3 ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิก

จากการทดลองใช้เครื่องมือวาร์เบิกวัด activity ของไลเปสในส่วนต่าง ๆ หลังจากนำรำมาโฮโมจีไนส์เป็นเวลา 5 นาทีแล้วแช่โฮโมจีเนตไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อให้ไลเปสออกมาอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำมากที่สุด (ไพเราะ ทิพยทัศน์, 2510) ในการสกัดรำสดด้วยน้ำได้ผลดังรูปที่ 1 จะเห็นว่า activity ของไลเปสในโฮโมจีเนตและในกากรำมีพอ ๆ กัน ส่วนใน supernatant มีไลเปสอยู่น้อยมาก ในรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการทดลองในรำที่สกัดไขมันออกแล้ว (defatted rice bran) ก็ยังคงมี activity ของไลเปสใน supernatant น้อยเช่นเดิม ส่วนการใช้แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ในการสกัดได้ผลดังรูปที่ 3 จะเห็นว่านอกจากจะไม่มีผลในการสกัดไลเปสออกจากรำแล้ว ยังทำให้ activity ในโฮโมจีเนตที่ใช้ 50 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สกัดลดลงเหลือเพียงประมาณครึ่งหนึ่งของ activity เมื่อสกัดด้วยน้ำ

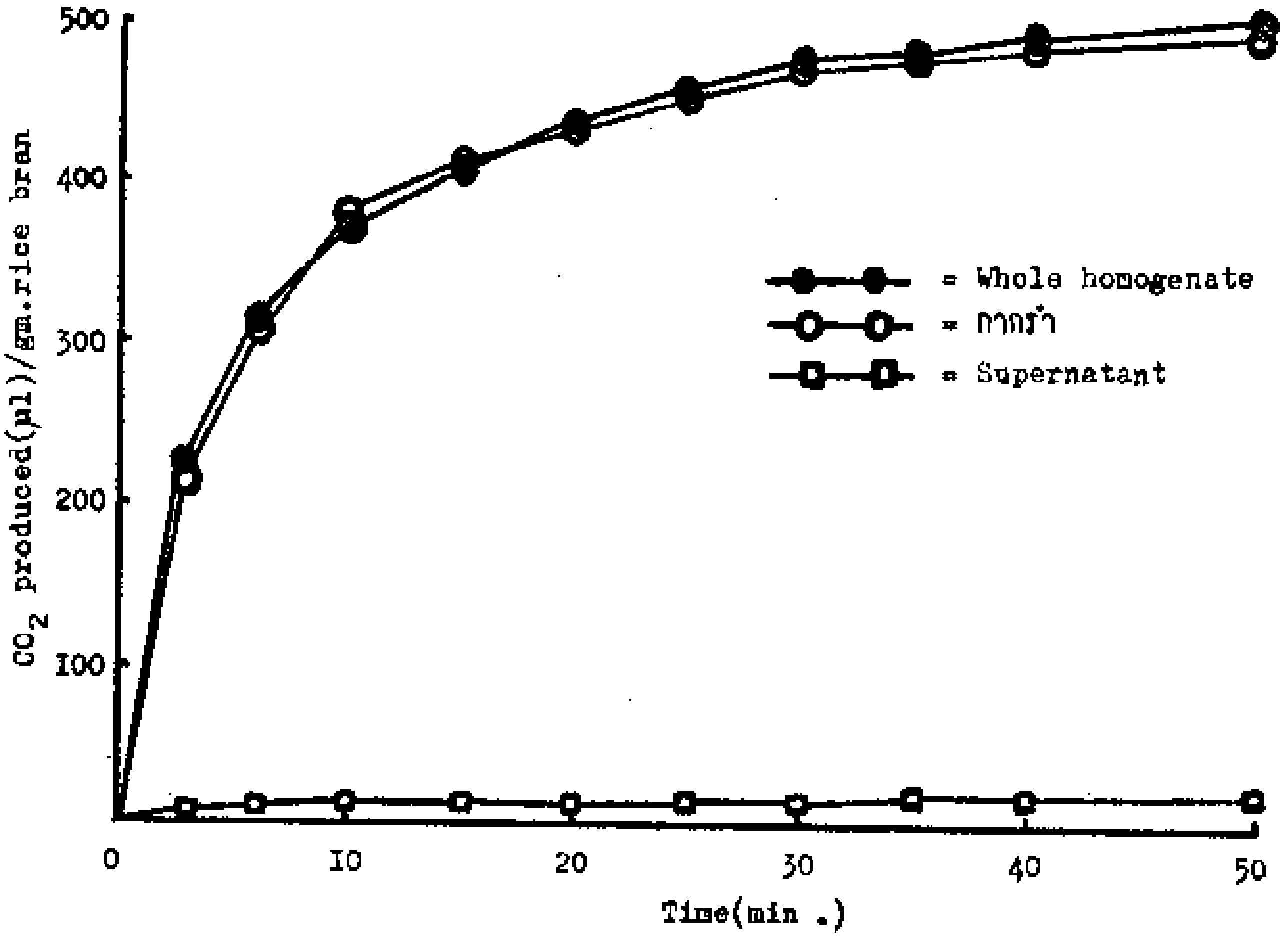
นอกจากนี้ในการใช้สารละลายอื่น ๆ เช่น บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตั้งแต่ pH 6.0 ถึง 8.0 หรือสารละลาย NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการสกัดไลเปสจากรำก็ไม่ได้ผลเช่นเดียวกับกรณีใช้น้ำเป็นตัวสกัด

Sensitivity ของเครื่องมือที่ใช้เท่ากับ 0.045 μmole NaOH

รูปที่ 1

แสดง activity ของไลเปสจากรำสดเมื่อแช่ไฮโมจิเนตไว้ 12 ชั่วโมง

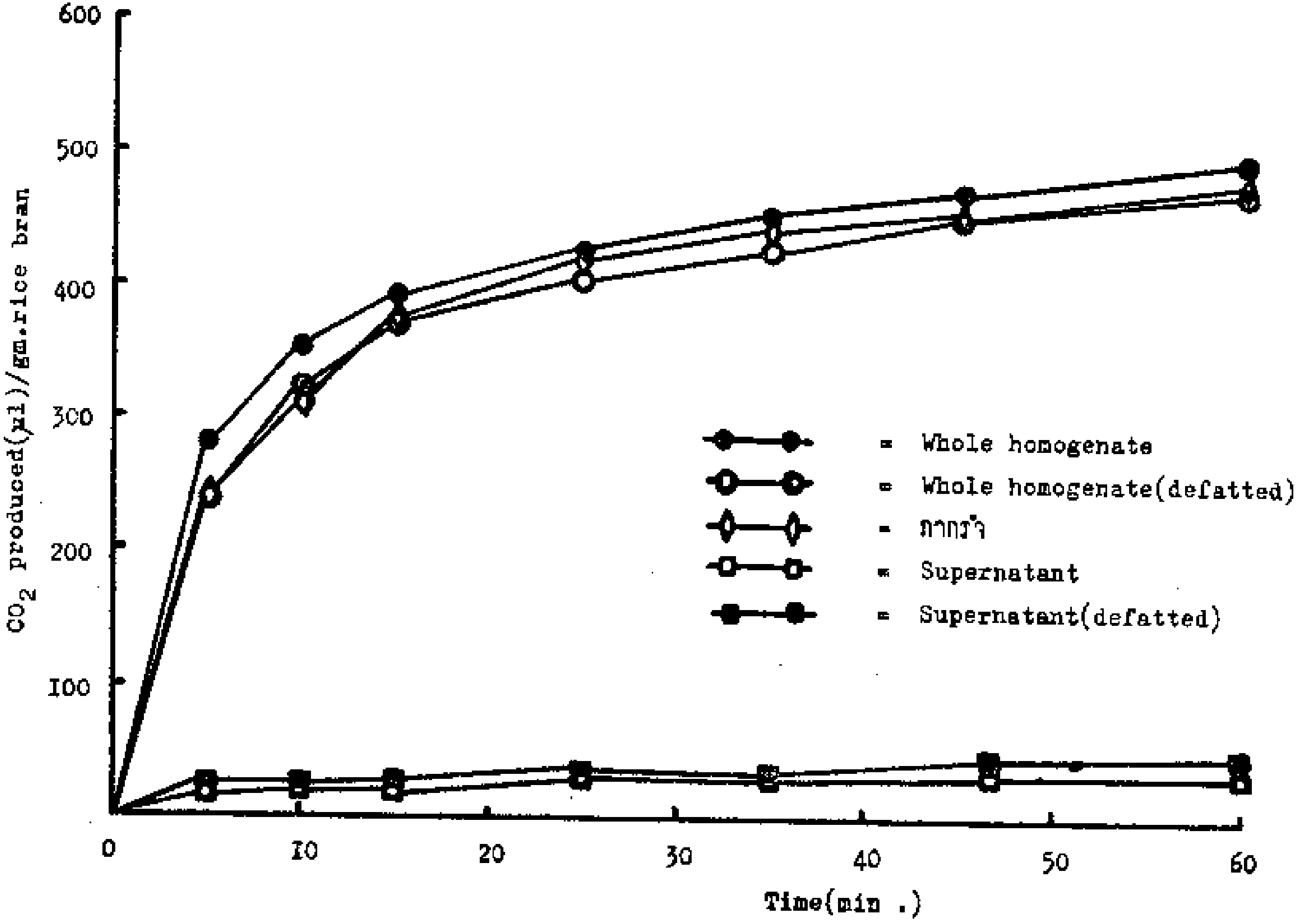
ทำการทดลองที่ pH 7.4 ความเข้มข้นของsubstrate 1 %(v/v) อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด



