Kasetsart J. (Nat. Sci.) 31 : 56 - 71 (1997) ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 31 : 56 - 71 (2540)

การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าว

A Preliminary Study on Enzymatic Properties of Rice Bran Lipase

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล[1] ประไพพิศ เดโชดมพันธ์[1] และ สิรี ชัยเสรี[2]

Sarote Sirisansaneeyakul, Prapaipis Daechophan, and Siree Chaiseri

ABSTRACT

The lipase enzyme extracted from defatted Thai scented rice bran with calcium chloride solution, which has been purified by ammonium sulfate precipitation, followed by dialysis had the specific activity of 2.04 units/mg protein and 1.32 times that of starting crude extract. The semi-purified lipase obtained showed the optimum pH at 7.6 with equilibrium rate constants, K_1 and K_2, and maximum enzyme reaction rate, $(EA)_{max}$ of 3.2×10^{-7}, 1.7×10^{-9} M and 44.2 units/ml, respectively. Based upon the enzyme kinetics of the temperature effect, the lipase enzyme had the activation energy, E_a = 11.03 kcal/mol and the energy for the thermal inactivation, ΔH_d = 30.8 kcal/mol. The absolute reaction rate function with the remained parameter constants estimated by non-linear regression analysis was $EA = \frac{5.5x10^4 Te^{(5.25)} e^{(-\frac{5,551}{T})}}{1+e^{(49.47)} e^{(-\frac{15,390}{T})}}$. As a result, the maximum enzyme activity of 42.7 units/ml was calculated with the mentioned equation at T_{max} equal to 35° C. Moreover, the Thai scented rice bran lipase were stable over the pH range from 4 to 9 and the temperature range from 20 to 45°C, but completely lost the activity by heating at 50°C for 60 min. Finally, the model for lipase activity affected by pH and temperature was proposed and figuredly simulated to predict the enzyme activity under various pH and temperature conditions.

Key words : lipase, rice bran, absolute reaction rate, enzyme kinetics, temperature effect

1 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Deaprtment of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้จากรำข้าวหอมไทย (พร่องไขมัน) ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์แล้ว จึงทำสารละลายสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำการแยกเกลือออกด้วยวิธีไดแอลิซิส สารละลายเอนไซม์ไลเพสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าวมีกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์เท่ากับ 2.04 หน่วย/มก. โปรตีน เมื่อเทียบกับสารละลายสกัดเอนไซม์เริ่มต้นที่ได้ สารละลายเอนไซม์ไลเพสมีความเข้มข้นของเพิ่มขึ้น 1.32 เท่า จากการศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวหอมไทยที่เตรียมได้นี้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.6 โดยมีค่าคงที่สมดุลของอัตรา (K_1 และ K_2) และกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด, $(EA)_{max}$ เท่ากับ 3.2×10^{-7}, 1.7×10^{-9} โมลาร์ และ 44.2 หน่วย/มล. ตามลำดับ อาศัยจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์จากอิทธิพลของอุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์ไลเพสมีพลังงานกระตุ้นเท่ากับ 11.03 กิโลแคลอรี/โมล และพลังงานยับยั้งเอนไซม์ด้วยความร้อนเท่ากับ 30.8 กิโลแคลอรี/โมล ค่าคงที่ของแบบจำลองอัตราปฏิกิริยาสัมบูรณ์ที่เหลือสามารถประมาณค่าได้จากการวิคราะห์การถดถอยไม่เชิงเส้นตรง และเขียนเป็นรูปสมการสรุปได้คือ

$$EA=\frac{5.5x10^{4}Te^{(5.25)}\,e^{(-\frac{5,551}{T})}}{1+e^{(49.47)}\,e^{(-\frac{15,390}{T})}}$$

ซึ่งคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากสมการดังกล่าวได้เท่ากับ 42.7 หน่วย/มล. ที่อุณหภูมิสูงสุด T_{max} เท่ากับ 35°C นอกจากนี้เอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวหอมไทย ยังมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชตั้งแต่ 4-9 และช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 20-45°C แต่เอนไซม์ไลเพสนี้สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์อย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลานาน 60 นาที นอกจากนี้ได้มีการสรุปแบบจำลองที่แสดงถึงอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเพส ซึ่งสามารถใช้พยากรณ์กิจกรรมเอนไซม์ภายใต้การเปลี่ยนแปลงของพีเอชและอุณหภูมิต่างๆ ได้

คำนำ

ข้าวหอมจะสูญเสียกลิ่นหอมและเกิดภาวะที่เรียกว่า กลิ่นเปลี่ยนแปลง (off-flavor) ได้ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของไขมันในข้าวจากการทำงานของเอนไซม์ไลโพไลติกในเมล็ดข้าว ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ไลเพสและไลพอกซีจีเนส โดยที่ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแยกสลายด้วยน้ำ (ไฮโดรไลซิส) ที่มีไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารตั้งต้น (Houston, 1972) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระที่สามารถถูกออกซิไดส์ต่อได้ด้วยเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส เกิดเป็นไฮโดรเพอร์ออกไซด์และสารประกอบคาร์บอนิลที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบระเหยต่อไป (อรอนงค์, 2532; Ory and Flick, 1992) ฉะนั้นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไขมันในเมล็ดข้าวโดยเกิดเป็นกรดไขมันอิสระเนื่องจากการทำงานของไลเพสจะสามารถใช้บ่งชี้ถึงการเกิดสภาวะกลิ่นเปลี่ยนแปลงได้ จึงเป็นเหตุผลที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเพสในเมล็ดข้าว เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ไลเพส ซึ่งจะทำให้สามารถชลอการเกิดปฏิกิริยาแยกสลายด้วยน้ำจากเอนไซม์ไลเพสได้

