วัสดุที่ใช้และวิธีทำ

ชนิดและลักษณะของรำ

รำที่ใช้ในการทดลองมี ๒ ชนิด คือ รำข้าวใหม่ ได้จากการสีข้าวเปลือกที่เก็บไว้นานไม่เกินครึ่งปี และรำข้าวเก่าได้จากการสีข้าวเปลือกที่เก็บไว้นานเกินครึ่งปี ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นรำข้าวขาว ส่วนจะเป็นรำข้าวเก่าหรือรำข้าวใหม่ขึ้นกับฤดูกาล

รำข้าวที่ทำการทดลองได้มาจากโรงสีที่อำเภอพระโขนง จังหวัดพระนคร ลักษณะของรำละเอียดและสะอาด เป็นรำที่รองมาจากเครื่องสีข้าวโดยตรงแล้วนำรำมาที่ห้องปฏิบัติการ ที่จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย (เวลาเดินทางประมาณครึ่งชั่วโมง) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - ๒๐°ซ. จนกว่าจะได้นำไปทดลอง

สารเคมีที่ใช้

Polyvinyl alcohol, tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris.), iodoacetamide, iodoacetic acid, potassium acid phtalate เป็นชนิดบริสุทธิ์ ซื้อจากบริษัท BDH. Laboratory Chemical Division, England.

Pure olive oil, calcium chloride ซื้อจากบริษัท E.Merck Ag. Darmstadt, Germany.

p- Nitrobenzoic acid ซื้อจากบริษัท Riedel De Haenag, Germany

Reagents ที่ใช้อื่น ๆ เป็น Technical grade จากบริษัท May and Baker Ltd., England และบริษัท Fisher Scientific Company, U.S.A.

การสกัดเอนไซม์เอสเทอเรส

ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดเอสเทอเรส (Aldridge, 1954) เอารำมาเติมน้ำให้ข้นประมาณ ๒๐ - ๓๐ %(W/V)ที่ ๔°ซ.๒๐ นาที แล้วเอามาเซ็นติฟิวต์โดยเครื่อง International Portable Refrigerated Centrifuge ที่ ๐°ซ. ด้วยแรง ๓๕๐๐ X g เป็นเวลา ๑๕ นาที ใช้เข็มฉีดยาค่อย ๆ ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำใสออกมาเรียกส่วนนี้ว่า supernatant และใช้เป็นเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ในการทดลอง

การสกัดเอนไซม์ไลเปส

ชั่งรำให้ข้น ๓๐ % (W/V) ในน้ำหรือ buffer solution แล้ว homogenize ด้วย Waring blender ๕ นาที (Alder and Kistiakowsky, ๑๙๖๑) ส่วนมากมักจะแช่ homogenate นี้ไว้ที่ ๔°ซ. ๑๒ ชั่วโมง homogenate นี้อาจนำไปใช้วัดเอนไซม์โดยตรง หรืออาจนำ homogenate นี้ ไปเซ็นติฟิวต์ ในเครื่อง International Portable Refrigerated Centrifuge ที่ ๐°ซ. ด้วยแรง ๔๕๐๐ Xg เป็นเวลา ๒๐ นาที ดูดเอาน้ำใสออกมาใช้เป็นเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ก็ได้

การวัด activity ของเอนไซม์เอสเทอเรส

วิธีสังเคราะห์ p- Nitrophenyl acetate ใช้วิธีของ Herggin and Lapides (๑๙๔๗)

ชั่ง ๐.๑ โมลของ p-Nitrophenol ๑.๒ กรัมของลวดแมกนีเซียม ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกริยา กับ ๐.๑๒ โมลของ acetyl chloride ซึ่งละลายอยู่ในเบนซีน ๓๐ มิลลิลิตร ใส่รวมกันในขวดก้นกลมขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตร reflux ๑ ชั่วโมง รินเอาน้ำยาที่ได้หลังการ reflux ใส่กรวยแยก เติมอีเทอร์ ๑๕๐ มิลลิลิตร จะได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน สกัด acetyl chloride ที่เหลือออกไปด้วยน้ำ แล้วสกัด p- Nitrophenol ที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แล้วสกัดด้วย