รูปที่ 2

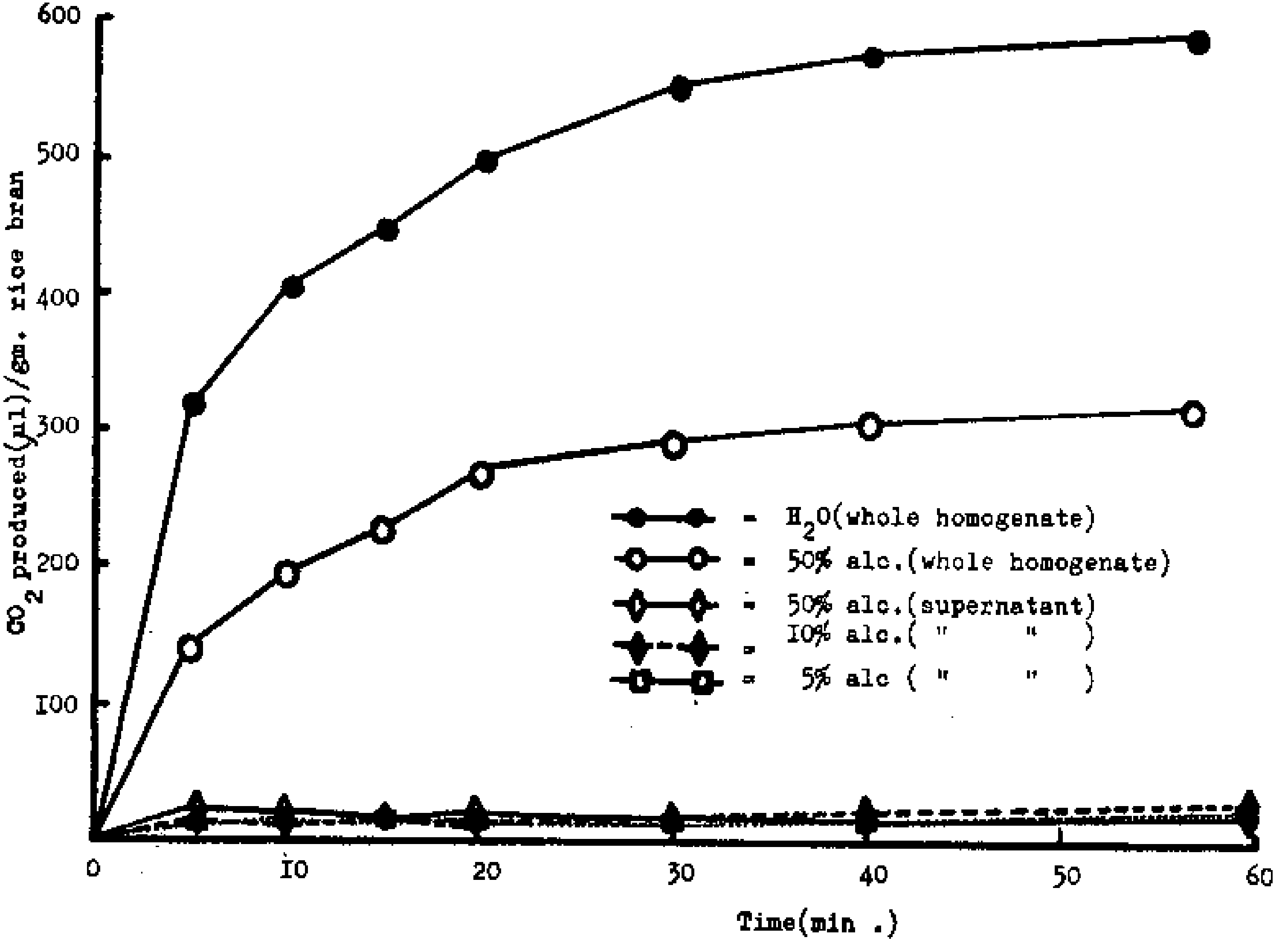
แสดง activity ของไลเปสในส่วนต่างๆของรำสดและ defatted rice bran

วัดไลเปสที่ pH 7.4 ความเข้มข้นของ substrate 1% (v/v) อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด



รูปที่ 3

แสดง activity ของไลเปสเมื่อสกัดด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรดเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลองที่ pH 7.4 ความเข้มข้นของ substrate 1 % (v/v) อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด



3.2 ผลการทดลองโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันอิสระมาไตเตรต

3.2.1 เวลาที่ใช้ในการ incubate

ในการทดลองเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้วัด activity ของไลเปสโดยการ incubate กับ substrate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรดแล้วสกัดเอากรดไขมันอิสระไปไตเตรตโดยใช้เครื่องมือไตเตรตอัตโนมัติ (auto - burette) ซึ่งอ่านปริมาตรของสารละลายที่ใช้ไตเตรตได้ละเอียดถึงทศนิยม 3 ตำแหน่งของมิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่า activity ของไลเปสในระยะ 3 ชั่วโมงแรกมีอัตราค่อนข้างจะคงที่แล้วค่อย ๆ ลดลงในเวลาหลังจากนั้น เพราะฉะนั้นในครั้งต่อ ๆ ไปจึงใช้เวลาในการทดลองไม่เกิน 3 ชั่วโมง

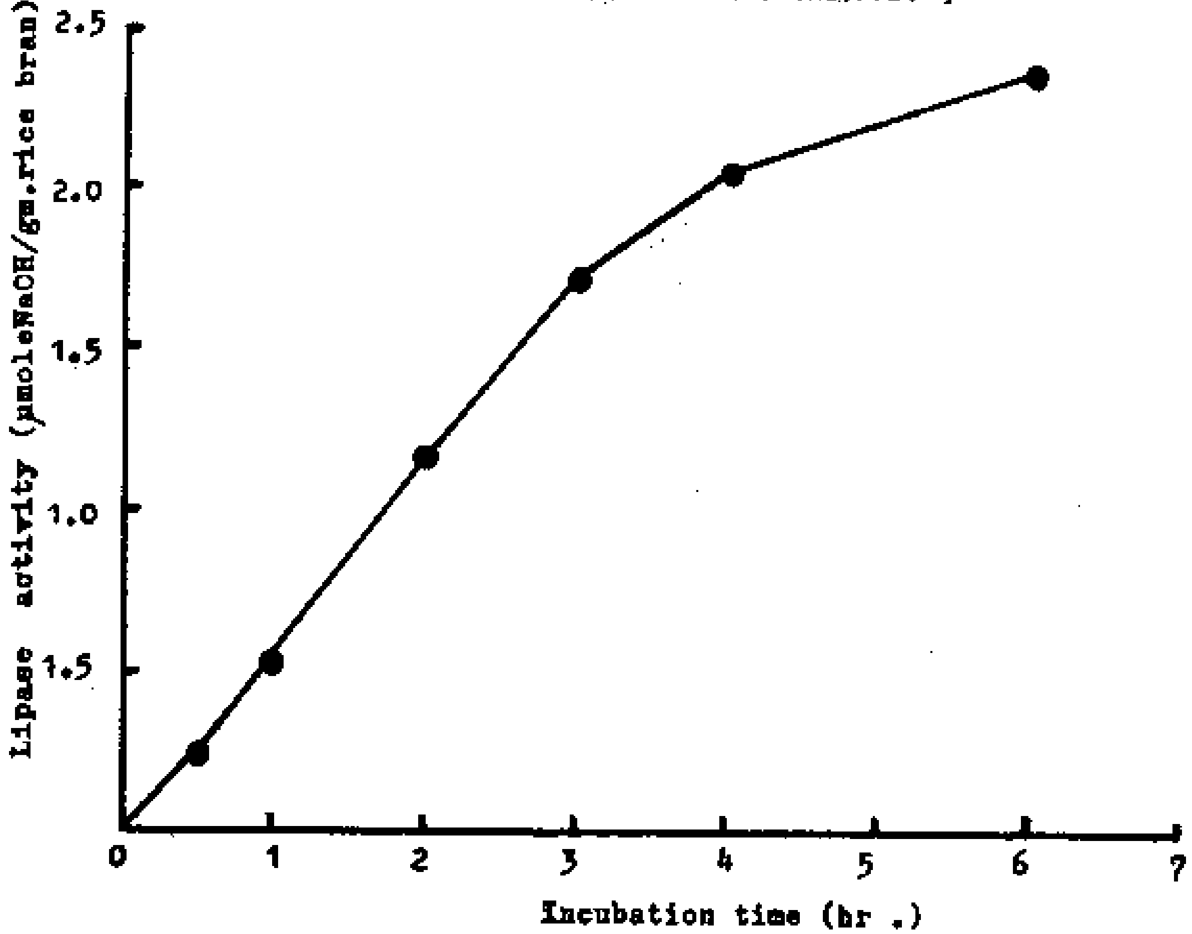
3.2.2 การสกัดไลเปสจากรำ

สำหรับการทดลองเพื่อดูการถูกสกัดของไลเปสจากรำโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดได้ผลดังในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าไลเปสถูกสกัดออกมาใน supernatant ประมาณหนึ่งในสาม อีกสองในสามยังคงอยู่ในกาก ในตารางเดียวกันนี้แสดงให้เห็นว่ารำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน (acetone - dried powder) ก็มี activity ของไลเปสใน supernatant, กากรำ และ whole homogenate เป็นแบบเดียวกันกับรำสด activity ของไลเปสในรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนมีน้อยกว่าในรำสดประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ (หลังจากแก้น้ำหนักที่ผิดไป เนื่องจากน้ำมันที่หายไปจากการสกัดของอะซีโตนซึ่งมีประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์)

3.3.3 Sensitivity ของเครื่องมือ auto - burette ที่ใช้เท่ากับ 0.01 μmole NaOH

รูปที่ 4

แสดงผลของ incubation time ต่อ activity ของไลเปสใน supernatant ของรำสดทดลองที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด ความเข้มข้นของ substrate 2.2 %(v/v) สกัดกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นไปไตเตรตโดยเครื่อง pH-stat.