โดยปกติจะพบเอนไซม์ไลเพสเป็นปริมาณมากในส่วนรำของเมล็ดข้าว และเอนไซม์ไลเพสในรำข้าวนี้มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันรำข้าว เพราะไลเพสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแยกสลายด้วยน้ำ การใช้รำข้าวที่มีไลเพสอยู่เป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตน้ำมันรำข้าวจะทำให้ได้น้ำมันรำข้าวที่มีคุณภาพต่ำ เพราะมีกรดไขมันอิสระอยู่สูงที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเหม็นหืนในน้ำมันรำข้าวได้โดยง่าย และมีอายุการเก็บรักษาสั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการสกัดเอนไซม์ไลเพสเฉพาะจากรำข้าวหอมไทยซึ่งเป็นส่วนของเมล็ดข้าวที่มีเอนไซม์อยู่เป็นจำนวนมาก เพื่อที่จะได้นำไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวหอมไทยต่อไป

ทฤษฎี

ผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์

เอนไซม์อาจประกอบด้วยกลุ่มประจุบวกหรือลบขึ้นอยู่กับค่าพีเอชในสารละลาย แต่เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งของปฏิกิริยานั้นจะมีเพียงสถานภาพประจุบวกหรือลบอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ฉะนั้นสัดส่วนของเอนไซม์ในสถานภาพประจุบวกหรือลบต่อปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดจึงขึ้นอยู่กับพีเอช ซึ่งสามารถแสดงแบบจำลองอย่างง่ายของจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่เกิดจากผลของพีเอช (Andreyeva and Biryukov, 1973; Bailey and Ollis, 1986) ได้ดังนี้

$$E \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} E^- \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} E^{2-} \qquad (1)$$

K_1 K_2

เมื่อ E^- คือ เอนไซม์รูปกัมมันต์

E, E^{2-} คือ เอนไซม์รูปไม่กัมมันต์

K_1, K_2 คือ ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา

ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาและความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์แสดงได้ตามสมการที่ (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\frac{C_{H^+} C_{E^-}}{C_E} = K_1, \frac{C_{H^+} C_{E^{2-}}}{C_{E^-}} = K_2 \qquad (2)$$

$$C_{E_0} = C_E + C_{E^-} + C_{E^{2-}} \qquad (3)$$

เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของเอนไซม์รูปกัมมันต์ต่อเอนไซม์ทั้งหมด ($y^- = \frac{C_{E^-}}{C_{E_0}}$) สามารถแสดงได้ตามสมการที่ (4)

$$y^- = \frac{1}{1 + \frac{C_{H^+}}{K_1} + \frac{K_2}{C_{H^+}}} \qquad (4)$$

ค่าสูงสุดของสัดส่วน y^- ต่อความเข้มข้นของโปรตอนหรือค่าพีเอชได้แสดงไว้ในสมการที่ (5)

$$(C_{H^+})_{optimum} = \sqrt{K_1 K_2} \quad , \quad (pH)_{optimum} = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) \tag{5}$$

เมื่อ $pK_i = -\log K_i$

ฉะนั้นอัตราสูงสุดของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์รูปกัมมันต์เป็นตัวเร่ง (V_{max}) แสดงได้ตามสมการที่ (6)

$$v_{max} = kC_{E_0} y^- = \frac{v^0_{max}}{1 + \frac{C_{H^+}}{K_1} + \frac{K_2}{C_{H^+}}} \tag{6}$$

เมื่อ $v^o_{max} = kC_{E_o}$

ค่าคงที่สมดุล K_1 และ K_2 สามารถประมาณค่าได้จากการวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้นตรงของสมการที่ (6) โดยอาศัยข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ฉะนั้นพีเอชที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (5) ซึ่งต้องอาศัยค่าคงที่สมดุลทั้งสองที่ประมาณค่าได้ข้างต้นจากสมการที่ (6)

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์

เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง ทำให้อัตราของปฏิกิริยาลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในระยะก่อนถึงจุดของอุณหภูมิที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้อัตราของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามทฤษฎีของ Arrhenius (สาโรจน์ และ ประวิทย์, 2538; Aiba *et al.*, 1973; Bailey and Ollis, 1986) ซึ่งแสดงได้ตามสมการที่ (7a) เมื่อเขียนรูปกราฟระหว่าง $\log k_r$ และ $\frac{1}{T}$ ตามสมการที่ (7b) จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $-\frac{E_a}{R}$ ทำให้สามารถหาพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้

$$k_r = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \tag{7a}$$

$$\log k_r = -\frac{E_a}{2.303RT} + \text{constant} \tag{7b}$$

เมื่อ k_r คือ ค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยา

E_a คือ พลังงานกระตุ้น

R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (1.987 แคลอรี/โมล/องศาเคลวิน)

A คือ Arrhenius factor

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (องศาเคลวิน)

การสูญเสียสภาพกัมมันต์ของเอนไซม์เนื่องจากความร้อนแบบผันกลับได้ ($E_a \underset{\leftarrow}{\overset{K_d}{\rightarrow}} E_i$) มีค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาดังแสดงในสมการที่ (8)

$$\frac{C_{E_i}}{C_{E_a}} = K_d = \exp^{(\frac{-\Delta G_d}{RT})} = \exp^{(\frac{-\Delta H_d}{RT})} \exp^{(\frac{\Delta S_d}{R})} \tag{8}$$

เมื่อ C_{E_a} , C_{E_i} คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์รูปกัมมันต์และไม่กัมมันต์ตามลำดับ

$\Delta G_d, \Delta H_d, \Delta S_d$ คือ พลังงานอิสระ เอนทัลปี และเอนโทรปี ตามลำดับ

ความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์เท่ากับ $C_{E_0} = C_{E_a} + C_{E_i}$ เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์รูปกัมมันต์สามารถแสดงได้โดยอาศัยสมการที่ (8) ดังนี้

$$C_{E_a} = \frac{C_{E_0}}{1+K_d} \tag{9}$$

ตามทฤษฎีทรานซิชันสเทต อัตราสูงสุดของปฏิกิริยาเขียนได้ตามสมการที่ (10)

$$v_{max} = C_{E_a} k_{r(T)} \tag{10}$$

เมื่อ

$$k_{r(T)} = \alpha\left(\frac{k_B T}{h}\right) e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \tag{11}$$

เมื่อ k_B คือ ค่าคงที่ Boltzmann (1.37×10^{-16} เอิร์ก/องศาเคลวิน)

h คือ ค่าคงที่ Planck's (6.62×10^{-27} เอิร์ก.วินาที)

α คือ ค่าคงที่

พิจารณาสมการ (8)-(11) จะได้ว่า

$$v_{max} = \frac{\beta T e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}}{1+e^{\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right)} e^{\left(\frac{-\Delta H_d}{RT}\right)}} \tag{12}$$

เมื่อ β คือ ค่าคงที่ ประกอบด้วย k_B, h และ C_{E_0}

สมการที่ (12) แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราของปฏิกิริยากับอุณหภูมิ อาศัยข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้สามารถคำนวณค่า E_a, ΔS^*, ΔS_d และ ΔH_d ได้ โดยค่าความชัน $-\frac{E_a}{R}$ และ $\frac{\Delta H_d - E_a}{R}$ เป็นความชันของกราฟเส้นตรงในช่วงของ $\frac{1}{T}$ ที่มีค่ามากและค่าน้อยตามลำดับ

ค่า ΔS_d คำนวณได้จากสมการที่ (8) โดยที่ $K_{d(T_{max})}$ คำนวณได้จากสมการที่ (13) ซึ่งได้กำหนดให้ $\frac{d(\log v_{max})}{dT} = 0$ และ T_{max} สามารถแทนค่าได้จากข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทดลอง

$$K_{d(T_{max})} = \frac{E_a + RT_{max}}{\Delta H_d - E_a - RT_{max}} \tag{13}$$

การประมาณค่าคงที่ β กระทำได้โดยการวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้นตรงของสมการที่ (12) โดยอาศัยข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ได้จากการทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและสารเคมี

รำข้าวหอมไทยที่ใช้ในการทดลองเป็นรำข้าวที่ได้จากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากจังหวัดสุรินทร์ ส่วนสารเคมีที่ใช้ในการสกัดไขมันจากรำข้าว การสกัดและการทำให้เอนไซม์ไลเพสบริสุทธิ์ ตลอดจนการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และโปรตีน เป็นสารเคมีที่มีคุณภาพใช้ในห้องปฏิบัติการได้โดยสั่งซื้อจากบริษัทสารเคมีหลายแหล่งที่มีตัวแทนจัดจำหน่ายในประเทศไทย

การเตรียมเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าว (Figure 1)

การเตรียมสารละลายเอนไซม์ได้ปฏิบัติตามวิธีการของ Tsuzuki *et al.* (1994) โดยการดัดแปรวิธีการเล็กน้อย นำรำข้าวหอมไทย 1 กก. มาทำการสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 3 ครั้ง ในอัตราส่วนรำข้าวต่อปิโตรเลียมอีเทอร์เท่ากับ 1:3, 1:2 และ 1:1 และทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ปิโตรเลียมอีเทอร์ระเหย หลังจากนั้นทำการสกัดเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวหอมไทยพร่องไขมัน โดยใช้อัตราส่วนรำข้าวพร่องไขมันต่อสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เท่ากับ 1:4 ทำการสกัดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (18,000 รอบ/นาที) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ปั่นเป็นเวลา 15 นาที กรองกากรำข้าวออก ได้ส่วนใสเป็นสารละลายสกัดเอนไซม์เริ่มต้น

นำสารละลายสกัดเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัว 60% แยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ5,000 รอบ/นาที ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และทำการไดแอลิซิสในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เป็นเวลา 2 คืน ได้เป็นสารละลายเอมไซม์ที่จะนำไปตรวจสอบคุณสมบัติทางเอนไซม์เบื้องต้นต่อไป

การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส

พีเอช ตรวจสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตั้งแต่พีเอช 4-9 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซิเทรต (พีเอช 4-6) ฟอสเฟต (พีเอช 6-8) และไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (Tris) (พีเอช 8-9) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยแอซีโตนและแอลกอฮอล์ (1:1) ปริมาตร 20 มล. แล้วไตเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

อุณหภูมิ ตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตั้งแต่ 20-50°C ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยการบ่มที่พีเอช 7.5 เป็นเวลา 1 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยแอซีโตนและแอลกอฮอล์ (1:1) ปริมาตร 20 มล. แล้วไตเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

การตรวจสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเพส

พีเอช โดยการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ตั้งแต่พีเอช 3-9 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชม. จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์

