การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว

(A Study of Rice Bran Lipase)

โดย

นาย นิคม ขัยศิริ วท.บ. 2509

วิทยานิพนธ์นี้

เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนกวิชาชีวเคมี

พ.ศ. 2513

001225

I15947713

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล

วันที่ 4 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2533

เรื่อง : การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว

ผู้เขียน : นาย นิคม ชัยศิริ

แผนกวิชา : ชีวเคมี

วันที่ : พฤษภาคม 2513

บทคัดย่อ

การวัดเอนไซม์ไลเปสที่มีจำนวนน้อยทำได้ลำบากมาก เช่นในการศึกษาไลเปสในรำข้าวของไพเราะ หิพยหัศน์ (2510)ต้องใช้เวลาในการ incubate ถึง 5 ชั่วโมง การสกัดเอาสารออกมาไตเตรตหาปริมาณกรดไขมันอิสระก็ยุ่งยากและไม่ละเอียด จึงทำให้การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ทำได้ไม่สะดวกและรวดเร็ว ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความประสงค์ที่จะหาวิธีใหม่ ๆ ที่สะดวก ถูกต้อง และ sensitive กว่าเดิม ได้ทดลองวัดไลเปสโดยวิธีใช้เครื่องมืออาร์เบิก วิธีสกัดเอาสารมาไตเตรตหาปริมาณกรดไขมันอิสระอย่างละเอียดโดยเครื่องมือ pH - stat และวิธีใช้เครื่องมือ pH - statวัดเอนไซม์โดยตรง พบว่าวิธีหลังสุดทำได้รวดเร็วและสะดวกที่สุด จากการทดลองโดยใช้วิธี pH - stat นี้ศึกษาไลเปสในรำข้าวพบว่าการโอไมจิไนส์ช่วยสกัดไลเปสให้ออกมาจากรำได้มากกว่าการแช่รำเพียงอย่างเดียว ไลเปสเสถียรมากที่อุณหภูมิต่ำๆ(4 องศาเซ็นติเกรด) หรือที่pH ระหว่าง 4 - 10 ไลเปสจะเสียสภาพง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซ็นติเกรดหรือที่ pH นอกเหนือไปจากที่กล่าว ค่า Michaelis - Menten Constant วัดได้ 3.88×10^{-2} โมลาร์และมีค่า activation energy 7020 cal/mole

เกลือที่มีฤทธิ์เป็นกลางที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ขึ้นไปทำให้ activity ของไลเปสลดลง ได้ทดลองทำให้ไลเปสบริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าไลเปสจะตกปนลงมากับตะกอนโปรตีนทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทดลอง ในการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ของ Sephadex (G-100) จะได้ไลเปส 2 peaks peak ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมี specific activity และปริมาณน้อยกว่า peak ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ recovery yield ของทั้ง2peaks รวมกันได้ 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอาผลที่ได้จากการทดลองมาใช้ในการระงับการเกิดกรดไขมันอิสระในรำข้าวเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานาน พบว่าการแช่รำในน้ำแล้วอบให้แห้งระงับการเกิดกรดไขมันอิสระได้ดีกว่าการอบรำเพียงอย่างเดียวและการแช่รำในกรดเจือจางแล้วอบให้แห้งระงับการเกิดกรดไขมันอิสระได้ดีที่สุด จากการค้นพบเหล่านี้จึงอาจจะนำเอาวิธีแช่รำในกรดไปใช้ในการป้องกันการสูญเสียน้ำมันรำเมื่อเก็บรำไว้นาน ๆ ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันรำ

Title : A Study of Rice Bran Lipase

Name : Mr. Nikom Chaisiri

Department : Biochemistry

Date : May 1970

ABSTRACT

The measurement of a small amount of lipase can be made only with difficulty. For instance the method used in the study of lipase in the rice bran by Tippayatasana(1967), was quite complicated and involved an incubation time of 5 hours. Consequently, the method is not convenient for detailed studies of properties of the enzyme. The purpose of this investigation is to find a new method which is accurate, more sensitive, and convenient. Manometric method using Warburg apparatus, the titration of free fatty acids after solvent extraction using a pH-stat titrimeter, and the direct titration of the reaction mixture using a pH-stat methods, were tried and compared. It was found that the last method was the quickest, most sensitive, and most convenient.

