเทอเรสออกมาได้ peak เดียว และมีจุดยอดของ peak อยู่ตรงกับปริมาตรของ effluent 104 มิลลิลิตร ซึ่งเขาสรุปว่ามีเอสเทอเรสอยู่เพียงตัวเดียวที่ไฮโดรไลส์ triacetin และมีน้ำหนักโมเลกุล 5100 ในการทำเอสเทอเรสจากรำข้าวให้บริสุทธิ์ โดยให้ผ่าน Sephadex G-100 column (45cm. x 2.50 cm.diam.) ใช้ eluant ชนิดเดียวกัน และ flow rate เท่ากัน ปรากฏว่าแยกเอสเทอเรสออกมาได้ peak เดียวเช่นกัน และมีจุดยอดของ peak ตรงกับปริมาตรของ effluent 95 มิลลิลิตร ซึ่งบ่อมแสดงให้เห็นว่าเอสเทอเรสจากรำข้าวซึ่งไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate มีเพียงตัวเดียว แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่ได้ calibrate Sephadex G-100 column ที่ใช้แยกเอสเทอเรสจากรำข้าวเอาไว้ เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของเอสเทอเรสจากรำข้าวอย่างเดียว ๆ แต่อย่างไรก็ดีอาจจะลองเปรียบเทียบดูกับของ Andrews (1964) ก็ได้ ซึ่งเขา calibrate Sephadex G-100 column(50cm.x2.4cm.diam.) ไว้ด้วยโปรตีนชนิดต่าง ๆ กัน ซึ่งที่ elution volume 95 มิลลิลิตร จะใกล้เคียงกับของ serum albumin (bovine) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 65,000-70,000 ดังนั้นเอสเทอเรสที่แยกออกจากรำข้าวโดยวิธีนี้จึงควรมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ 65,000-70,000

ในการแยกเอสเทอเรสออกจากรำโดยวิธี gel-filtration เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของโปรตีนซึ่งวัดโดยวิธีของ Lowry et al (1951) กับactivity ของเอสเทอเรส จะเห็นได้ว่าไม่มีความสัมพันธ์กันเลย activity ของเอนไซม์สูง ๆ ไม่จำเป็นจะต้องมีปริมาณของโปรตีนสูงด้วย เพราะอาจเป็นไปได้ว่า enzymic protein เพียงส่วนนิดเดียวเท่านั้นก็สามารถให้ activity ของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์(Paul & Fottrell,1961) ส่วนการวัดปริมาณของโปรตีนโดยวิธีวัด absorbance ที่ 280 mm

นั้น เมื่อเปรียบเทียบกับการวัดปริมาณของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry et al (1951) พบว่าส่วนใหญ่แล้วไม่ค่อยสัมพันธ์กันเลย โดยเฉพาะ peak ที่สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการวัด absorbance ที่ 280 nm ถูกรบกวนเกี่ยวกับความขุ่นของสารละลาย (turbidity) ได้มากกว่า และการวัดปริมาณของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry et al (1951) นี้ยัง sensitive กว่าวิธีแรกถึง 10-20 เท่า และยังไม่ค่อยถูก interfere โดย free amino acids อีกด้วย (Lowry et al, 1951)

