2 วิธีทดลอง

2.1 วิธีเตรียมรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน (acetone - dried powder)

ใช้วิธีของ Nason (1955) โดยนำรำที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งมาชั่งให้มีน้ำหนักประมาณ 200 กรัมใส่ลงในวาร์ริ่งเบล็นเดอร์ เติมอะซีโตน (acetone) ที่มีอุณหภูมิประมาณ - 20 องศาเซ็นติเกรดลงไป 4 เท่าโดยปริมาตร เปิดเครื่องให้ปั่นอยู่ประมาณ 30 วินาทีแล้วเทลงใน Büchner funnel ดูดเอาอะซีโตนและสิ่งที่สกัดได้ด้วยอะซีโตนออกแล้วล้างด้วยอะซีโตนอีก 4 ครั้ง ๆละประมาณ 150 - 200 มิลลิลิตร นำรำที่ได้มาทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิของห้องโดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง รำที่ได้มีลักษณะสีขุ่นกว่าเดิม เป็นผงละเอียด มีน้ำมันรำเหลืออยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

2.2 วิธีเตรียม defatted rice bran

ใช้วิธีของ Houston et al (1951) โดยใช้รำที่เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งประมาณ 100 กรัม เติม n - hexane ที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซ็นติเกรดลงไป 4 เท่าโดยปริมาตร ปั่นให้เข้ากันและล้างด้วย n - hexane อีก 3 ครั้ง แบบเดียวกับวิธีเตรียมรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนในข้อ 2.1

2.3 วิธีสกัดเอนไซม์ไลเปส

ใช้วิธีของ Fiore and Nord (1950) โดยนำเอารำสดหรือรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนมาเติมน้ำ บัฟเฟอร์ (buffer) หรือสารละลายชนิดอื่น ๆ ให้มีความเข้มข้นของรำเป็น 20 หรือ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แล้วโฮโมจีไนส์ (homogenize) ด้วยเครื่องวาร์ริ่งเบล็นเดอร์ 5 นาที นำเอาโฮโมจีเนท (homogenate) ที่ได้มาทดลองโดยตรงหรือนำมาเหวี่ยง

ด้วยแรงขนาด 12,000×g 15 นาที แล้วนำเอาส่วนที่เป็นน้ำมาใช้ในการทดลอง รำสดเมื่อนำมาเหวี่ยงหลังจากโฮโมจีไนส์แล้วจะเกิดเป็นชั้น 3 ชั้น คือ ชั้นไขมัน (fatty layer)อยู่ข้างบน ชั้นกลางเป็นน้ำมีลักษณะขุ่นขาว ชั้นล่างเป็นตะกอนของกากรำ ส่วนรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนนั้นหลังจากเหวี่ยงแล้ว ชั้นไขมันจะหายไปแสดงว่าไขมันหรือน้ำมันรำถูกสกัดออกไป ชั้นที่เป็นน้ำมีลักษณะใสกว่าเดิมมาก มีสีค่อนไปทางชีน้ำตาลจาง ๆ การทดลองทั้งหมดทำที่อุณหภูมิประมาณ 3 องศาเซ็นติเกรด

2.4 <u>วิธีเตรียม substrate</u>

2.4.1 เตรียม substrate โดยใช้ polyvinyl alcohol เป็น emulsifying agent

ใช้วิธีของ Bier (1955) ทำโดยชั่ง polyvinyl alcohol 10 กรัม ค่อย ๆ เติมลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรที่มีกรดเกลือ 0.1 นอร์แมล 5 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 75 - 80 องศาเซ็นติเกรด พร้อมกับคนบ่อย ๆ จนได้สารละลายใส (ใช้เวลาประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง) ทำให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้องแล้วกรองเอาตะกอนออก ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์แมล เหลงในวารีริ่งเบล็นเดอร์ เติมน้ำมันมะกอก 15 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ 10 นาที ใช้เป็น substrate ของไลเปส เก็บไว้ทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรด ใช้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์และต้องโฮโมจีไนส์ทุกครั้งที่ทดลองเป็นเวลา 5 นาที