ตารางที่ 1

แสดง activity ของไลเปสซึ่งวัดโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรตในส่วนต่าง ๆ ของรำเมื่อสกัดด้วยน้ำ วัดไลเปสที่ pH 7.4, อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด, ความเข้มข้นของ substrate 2.2 % (v/v)

ชนิดของรำ	lipase activity (unit)		
	supernatant	กากรำ	whole homogenate
รำสด	0.0086	0.0166	0.0260
รำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน	0.0079	0.0126	0.0227

3.3 ผลการศึกษาไลเปสด้วยเครื่องมือ pH - Stat

3.3.1 ผลการสกัดไลเปสและ activity ของไลเปสในรำชนิดต่าง ๆ

3.3.1.1 ผลของการสกัดไลเปสโดยการแช่รำในน้ำและการโฮโมจีไนส์

ในการทดลองวัด activity ของไลเปสในรำซึ่งทำให้แห้งด้วยอะซีโตนที่แช่น้ำ และรำที่โฮโมจีไนส์เสียก่อนแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรดในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าไลเปสถูกสกัดออกจากรำโดยวิธีแช่น้ำน้อยกว่ารำที่สกัดโดยวิธีโฮโมจีไนส์เสียก่อนแล้วแช่ไว้มาก รำที่สกัดโดยวิธีแช่น้ำอย่างเดียวทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมงจะมีไลเปสออกมาใน supernatant เพียง 60 % ของรำที่สกัดโดยวิธีโฮโมจีไนส์ 5 นาที แล้วแช่ไว้ในระยะเวลาเดียวกัน ถ้าจะให้ไลเปสถูกสกัดออกมาจากรำแช่น้ำเกือบหมด (93 %) เมื่อเทียบกับรำที่โฮโมจีไนส์จะต้องเสียเวลานานถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นการสกัดไลเปสในครั้งต่อ ๆ ไปจึงกระทำโดยเอามาโฮโมจีไนส์ 5 นาที แล้วนำมาเหวี่ยงเอากากรำออกด้วยแรง 12,000 x g 15 นาที ได้ supernatant ซึ่งมีลักษณะขุ่นเล็กน้อยมาวัด activity ของไลเปส

3.3.1.2 ผลการสกัดไลเปสจากรำด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง

การสกัดไลเปสจากรำด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งทำการทดลองโดยนำเอารำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนมาสกัดโดยวิธีโฮโมจีไนส์ 5 นาที ตามวิธีในข้อ 3.3.1.1 เติมน้ำกลั่นลงไปให้มีปริมาตรเท่าเดิมแล้วสกัดไลเปสแบบเดิมอีก 2 ครั้ง ผลของการสกัด 3 ครั้ง ได้ activity ของไลเปสออกมาใน supernatant เท่ากับ 78 %, 18 %

และ4.5 % ตามลำดับ จะเห็นว่าการสกัดเพียงครั้งเดียวก็จะได้ไลเปส ออกมาอยู่ในน้ำเกือบหมดแล้ว

3.3.1.3 <u>ไลเปสในรำข้าวชนิดต่าง ๆ</u>

จากการทดลองวัด activity ของไลเปส ในรำข้าวชนิดต่าง ๆ ที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน มีรำข้าวใหม่ (ข้าวขาว) รำข้าวเก่า (ข้าวขาว) รำข้าวใหม่ (ข้าวแดง) และรำข้าวกลางปี (ข้าวแดง) ได้ผลดังรูปที่ 4 จะเห็นว่ารำข้าวใหม่มี activity มากกว่า รำข้าวเก่าประมาณ 6 เท่า รำข้าวแดงมี activity ของไลเปสเพียง 53 เปอร์เซ็นต์ของรำข้าวขาว (ข้าวใหม่)

ตารางที่ 2

ผลของเวลาแช่รำและการโฮโมจีไนส์ ในการใช้น้ำสกัดไลเปสออกจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน (วัดไลเปสที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด substrate concentration 7 % (v/v)

เวลาที่แช่รำ (ชั่วโมง)	lipase activity (units)		
	รำแช่น้ำ	รำโฮโมจีไนส์ 2นาที	รำโฮโมจีไนส์ 5 นาที
0	0.942	1.649	1.713
$\frac{1}{2}$	1.019	1.701	1.709
1	1.052	1.694	1.733
3	1.225	1.694	1.767
6	1.316	1.739	1.802
12	1.642	1.719	1.739
24	1.651	1.708	1.785

ตารางที่ 3

ผลของการสกัดไลเปสจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนด้วยน้ำโดยการสกัดหลาย ๆ ครั้ง วัดไลเปสที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด substrate concentration 7 % (v/v)

สกัดครั้งที่	ปริมาตรของน้ำที่เติมลงในรำ 20กรัม ให้เป็น 100 มิลลิลิตร (ml)	supernatant (ml)	lipase activity (units)	% actitity
1	86	70	1.778	78
2	70	70.5	0.420	18
3	70.5	70.5	0.105	4.5

ตารางที่ 4

แสดง activity ของไลเปสในรำข้าวชนิดต่าง ๆ (ใช้รำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน) วัดไลเปสที่pH 8.5 อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด substrate concentration 7% (v/v)

ชนิดของรำข้าว	lipase activity (units)	% activity
รำข้าวขาว (ใหม่)	1.778	100
รำข้าวขาว (เก่า)	0.294	17
รำข้าวแดง (ใหม่)	0.935	53
รำข้าวแดง (กลางปี)	0.662	37

3.3.2 เสถียรภาพ(stability) ของไลเปส

3.3.2.1 เสถียรภาพของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ

ในการหาเสถียรภาพของไลเปสในรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน ได้ทำการทดลองโดยเก็บรำไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือในตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ - 20 องศาเซ็นติเกรด) ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรด) และที่อุณหภูมิของห้องเป็นเวลา 2 เดือน แบ่งรำแต่ละชนิดมาหา activity ของไลเปสเป็นระยะ ๆ ได้ผลดังตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่ารำที่เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งและที่ตู้เย็นเสถียรมากคือรำที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง เป็นเวลา 2 เดือน แทบจะไม่ลด activity ไปเลย รำที่เก็บไว้ที่ตู้เย็นมี activity ลดลงไปจากเดิมเพียง 11 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนรำที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิของห้องจะมี activity ของไลเปสลดลงถึง 73 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาที่เก็บรำไว้เท่า ๆ กัน

สำหรับการทดลองเกี่ยวกับเสถียรภาพของไลเปสที่สกัดออกมาด้วยน้ำ ทำโดยแช่เอนไซม์ไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันแล้วนำเอนไซม์มาวัด activity ของไลเปสเป็นระยะ ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 5 พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซ็นติเกรด การแช่เอนไซม์ 2 ชั่วโมงจะเสีย activity ของไลเปสไปเพียง 22 เปอร์เซ็นต์ ถ้าอุณหภูมิที่แช่สูงขึ้น การสูญเสีย activity ก็จะเกิดมากขึ้น เช่น ถ้าแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซ็นติเกรดเป็นเวลาเพียง 15 นาที ไลเปสก็จะเสียสภาพของเอนไซม์ไปอย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 5

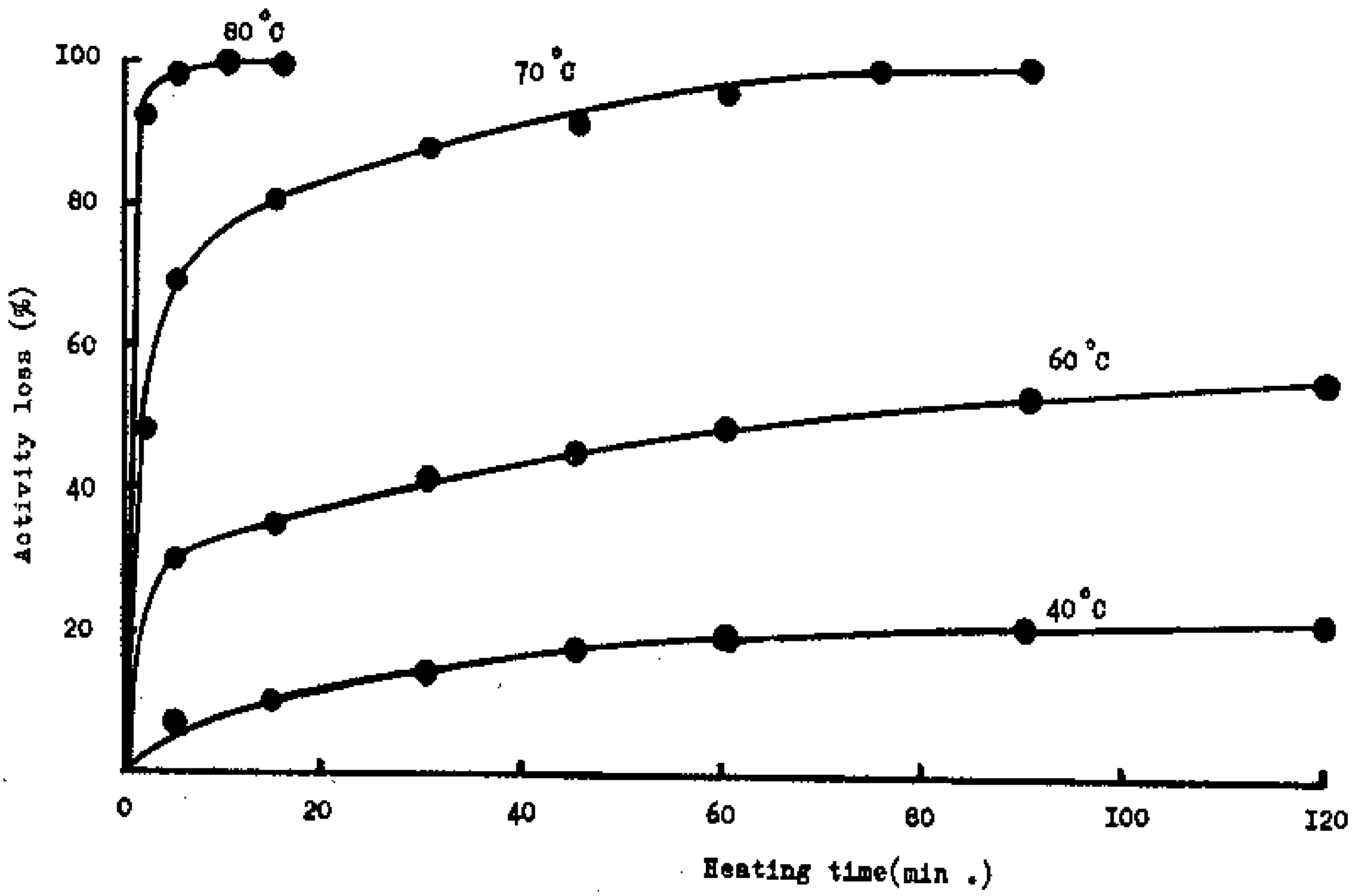
แสดงเสถียรภาพของไลเปสในรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโทนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ วัดไลเปสที่ pH 8.5, อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด ความเข้มข้นของ substrate 7 % (v/v)