ในด้าน activity ของเอสเทอเรสจากรำข้าวทั้งที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์และที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดย ammonium sulfate fractionation และโดยวิธี gel-filtration ต่อ β-naphthyl acetate เมื่อ plot ระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{S}$ (Lineweaver & Burk, 1934) ปรากฏว่าได้กราฟออกมาเป็นเส้นตรงดีพอสมควร ซึ่งย่อมแสดงว่ามีเอนไซม์ตัวเดียวที่ไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate (Hofstee, 1952, 1954) สำหรับเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะมีค่า Km (Michaelis-Menten constant) 0.22×10^{-3}M ส่วนเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเท่ากับ 0.16×10^{-3}M Km ของเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ มีค่ามากกว่าของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเล็กน้อย แสดงว่า affinity ของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วต่อ β-naphthyl acetate ดีกว่าของเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ Burch (1954) พบว่าคุณสมบัติทาง kinetics ของเอนไซม์ชนิดเดียวกันอาจแตกต่างกันได้เนื่องจากความแตกต่างของ experimental condition Craig & Kistiakowsky (1958) พบว่า Km ของเอสเทอเรสจากกับของม้าเปลี่ยนแปลงไปตาม pH แม้จะใช้ substrate ตัวเดียวกัน Wilson & Cabib (1956) พบว่า ความแตกต่างของ Km ของ acetylesterase เมื่อใช้เอสเทอเรสของกรดอะซิติคชนิดต่าง ๆ กัน เป็น substrate เกิดเนื่องจากความแตกต่างในความสามารถของส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ของ substrate ที่จะไปรวมกับโมเลกุลของเอนไซม์ เช่นเมื่อเขาใช้ ethyl acetate เป็น substrate จะได้ค่า Km 0.5 M แต่เมื่อใช้ isoamyl acetate เป็น substrate จะได้ค่า Km 8×10^{-3}M นอกจากนี้เขายังพบว่าความแตกต่างของวิธีที่ใช้วัด activity ของเอนไซม์ยังทำให้ค่า Km แตกต่างกันด้วย เช่น เมื่อเขาใช้วิธี manometric ได้ค่า

Km 5×10^{-4} M แต่เมื่อใช้วิธี automatic titration จะได้ค่า Km 1×10^{-4} M

จากการศึกษาเอสเทอเรสในรำข้าว เมื่อวัด activity ของเอนไซม์โดยวิธี pH-stat titration แต่ใช้ substrate ต่างกัน เช่น เมื่อใช้ β-naphthyl acetate เป็น substrate จะได้ค่า Km 0.16×10^{-3} M และเมื่อใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate จะได้ค่า Km 0.15×10^{-3} M ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า Km ของเอสเทอเรส เมื่อใช้วิธีวัดวิธีเดียวกัน แต่ใช้เอสเทอของกรดอะซิติคต่างชนิดกันเกือบจะไม่มีความแตกต่างกันเลย และเมื่อเปรียบเทียบค่า Km ของเอสเทอเรสเมื่อใช้ p-nitrophenyl acetate เป็น substrate เหมือนกัน แต่วิธีที่ใช้วัด activity ของเอนไซม์ต่างกัน เช่น เมื่อใช้วิธี pH-stat titration จะได้ค่า Km 0.15×10^{-3} M แต่เมื่อใช้วิธี spectrophotometric จะได้ค่า Km 1.7×10^{-5} M (ไพเราะ ทิพยทัศน์, 2510) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าความแตกต่างกันของ Km ของเอสเทอเรสจากรำข้าวนั้นเกิดเนื่องจากความแตกต่างของวิธีที่ใช้วัด activity ของเอนไซม์มากกว่าความแตกต่างของเอสเทอของกรดอะซิติคที่ใช้เป็น substrate หรืออาจกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่าส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ของเอสเทอ มีความสำคัญต่อ activity ของเอนไซม์น้อยกว่าส่วนที่เป็นกรด (Ammon & Jaarma, 1950)

Ammon & Jaarma (1950) กล่าวว่าเอสเทอเรสโดยทั่ว ๆ ไปมักจะมี optimum pH อยู่ระหว่าง pH 5.0-9.0 Aldridge (1953 a,b) พบว่าเอสเทอเรสจากซีรัมของสัตว์หลายชนิดมี optimum pH ประมาณ 7.4 Mounter, Tuck, Alexander & Dien (1957) พบว่าเอสเทอเรสจากซีรัมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งไฮโดรไลส์ aromatic esters จะมี optimum pH ประมาณ 7.8 ซึ่ง Wilde & Kekwick (1964) พบว่าเอสเทอเรสจากซีรัมของคนมี optimum pH 7.9 และ Shibko & Tappel (1964) พบว่าเอสเทอเรสจากตับของหนูซึ่งไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate มี optimum pH 5.0 แต่ Craig & Kistiakowsky (1958)

พบว่าเอสเทอเรสในตับของม้ามี optimum pH 8.0 Jansen et al(1947) พบว่าเอสเทอเรสจาก citrus-fruit มี optimum pH 5.5-6.5 จะเห็นได้ว่าเอสเทอเรสที่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกันมักจะมี optimum pH ต่างกัน และแม้มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันแต่มาจากสัตว์ต่าง species กันก็อาจมี optimum pH ต่างกันได้ optimum pH จึงใช้แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ไม่ได้ (Frankel & Tarasouk, 1956)