น้ำอีกหนึ่ง เพื่อกำจัดโซเดียมคาร์บอเนตที่เหลือ ระเหยเอาอีเทอร์ออกโดยใช้วิธีลดความดัน จนกระทั่งได้ p- Nitrophenyl acetate ตกตะกอนออกมา นำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกใหม่ด้วยอีเทอร์ และระเหยเอาอีเทอร์ออกโดยการลดความดันอีก ๒ - ๓ ครั้ง สารที่ได้จะไม่บริสุทธิ์ที่เดียว แต่จะบริสุทธิ์พอที่จะเป็น substrate ได้ โดยไว้ในตู้แช่แข็งที่ - ๒๐° ซ.

วิธีเตรียมสารละลายของ p- Nitrophenyl acetate

ชั่ง p- Nitrophenyl acetate ๔๕.๓ มิลลิกรัม ละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ หรืออาซีโตน ๕ มิลลิลิตร นำมา ๑ มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมลงไปในน้ำ ๕๐ มิลลิลิตร ที่อยู่ใน conical flask พร้อมทั้งแกว่งอยู่เสมอกันการตกตะกอนของ p- Nitrophenyl acetate สารนี้ใช้เป็น substrate ของเอสเทอเรส ได้ไม่เกิน ๖ ชั่วโมง และจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

๑. Spectrophotometer ของบริษัท Unicam (Model S.P. 500) และของบริษัท Beckman (Model D.U.)

๒. pH meter ของบริษัท E.I.L. และของบริษัทBeckman

วิธีดำเนินการทดลอง (ดัดแปลงจาก Bier, 1955)

Reaction mixture ใน glass cuvette (๑ ซม.) ประกอบด้วย ๐.๐๒๕ โมลาร์ของ phosphate Buffer pH ๗.๕ และ ๐.๖๖ X $๑๐^{-๖}$ โมลาร์ของ p- Nitrophenyl acetate และ ๐.๑ มิลลิลิตรของเอนไซม์ (ใช้ automatic pipette) ปริมาตรสุดท้ายรวมทั้งหมด ๓ มิลลิลิตร เริ่มปฏิกริยาเมื่อเติม substrate ลงไปใน incubation mixture แล้ววัด optical density ที่เพิ่มขึ้นที่ ๔๐๐ มิลลิไมครอน ทุก ๑๕ วินาที เป็นเวลานาน ๒ - ๓ นาที โดยมี blank ที่ประกอบด้วยสารทุกอย่างยกเว้น substrate

Optical density ที่เพิ่มขึ้นนั้น ต้องนำมาแก้จากค่า optical density ที่เพิ่มขึ้นในเมื่อไม่มีเอนไซม์ทุกครั้งไป การเปลี่ยนแปลงของ optical density เมื่อแก้แล้วในเวลา ๑ นาที จะถือว่าเป็น ๑ unit acitivity ของเอสเทอเรส

การวัด activity ของเอนไซม์ไลเปส

วิธีเตรียม olive oil emulsion (Bier, 1955)

ชั่ง Polyvinyl alcohol ๑๐ กรัม ค่อย ๆ เติมลงในน้ำกลั่น ๕๐๐ มิลลิลิตร ซึ่งมีกรดเกลือ ๐.๑ นอร์แมลอยู่ ๕ มิลลิลิตร อุ่นบน water bath ที่ ๗๕ - ๘๕°ซ. คนบ่อย ๆ จนกระทั่งได้สารละลายใส (เวลาที่ใช้ประมาณ ๑ - ๒ ชั่วโมง) ทำให้เย็น กรองเอาตะกอนที่มีอยู่ออก ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๐.๑ นอร์แมล ถ่ายใส่ Waring blender เติมน้ำมันมะกอก ๑๕ มิลลิลิตร homogenize ๑๐ นาที สารที่ได้มีลักษณะขุ่นขาวคล้ายน้ำนม ใช้เป็น substrate ของไลเปส โดยเก็บไว้ที่ ๔°ซ. ใช้ได้ประมาณ ๒ อาทิตย์ และนำมา homogenize ๕ นาทีทุกครั้งที่ใช้ทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