2.4.2 เตรียม substrate โดยใช้ gum acacia เป็น emulsifying agent

ใช้วิธีของ Downey and Andrews (1965) เตรียมโดยชั่ง gum acacia 10 กรัมผสมกับน้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตร ในวาร์ริ่งเบล็นเดอร์ เติมน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรด 70 มิลลิลิตร แล้วโฮโมจีไนส์ 5 นาที นำเอาอีมัลชั่น (emulsion) ที่ได้มาปรับให้ pH เท่ากับ8.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 นอร์แมล ปรับปริมาตรสุดท้ายของ substrate ให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ substrate นี้เตรียมใหม่ทุกวันที่ทำการทดลอง

2.5 <u>วิธีวัดไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิก</u>

เครื่องมือวาร์เบิกเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้วัดปฏิกริยาที่มีแก๊สเกิดขึ้นหรือลดลงได้ จึงสามารถใช้วัดไลเปสได้ตามวิธีของWills (1954) ในการทดลองนี้กรดไขมันอิสระซึ่งได้จากการไฮโดรไลซีสของน้ำมันมะกอก จะทำปฏิกริยากับไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ซึ่งจะทำให้ความกดดันของมาโนมิเตอร์ในเครื่องมือวาร์เบิกเปลี่ยนแปลงไป จึงสามารถวัดไลเปสได้จากปริมาตรของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น sensitivity ของเครื่องมือเท่ากับ 0.045 µmole NaOH

ในการทดลองใช้ขวดวาร์เบิก (Warburg flask) ชนิดที่มีแขน (sidearm) ข้างเดียว ที่ main compartment มีไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ และ substrate ที่เตรียมตามวิธีที่ 2.4.1 ที่แขนของขวดมีไฮโมจีเนตหรือส่วนที่เป็นน้ำหรือกากรำที่ผสมกับน้ำให้มีปริมาณรำข้นเท่ากับในไฮโมจีเนต 1 มิลลิลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 3 มิลลิลิตร จะมีไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 14.5×10^{-3} โมลาร์ มี substrate 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำขวดวาร์เบิกสวมเข้ากับแขนของมาโนมิเตอร์หลังจากนั้นผ่านแก๊ส 5 % CO_2 + 95 % N_2 5 นาที แล้วปิดจุกด้านแขนของขวด นำเอาไปจุ่มลง

ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรดในเครื่องวาร์เบิก ค่อย ปรับให้คอขวดติดสนิทกับแขนของมาโนมิเตอร์ 2 - 3 ครั้งในเวลา 5 นาทีแรก. เพื่อกันรั่วเปิดเครื่องให้เขย่า 15 นาที เพื่อให้เกิดสมดุลย์ระหว่างอากาศภายในขวดกับในมาโนมิเตอร์ ปรับของเหลวในมาโนมิเตอร์ให้ตรงกับ reference point ปิดเครื่องเขย่าและปิดจุกของ มาโนมิเตอร์ไม่ให้อากาศภายนอกเข้า แต่ให้มีช่องติดต่อถึงกันระหว่างมาโนมิเตอร์กับขวดวาร์เบิก ยกมาโนมิเตอร์ออกมาเอียงให้เอนไซม์ในแขนลงมาผสมกับของเหลวใน main compartment แล้วใส่ลงใน water bath ตามเดิน เปิดเครื่องเขย่าแล้วเริ่มอ่านการเปลี่ยนแปลงของของเหลวในมาโนมิเตอร์ด้านเปิดเปรียบเทียบกับ reference point ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ปริมาณของแก๊สที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยาของบัฟเฟอร์กับกรดไขมันอิสระวัดเป็นไมโครลิตรที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