เอสเทอเรสจากรำข้าวที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มี optimum pH 7.6 - 8.0 และเมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี gel-filtration มี optimum pH 7.2-7.8 นอกจากนี้จากผลการทดลองจะเห็นได้ชัดว่า เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วถูก inactivate ได้ง่ายเมื่อ pH ค่อนไปทางด่าง เช่น activity จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH สูงกว่า 8.0 ซึ่งเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะลดลงอย่างช้า ๆ

Bergmann & Rimon (1958) พบว่า เมื่อให้เอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากไตของหนูอยู่ใน pH ต่ำมาก ๆ หรือสูงมาก ๆ แล้วปรับ pH ให้กลับมาที่ pH 8.0 ซึ่งเป็น optimum pH ของเอสเทอเรสนั้น activity ของเอนไซม์จะกลับคืนมาได้ทั้งหมด แต่สำหรับเอสเทอเรสจากรำข้าวซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี gel-filtration เมื่อนำไปแช่ที่ pH ต่ำ ๆ หรือสูง ๆ ที่อุณหภูมิของห้องที่เวลาต่าง ๆ กัน แล้วปรับ pH ให้กลับมาที่ pH 7.8 ซึ่งเป็น optimum pH พบว่าเอสเทอเรสจะเสีย activity ไปมาก

Craig & Kistiakowsky (1958) พบว่า Km ของเอสเทอเรสจากตับของม้าจะเปลี่ยนแปลงไปตาม pH แม้สภาพอย่างอื่นทุกอย่างจะเหมือนกัน แต่ Dixon & Webb (1964) พบว่าผลของ pH ที่มีต่อ affinity ของเอนไซม์จะไม่แสดงความสำคัญถ้าใช้ความเข้มข้นของ substrate สูงมากพอที่จะทำให้เอนไซม์นั้นอิ่มตัวด้วย substrate เมื่อลองทำการทดลองกับเอสเทอเรสในรำข้าว โดยแช่เอนไซม์ไว้ที่ pH ที่เป็นกรดหรือเป็นด่างมาก ๆ พร้อม ๆ กับมี substrate ที่มีความเข้มข้นเท่ากับที่จะ assay จริง ๆ อยู่ด้วย เมื่อเปรียบเทียบ activity ของเอนไซม์ที่สูญเสียไปกับเอนไซม์ที่แช่ไว้ที่ pH นั้น ๆ แต่ไม่มี substrate อยู่ด้วย ปรากฏว่าที่ pH 5.0 และ 10.0 เอนไซม์ที่มี substrate

อยู่ด้วยจะสูญเสีย activity ไปมากกว่าเอนไซม์ที่ไม่มี substrate อยู่ด้วย ซึ่งได้ผลตรงกันข้ามกับ Dixon & Webb (1964) เหตุที่เป็นเช่นนี้ประการแรกอาจเป็นเพราะว่า substrate ที่ใช้แช่เอนไซม์นั้นยังมีความเข้มข้นไม่สูงพอที่จะทำให้เอนไซม์อิ่มตัว ประการที่สองอาจเนื่องจาก เมทิลแอลกอฮอล์ ที่ใช้ละลาย substrate ซึ่งมีอยู่ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลง (Craig & Kistiakowsky, 1958) และประการสุดท้าย การแช่เอนไซม์ไว้กับ substrate ก่อนอาจทำให้เกิด inactive complex ได้มากกว่า (Nachmansohn & Wilson, 1951)

Desmuelle (1961) พบว่า activation energy ของเอสเทอเรสจากตับอ่อนมีค่า 5240 cal./mole ซึ่งเขาบอกว่าเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับของเอสเทอเรสทั่ว ๆ ไป Connors et al. (1960) พบว่าเอสเทอเรสจากตับมี optimum temperature อยู่ระหว่าง 25-30° ซ. และมี activation energy 4430 cal /mole Nord & Werkman (1943) ยังพบว่า optimum temperature จะเปลี่ยนแปลงไปได้ตามความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ของ substrate ตลอดจนปริมาณของ activators, inhibitors และวิธีที่ใช้วัด activity ของเอนไซม์ ส่วน activation energy จะเปลี่ยนแปลงไปได้ก็ต่อเมื่อมีอะไรที่ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ catalytic surface ของเอนไซม์เท่านั้น เอสเทอเรสจากรำข้าวที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์พบว่ามี optimum temperature 33-35° ซ และมี activation energy 5207 cal ,mole ส่วนเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี gel-filtration พบว่ามี optimum temperature 30°ซ และมี activation energy 5203 cal /mole ซึ่งทำให้เห็นว่าactivation energy นั้น ไม่ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