อุณหภูมิที่เก็บรำ (°ซ.)	ระยะเวลาที่เก็บรำ (วัน)	lipase activity (units)	% activity
-20	1	1.645	100
	10	1.657	100
	20	1.630	100
	30	1.645	100
	40	1.615	99
	61	1.595	97
4	1	1.637	100
	10	1.615	99
	20	1.570	96
	30	1.534	93
	40	1.502	91
	61	1.468	89
อุณหภูมิของห้อง (30)	1	1.621	99
	10	1.317	80
	20	0.864	52
	30	0.662	40
	40	0.542	33
	61	0.441	27

รูปที่ 5

ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการสูญเสีย activity ของไลเปส

วัดไลเปสที่ pH 8.5 ความเข้มข้นของ substrate 7 % (v/v)

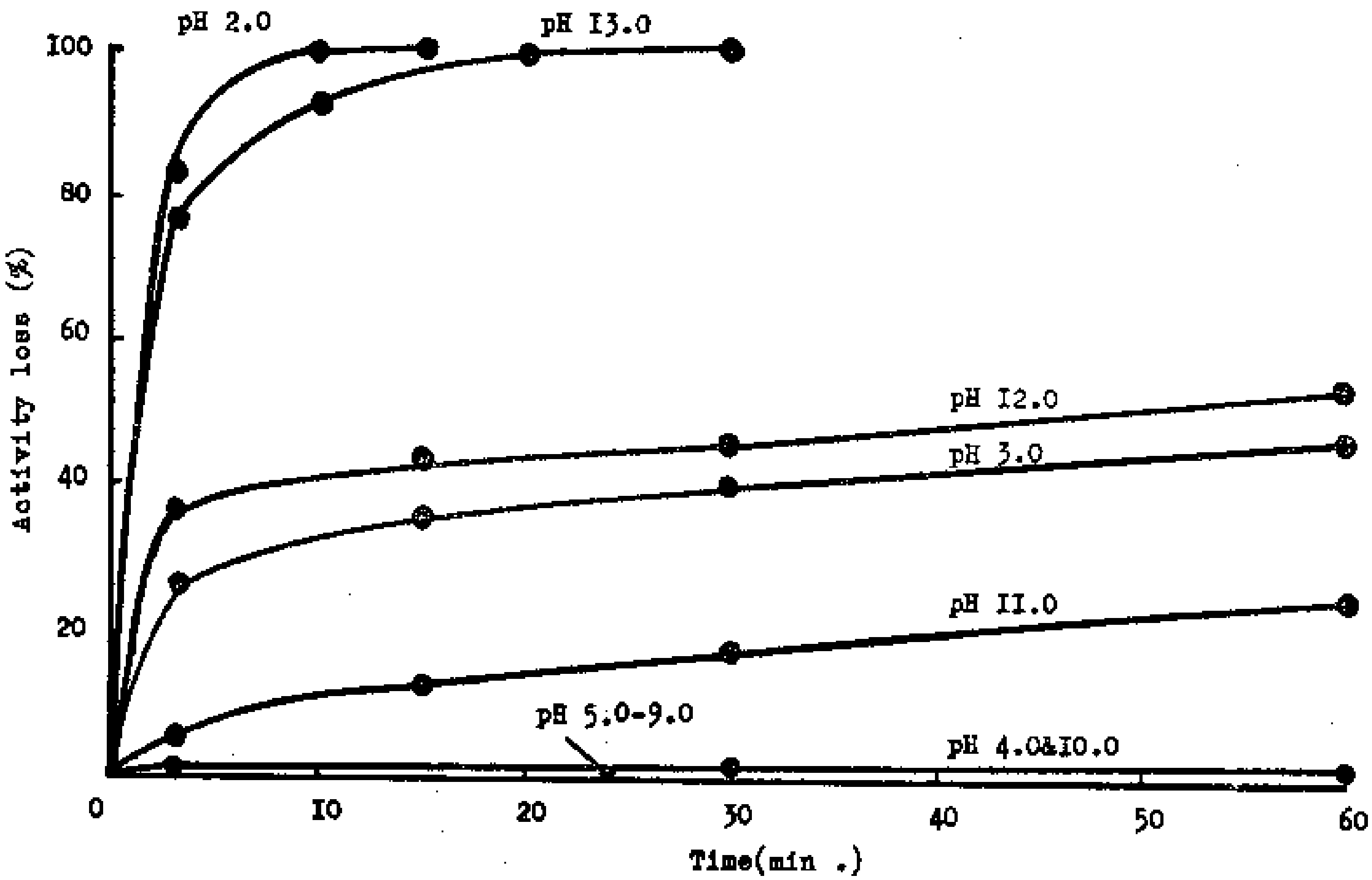


3.3.2.2 เสถียรภาพของไลเปสที่ pH ต่าง ๆ

ในการทดลองเกี่ยวกับเสถียรภาพของไลเปสที่ pH ต่าง ๆ ทำการทดลองโดยปรับ pH ของสารละลายที่สกัดจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนด้วยกรดเกลือ 0.2 นอร์มแบล หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 ถึง 1.0 นอร์มแบล แล้วทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซ็นติเกรด แบ่งเอาสารละลายแต่ละ pH มาหา activity ของไลเปสเป็นระยะ ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัด activity ของไลเปสโดยใช้กรดหรือด่างปรับ pH ให้เท่ากับ 8.6 เสียก่อนแล้วคอยจน pH ลดลงมาเป็น 8.5 จึงเริ่มวัด activity ของไลเปส เปรียบเทียบการสูญเสีย activity ของไลเปสที่ pH ต่าง ๆ กับ activity ของไลเปสที่ไม่ได้ปรับ pH หลังจากสกัด (pH ของสารละลายที่สกัดได้ประมาณ 6.5) ผลการทดลองซึ่งแสดง activity ของไลเปสที่ pH ต่าง ๆ หลังจากได้แก้ non - enzymic activity ออกแล้ว แสดงไว้ในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าไลเปสมีความเสถียรมากที่ช่วง pH 5 ถึง 9 จากการปรับให้ pH ของเอนไซม์ที่สกัดจากรำให้อยู่ที่ pH ช่วงนี้ 1 ชั่วโมง ไม่พบว่าไลเปสเสีย activity ไปเลย เอนไซม์ที่แช่ที่ pH 4 และ pH 10 ไลเปสเสีย activity ไปเพียง 2.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ถ้า pH ต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 10 ไลเปสจะเริ่มสูญเสีย activity เร็วขึ้นโดยเฉพาะในช่วงเวลา 10 นาทีแรก จะเห็นได้ว่าถ้าแช่ที่ pH 2 เวลา 10 นาทีหรือที่ pH 13 30 นาที ไลเปสจะเสีย activity ไปอย่างสมบูรณ์

รูปที่ 6

การสูญเสียสภาพของไลเปสเมื่อแช่ไว้ที่pH ต่างๆ(อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรด)ในเวลาต่างๆกัน
วัดไลเปสที่อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด ความเข้มข้นของ substrate 7%(v/v)



3.3.3 Enzyme Kinetics

3.3.3.1 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส

ในการทดลองเพื่อดูผลของ substrate ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อ activity ของไลเปสโดยวัด activity ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด pH 8.5 ได้ผลดังรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่า activity ของไลเปสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ substrate ที่ใช้และเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ substrate เท่ากับ 6.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นต้นไป เนื่องจากการเตรียมอีมัลชั่นของน้ำมันมะกอกโดยใช้ gum acacia เป็น emulsifying agent ทำได้ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพราะมีน้ำมันบางส่วนถูกทำให้เป็นอีมัลชั่นไม่หมดถ้าใช้น้ำมันมะกอกที่มีความเข้มข้นเกินกว่านี้ ดังนั้นในการทดลองจึงไม่สามารถใช้ substrate ให้มีความเข้มข้นเกิน 9 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

จากการคำนวณเพื่อหา Michaelis - Menton Constant (Km) ตาม Lineweaver and Burk's Plot (1934) ในรูปที่ 8 ได้กราฟเป็นเส้นค่อนข้างตรง พบว่า

$$\text{intercept} = \frac{1}{V} = 0.60$$

$$\therefore V = 1.67$$

$$\text{slope} = \frac{Km}{V} = 2.13$$

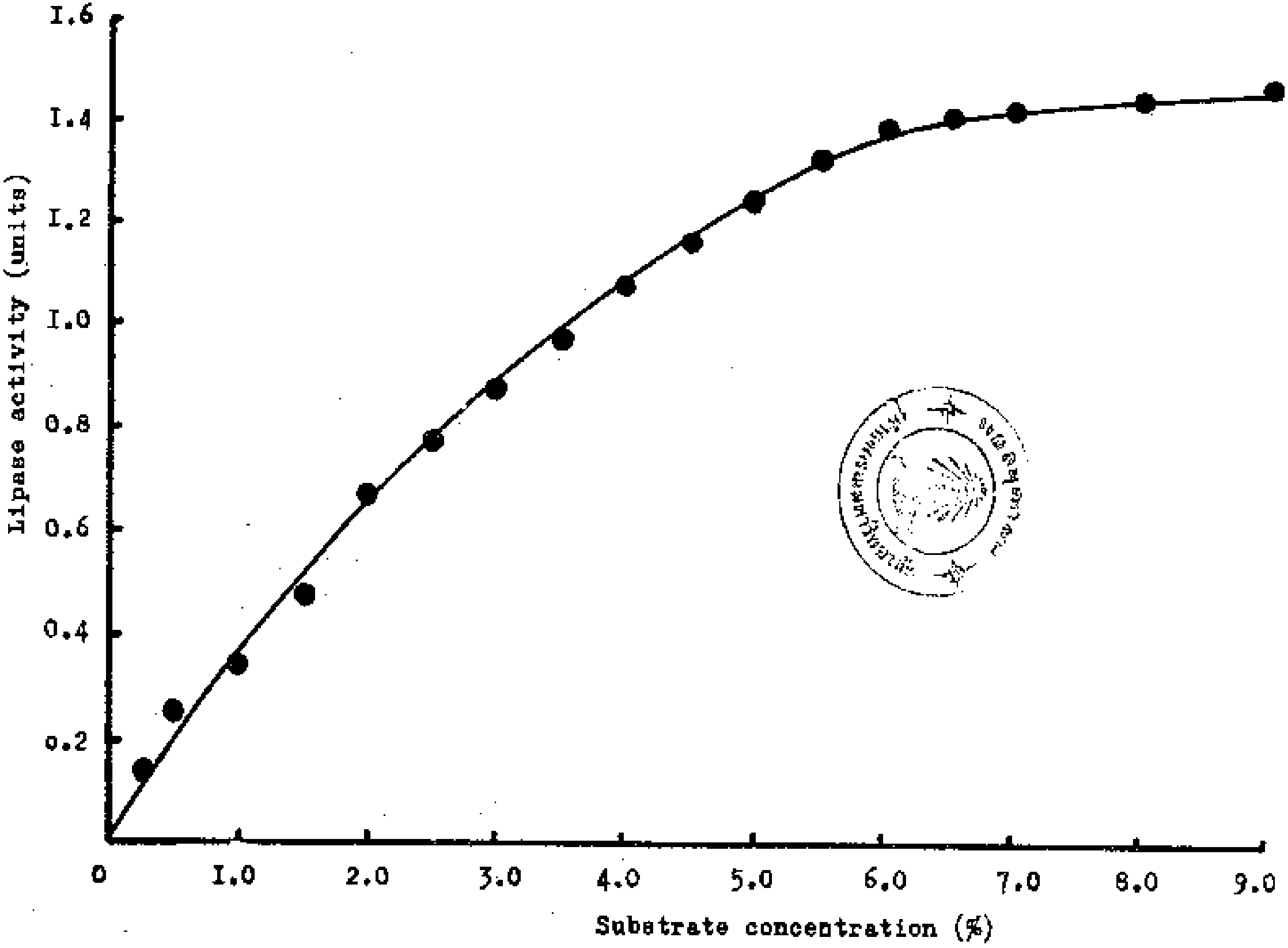
$$\therefore Km = 3.55 \ \% \ (v/v)$$

เมื่อคิดเป็นความเข้มข้นของ triolein จะได้ $Km = 3.82 \times 10^{-2}$ Molar

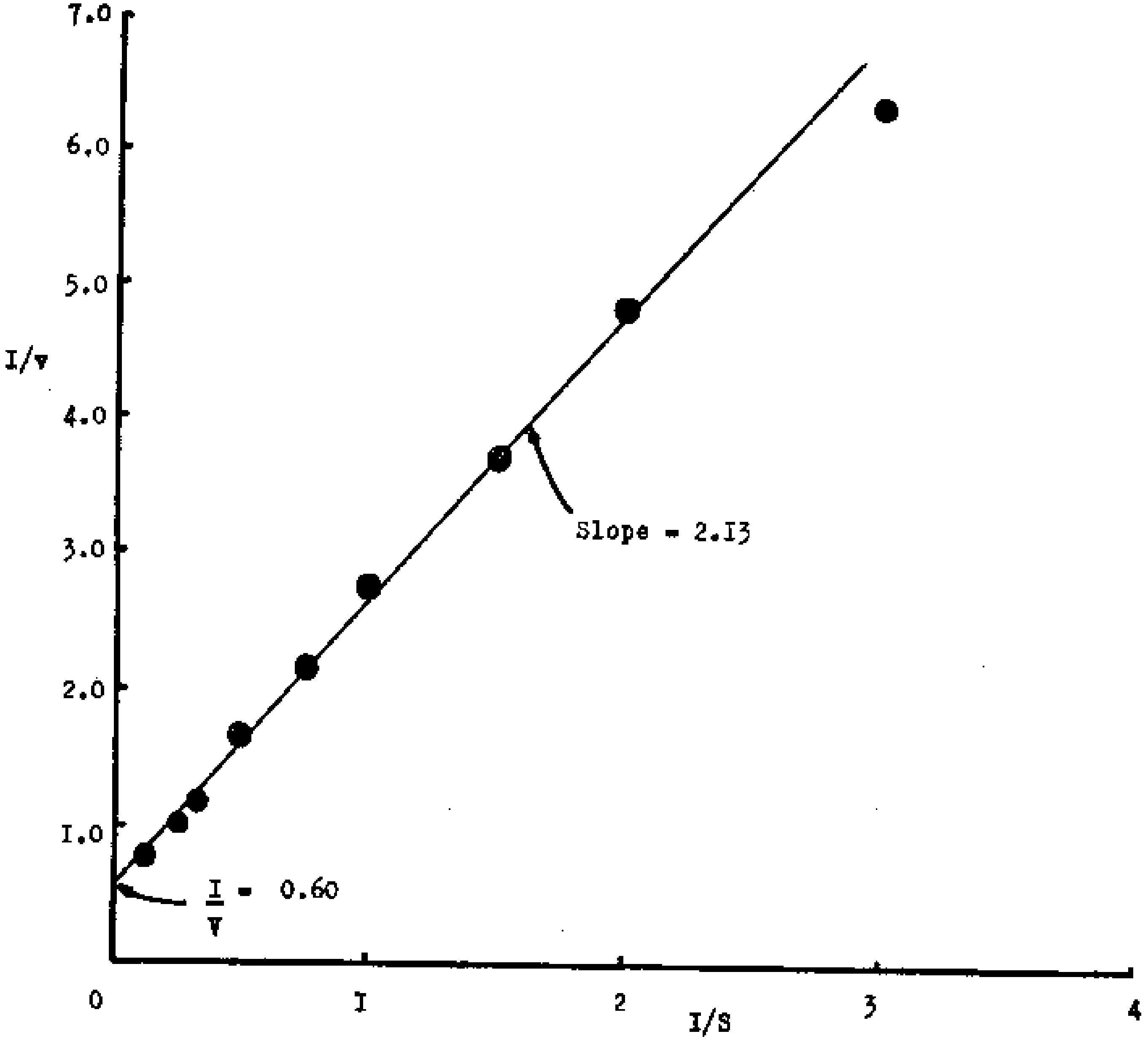
115947713

รูปที่ 7

แสดงผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปสเมื่อใช้อิมัลชั่นของน้ำมันมะกอก
เป็น substrate วัดไลเปสที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซ็นติเกรด



รูปที่ ๘ แสดง Lineweaver and Burk's Plot ของไลเปสเมื่อใช้อิมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็น substrate v=velocity(unit) ; S=substrate concentration(%v/v)



3.3.3.2 ผลของ pH ต่อไลเปส

จากการทดลองวัดไลเปสที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ pH 3.0 ถึง pH 10.0 ได้ผลดังรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่าไลเปสมี activity สูงสุดที่ pH 8.5 ซึ่งจะถือเป็น optimum pH ของไลเปสในรำข้าวเมื่อใช้เครื่องมือ pH - stat วัด activity ในสภาวะของการทดลองดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองทั้งหมดจึงใช้ pH นี้วัดไลเปส เนื่องจาก non - enzymic activity สูงมากเมื่อ pH ในการทดลองสูงกว่า 10.0 จึงไม่สามารถทดลองหา activity ของไลเปสที่ pH มีค่ามากกว่านี้

3.3.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของไลเปส

จากการหา activity ของไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 90 องศาเซ็นติเกรด ได้ผลดังรูปที่ 10 จะเห็นได้ว่าหลังจากได้แก้ activity ของ non - enzymic แล้วไลเปสมี optimum temperature ระหว่าง 42.5 ถึง 50 องศาเซ็นติเกรด เมื่อทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของ substrate 7% (v/v), pH 8.5 ไลเปสจะมี activity ลดลงเมื่ออุณหภูมิในการทดลองต่ำหรือสูงกว่าช่วงอุณหภูมินี้และจะเสีย activity หมดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซ็นติเกรด

จากกราฟของผลของอุณหภูมิต่อ activity ของไลเปส ได้คำนวนหา activation energy ตามวิธีของ Arrhenius โดยเขียนกราฟของ log velocity เป็นแกนตั้งและ $\frac{1}{T}$ เป็นแกนนอน (รูปที่ 11)

