เอนไซม์ในรำข้าว

RICE BRAN ENZYMES

โดย

น.ส.ไพเราะ พิพยทัศน์ วท.บ. (เกียรตินิยมอันดับสอง) ๒๕๐๗

002209

วิทยานิพนธ์
เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต
ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แผนกวิชาเคมี (สาขาชีวเคมี)
พ.ศ. ๒๕๑๐

I16816985

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

กรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย อาจารย์ ดร.กำจัด มงคลกุล

วันที่ ...6... เดือน ..พฤษภาคม.. พ.ศ. 2510

บทคัดย่อ

ปัญหาในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันรำ ซึ่งเป็นน้ำมันที่สกัดจากรำข้าว คือ ถ้าเก็บรำไว้นาน จะสกัดได้น้ำมันปริมาณน้อยลง เนื่องจากมีเอนไซม์ในรำข้าวเป็นตัวไฮโดรไลส์น้ำมันรำ ออกเป็นกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ดังกล่าว คือเอสเทอเรส และไลเปส สำหรับเอสเทอเรสศึกษาโดยใช้ p- Nitrophenyl acetate เป็น substrate วัดสีที่เกิดจาก p- Nitrophenol ด้วย spectrophotometer ที่ ๔๐๐ mμ เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้ง่ายด้วยน้ำ มี activity สูง เสถียรมากที่อุณหภูมิต่ำ ๆ สลายได้ง่ายถ้าอุณหภูมิเพิ่มสูง มีค่า optimum pH ประมาณ ๗.๔ ขึ้นไป, activity ลดลงอย่างรวดเร็วในสภาพ pH ต่ำ ๆ , ค่า optimum substrate concentration ประมาณ ๐.๖๖mM , ค่า Michaelis - Menten constant (Km) ประมาณ ๕.๐ X ๑๐$^{-5}$โมลาร์, อาศัยหมู่ -SH เป็น active site ไอออนของทวก ปรอท, อาเซไนด์ , ไฮโอไซยาเนต และฟลูออไรด์ จะห้ามปฏิกริยาได้ดี แต่ไอออนของทวก ซัลเฟต, ไซยาไนด์, แคลเซียม และแมกนีเซียม ไม่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกริยาเปลี่ยน, เมื่อใช้ iodoacetamide เป็นตัวห้ามปฏิกริยา พบว่าเป็นชนิด non - competitive ซึ่งมีค่า Ki ประมาณ ๐.๓ X ๑๐$^{-5}$โมลาร์. สำหรับไลเปสศึกษาได้โดยใช้ olive oil emulsion เป็น substrate วัด activity ได้โดยไตเตรตกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตราฐาน, เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้ด้วยน้ำ, การ homo - genize และแช่รำช่วยให้สกัดเอนไซม์ได้มากขึ้น แต่ activity ที่ได้ก็ยังน้อย, มีค่า optimum pH ประมาณ ๖ - ๗ , optimum substrate concentration ประมาณ ๒ % (v/v) ของ olive oil emulsion, ค่า Michaelis - Menten constant (Km) ประมาณ ๐.๑๖ ถูกห้ามปฏิกริยาได้ด้วย iodoace- tamide และ mercuric chloride และมีแคลเซียมเป็นตัวเร่งปฏิกริยาที่ดี, จากสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ อาจนำไปดัดแปลงใช้เป็นวิธีเก็บรักษารำได้ เช่น โดยการอบรำ, การล้างรำด้วยน้ำ, การแช่รำด้วยกรดแก่เจือจาง หรือการใช้ตัวห้ามปฏิกริยาที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งอาจนำบางวิธีไปใช้แก้ปัญหาในอุตสาหกรรมน้ำมันรำได้.

ค่าขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ ดร.ถำจัด ยงกะกุล อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ซึ่งได้ แนะนำ ชี้แจง ทุกสิ่งทุกอย่างในการวิจัยด้วยความกรุณาตลอดมา

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย, สภาวิจัย และบริษัทการบินไทย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเรื่องนี้.