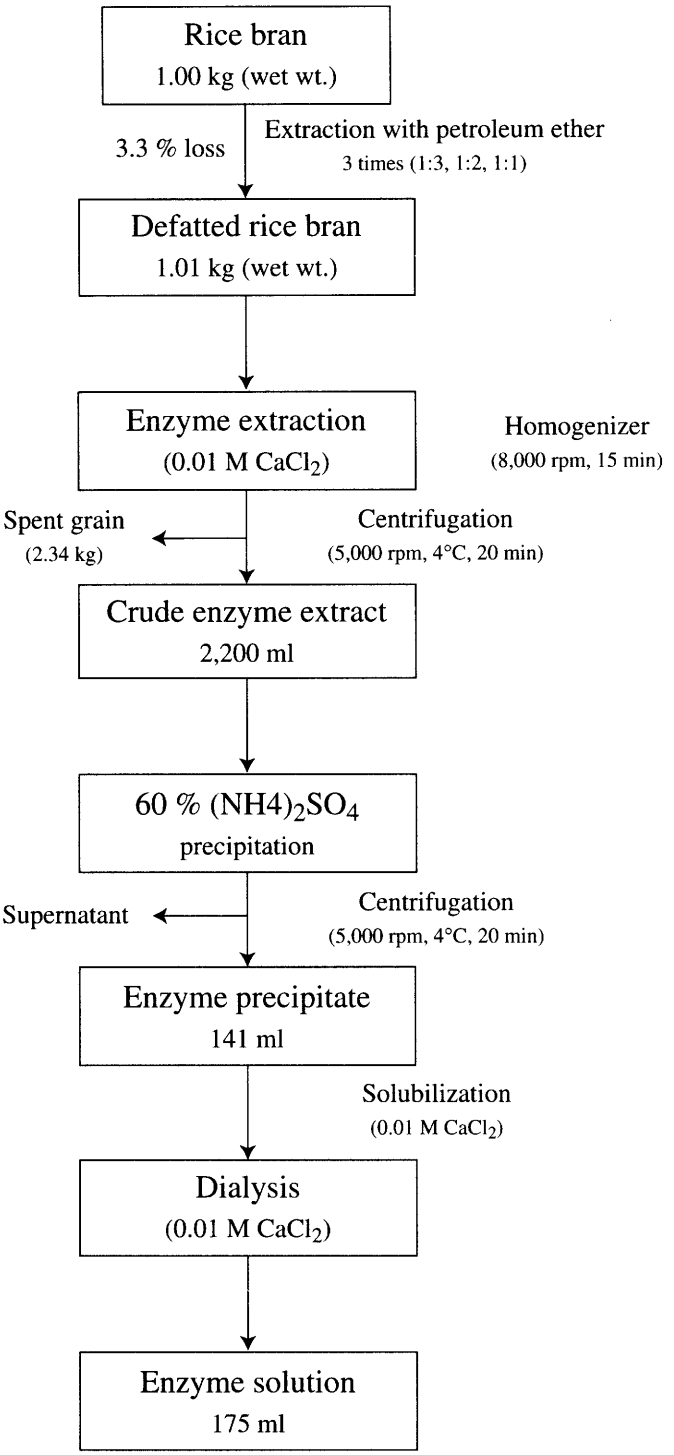


Figure 1 Schematic diagram for preparation of rice bran lipase.

อุณหภูมิ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-50°C ที่พีเอช 7.5 เป็นระยะเวลา 1 ชม. จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (กิติเดช, 2534)

ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ สารผสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันมะกอก 5 มล. สารละลายเอนไซม์ไลเพส 2 มล. และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 3 มล. ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสมเท่ากับ 300 รอบ/นาที (การเพิ่มความเร็วรอบจะทำให้การวัดกิจกรรมเอนไซม์ดีขึ้น) ทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยแอซีโตนและแอลกอฮอล์ (1:1) ปริมาตร 20 มล. แล้วทำการไตเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

หนึ่งหน่วยกิจกรรมเอนไซม์ไลเพส หมายถึง ปริมาณกรดไขมันอิสระในรูปกรดโอเลอิกหนึ่งไมโครโมลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแยกสลายด้วยน้ำของน้ำมันมะกอกด้วยเอนไซม์ไลเพสที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และพีเอช 7.5 ในเวลา 1 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ ใช้วิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโมเมตร และใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

ผล

การสกัดเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวหอมไทย

ทำการสกัดไขมันจากรำข้าวหอมไทยที่มีความชื้นเท่ากับ 13.1% ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ได้รำข้าวพร่องไขมันที่มีความชื้นเท่ากับ 16.8% โดยมีการสูญเสียระหว่างการสกัดเท่ากับ 3.3% น้ำหนักแห้ง จากนั้นนำรำข้าวพร่องไขมัน 1 กก. มาสกัดเอนไซม์ไลเพสด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ได้สารละลายสกัดเอนไซม์ปริมาตร 2,200 มล. ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 14,740 หน่วย คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.55 หน่วย/มก. โปรตีน สารละลายสกัดเอนไซม์ดังกล่าวได้ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60% ได้ตะกอนที่มีปริมาตรเท่ากับ 141 มล. ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 3,328 หน่วย คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.71 หน่วย/มก. โปรตีน โดยได้เอนไซม์จากการตกตะกอนเพียง 22.6% และตะกอนเอนไซม์ที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.1 เท่าจากสารละลายสกัดเอนไซม์ และเมื่อผ่านการไดแอลิซิสในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ สารละลายเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดเท่ากับ 1,050 หน่วย คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 2.04 หน่วย/มก. โปรตีน โดยเหลือเอนไซม์จากการไดแอลิซิสเพียง 7.1% และสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.32 เท่าจากสารละลายสกัดเอนไซม์เริ่มต้น (Table 1)

Table 1 Purification of rice bran lipase (1,000 g fresh bran used).