Using this pH-stat method for subsequent studies on rice bran lipase, it was found that homogenization helped in the extraction of the enzyme uing water. Lipase in the rice bran extract was stable at low temperature(4° C) and at medium pH. The

enzyme was very unstable at temperture greater than 60 C or at pHs lower than 4 or higher than 10. The Michaelis- Menten constant of lipase was found to be $3.88X10^{-2}$M and its activation energy was 7020 cal/mole. Some neutral salts of concentrations greater than 0.5 M would decrease the activity of the enzyme. When the lipase was purified by ammonium sulfate fractionation, it was found that the lipase would be precipitated by all concentrations of ammonium sulfate used. Purification of the enzyme by eluting through a Sephadex G-100 column resulted in two distinct peaks of lipases. The higher molecular weight peak had less specific activity and smaller in yield than the lower molecular weight peak. The overall recovery yield of both peaks was 95 %. Attempts were made to make use of the experimental results obtained obove in preventing the enzymic hydrolysis of rice bran oil in the stored rice bran. It was found that if rice bran was suspended in water then dried, the liberation of free fatty acids was less than the bran which was not treated with water. Suspending of rice bran in dilute acids and drying it in the oven was most effective in preventing the liberation of the free fatty acids. It is suggested that this discovery may be applied in preventing losses of the oil during storage in the rice bran oil industry.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กำจัด มงคลกุล อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำและชี้แจงเป็นอย่างดีตลอดเวลาของการทดลอง ทำให้การวิจัยบรรลุผลสมความปรารถนา

ขอขอบคุณอาจารย์ สัณห์ พณิชยกุล แผนกชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณปรีดา อันประเสริฐ ที่ได้แนะนำและช่วยเหลือการวิจัยบางตอน

และขอขอบคุณ สภาวิจัยแห่งชาติและบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเรื่องนี้

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ค

คำขอบคุณ ..... จ

สารบาญ ..... ฉ

รายการตารางประกอบ ..... ฌ

รายการรูปประกอบ ..... ญ

บทนำ 1

วัสดุที่ใช้ 5

รำข้าว 5

สารเคมี 5

เครื่องมือ 6

วิธีทดลอง 7

วิธีเตรียมรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน 7

วิธีเตรียม defatted rice bran 7

วิธีสกัดเอนไซม์ไลเปส 7

วิธีเตรียม substrate 8

วิธีวัดไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิก 9

การวัดไลเปสด้วยวิธีสกัดกรดไขมันมาไตเตรท 10

สารบาญ(ต่อ)

หน้า

วิธีวัดไลเปสด้วยเครื่องมือ pH - stat 12

วิธีทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ 13

วิธีหาปริมาณโปรตีน 15

การแช่รำในน้ำหรือกรด 16

การอบรำ 17

วิธีหาปริมาณกรดไขมันอิสระในรำข้าว 17

การหาความชื้น 18

ผลการทดลอง 19

ผลการศึกษาไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิก 19

ผลการทดลองโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันอิสระมาไตเตรต 23

ผลการศึกษาไลเปสด้วยเครื่องมือ pH - stat 26

ผลการสกัดไลเปสและ activity ของไลเปสในรำชนิดต่าง ๆ 26

เสถียรภาพของไลเปส 30

Enzyme Kinetics 35

ผลของการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ 44

สารบาญ(ต่อ)

หน้า

ผลของการแช่ร่ำแล้วอบต่อการเกิดกรดไขมันอิสระในร่ำข้าว.... 48

วิจารณ์ผลของการทดลอง 52

สรุปผลการทดลอง 60

ภาคผนวก 62

บรรณานุกรม 65

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดง activity ของไลเปสซึ่งวัดโดยวิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรตในส่วนต่าง ๆ ของรำเมื่อสกัดด้วยน้ำ 25