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ค
คำขอบคุณ ..... ง
สารบาญ ..... จ
รายการตารางประกอบ ..... ช
รายการภาพประกอบ ..... ซ
บทนำ ๑
วัสดุที่ใช้และวิธีทำ
ชนิดและลักษณะของรำ ๕
สารเคมีที่ใช้ ๕
การสกัดเอนไซม์เอสเทอเรส ๖
การสกัดเอนไซม์ไลเปส ๖
การวัด activity ของเอนไซม์เอสเทอเรส ๖
การวัด activity ของเอนไซม์ไลเปส ๘
ผลของการทดลอง
การศึกษาเกี่ยวกับเอสเทอเรส
ผลของการแช่น้ำ และการ homogenization ในการสกัดเอสเทอเรสออกจากรำ ๑๐
ความเสถียรของเอสเทอเรสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ๑๘
ผลของ pH ต่อเอสเทอเรส ๑๖
ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรส. ๑๗
ผลของตัวห้ามปฏิกริยา ๒๓

การศึกษาเกี่ยวกับไลเปส หน้า

สภาพต่าง ๆ ในการสกัดไลเปสจากกล้า ๓๘
ผลของ pH ต่อไลเปส ๓๘
ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส ๓๑
ผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกริยา ๓๙
วิจารณ์ผลของการทดลอง ๔๕
สรุปผลของการทดลอง ๔๓
บรรณานุกรม ๔๕

รายการตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ๑ ..... แสดงผลการ homogenize การแช่ร่ำ
ในการสกัดเอสเทอเรสออกจากร่ำ ๑๑

ตารางที่ ๒ ..... แสดงปริมาณเอสเทอเรสที่สกัดได้ จาก
การแช่ร่ำที่เวลาต่าง ๆ กัน ๑๒

ตารางที่ ๓ ..... แสดงปริมาณเอสเทอเรสจากร่ำ โดย
ใช้น้ำสกัดหลาย ๆ ครั้ง ๑๒

ตารางที่ ๔ ..... แสดงการสูญเสียเอนไซม์ที่เก็บไว้ ใน
สภาพต่าง ๆ กัน ๑๔

ตารางที่ ๕ ..... แสดงผลของตัวห้ามเอนไซม์เอสเทอเรส ๒๔

ตารางที่ ๖ ..... ผลของการสกัดไลเปสด้วยตัวทำละลาย
ชนิดต่าง ๆ ๒๘

ตารางที่ ๗ ..... แสดงผลของการ homogenization
และการแช่ร่ำในการสกัดไลเปสจากร่ำ ๒๘

ตารางที่ ๘ ..... แสดงผลของตัวเร่งและตัวห้ามปฏิกริยา
ของไลเปส ๓๔

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ ๑ .... แสดง activity ของเอสเทอเรสที่สกัดจากรำข้าวเก่า และรำข้าวใหม่ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ๑๗

รูปที่ ๒ .... แสดงความเสถียรของเอสเทอเรส ที่อุณหภูมิสูง ๆ ในเวลาต่าง ๆ กัน ๑๕

รูปที่ ๓ .... p- Nitrophenol curve ๑๘

รูปที่ ๔ .... แสดงผลของ pH ต่อเอสเทอเรส ๑๙

รูปที่ ๕ .... แสดงการเสีย esterase activity เมื่อแช่ใน buffer pH ต่าง ๆ ด้วยระยะเวลาต่าง ๆ กัน ๒๐

รูปที่ ๖ .... ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อเอสเทอเรส ๒๑

รูปที่ ๗ .... แสดงการหา Km ของเอสเทอเรส โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot ๒๖

รูปที่ ๘ .... แสดงการหา Ki ของเอสเทอเรส เมื่อมี iodoacetamide เป็นตัวต้านปฏิกริยาโดยใช้ Lineweaver and Burk's plot ๒๗

รูปที่ ๙ .... แสดงผลของ pH ต่อ lipase activity ๓๐

รูปที่ ๑๐ ... แสดงผลของความเข้มข้นของ substrate ต่อไลเปส ๓๑

รูปที่ ๑๑ ... แสดงการหา Km ของไลเปส โดยใช้ Lineweaver and Burk's plot ๓๓