จากสูตร $\text{slope} = \frac{A}{2.303\,R}$

$\text{slope} = -1533$

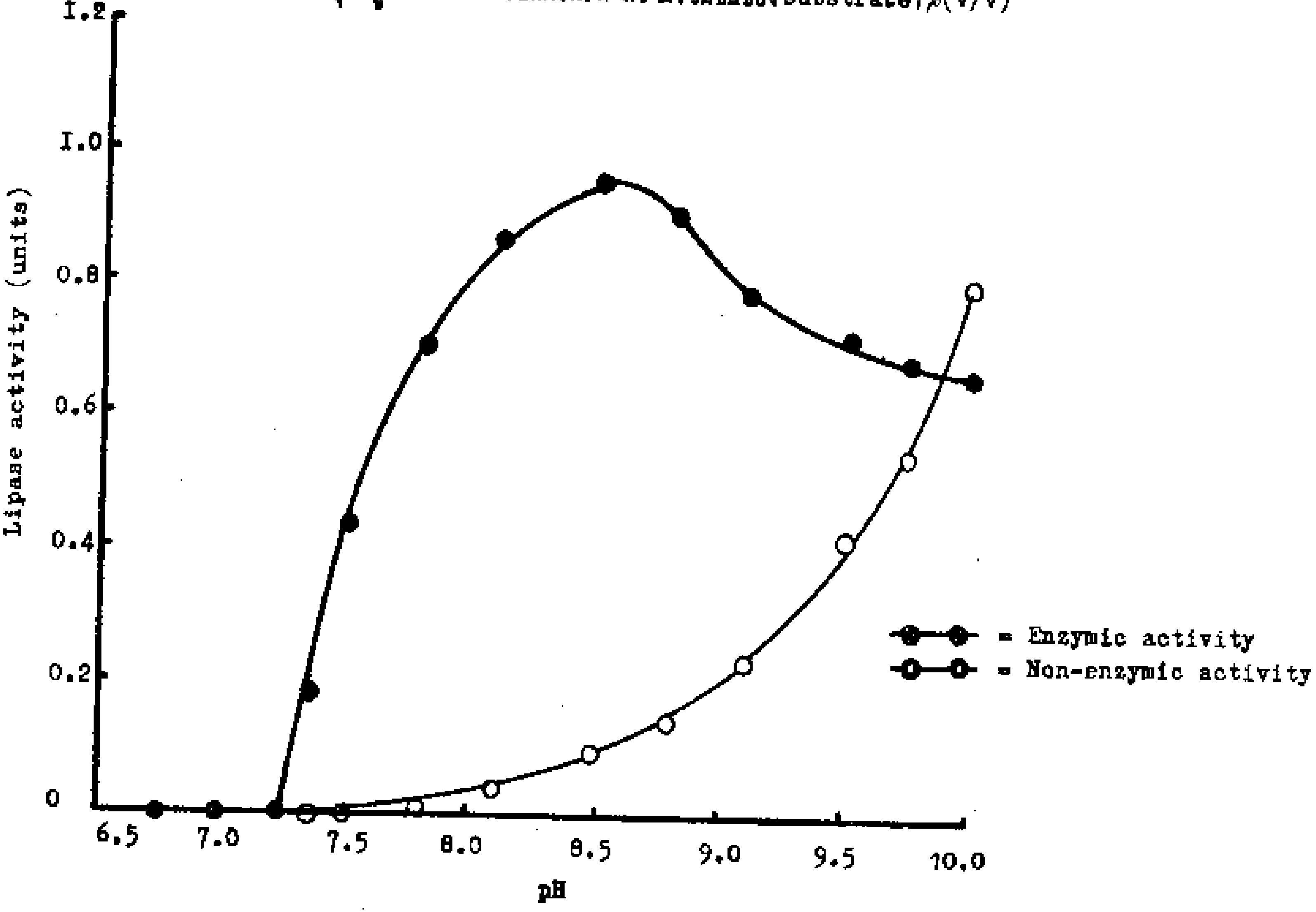
(A = activation energy, R = gas constant)

จากการคำนวนได้ค่า A = 7020 cal / mole

<u>รูปที่ 9</u>

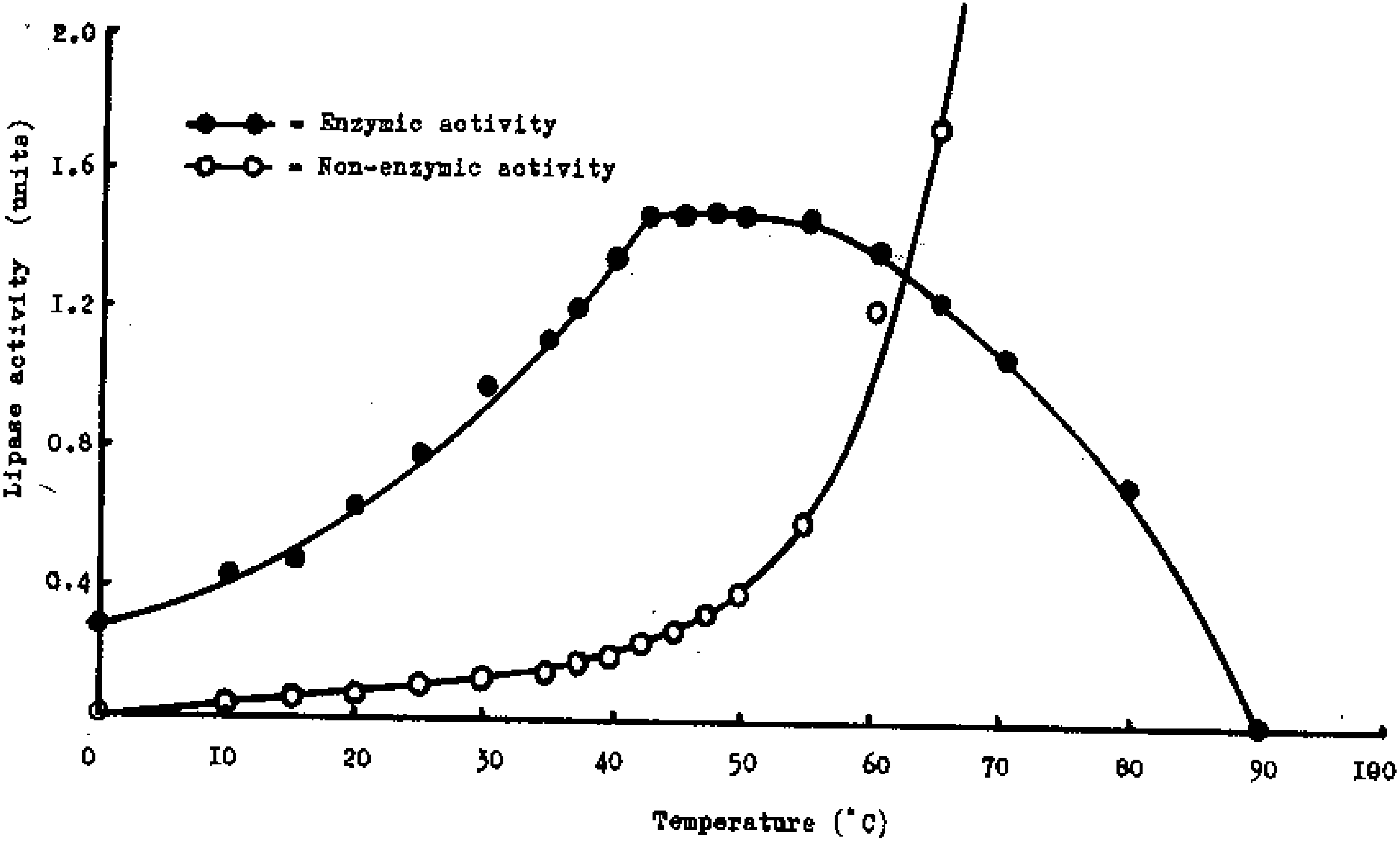
แสดงผลของ pH ต่อactivity ของไลเปส

วัดไลเปสที่อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด ความเข้มข้นของ substrate7%(v/v)