2.6 <u>การวัดไลเปสโดยวิธีสกัดกรดไขมันอิสระมาไตเตรต</u>

ในการทดลองอาศัยหลักที่ substrate ซึ่งเป็นน้ำมันเมื่อ incubate กับเอนไซม์จะเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซีสขึ้น สกัดกรดไขมันอิสระที่เกิดและน้ำมันที่เหลือด้วยตัวทำละลาย คือน้ำมันปิโตรเลียม แยกชั้นของตัวทำละลายมาระเหยเอาตัวทำละลายออก สิ่งที่เหลือคือกรดไขมันอิสระและน้ำมัน หาปริมาณของกรดไขมันอิสระโดยไตเตรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน

วิธีทดลองดัดแปลงจากวิธีของไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) โดยใช้หลอดทดลองชนิดที่มีฝาเกลียว ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซ็นติเมตร สูง 8 เซ็นติเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จน 0.08 โมลาร์ substrate (เตรียมตามข้อ 2.4.1) 2.2 % (v/v) เอนไซม์ 3.0 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายรวมเป็น 15 มิลลิลิตร

incubate ในเครื่อง shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด เปิดเครื่องให้เขย่าอยู่ตลอดเวลาจนถึงกำหนดเวลาที่ต้องการ หยุดปฏิกริยาของเอนไซม์โดยเติมกรดกำมะถัน 0.3 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร สกัดน้ำมันและกรดไขมันอิสระออกโดยใช้น้ำมันปิโตรเลียมที่มีจุดเดือดระหว่าง 60 ถึง 80 องศาเซ็นติเกรด 2 ครั้ง

สกัดครั้งแรกโดยเติมน้ำมันปิโตรเลียมลงไป 15 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 200 ครั้ง แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยแรง 3,000x g 20 นาที ชั้นปิโตรเลียมซึ่งมีน้ำมันและกรดไขมันอิสระละลายอยู่จะแยกออกมาอยู่ชั้นบน ดูดชั้นของปิโตรเลียมออก 10 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตต์ เติมปิโตรเลียมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร เขย่าและเหวี่ยงแบบเดียวกับครั้งแรก ดูดชั้นของปิโตรเลียมออกอีก 10 มิลลิลิตร ใส่รวมกับน้ำมันที่สกัดได้ครั้งแรก ระเหยเอาตัวทำละลายออกบน steam bath โดยพ่นแก๊สไนโตรเจนลงไปเพื่อช่วยให้การระเหยเร็วขึ้น เมื่อปิโตรเลียมระเหยไปหมดแล้ว (ทดสอบโดยนำมาชั่งจนมีน้ำหนักคงที่) นำสิ่งที่เหลือจากการระเหยคือน้ำมันปนกับกรดไขมันอิสระมาเติมแอลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์) 10 มิลลิลิตร หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.01 นอร์แมล โดยใช้เครื่องมือ Radiometer pH - stat titrimeter จุดสุดท้ายของการไตเตรทคือจุดที่ pH ของสารละลายเท่ากับ 8.5 คำนวนหา activity ของไลเปสคิดเป็น unit ซึ่งเท่ากับจำนวน μmole NaOH / min / gm rice bran

blank ของการทดลองคือหลอดที่เติมสารทุกอย่างเหมือนกับขวดที่วัดไลเปสแต่เอนไซม์ที่เติมจะต้มเสียก่อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที

2.7 วิธีวัดไลเปสด้วยเครื่องมือ pH - Stat

pH-stat เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของกรดหรือด่างที่เกิดขึ้นในปฏิกริยาต่าง ๆ โดยที่จะเป็นตัวควบคุมให้ pH คงที่เช่นในการวัดไลเปส ถ้ามีไลเปส incubate กับ substrate ที่ pH เหมาะสมก็จะเกิดไฮโดรไลซีสของ substrate ได้กรดไขมันอิสระ กรดจะทำให้ pH ของสารละลายลดลงเรื่อย ๆ เครื่องมือจะเริ่มไตเตรตเมื่อ pH ลดลงต่ำกว่าที่กำหนดและจะไตเตรตตลอดเวลาที่ยังมีกรดเกิดขึ้นในปฏิกริยา sensitivity ของเครื่องมือเท่ากับ 0.005 μmole NaOH