Purification step	Volume (ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)
Crude extract	2,200	14,740	1.55	100
Fractionation with 60% $(NH_4)_2SO_4$	141	3,328	1.71	22.6
Dialysis	175	1,050	2.04	7.1

ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส

สารละลายเอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้จากรำข้าวหอมไทยพร่องไขมัน สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8 โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้เท่ากับ 36.9 หน่วย/มล. ที่พีเอช 8 (Figure 2) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้นตรงตามสมการที่ (6) จะได้ค่าคงที่สมดุล K_1 และ K_2 เท่ากับ 3.2×10^{-7} และ 1.7×10^{-9} โมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อแทนค่าค่าคงที่สมดุลทั้งสองที่ได้ในสมการที่ (5) จะได้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพสเท่ากับ 7.6 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด, $(EA)_{max}$ เท่ากับ 44.2 หน่วย/มล. รูปกราฟที่เขียนตามสมการที่ (6a) มีความสอดคล้องเป็นอย่างดีกับกิจกรรมเอนไซม์ (EA) ที่วัดค่าได้จากการทดลอง (Figure 2) ทำให้สามารถใช้ทำนายกิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ได้อย่างถูกต้องภายใต้สภาวะของการทดลองที่กำหนดไว้

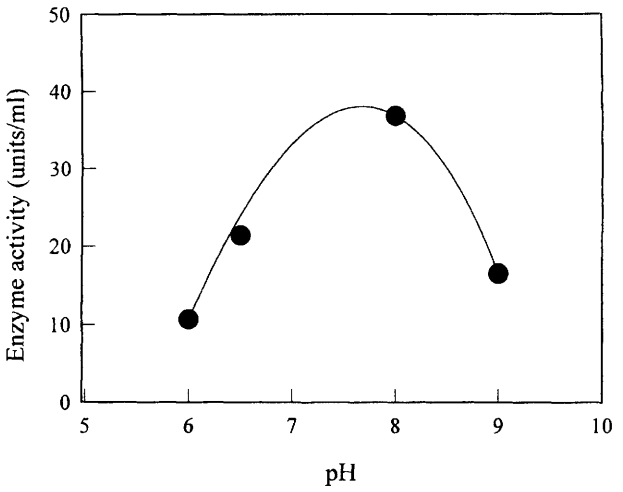


Figure 2 Effect of pH on rice bran lipase activity. The solid curve was calculated from the equation:

$$EA = \frac{44.2}{1 + \frac{(H^+)}{3.2\times10^{-7}} + \frac{1.7\times10^{-9}}{(H^+)}}$$

$$EA = \frac{44.2}{1+\frac{(H^+)}{3.2x10^{-7}}+\frac{1.7x10^{-9}}{(H^+)}} \quad (6a)$$

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้เท่ากับ 35°C (Figure 3b) ซึ่งสามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้เท่ากับ 42.7 หน่วย/มล. พบว่าการทำงานของเอนไซม์ถูกแบ่งออกเป็นสองช่วงตามอุณหภูมิ ช่วงแรกเรียกว่าการกระตุ้นเอนไซม์ (Enzyme activation) เกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35°C และช่วงที่สองเรียกว่าการยับยั้งเอนไซม์ (Enzyme deactivation) เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°C เมื่ออาศัยสมการที่ (7b) เขียนรูปกราฟเส้นตรงระหว่าง $\log k_r$ กับ $\frac{1}{T}$ จะได้ค่าความชันเท่ากับ -2.41×10^3 ($-\frac{E_a}{R}$) และ 4.33×10^3 ($\frac{\Delta H_d - E_a}{R}$) (Figure 3a) สำหรับช่วงกระตุ้นเอนไซม์และช่วงยับยั้งเอนไซม์ตามลำดับ ซึ่งทำให้คำนวณพลังงานกระตุ้น (E_a) และเอนทัลปี (ΔH_d) หรือพลังงานที่ยับยั้งเอนไซม์ได้เท่ากับ 11.03 กิโลแคลอรี/โมล และ 30.8 กิโลแคลอรี/โมล ตามลำดับ

ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา ณ อุณหภูมิสูงสุด (จากการทดลองเท่ากับ 35°C) ที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ ($K_{d(T_{max})}$) คำนวณตามสมการที่ (13) ได้เท่ากับ 0.6146 และเมื่อแทนค่าในสมการที่ (8) จะได้ค่าเอนโทรปี (ΔS_d) เท่ากับ 98.32 แคลอรี/โมล/องศาเคลวิน

ตามทฤษฎีทรานซิชันสเทตและทฤษฎีของ Arrhenius (สาโรจน์ และ ประวิทย์, 2538) จะได้ว่า $E_a = \Delta H^* + RT$; $\Delta G^* = -2.303RT\log\frac{k_r h}{k_B T}$ และ $\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$ ทำให้สามารถคำนวณค่าเอนโทรปีที่สถานะเปลี่ยนแปลง (ΔS^*) ได้เท่ากับ 10.44 แคลอรี/โมล/องศาเคลวิน

ฉะนั้นกิจกรรมเอนไซม์แสดงตามสมการที่ (12) ยังคงเหลือค่าคงที่ β ที่สามารถประมาณค่าได้จากข้อมูลกิจกรรมเอนไซมที่ได้จากการทดลองโดยการวิเคราะห์การถดถอยไม่เชิงเส้นตรง ทำให้เขียนสมการที่ (12a) ได้ดังนี้

$$EA = \frac{5.5x10^4 T e^{(5.25)} e^{(-\frac{5,551}{T})}}{1+e^{(49.47)} e^{(-\frac{15,390}{T})}} \quad (12a)$$

Figure 3b เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองที่ได้กับสมการที่ (12a) ซึ่งให้ผลลัพธ์ได้ไม่ค่อยดี แต่เป็นไปตามทฤษฎีของอัตราปฏิกิริยาสัมบูรณ์ และเมื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากสมการ 12a จะได้เท่ากับ 42.7 หน่วย/มล. ที่อุณหภูมิ T_{max} เท่ากับ 35°C

ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเพส

เอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้จากข้าวหอมไทย หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. พบว่าเสถียรภาพของเอนไซม์อยู่ในพีเอชค่อนข้างกว้างตั้งแต่ 4-9 (Figure 4) แต่ก็มีการสูญเสียกิจกรรมจากการบ่มประมาณ

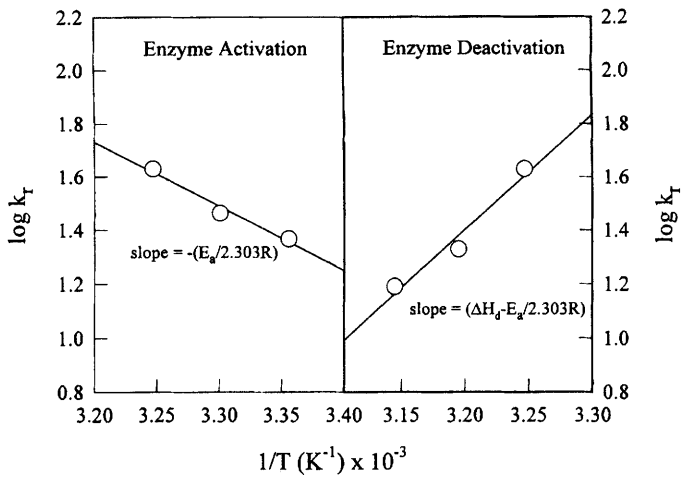


Figure 3a Effect of temperature on rice bran lipase activity.

Enzyme activation $: -\frac{E_a}{2.303R} = -2.41 \times 10^3$

Enzyme deactivation $: \frac{\Delta H_d - E_a}{2.303R} = 4.32 \times 10$

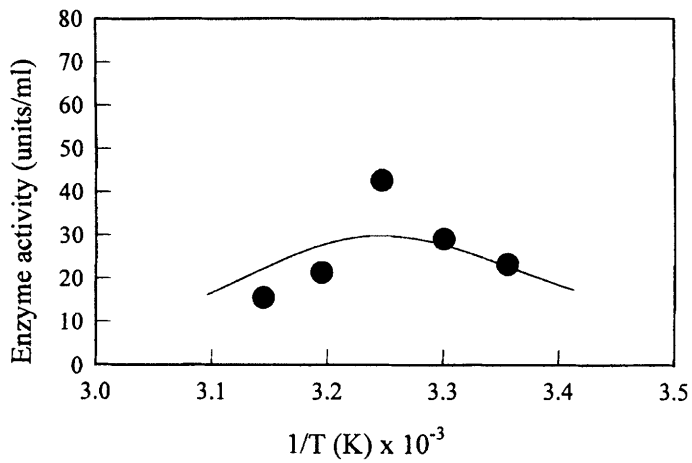


Figure 3b Effect of temperature on rice bran lipase activity. The solid curve was calculated from the equation (12a):

$$EA = \frac{5.5 \times 10^4 T e^{(5.25)} e^{(-\frac{5,551}{T})}}{1 + e^{(49.47)} e^{(-\frac{15,390}{T})}}$$

The maximum temperature, T_{max} = 35°C was obtained by setting $\frac{d(EA)}{dT}$ equal to zero.

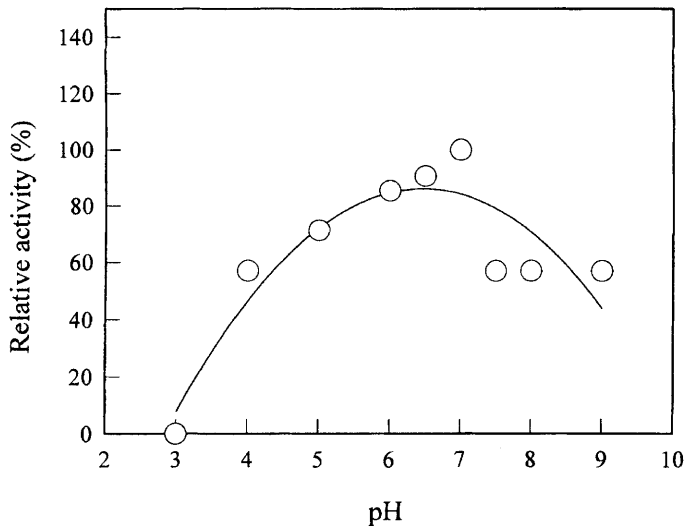


Figure 4 Effect of pH on stability of rice bran lipase activity. One hundred percent relative activity corresponds to enzyme activity of 7.7 units/ml of enzyme solution. The solid curve was calculated from the polynomial equation: RA (%) = -111.4+61.9(pH)-4.9(pH)^2

80-88% เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (36.9 หน่วย/มล. ที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 37°C) โดยมีกิจกรรมเอนไซม์หลังการบ่มที่พีเอชต่างๆ อยู่ในช่วง 4.4-7.2 หน่วย/มล. เมื่อตรวจสอบข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยไม่เชิงเส้นตรงด้วยสมการพหุนามอันดับสอง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องค่อนข้างดีกับผลการทดลอง (Figure 4) ด้วยสมการ

$$RA\ (\%) = -111.4+61.9(pH)-4.9(pH)^2$$

เมื่อ RA (%) คือ กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์

ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเพส

เอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้จากข้าวหอมไทย หลังจากการบ่มที่พีเอช 7.5 เป็นเวลา 1 ชม. พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพของอุณหภูมิระหว่าง 20-45°C (Figure 5) และมีการสูญเสียกิจกรรมจากการบ่มประมาณ 70-80% เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น (42.7 หน่วย/มล. ที่อุณหภูมิ 35°C และพีเอช 7.5) โดยมีกิจกรรมเอนไซม์หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ อยู่ในช่วง 8.6-12.8 หน่วย/มล. และพบว่าเอนไซม์ไลเพสสูญเสียกิจกรรมโดยสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที

เช่นเดียวกับผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ เมื่อตรวจสอบข้อมูลกิจกรรมเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยไม่เชิงเส้นตรงด้วยสมการพหุนามอันดับสอง ได้แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องค่อนข้างดีกับผลการทดลองที่ได้ (Figure 5) ด้วยสมการ RA (%) = -157.7+15.9(T)-0.25(T)^2

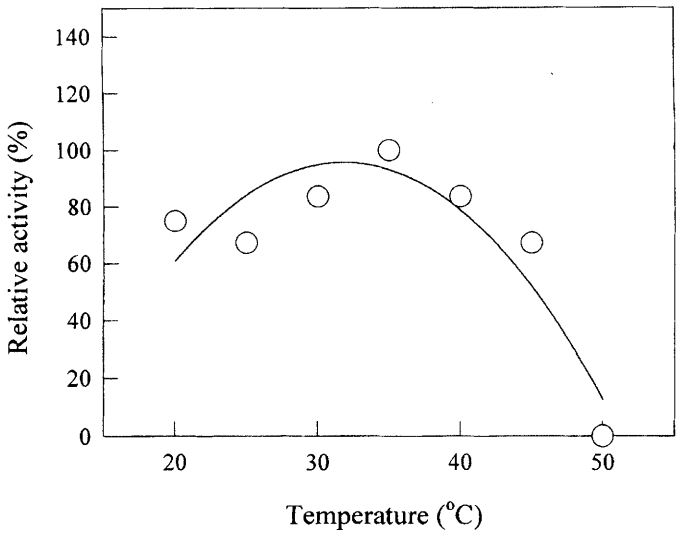


Figure 5 Effect of temperature on stability of rice bran lipase activity. One hundred percent relative activity corresponds to enzyme activity of 12.8 units/ml of enzyme solution. The solid curve was calculated from the polynomial equation: RA (%) = -157.7+15.9(T)-0.25(T)^2

แบบจำลองการยับยั้งเอนไซม์ด้วยพีเอชและอุณหภูมิ

จากอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งดังแสดงด้วยสมการที่ (6) และ (12) ตามลำดับนั้น ปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลร่วมต่อปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งที่เกิดขึ้นพร้อมเพรียงกัน เมื่อพิจารณาร่วมกันจะได้สมการรูปผลคูณที่เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามมิติของกิจกรรมเอนไซม์ที่มีพีเอชและอุณหภูมิเป็นตัวแปรสถานะตามสมการที่ (14)

$$EA = \frac{\gamma}{1+\frac{C_{H^+}}{K_1}+\frac{K_2}{C_{H^+}}} \cdot \frac{Te^{(\frac{\Delta S^*}{R})}\, e^{(\frac{-E_a}{RT})}}{1+e^{(\frac{\Delta S_d}{R})}\, e^{(\frac{-\Delta H_d}{RT})}} \qquad (14)$$

เมื่อ EA คือ กิจกรรมเอนไซม์

γ คือ ค่าคงที่ ประกอบด้วย $(EA)_{max}$ และ β

Figure 6 แสดงการเลียนแบบสมการที่ (14) โดยอาศัยค่าคงที่จากสมการที่ (6a) และ (12a) ส่วนค่าคงที่ประมาณค่าได้เท่ากับ 1.0×10^5 ฉะนั้นสมการ (14a) ที่ได้สามารถใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์กิจกรรมเอนไซม์ไลเพสเนื่องด้วยอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิได้เป็นอย่างดี

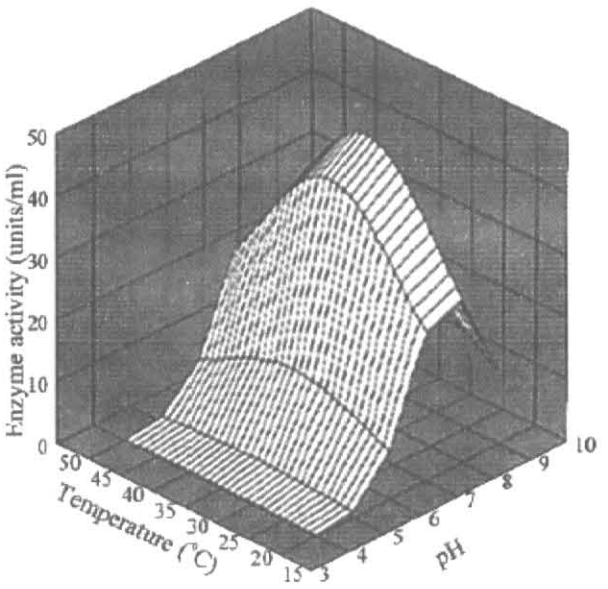


Figure 6 Simulation of rice bran lipase activity affacted by pH and temperature. The 3D solid curve was calculated from the combined equation:

$$EA=\frac{1.0\times10^{5}\quad Te^{(5.25)}e^{\left(\frac{-5551}{T}\right)}}{1+\frac{C_{H^+}}{3.2\times10^{-7}}+\frac{1.7\times10^{-9}}{C_{H^+}}\quad 1+e^{(49.47)}e^{\left(\frac{-15390}{T}\right)}} \qquad (14a)$$