๑. Automatic burette (capacity 5.0 ml, accuracy ± 0.02ml) มีหลอดบรรจุโซเดียมไฮดรอกไซด์กันการดูดของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย

๒. pH meter ของบริษัท E.I.L. และบริษัท Coleman

๓. เครื่อง Shaking water bath ของบริษัท Gallenkamp

วิธีดำเนินการทดลอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Vincent and Meinertz, 1960 และ Willstatter etal., 1923)

ใช้ conical flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ ๐.๐๔ โมลาร์ ของ phosphate buffer pH ๗.๐, olive oil emulsion ๒ % ,

เอนไซม์ ๒ มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายรวมทั้งหมด ๑๕ มิลลิลิตร incubate ที่ ๓๗°ซ ในเครื่อง shaking water bath ซึ่งเขย่าอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา ๕ ชั่วโมง แล้วจึงหยุดปฏิกริยาของเอนไซม์โดยเติม ๑ มิลลิลิตรของกรดกำมะถัน ๐.๓ โมลาร์ ถ่ายทั้งหมดใส่หลอดสกัด (extracting tube) สกัดกรดไขมันที่เกิดขึ้นโดยใช้น้ำมันปิโตรเลียม (จุดเดือด ๖๐ - ๖๖°ซ.) ๒ ครั้ง

ครั้งแรกใช้น้ำมันปิโตรเลียม ๑๐ มิลลิลิตร เขย่าประมาณ ๒ นาที (๒๐๐ ครั้ง) แล้วนำไปเซ็นติฟิวต์ด้วยแรง ๔๕๐๐ Xg ๑๕ นาที เพื่อแยกชั้น (ปิโตรเลียมอยู่ข้างบน) ใช้เข็มฉีดยาขนาด ๕ มิลลิลิตร ดูดเอาชั้นของปิโตรเลียมมา ๕ มิลลิลิตร แล้วจึงเติมปิโตรเลียมลงไปในสารละลายที่เหลืออีก ๕ มิลลิลิตร เขย่า และเซ็นติฟิวต์ตามวิธีครั้งแรก จากนั้นดูดเอาชั้นปิโตรเลียมออกมาอีก ๕ มิลลิลิตร ใส่รวมกับที่ได้ครั้งแรก

นำปิโตรเลียมที่สกัดได้นี้ ไประเหยเอาตัวทำละลายออกใน water bath ที่มีอุณหภูมิ ๗๕ - ๘๕°ซ. ใช้กาซไนโตรเจนพ่นลงไป เพื่อช่วยการระเหยให้เร็วขึ้นด้วย เมื่อปิโตรเลียมระเหยไปหมดแล้ว สิ่งที่เหลือคือกรดไขมันอิสระ และน้ำมันรำรวมกันอยู่ที่ก้นหลอด

เติมแอลกอฮอล์ ๙๕ % ๕ มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเพื่อละลายสารที่สกัดได้ แล้วหาปริมาณของกรดไขมันอิสระ โดยการไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตราฐาน ที่มีความเข้มข้นประมาณ ๐.๐๑ นอร์แมล ใช้เครื่องมือ automatic burette โดยมี ๐.๐๒ % nile blue (ใน ๙๐ % แอลกอฮอล์) เป็น indicator จุดสุดท้ายของการไตเตรตคือ จุดที่เปลี่ยนจากสีน้ำเงินของ nile blue มาเป็นสีชมพูแกมส้ม