Nord & Werkman (1943) พบว่าเอนไซม์โดยทั่ว ๆ ไปส่วนใหญ่จะถูก inactivate ที่อุณหภูมิ 50-60° ซ Downey & Andrews (1965) พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่ 60° ซ หรือ 80° ซ กับเอสเทอเรสใน skimmed milk เป็นเวลา 2 นาที จะทำลายเอนไซม์ไปได้เพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เขาจึงสรุปว่าใน skimmed milk มีเอสเทอเรสอยู่เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็น nonenzymic proteins

สำหรับเอสเทอเรสจากรำข้าวที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี gel-filtration ถูก inactivate โดยความร้อนได้ง่าย เช่น ถ้าให้ความร้อนที่ 50° ซ เอนไซม์จะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ในเวลา 30 นาที และถ้าให้ความร้อนที่ 60° ซ จะใช้เวลาเพียง 2 นาทีเท่านั้น ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าเอสเทอเรสที่แยกออกมาได้นั้นเป็นเอนไซม์

Downey & Andrews (1966) พบว่าเมื่อเก็บ whole milk enzyme ไว้ที่ 2° ซ เป็นเวลา 7 วัน activity ของเอนไซม์จะลดลงไป 10-22 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเก็บ skimmed milk enzyme ไว้ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันนี้ activity จะลดลง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า endogeneous substrate ช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ เอสเทอเรสจากรำข้าวที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์เมื่อเก็บไว้ที่-20° ซ จะเสถียรมากกว่าเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี gel-filtration ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มี endogeneous substrate, activators หรือ coenzymes ปนอยู่ซึ่งจะช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรดีขึ้น

เอสเทอเรสจากแหล่งกำเนิดต่าง ๆ มักจะมี sulfhydry group (-SH) เป็น active site ทั้งนี้เพราะถูกห้ามปฏิกริยาโดย iodoacetic acid หรืออนุพันธ์ของมัน หรือ p-chloromercuribenzoate เป็นต้น (Aldridge, 1953; Sih et al 1963) เอสเทอเรสจากซีรัมของคนถูกห้ามปฏิกริยาโดย iodoacetamide ได้ง่าย นอกจากนี้ยังถูกห้ามปฏิกริยาโดย Cu^{+2}, Zn^{+2} และ Hg^{+2} (Wilde & Kekwick, 1964) เอสเทอเรสจากรำข้าวก็ถูกห้ามปฏิกริยาโดย iodoacetamide, sodium arsenite และ mercuric chloride ได้ดี ซึ่งแสดงว่าที่ active site ของเอสเทอเรสมี sulfhydryl group และถูก inactivate โดยเกลือของโลหะหนัก นอกจากนี้เอสเทอเรสจากรำข้าวยังถูกห้ามปฏิกริยาโดย β-naphthol ซึ่งเป็น end product ของปฏิกริยาระหว่างเอสเทอเรสกับ β-naphthyl acetate. จึงเป็น product inhibition เอสเทอเรสจากรำข้าวถูกห้ามปฏิกริยาได้บ้างโดย pot. fluoride และ pot. iodide ซึ่งปกติ anions เหล่านี้ก็สามารถห้ามปฏิกริยาชนิด

esterolytic reaction ได้บ้าง (Koshland, 1959) Ca^{+2} และ Mg^{+2} เป็นตัวเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์หลายชนิดรวมทั้งเอสเทอเรสจากบางแหล่ง เช่น จากซีรัมของคน (Wilde & Kekwick, 1964) แต่เอสเทอเรสจากรำข้าวพบว่าถูกห้ามปฏิกริยาโดย ion ทั้งสองชนิดนี้