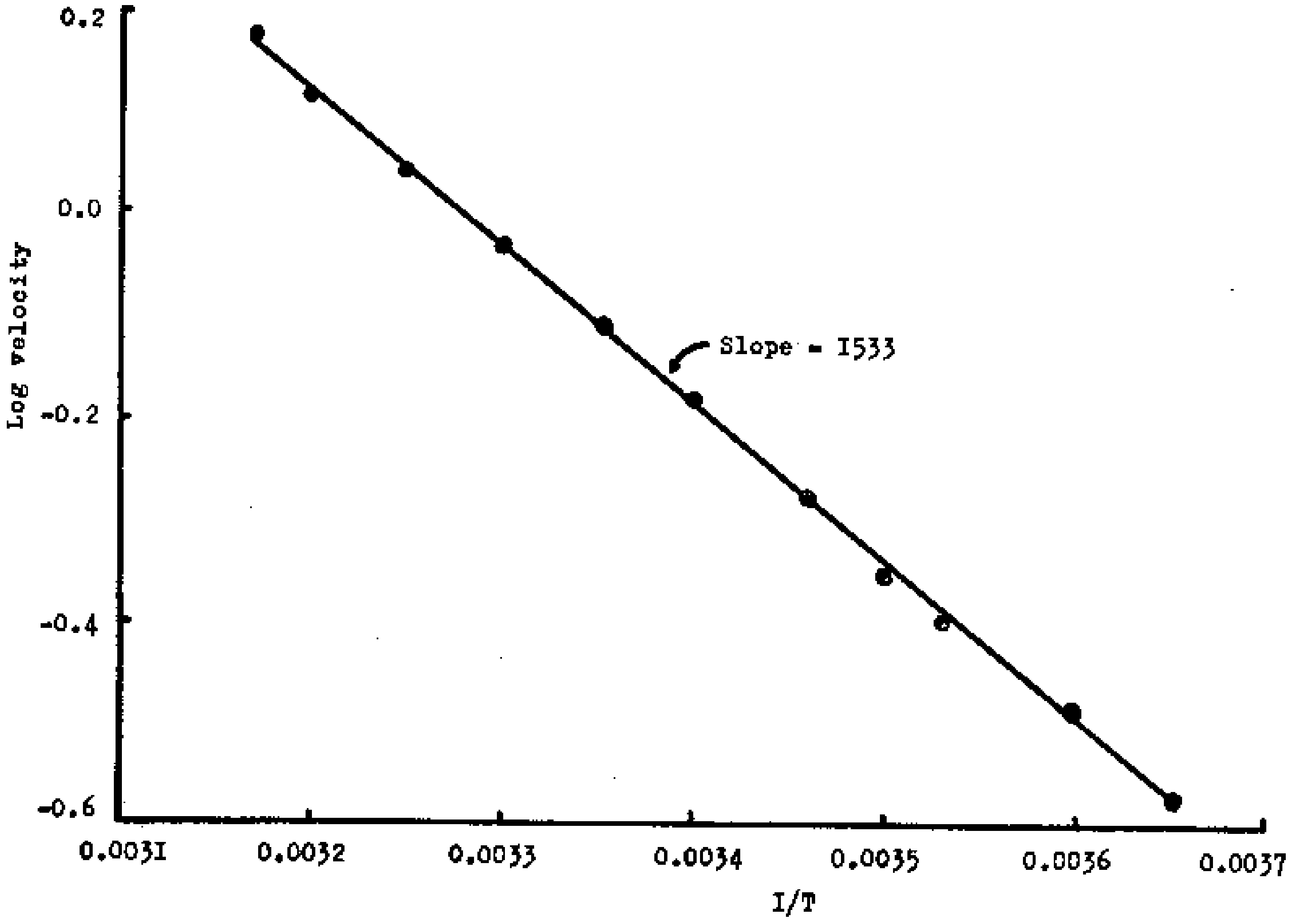
รูปที่ 10

แสดงผลของอุณหภูมิต่อการไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอกเมื่อมีไลเปสและเมื่อไม่มีเอนไซม์ วัดปฏิกริยาที่ pH 8.5 ความเข้มข้นของsubstrate7%(v/v)



รูปที่ 11

แสดง Arrhenius Plot ของการไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอกโดยไลเปส



3.3.3.4 <u>ผลของไอออนบางชนิดต่อ activity ของไลเปส</u>

activity ของไลเปสเมื่อเติมสารละลาย calcium chloride, magnesium chloride และ sodium chloride ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันแสดงไว้ในตารางที่ 6 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของ calcium chloride ตั้งแต่ 1×10^{-3} ถึง 5×10^{-1} โมลาร์มีผลทำให้ activity ของไลเปสเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 5×10^{-1} โมลาร์ ไลเปสจะมี activity เพิ่มขึ้นมากกว่าเดิมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ magnesium chloride มีผลคล้ายกับผลของ calcium chloride แต่มีผลในการเพิ่ม activity ไม่มากนัก ส่วน sodium chloride นั้นไม่มีผลในการเพิ่ม activity ของไลเปส ที่ความเข้มข้นสูง ๆ ของสารละลายทั้งสามชนิดทำให้ activity ของไลเปสลดลง

ตารางที่ 6

แสดงผลของ $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ NaCl ต่อ activity ของไลเปส วัดไลเปสที่ 8.5, อุณหภูมิ 43 องศาเซ็นติเกรด, ความเข้มข้นของ substrate 7% (v/v)

ความเข้มข้น (โมลาร์)	lipase activity (unit)		
	$CaCl_2$	$MgCl_2$	NaCl
0	1.268	1.289	1.470
1×10^{-8}	1.255	1.260	-
1×10^{-6}	1.268	1.285	-
1×10^{-4}	1.268	1.253	1.490
1×10^{-3}	1.277	1.289	1.465
1×10^{-2}	1.316	1.295	1.470
5×10^{-2}	1.425	1.324	1.458
1×10^{-1}	1.544	1.355	1.475
3×10^{-1}	1.585	1.220	1.475
5×10^{-1}	1.654	0.227	1.435
1.0	1.097	-	1.380
1.5	1.075	-	1.142

3.3.4 ผลของการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ (Purification of lipases)

3.3.4.1 Ammonium sulfate fractionation

ในการทดลองแยกโปรตีนออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายที่สกัดจากรำโดยการปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดน้ำส้มแล้วเหวี่ยงเอาตะกอนออก นำสารละลายที่เหลือมาปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายให้เข้มข้นเป็น 30, 60 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายแอมโมเนียมอิ่มตัวตามลำดับ เหวี่ยงเอาตะกอนที่ตกลงมาไปละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 หรือ 25 มิลลิลิตร แบ่งมาวัด activity ของไลเปสพร้อม ๆ กับเอนไซม์ที่สกัดจากรำในตอนแรก activity ของไลเปสในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่ตกตะกอนได้ทุก ๆ ส่วนมี activity ของไลเปสปนอยู่ ตะกอนที่ตกที่ pH 5.5 มีปริมาณโปรตีนและ activity ของไลเปสประมาณ 45 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนในตะกอนที่ตกโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต มี activityปนอยู่มาก ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30-60 เปอร์เซ็นต์ ความบริสุทธิ์ของไลเปสเมื่อเทียบกับสารละลายก่อนตกตะกอนจะมีมากที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 30 เปอร์เซ็นต์ คือประมาณ 2.2 เท่า ส่วนที่ความเข้มข้นอื่น ๆ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

สำหรับการตกตะกอนโดยวิธีตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตโดยตรงและโดยตกตะกอนที่ pH 3.0 ก็ได้ผลคล้ายคลึงกันคือมีไลเปสปนอยู่ทุก ๆ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและมี activity ของไลเปสมากที่ส่วนของ 20 - 60 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7

แสดงผลของการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายที่สกัดจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน 100 มิลลิลิตร

(25 % extract)

Preparation	volume (ml)	protein mg/ml	Lipase activity (umole NaOH /min./ml)	specific activity (umole NaOH /min./mg prot)	Yield (%)	Purification (folds)
crude extract	100	13.8	0.194	0.014	100	1
Precipitate at pH 5.5	50	12.3	0.233	0.019	60	1.4
0-30% sat$^{\underline{n}}$	25	4.3	0.129	0.030	16	2.2
30-60% sat$^{\underline{n}}$	25	10.2	0.183	0.018	23.5	1.3
60-100% sat$^{\underline{n}}$	25	1.9	0.036	0.019	4.5	1.4

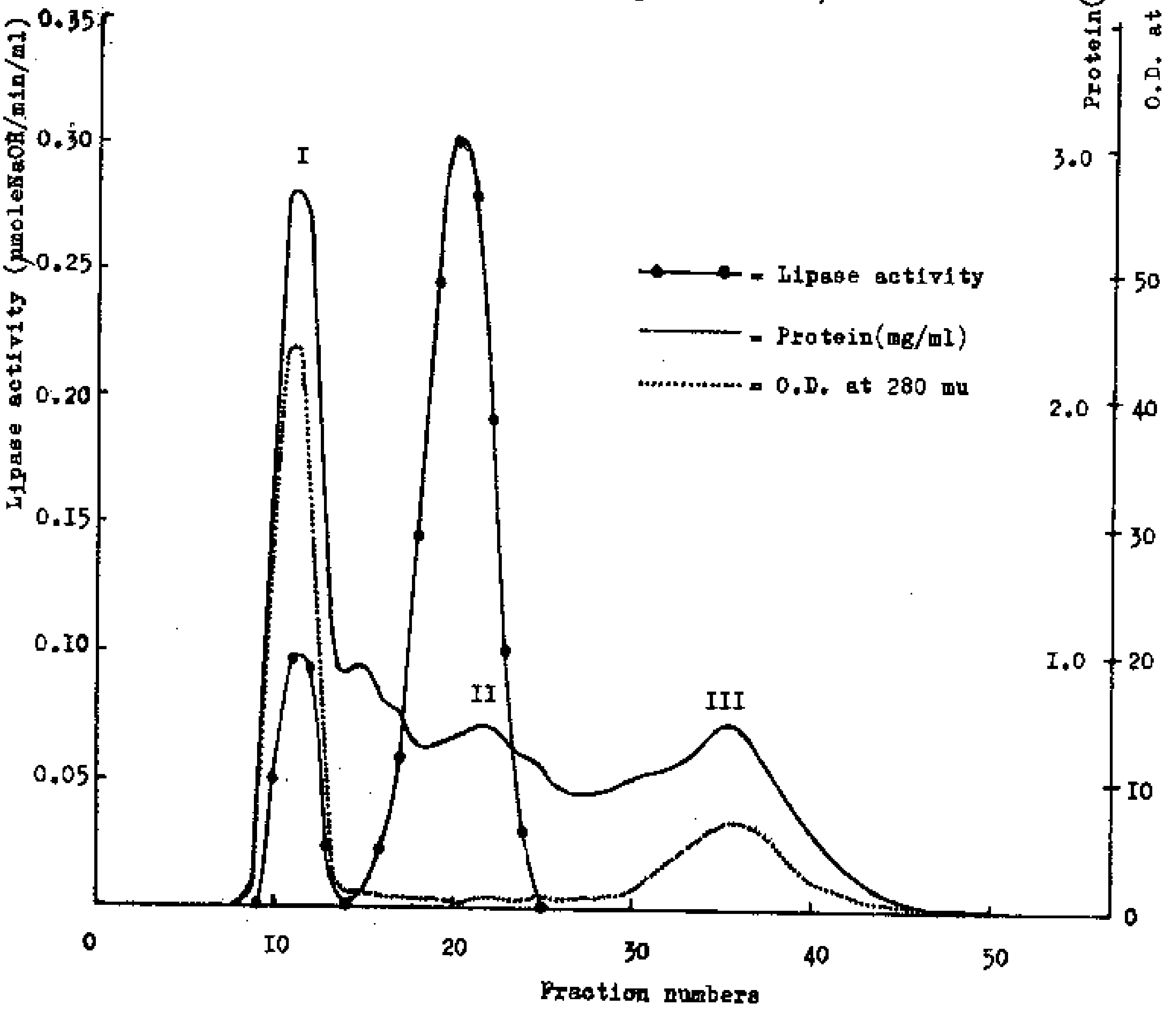
3.3.4.2 Gel - filtration

จากการใช้สารละลายที่สกัดจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน (25 % extract) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนในสารละลาย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G - 100 เก็บสารละลายที่ออกมาทีละ 5 มิลลิลิตรได้ผลดังรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่าเมื่อวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายที่ออกมาโดยใช้วิธีของ Lowry จะแบ่งออกเป็น peak ใหญ่ ๆ ได้ 3 peaks ได้แก่ peak ที่ I, II และ III peak ที่ I ออกมากับ void volume (55 มิลลิลิตร) peak ที่ II ออกมาตั้งแต่ fraction number ที่ 19 ถึง 26 และ peak ที่ III ออกมาตั้งแต่ fraction number ที่ 28 ถึง 48 ต่อจากนั้นจะไม่พบว่ามีโปรตีนออกมาอีกเลยจากการผ่านคอลัมน์จนครบ 24 ชั่วโมง (ผ่านไปจนถึง fraction number ที่ 100) ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวัด optical density ที่ 280 มิลลิไมครอนจะเห็นได้ชัดเพียง 2 peaks ซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ peak ที่ I และที่ III ของวิธีแรก

สำหรับการวัด activity ของไลเปสใน fraction number ต่าง ๆ พบว่าแยกออกไปเป็น 2 peaks peak แรกออกมากับ void volume คือตั้งแต่ fraction number ที่ 9 ถึง 13 ไลเปสที่ออกมานี้มี activity น้อยและมีโปรตีนปนอยู่มาก (specific activity 0.5 เท่าของเอนไซม์ก่อนผ่านคอลัมน์) ส่วนไลเปส peak หลังออกมาตั้งแต่ fraction number ที่ 15 ถึง 24 ซึ่งอยู่ใกล้กับโปรตีน peak ที่ II specific activity ของไลเปส peak นี้มากกว่าเอนไซม์ก่อนผ่านคอลัมน์ประมาณ 4 เท่า recovery yield ของไลเปสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 12

แสดง peaks ของโปรตีนและ lipase activity ใน fraction ต่างๆ
ที่ได้จาก Gel filtration (ใช้ Sephadex G-100)



3.4 ผลของการแช่รำแล้วอบต่อการเกิดกรดไขมันอิสระในรำข้าว

3.4.1 ผลของการแช่รำในน้ำและกรดแล้วอบ

ในการทดลองวัดการเกิดกรดไขมันอิสระในรำอบ รำแช่น้ำ และรำแช่กรดกำมะถัน 0.1 โมลาร์นานครึ่งชั่วโมงแล้วนำมาทำให้แห้ง เทียบกับรำ control (รำสดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิของห้อง) ที่ทิ้งไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กันได้ผลดังรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่ารำ control มีปริมาณกรดไขมันอิสระเกิดขึ้นเร็วมากโดยเฉพาะในระยะ 10 วันแรกของการทดลอง หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ รำที่อบอย่างเดียวมีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นมากกว่ารำที่แช่น้ำแล้วอบ ส่วนรำที่แช่กรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์แมลแทบไม่มีกรดไขมันอิสระเกิดขึ้นอีกเลยจากการเก็บรำไว้ถึง 30 วัน

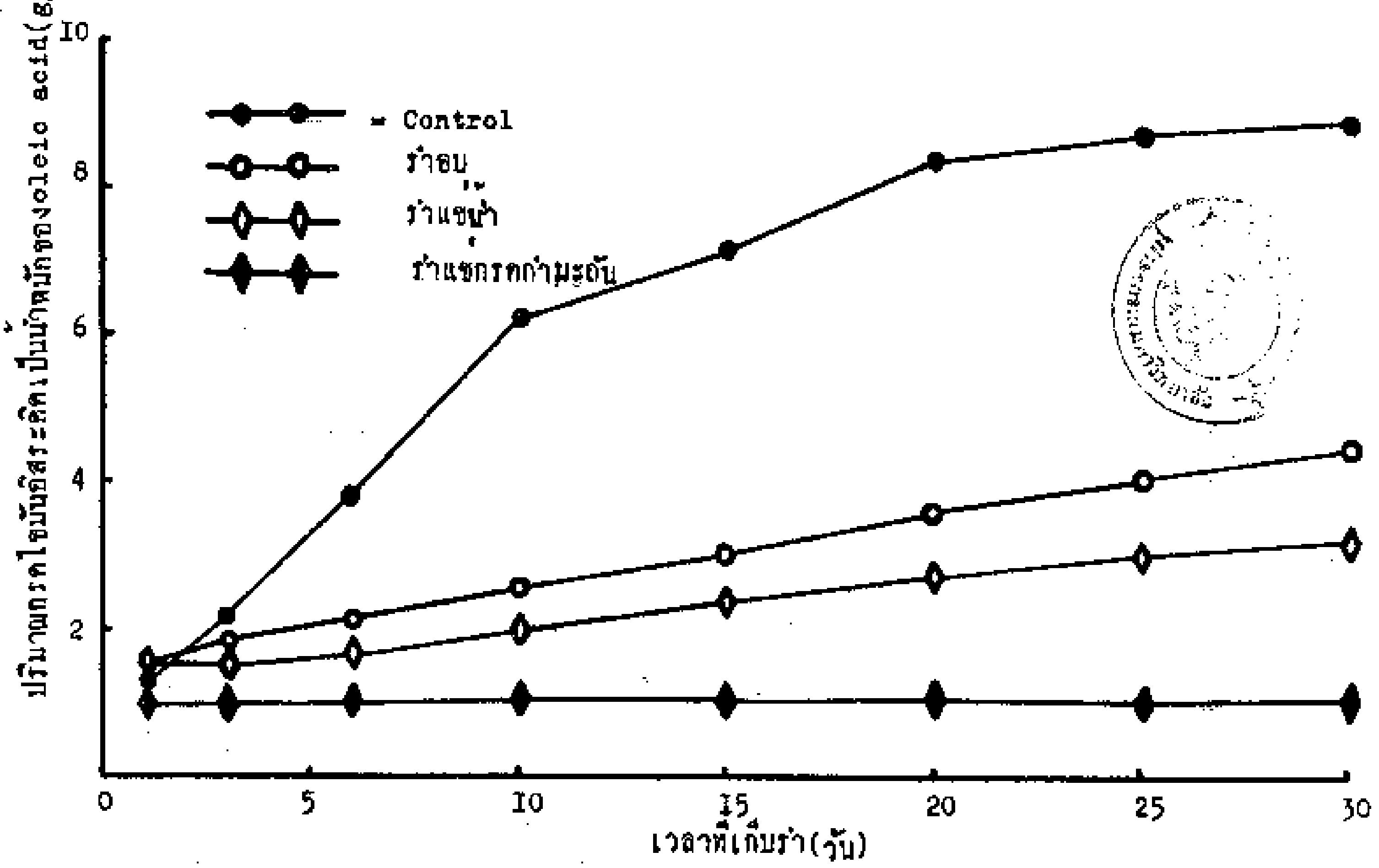
3.4.2 ผลของชนิดของกรดและความเข้มข้นของกรด

ในการแช่รำในกรดชนิดต่าง ๆ 4 ชนิดโดยใช้ความเข้มข้นของกรดเท่า ๆ กัน (0.1 นอร์แมล) โดยแช่ให้รำชื้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) อบให้แห้งแล้วทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิของห้อง การเกิดกรดไขมันอิสระในรำแช่กรดชนิดต่าง ๆ เทียบกับรำ control แสดงไว้ในตารางที่ 8 จะเห็นว่ารำแช่กรดแต่ละชนิดมีกรดไขมันอิสระเกิดขึ้นน้อยมาก และรำที่แช่กรดอนินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดมีกรดไขมันอิสระเกิดขึ้นน้อยกว่ารำที่แช่กรดน้ำส้ม

ในการทดลองแช่รำในกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0001 นอร์แมล ถึง 0.1 นอร์แมลได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นว่ายิ่งใช้ความเข้มข้นของกรดสูงขึ้น การเกิดกรดไขมันอิสระในรำก็ยิ่งน้อยลง

รูปที่ 13

แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระคิดเป็นน้ำหนักของ oleic acid ของรำอบ รำแช่น้ำ และรำแช่กรดกำมะถันแล้วอบให้แห้ง เมื่อทิ้งไว้ในระยะเวลาต่างๆกัน



ตารางที่ 8

แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระ (คิดเป็นน้ำหนักของ oleic acid) ในรำแช่กรดชนิดต่าง ๆ (0.1 N , 20% w / v) อบให้แห้งแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิของห้อง

เวลาที่เก็บรำ (วัน)	กรดไขมันอิสระในรำ control (g/100g dry wt)	กรดไขมันอิสระในรำแช่กรดชนิดต่าง ๆ (g/100 g dry wt)			
		H_2SO_4	HCl	HNO_3	CH_3COOH
1	3.79	1.13	1.17	1.16	1.33
5	5.60	1.17	1.22	1.13	1.42
10	6.86	1.12	1.21	1.15	1.49
15	7.48	1.09	1.17	1.16	1.54
20	8.54	1.15	1.28	1.16	1.48
25	9.48	1.10	1.24	1.15	1.58

ตารางที่ 9

แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระ (คิดเป็นน้ำหนักของ oleic acid) ในรำแช่กรดกำมะถันที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (20 % w/v) อบให้แห้ง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิของห้อง

เวลาที่เก็บรำ (วัน)	กรดไขมันอิสระในรำ control (g/100g dry wt)	กรดไขมันอิสระในรำอบ (g/100g dry wt)	กรดไขมันอิสระในรำแช่กรดกำมะถันที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (g/100g dry wt)			
			0.1N	0.01N	0.001N	0.0001N
4	3.78	2.57	1.13	2.13	1.97	1.79
8	5.63	2.67	1.16	1.93	2.08	1.92
12	6.40	3.20	1.13	2.20	2.29	1.87
16	7.65	3.30	1.09	2.24	2.32	2.00
21	8.53	3.65	1.16	2.31	2.52	2.21
30	9.25	4.25	1.36	2.38	2.69	2.26