ตารางที่ 2 ผลของเวลาแช่รำและการใช้โมจีไนส์ ในการใช้น้ำสกัดไลเปสจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน..... 28

ตารางที่ 3 ผลของการสกัดไลเปสจากรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตนด้วยน้ำโดยการสกัดด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง 29

ตารางที่ 4 activity ของไลเปสในรำข้าวชนิดต่าง ๆ (ใช้รำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน) 29

ตารางที่ 5 แสดงเสถียรภาพของไลเปสในรำที่ทำให้แห้งด้วยอะซีโตน เมื่อเก็บรำไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 31

ตารางที่ 6 ผลของ $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ NaCl ต่อ activity ของไลเปส 43

ตารางที่ 7 ผลของการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 45

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระในรำแช่กรดชนิดต่าง ๆ แล้วอบให้แห้ง 50

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระในรำที่แช่กรดกำมะถันที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วอบให้แห้ง 51

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 แสดง activity ของไลเปส เมื่อใช้รำสด เมื่อแช่ไฮโมจีเนตไว้ 12 ชั่วโมง 20

รูปที่ 2 activity ของไลเปสในส่วนต่าง ๆ ของรำสดและ defatted rice bran 21

รูปที่ 3 แสดง activity ของไลเปสเมื่อสกัดด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 22

รูปที่ 4 แสดง inbation time ต่อactivity ของไลเปสใน supernatant ของรำสด..... 24

รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการสูญเสีย lipase activity 32

รูปที่ 6 ความเสถียรของไลเปสเมื่อแช่ไว้ที่ pH ต่าง ๆ 34

รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส 36

รูปที่ 8 แสดง Lineweaver and Burk's Plot ของไลเปส เมื่อใช้อีมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็น substrate 37

รูปที่ 9 แสดงผลของ pH ต่อ activity ของไลเปส 39

รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อ activity ของไลเปส 40

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 แสดง Arrhenius plot ของการไฮโดรไลซีสของน้ำมันมะกอกโดยไลเปส 41

รูปที่ 12 แสดง peaks ของโปรตีนและ activity ของไลเปสใน fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก gel - filtration (ใช้ Sephadex G - 100) 47

รูปที่ 13 แสดงปริมาณกรดไขมันอิสระของรำอบ รำแช่น้ำ และรำแช่กรดกำมะถัน แล้วอบให้แห้ง 49

รูปที่ 14 แสดงรูปของเครื่องมือ pH - stat 64

บทนำ

เอสเทอเรสเป็นชื่อกว้าง ๆ ของเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ ester bond ของsubstrate หลายชนิด ดังนั้นไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ substrate จำพวกไขมันจึงรวมอยู่ในเอนไซม์จำพวกนี้ด้วย แต่ความแตกต่างระหว่างไลเปสกับเอนไซม์เอสเทอเรสชนิดอื่น ๆ ก็ยังมิได้มีการให้คำจำกัดความที่แน่นอนลงไป (Hoftee, 1960) ความแตกต่างระหว่างไลเปสและเอสเทอเรสบางทีก็อาศัยคุณสมบัติทางเคมีของ substrate กล่าวคือไลเปสหมายถึงเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซีสกับเอสเทอของกรดไขมันที่มี chain ยาว ส่วนเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ aliphatic ester ที่มี chain สั้น ๆ เรียกว่า oli-esterases หรือ simple esterases (Hoftee,1954) หรืออีกอย่างหนึ่งไลเปสหมายถึงเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ substrateพวก triglycerides