ในการทดลองดัดแปลงจากการทดลองของ Downey and Andrews (1965) ในขวดไตเตรต (titration vessel) มี substrate (เตรียมตามวิธีในข้อ 2.4.2) 7%(v/v) มีสารละลาย NaCl 0.15 โมลาร์ และมีเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมดรวมเป็น 20 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาปรับให้มี pH เท่ากับ 8.6 แล้วเริ่มไตเตรตเมื่อ pH ของสารละลายลดลงมาที่ pH 8.5 (ใช้เวลาประมาณ 6 - 7 นาที) blank ของปฏิกริยาทำแบบเดียวกันแต่ไม่มีเอนไซม์ ในการทดลองต้องทำให้อุณหภูมิของสารละลายที่จะไตเตรตเท่ากับอุณหภูมิที่ทดลองเสียก่อน (ปรกติใช้อุณหภูมิ 43 องศาเซนติเกรดซึ่งจะต้องใช้เวลาในการแช่ substrate ที่อุณหภูมินี้ 10 นาที) ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาพร้อมกับบันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการทำให้ pH คงที่ (ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.006 นอร์มอล) ด้วยเครื่อง titrigraph อย่างน้อย 3 นาที คำนวณผลที่ได้เป็น unit activity (μmole NaOH / min / gm rice bran) หรือเป็นหน่วยอย่างอื่นซึ่งจะกล่าวภายหลัง

หมายเหตุ ส่วนประกอบและวิธีการใช้เครื่องมือ pH - stat มีอยู่ในภาคผนวก

2.8 วิธีทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ (Purification of Lipases)

2.8.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate fractionation)

ได้ทำการทดลองทำที่ pH ต่าง ๆ 3 ค่า

2.8.1.1 ใช้สารละลายที่สกัดจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน ที่มีความข้นของรำ 20 เปอร์เซนต์ ซึ่งมี pH ประมาณ 6.5 - 6.7 มาเติมผลึกของแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดให้ละเอียดทีละน้อย คนให้ผลึกละลายตลอดเวลาด้วย magnetic stirror จนมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ในสารละลายเป็น 30 เปอร์เซนต์ของสารละลายอิ่มตัว (% saturation) ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเหวี่ยงด้วยแรง 12,000×g 15 นาที เก็บตะกอนไว้ นำเอาส่วนที่เป็นน้ำมาวัดปริมาตร แล้วเติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปอีกให้มีความเข้มข้นเป็น 60, และ 100 เปอร์เซนต์ของสารละลายอิ่มตัวนำตะกอนที่ได้แต่ละส่วนมาละลายในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 3 องศาเซ็นติเกรด ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หา activity ของแต่ละส่วนพร้อม ๆ กับสารละลายที่สกัดจากรำก่อนนำมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

2.8.1.2 ทำแบบเดียวกับวิธีแรกแต่ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 3.0 เสียก่อนแล้วนำมาเติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟต

2.8.1.3 ทำแบบเดียวกับวิธีแรกแต่ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 5.5 เสียก่อน (ใช้ตามวิธีของ Singer,1948) เก็บตะกอนที่ได้ที่ pH นี้ โดยนำมาเหวี่ยงด้วยแรง 12,000×g 15 นาที ปรับ pHของสารละลายที่ได้ให้เท่ากับ 6.5 ด้วยด่าง 0.5 นอร์แมลแล้วจึงเติมแอมโมเนียมซัลเฟตแบบเดียวกับวิธีแรก การทดลองทั้งหมดทำในอ่างน้ำแข็งปนเกลือที่มีอุณหภูมิ 0 - 2 องศาเซ็นติเกรด

2.8.2 Gel - filtration ใช้วิธีของ Downey and Andrews (1965) แบ่งวิธีทดลองออกเป็นขั้น ๆ ได้ดังนี้

2.8.2.1 การเตรียมคอลัมน์ (column)