วิจารณ์

สารละลายเอนไซม์ไลเพสที่สกัดจากรำข้าวหอมไทยพร่องไขมัน ซึ่งผ่านการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมอิ่มตัวและการไดแอลิซิส เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางเอนไซม์ของเอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้พบว่า มีสภาวะของการทำงานที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 35°C และที่พีเอช 7.4 ส่วนเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวไทย พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C จะมีความคงตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชตั้งแต่ 4-9 และพบว่าในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 มีความคงตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 20-45°C ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไลเพสที่สกัดจากรำข้าวญี่ปุ่น (Aizono *et al.*, 1973) ที่มีพีเอชการทำงานเหมาะสมระหว่าง 7.5-8 และอุณหภูมิการทำงานเหมาะสมเท่ากับ 37°C นอกจากนี้เอนไซม์ไลเพสที่สกัดจากรำข้าวญี่ปุ่นมีความคงตัวที่พีเอชอยู่ระหว่าง 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C และสูญเสียกิจกรรมทั้งสิ้นที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 15 นาที จะเห็นว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ไลเพสที่สกัดจากรำข้าวไทย (50°C ระยะเวลา 60 นาที) (Table 2)

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้พบว่า ค่าคงที่ K_1, K_2 และ $(EA)_{max}$ จากผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ 3.2×10^{-7}, 1.7×10^{-9} โมลาร์ และ 44.2 หน่วย/มล. ตามลำดับ (สมการที่ 6) ส่วนค่าคงที่จากสมการแสดงผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ (สมการที่ 12) สรุปได้ดังนี้

Table 2 Comparison of enzymatic properties of rice bran lipases.

Rice bran	Optimal activity		Stability		Reference
	pH	Temperature	pH	Temperature	
Thai scented rice (Jasmine 105)	6.6	35°C	4-9	20-45°C	this work
Japonica (Hohyoku)	7.5-8	37°C	4-9	< 40°C	Aizono *et al.*, 1973

E_a = 11.03 kcal/mol

ΔH_d = 30.58 kcal/mol

ΔS_d = 98.32 cal/mol.K

ΔS^* = 10.44 cal/mol.K

β = 5.5×10^4

ค่าพลังงานกระตุ้น (E_a) และเอนโทรปีของการกระตุ้น (ΔS^*) มีค่าต่ำกว่าไลเพสจากตับ 4.2 และ 6.5 เท่าตามลำดับ (Bailey and Ollis, 1986) เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวสามารถสรุปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามมิติเพื่อใช้พยากรณ์กิจกรรมเอนไซม์ได้ดังนี้

$$EA = \frac{1.0\times10^{5}}{1+\frac{C_{H^+}}{3.2\times10^{-7}}+\frac{1.7\times10^{-9}}{C_{H^+}}} \cdot \frac{Te^{(5.25)}\, e^{(\frac{-5551}{T})}}{1+e^{(49.47)}\, e^{(\frac{-15390}{T})}} \qquad (14a)$$

การทดลองนี้เป็นเพียงการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวไทยเท่านั้น ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการสกัดและการเตรียมเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวไทย ตลอดจนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีในการทดลองขั้นต่อไป นอกเหนือจากการตรวจสอบคุณลักษณะของเอนไซม์ทางกายภาพและเคมีทั่วไป (Funatsu *et al.*, 1971) แล้ว การศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ของเอนไซม์ไลเพสบริสุทธิ์จากรำข้าวไทยควรศึกษาเน้นเรื่องอิทธิพลของไอออนโลหะต่อการกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Munshi *et al.*, 1993) และความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเทรต เป็นต้น ซึ่งจะสามารถใช้เป็นวิธีการในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวที่มีผลต่อเนื่องต่อคุณภาพน้ำมันรำข้าวที่ผลิตได้ ตลอดจนการป้องกันการสูญเสียกลิ่นหอมของข้าวหอมไทยเนื่องจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลโพไลติกในเมล็ดข้าวระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้จลนพลศาสตร์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้พยากรณ์การทำงานของเอนไซม์ไลเพสจากรำข้าวภายใต้สภาวะที่ทำการทดลองได้เป็นอย่างดี

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการรักษาคุณภาพข้าวหอมไทย งานวิจัยนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของโครงการย่อยที่ 4 (KIP 28.4.37 ผลของเอนไซม์ไลโพไลติกในเมล็ดข้าวที่มีต่อกลิ่นของข้าวหอมไทย)

เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2534 การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเพสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 251 น.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2532. เคมีทางธัญญาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 148 น.

Aiba, S., A.E. Humphrey, and N.F. Millis. 1973. Biochemical Engineering. 2nd ed. University of Tokyo Press, Tokyo. 434p.

Aizono, Y., M. Funatsu, M. Sugano, K. Hayashi, and Y. Fujiki. 1973. Enzymatic properties of rice bran lipase. Agr. Biol. Chem. 37: 2031-2036.

Andreyeva, L.N. and V.V. Biryukov. 1973. Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp. 4 : 61-76.

Bailey, J.E. and D.F. Ollis. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 984p.

Funatsu, M., Y. Aizono, K. Hayashi, M. Watanabe, and M. Eto. 1971. Biochemical studies on rice bran lipase. Agr. Biol. Chem. 35 : 734-742.

Houston, D. E. 1972. Rice: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. 517 p.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Ory, R. L. and G. J. Flick. 1992. Off-flavor in rice and products, pp. 77-101. *In* G. Charalambous (ed.). Off-flavors in Foods and Beverages. Elsevier Science, New York.

Munshi, S.K., N. Bhatia, B.S. Sekhon, and P.S. Sukhija. 1993. Inactivation of rice bran lipase with metal ions. J. Chem. Tech. Biotechnol. 57 : 169-174.

Tsuzuki, W., H. Kasumimoto, S. Kobayashi, and T. Suzuki. 1994. Esterase activity and free fatty acid accumulation in the bran of selected rice cultivars. Cereal Chem. 71: 162-165.