อย่างไรก็ตาม Cherry & Crandall (1932) พบว่าทั้งไลเปสและเอสเทอเรสจากตับอ่อนสามารถไฮโดรไลส์ tributyrin จึงทำให้ความหมายของเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวไม่ค่อยชัดเจน Sarda & Desnuelle (1958) ได้ศึกษาไลเปสจากตับอ่อนที่มีความบริสุทธิ์สูงทำให้พบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อทดลองโดยใช้ substrate ที่ยังไม่ละลายเกินจุดอิ่มตัวของมันเท่านั้น Aldridge (1954) และ Desnuelle (1961) ได้ทดลองหา activity ของไลเปสโดยใช้ substrate หลาย ๆ ชนิด แล้วสรุปว่า เอสเทอเรสคือเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ substrate ที่ละลายน้ำได้ ส่วนไลเปสหมายถึงเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์อีมัลชั่นของsubstrateพวกไขมัน สำหรับเอนไซม์ที่เกิดปฏิกริยากับ substrate ที่เป็นอีมัลชั่น Desnuelle(1951) เรียกรวมกันว่า "lipase-type esterase" ซึ่งจะรวมทั้งเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ด้วยเช่น cholesterol esterase เป็นต้น คำจำกัดความของไลเปสตามที่ Aldridge และ Desnuelle กล่าวนี้

มีผู้นิยมใช้กันมากในระยะหลัง ๆ เช่นในการศึกษาของ Reboud et al (1962) Downey & Andrews(1965) เป็นต้น

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าเอนไซม์ในรำข้าวทำให้น้ำมันรำเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซีสเป็นผลให้ปริมาณน้ำมันในรำที่เก็บไว้ลดลง(Drown, 1903) ดังนั้นในการที่จะสกัดน้ำมันรำให้ได้ปริมาณสูงจึงต้องนำเอารำมาสกัดน้ำมันออกหลังจากสีข้าวให้เร็วที่สุด แต่ในทางปฏิบัติไม่สามารถที่จะนำรำไปสกัดน้ำมันได้ในเวลาที่รวดเร็วพอ การลดลงของน้ำมันเมื่อทิ้งรำไว้นาน ๆ จึงเป็นปัญหาประการสำคัญอันหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันรำ ในการทดลองเพื่อระงับการเกิดไฮโดรไลซีสของน้ำมันรำซึ่งเนื่องมาจากเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่มักจะใช้ความร้อนในการทำลายเอนไซม์เสียก่อนที่จะนำรำมาเก็บ เช่นในการทดลองของWest & Cruz (1933) พบว่าก้อนรำที่ 100 องศาเซ็นติเกรด 6 ชั่วโมงแล้วเก็บรำไว้ในถุงที่กันความชื้น จะทำให้การเพิ่มของกรดไขมันอิสระลดลงกว่าเดิมมาก เขาแสดงให้เห็นด้วยว่าอุณหภูมิและเวลาที่ใช้อบดังกล่าวไม่ได้ทำให้เอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์น้ำมันรำเสียสภาพไปมากนัก เป็นแต่เพียงทำให้มันอยู่ในสภาวะdormant เท่านั้น ถ้าหากทิ้งรำที่อบแล้วไว้ให้ดูดความชื้นอีกก็จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นมากกว่ารำอบที่เก็บไว้ในถุงที่กันความชื้นได้ อีกประการหนึ่งจุลินทรีย์ที่อาจจะมีอยู่ในรำขณะที่ทดลองไม่มีส่วนในการทำให้กรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น Loeb et al(1949)ทำการทดลองโดยเติมตัวห้ามปฏิกริยาบางชนิดเช่น sodium cyanide, ethylene chlorohydrin etc ...และ innert gas บางชนิด ก็ไม่พบว่ามีผลในการระงับการเกิดกรดไขมันอิสระในรำ ส่วนการสกัดไลเปสออกจากรำมาทดลองนั้นยังทำกันน้อยมาก Houston et al (1951) ศึกษาไลเปสในรำข้าวโดยใช้ tween - 20 เป็น substrate แต่ก็ไม่ได้ศึกษาให้ละเอียดมากนัก ต่อมาไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ทาง enzyme kinetics โดยใช้วิธีสกัดเอากรดไขมันมาไตเตรตหลังจาก incubate กับ substrate

เป็นเวลา 5 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซ็นติเกรด พบว่าเมื่อใช้อีมัลชั่นของน้ำมันมะกอก เป็น substrate ไลเปสจะมี optimum pH ระหว่าง 6 - 7 มี optimum substrate concentration 2 เปอร์เซนต์ (v/v) และไลเปสจะเสียสภาพเร็วขึ้นที่ pH เป็นกรดหรือด่างมาก ๆ