เอสเทอเรสส่วนมากโดยเฉพาะจากพืชสามารถถูกห้ามปฏิกริยาได้โดยสารประเภท organophosphorus compounds เช่น diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) diisopropyl fluorophosphate (DFP) ในการศึกษาทาง kinetics ของ เอสเทอเรสโดยทั่ว ๆ ไป นิยมใช้ตัวห้ามปฏิกริยาชนิดนี้กันอย่างกว้างขวาง ตลอดจนใช้ในการแยกชนิดของเอสเทอเรสจากแหล่งต่าง ๆ ด้วย (Aldridge 1953, 1954; Myers 1956; Main, 1960; Jansen, 1947; Boursnell et al, 1949; Wilson et al, 1952 and Nachmansohn et al 1947) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าเสียดายที่ไม่สามารถหาตัวห้ามปฏิกริยาชนิดนี้มาศึกษากับเอสเทอเรสในรำข้าวได้

Mounter & Mounter (1962) พบว่าเอสเทอเรสจาก wheat-germ สามารถไฮโดรไลส์ aromatic esters ได้ดี ซึ่งจะไฮโดรไลส์ phenyl acetate และ p-nitrophenyl acetate ได้ดีกว่า triacetin และเมื่อความยาวของ carbon chain ของ alkyl group ใน aromatic esters เท่ากับ 4 คือเป็น n-butyl เอสเทอเรสจาก wheat-germ จะไฮโดรไลส์ได้ดีที่สุด แต่เอสเทอเรสจากซีรัมของคนสามารถไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate และ phenyl acetate ได้ดีกว่า phenyl propionate และ butyrate (Wilde & Kekwick, 1964)

เอสเทอเรสจากรำข้าวสามารถไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate และ p-nitrophenyl acetate ได้ดี แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์ triacetin และ n-propyl gallate การศึกษาเกี่ยวกับ substrate ของเอสเทอเรสในรำข้าวนี้นับว่ายังน้อยมาก เนื่องจากมีเวลาจำกัดและหา substrate ที่จำเป็นบางตัวที่ควรจะต้องศึกษาไม่ได้ ดังนั้น จึงไม่สามารถที่จะหราบคุณสมบัติตลอดจนชนิดของเอสเทอเรสจากรำข้าว

ได้โดยละเอียด โดยมากแล้วการศึกษาทาง **kinetics** เกี่ยวกับเอสเทอเรสมักจะศึกษาชนิดของ **substrate** ควบคู่ไปกับตัวห้ามปฏิกริยาที่สำคัญของเอสเทอเรส คือ **organophosphorus compounds (Aldridge 1953 a, b, 1954)** เพื่อจะทำให้บอกได้ว่าเป็นเอสเทอเรสชนิดใด

ในขณะเดียวกันกับที่กำลังศึกษาเอสเทอเรสจากรำข้าวอยู่นี้ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับไลเปสไปด้วย (นิคม ชัยสิริ,2513) ซึ่งพยายามที่จะทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธี **gel-filtration** เช่นกันโดยใช้ **Sephadex G-100 column** เช่นเดียวกันกับเมื่อใช้กับเอสเทอเรสโดยใช้สารละลายที่สกัดจากรำซึ่งมีปริมาณของโปรตีนประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.025 **M** ซึ่งละลายอยู่ในโซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 0.2 **M** เป็น **eluant** ใช้ **flow rate** ประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเก็บ **fraction** ทีละ 5 มิลลิลิตร ซึ่งปรากฏว่าแยกไลเปสออกมาได้ 2 **peaks** โดยมีจุดยอดของ **peak** อยู่ที่ **fraction number** 13 กับ 22 และในขณะเดียวกันนี้ได้นำ **fraction** ต่าง ๆ นี้ไปหา **activity** ของเอสเทอเรสด้วย ซึ่งพบว่ามีเอสเทอเรสอยู่ **peak** เดียว และมีจุดยอดของ **peak** อยู่ที่ **fraction number 21** จากการที่นำเอาเอนไซม์จากรำข้าวไปผ่าน **Sephadex G-100** แล้วแยกเอสเทอเรสกับไลเปสออกมาที่คนละ **fraction number** นี้ ย่อมแสดงให้เห็นว่าเอสเทอเรสกับไลเปสเป็นเอนไซม์คนละตัว นอกจากเหตุผลนี้แล้วยังพบว่า เอสเทอเรสกับไลเปสยังมีความแตกต่างกันอีกหลายอย่าง เช่น ความเสถียรต่ออุณหภูมิ **Fodor** (1950) พบว่าไลเปสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้มากกว่าเอสเทอเรสไลเปสจากรำข้าวก็เช่นเดียวกัน มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่าเอสเทอเรสเช่น เมื่อให้ความร้อนที่ 60°ซ เป็นเวลา 2 นาที ไลเปสจะสูญเสีย **activity** ไปเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เอสเทอเรสจะสูญเสียสภาพของเอนไซม์ไปอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ Ca^{+2} และ Mg^{+2} ซึ่งเป็นตัวห้ามปฏิกริยาของเอสเทอเรสแต่กลับเป็นตัวเร่งปฏิกริยาของไลเปส ไลเปสในรำข้าวมีความเสถียรที่ **pH** ระหว่าง 4.0 - 10.0 แต่ของเอสเทอเรสอยู่ที่ 7.0 - 8.0 และ **activation energy** ของไลเปสประมาณ 7020 **cal/mole** ส่วนของเอสเทอเรสประมาณ 5200 **cal / mole** จากคุณสมบัติที่แตกต่างกันอย่างเห็น