ใช้ Sephadex G - 100 gel - filtration ชนิดที่มี particle size ขนาดปานกลาง (40 - 120 ไมครอน) แช่ในสารละลายที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.025 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซ็นติเกรดเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ gel พองตัวเต็มที่ (swell) แล้วนำมาบรรจุใน Sephadex column ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซ็นติเมตร ยาว 45 เซ็นติเมตร ตามวิธีของ Flodin (1963) นำเอามาทำให้สมดุลย์ (equilibrate) ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.025 โมลาร์กับโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ในห้องที่มีอุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซ็นติเกรด total bed volume ของ column เท่ากับ 170 มิลลิลิตร

2.8.2.2 การเตรียมเอนไซม์เพื่อผ่านคอลัมน์

ใช้สารละลายที่สกัดได้จากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน (25 % extract) โดยสกัดด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมแบบเดียวกับที่ใช้ผ่านคอลัมน์ แล้วนำเอาส่วนเป็นน้ำที่ได้นี้ไปเหวี่ยงอีกครั้งด้วยแรง 20,000xg 60 นาที ส่วนที่เป็นไขมันซึ่งเดิมอยู่ในสารละลายจะแยกตัวออกเป็นฝ้าอยู่ข้างบน ใช้ปิเปตต์ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสมาผ่านคอลัมน์

2.8.2.3 การผ่านคอลัมน์

เมื่อปรับอัตราการไหลออกของ effluent ให้เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงแล้ว apply สารละลายเอนไซม์จำนวน 15 มิลลิลิตร ผ่านเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์ เก็บ effluent ด้วยเครื่อง

fraction collector โดยใช้ siphon ขนาด 5 มิลลิลิตร การทดลองทำในห้องที่มีอุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซ็นติเกรด ปล่อยให้ eluent ผ่านคอลัมน์เรื่อย ๆ ไปจนเก็บได้ 50 fractionsในเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำแต่ละหลอดมาวัด activity ของไลเปสและหาปริมาณโปรตีนต่อไป

2.9 การวัดโปรตีน

ใช้วิธีของ Lowry (Lowry et al.,1951) ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

2.9.1 สารละลายที่ใช้

Reagent A, 2 เปอร์เซ็นต์ Na_2CO_3 ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 นอร์มอล

Reagent B, 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4.5H_2O$ ใน1.0 เปอร์เซ็นต์ potassium tartrate

Reagent C, alkaline copper solution เตรียมโดยผสม reagent A.50 มิลลิลิตรกับ reagent B. 1 มิลลิลิตร

Reagent E, Phenol (Folin - Ciocalteu) reagent ทำให้เจือจางในน้ำ 1.2 เท่าโดยปริมาตร

001225

2.9.2 วิธีวัด

ใช้หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร เติม reagent C 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที เติม reagent E 0.5 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้ผสมกันทันทีเพื่อป้องกันการสลายตัวของ phenol reagent ในด่าง ทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หรือมากกว่านั้น วัด optical density ของสารละลายที่ 750 มิลลิไมครอนเทียบกับ blank ซึ่งทำแบบเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโปรตีน ในการทดลองใช้ bovine serum albumin เป็นมาตรฐาน

การหาปริมาณของโปรตีนโดยวิธีนี้ Lowry ได้หา sensitivity ของการวัดพบว่าเท่ากับ 0.2 µg protein ซึ่งพอ ๆ กับวิธีที่ใช้ Nessler's reagent มี sensitivity มากกว่าการวัด absorption ของแสงอุลตราไวโอเลตที่ 280 มิลลิไมครอนราว 20 เท่า และเมื่อเทียบกับวิธี biuret จะ sensitive มากกว่าราว 100 เท่า

2.10 การแช่ร่ำในน้ำหรือกรด

นำร่ำมาแช่ในน้ำหรือกรดที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซ็นติเกรด) โดยทำให้มีความเข้มข้นของร่ำเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใช้เวลาในการแช่ 30 นาทีพร้อม ๆ กับคนให้เข้ากัน 3 - 4 ครั้ง นำมาเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยแรง 3,000 x g 20 นาที เหส่วนที่เป็นน้ำ (supernatant) ทิ้งไป เก็บส่วนที่ตกตะกอนไปอบต่อไปดังในข้อที่ 2.11