อย่างไรก็ดีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติต่าง ๆ ของไลเปสในรำข้าวเท่าที่ทำมาแล้วยังไม่ละเอียดและเป็นการศึกษาใน crude enzyme ผลที่ได้จึงอาจจะมิใช่คุณสมบัติที่แท้จริงก็ได้ การหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) ใช้อยู่เดิมใช้ไมโครบิวเร็ตต์ (microburette) ขนาด 5 มิลลิลิตรซึ่งมี accuracy ± 0.02 ml การไตเตรตใช้อินดิเคเตอร์ (indicator) ที่เปลี่ยนสีที่ end point ซึ่งจะเห็นว่าไม่ค่อยจะ sensitive พอในการทดลองที่ใช้ปริมาณของสารน้อย ๆ อีกประการหนึ่งวิธีทดลองที่ใช้อยู่เดิมก็ยุ่งยากและเสียเวลามากเพราะต้องใช้เวลาในการ incubate ถึง 5 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาสกัดเอาสารที่ต้องการออกมา ต้องระเหยเอาตัวสกัดออกแล้วจึงไตเตรต การทดลองแต่ละชุดจึงต้องเสียเวลาอย่างน้อย 14 - 15 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าว activity ของไลเปสที่ได้ก็ยังน้อยมาก จึงเป็นไปได้ว่า activity ส่วนใหญ่ยังติดอยู่ในกากรำ

จุดประสงค์ในการทดลองครั้งนี้ก็เพื่อจะหาวิธีทดลองใหม่ที่ดีขึ้นกว่าที่ ไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) ใช้อยู่เดิม โดยจะหาวิธีที่จะวัด activity ของไลเปสในเวลาที่น้อยลง หรือวัดความเร็วของปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระยะเริ่มต้น (initial velocity) และสามารถติดตามอัตราของปฏิกริยาในระยะเวลาต่าง ๆ กันได้ เครื่องมือวาร์เบิกนับว่าเป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่อาจจะทำให้การวัด activity ของไลเปสทำได้รวดเร็วขึ้นและยังสามารถวัดปฏิกริยาในกากของรำได้ด้วย การศึกษาไลเปสด้วยเครื่องมือวาร์เบิกมีผู้นิยมทำกันมาแล้ว เช่น ไลเปสจากต้นอ่อนของข้าวสาลี (Singer,1948) จากตับอ่อนของหนู (Aldridge,

1954) และไลเปสจากตับอ่อนของสุกร (Gill, 1954)

เครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่น่าจะอำนวยความสะดวกในการวัด activity ของไลเปสได้แก่เครื่อง pH - stat เพราะว่าเป็นเครื่องมือที่มี sensitivity สูง (accuracy ของเครื่องมือ 0.001 มิลลิลิตรและสามารถทำให้มี accuracy เป็น 0.0001 มิลลิลิตรได้) การวัด activity ของเอนไซม์แต่ละครั้งใช้เวลาน้อยทั้งยังสามารถทดลองโดยใช้สารละลายปริมาณมากหรือน้อยได้ตามต้องการ ในปัจจุบันเครื่องมือ pH - stat จึงเป็นที่นิยมใช้ในการวัด activity ของเอนไซม์พวกเอสเทอเรสและไลเปส เช่นในการทดลองของ Downey & Andrews (1965) Ory et al (1962) เป็นต้น

หลังจากได้หาคุณสมบัติของไลเปสโดยเครื่องมือเหล่านี้แล้วก็จะทำไลเปสให้มีบริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ศึกษาดูว่ามีไลเปสอยู่กี่ชนิดในรำ วิธีที่จะใช้ได้แก่ salt fractionation และ gel - filtration

จากผลของการทดลองเกี่ยวกับความเสถียร (stability) ของไลเปส เช่น ถ้าไลเปสถูกทำลายที่ pH เป็นกรด ก็จะนำเอามาประยุกต์โดยการนำเอารำมาแช่กรดดู เพื่อที่จะเป็นแนวทางในการระงับการเกิดกรดไขมันอิสระในรำเมื่อเก็บรำไว้นาน ๆ