ได้ผลของเอนไซม์ทั้งสองนี้ จึงพอสรุปได้ว่าเอสเทอเรสที่แยกได้จากรำข้าวนี้ไม่ใช่ไลเปส

Desnuelle (1951) พบว่า ไลเปส สามารถไฮโดรไลส์ substrate ที่เป็น oil-water interface ได้ ส่วนเอสเทอเรสจะไฮโดรไลส์ substrate ที่ละลายเป็น aqueous phase ดังนั้น เอนไซม์ในรำข้าวซึ่งสามารถไฮโดรไลส์น้ำมันในรำข้าวได้จึงควรเป็นไลเปสมากกว่าเอสเทอเรส ไลเปสจึงมีบทบาทสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันรำ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเอสเทอเรสในรำข้าว พบว่าเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำ สามารถสกัดออกได้ง่ายโดยการแช่น้ำ ในการทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ โดย salt fractionation และโดยวิธี gel-filtration จะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นกว่าเดิมประมาณ 8.7 เท่า หลังจากการศึกษาทาง kinetics ของเอสเทอเรสทั้งที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ และที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอสเทอเรสมี optimum substrate concentration ประมาณ 0.65×10^{-3} M Michaelis-Menten constant(Km) ของเอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มีค่า 0.22×10^{-3} M ส่วนของเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีค่าเท่ากับ 0.16×10^{-3} M เอสเทอเรสมี optimum pH ประมาณ 7.2 - 8.0 ถูก inactivate ได้ง่ายเมื่อ pH ลดลงไปข้างต่ำ และจะมีความเสถียรมากที่สุดที่ pH 7.0-8.0 ที่อุณหภูมิของห้อง เอสเทอเรสที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะมีความเสถียรมากกว่าเอสเทอเรสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อเก็บไว้ที่ -20°ซ เป็นเวลาบานเท่ากัน activation energy ของเอสเทอเรสมีค่าประมาณ 5200 cal / mole iodoacetamide, sodium arsenite และ mercuric chloride สามารถห้ามปฏิกริยาของเอสเทอเรสได้ดี เอสเทอเรสสามารถไฮโดรไลส์ β-naphthyl acetate และ p-nitrophenyl acetate ได้ดี แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์ triacetin Km ของเอสเทอเรสเมื่อใช้ p- nitrophenyl acetate เป็น substrate มีค่าประมาณ 0.15×10^{-3} M

ถ้าจะมีการศึกษาเอสเทอเรสจากรำข้าวต่อไปอีก ขอเสนอแนะว่าควรจะได้ศึกษาในเรื่องต่อไปนี้ด้วย

1. ทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ต่อไปอีก
2. ศึกษา substrate specificity เพิ่มเติมให้มากกว่านี้
3. ศึกษาตัวห้ามปฏิกริยาที่ specific ต่อเอสเทอเรสเพื่อจำแนกชนิดของเอสเทอเรส

รูปที่ 17 แสดง Sephadex column

(ที่มา Pharmacia, Uppsala, Sweden.)