2.11 การอบรำ

ในการทดลองแต่ละชุด นำรำอ่อนและรำแช่น้ำหรือแช่กรดแล้วมาทำให้แห้ง โดยการนำรำมาแผ่บาง ๆ ในถาด แล้วนำมาเข้าตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซ็นติเกรด เกลี่ยรำไปมาเป็นครั้งคราวประมาณครึ่งชั่วโมงต่อครั้ง เพื่อช่วยให้รำแห้งเร็วขึ้น อบไว้ประมาณ 6 ชั่วโมง รำที่ได้นั้นจะมีความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซนต์ นำรำออกมาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิของห้องประมาณ 1 ชั่วโมง รำแช่น้ำหรือรำแช่กรดหลังอบให้แห้งแล้วมักจะเป็นก้อนเล็ก ๆ ต้องนำมาทำให้ละเอียดด้วยวาร์ริ่งเบล็นเดอร์ (Waring blender) โดยเปิดเครื่องให้ปั่นเป็นเวลา 1 นาที เก็บรำแต่ละชนิดไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิดสนิทเพื่อวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

2.12 วิธีหาปริมาณกรดไขมันอิสระในรำข้าว

ชั่งรำที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ ให้มีน้ำหนักประมาณ 20 - 25 กรัม (ชั่งอย่างละเอียด) ใส่ในถุงผ้าหรือ thimble แล้วใส่ใน Soxhlet apparatus เติมน้ำมันปิโตรเลียม (จุดเดือดระหว่าง 60 - 68 องศาเซ็นติเกรด) 100 มิลลิลิตร เปิดเครื่องให้สกัดน้ำมันอยู่ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นลงแล้วเหลี่ยงที่สกัดได้เก็บไว้ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี anhydrous โซเดียมซัลเฟต เพื่อดูดน้ำที่ติดมาด้วย โดยเขย่าแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมงหรือค้างคืน กรองเอาโซเดียมซัลเฟตออกนำสิ่งที่กรองได้ (filtrate) ไประเหยเอาน้ำมันปิโตรเลียมออกโดยวางบน steam bath แล้วพ่นแก๊สไนโตรเจนลงไปเพื่อช่วยให้การระเหยเร็วขึ้น นำสิ่งที่เหลือหลังจากระเหยเอาปิโตรเลียมออกหมดแล้วมาชั่งหาน้ำหนักอย่างละเอียด ซึ่งจะมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 3 - 4 กรัม

นำเอาน้ำมันที่ได้มาเติมแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร อุ่นใน water bath พร้อมกับเขย่าให้กรดไขมันอิสระละลายในชั้นของแอลกอฮอล์แล้วไตเตรตหาปริมาณของกรดไขมันอิสระโดยใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 นอร์แมล โดยใช้บิวเรตต์ (burette) ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ nile blue เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) จุดสุดท้ายของการไตเตรตคือจุดที่เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูแกมส้ม การทดลองแต่ละครั้งใช้รำชนิดละ 2 ตัวอย่าง (duplicate) คำนวณปริมาณของกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นในรำคิดเป็นน้ำหนักของ Oleic acid ต่อปริมาณรำ 100 กรัมที่หักความชื้นออกแล้ว

2.13 <u>การหาความชื้น</u>

ชั่งภาชนะอย่างละเอียดแล้วใส่รำลงในภาชนะดังกล่าวแล้ว นำมาชั่งอีกครั้งหนึ่งให้ได้น้ำหนักรำประมาณ 8 กรัม นำรำเข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซ็นติเกรด จนมีน้ำหนักคงที่ (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที) นำมาเก็บไว้ให้เย็นลงในโถอบ (desiccator) แล้วชั่งหาน้ำหนักที่หายไป คำนวณหาปริมาณของความชื้นเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของรำ