# การสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวเพื่อเพิ่มมูลค่าของรำข้าว

# Extraction of Lipase from White Sticky Rice Bran to Add Rice Bran Valuable

**พรทิพพา พิญญาพงษ์***
Porntippa Pinyaphong
**กัลยารัตน์ เทียนรุ่งอรุณ****
Kanyarat Teanrungarun

**บทคัดย่อ**

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว และศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสที่สกัดได้ เริ่มต้นด้วยการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวโดยแช่รำข้าวเหนียวขาวในไดเอทิลอีเทอร์ (100 มิลลิลิตร ต่อ กรัม ของกากรำข้าวเหนียวขาว) เป็นเวลา 30 นาที ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ อยู่ด้วย (80 มิลลิลิตร ต่อกรัม ของกากรำข้าวเหนียวขาว) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการสกัด 20 นาที เอนไซม์ที่สกัดได้มีแอคติวิตีของไลเปสเท่ากับ 75.35 $\pm$ 3.76 ยูนิตต่อมล. เอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากกากรำข้าวเหนียวขาวได้ผลผลิตร้อยละ 6.37 และมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มคือ 25 องศาเซลเซียส และ 7.2 ตามลำดับ ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิและพีเอชสูงได้ สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันรำข้าวดิบได้หมดภายในเวลา 3 ชั่วโมง และสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าวกับเมทานอลได้โดยให้เมทิลเอสเทอร์เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

**คำสำคัญ : การสกัด / เอนไซม์ไลเปส / กากรำข้าว**

*อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์
**นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์

ABSTRACT

The objective of this research was to study the proper way to extract lipase from white sticky rice bran and study some properties of extracted lipase. First, fat in rice bran was removed by soaking rice bran in diethyl ether (100 ml/g rice bran) for 30 minutes in shaking incubator (200 rpm) at 4°C, then lipase was extracted from defatted rice bran using 0.15 M of phosphate buffer, pH 7 with 10 mM of calcium chloride (80 ml/g rice bran) at 4°C for 20 minutes. The lipolytic activity of extracted lipase was 75.35 ± 3.76 units/ml enzyme. The yield of extracted lipase was 6.37%. Extracted lipase showed some properties as follow: the optimum temperature and the optimum pH of palm oil hydrolysis were 25°C and 7.2, respectively. It could not tolerate high temperature and high pH. The extracted lipase from white sticky rice bran could catalyze hydrolysis of crude rice bran oil within 3 hours and could catalyze transesterification of rice bran oil with methanol which produced methyl ester after 72 hours.

**Keywords : Extraction / Lipase / Rice Bran**

**ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา**

ไลเปส (lipase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerolacylhydrolases) หรือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน (Sharma, Chisti & Banerje, 2001) ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีความสำคัญใน อุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นเอนไซม์หนึ่งเดียวที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของ กรดไขมันในสภาวะที่มีน้ำและทำให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีการนำไป ประยุกต์ใช้ในงานที่หลากหลายทั้งในการย่อยสลายกลุ่มของไขมันหรือน้ำมัน การนำไปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในการผลิตช็อกโกแลต นม เนยแข็ง ผสมในอาหารสัตว์ ผสม ผงซักฟอก เสริมการย่อยอาหารของมนุษย์ และใช้ทำลายไขมันตามท่อน้ำ (Hasan, Shah & Hameed, 2006)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสโดยส่วนใหญ่จะได้มาจากการผลิตแล้วขับออกมานอกเซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อนำไป ย่อยสลายอาหารในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ เพื่อใช้ในการดำรงชีวิต ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงทั้งในการเร่งปฏิกิริยาและการเก็บ แต่แหล่งของไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นต้อง ใช้ค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าว ทำให้เอนไซม์มีราคาแพง (Jaeger & Eggert, 2004) การหาแหล่งเอนไซม์ไลเปสจากพืชนั้นยังไม่ได้มีการค้นพบมากนักตัวอย่างเช่น รายงานเกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์ ไลเปสจากเนื้อมะพร้าวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4-6 และสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7-9 ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส โดยใช้เทคนิคระบบน้ำสองวัฏภาค (สโรธร ตันตสีมันต์, กุลธิดา คชรัตน์ และปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2552) การนำไลเปสจากยางมะละกอซึ่งจะจับแน่นอยู่กับส่วนที่ไม่ละลายน้ำของยางมะละกอมาใช้สังเคราะห์เนย โกโก้จากน้ำมันปาล์ม (Pinyaphong & Phutrakul, 2009)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการกสิกรรมเป็นหลักและมีการทำนาเป็นอาชีพที่สำคัญ ในปีแต่ละปีสามารถ ผลิตข้าวเปลือกได้ประมาณปีละ 20-22 ล้านตัน สีเป็นข้าวสารประมาณ 16 ล้านตันและจะได้ รำข้าวเป็นผลผลิต พลอยได้ประมาณ 1.12 ล้านตัน (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2556) ซึ่งรำข้าวนี้นอกจากใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบ สำหรับทำน้ำมันหรือใช้เป็นอาหารสัตว์แล้วยังเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ (Houston, 1972) รำข้าว

เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าว มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองปนน้ำตาล ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าว ได้แก่ ปลอกเมล็ดข้าว (pericarp) และ เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) (Houston, 1972) ปริมาณและองค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับชนิดของข้าว คุณภาพของข้าวเปลือก ชนิดของวิธีการสีข้าวและระดับของการขัดขาว องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในรำข้าวได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโน ไขมัน แร่ธาตุ วิตามิน และ เอนไซม์ (Kelley, 2005) ไลเปสที่พบในกากรำข้าว (รำข้าวที่กำจัดไขมันออกแล้ว) สามารถละลายน้ำได้ มีอยู่ 2 ชนิด คือ ไลเปส I มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.5 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ และ ไลเปส II มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.5 มีน้ำหนักโมเลกุล 32 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อกรดไขมันชนิดสายสั้น (Aizono, et al., 1976; Fujiki, Aizono & Funatsu, 1978) จากการศึกษาความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวไทยสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งพันธุ์ข้าวก่ำซึ่งมีสีดำ และพันธุ์ข้าวเหนียวขาวซึ่งมีสีขาวโดยวิธีทางจลนศาสตร์ พบว่าไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว กข 6 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์น้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุด (ธีรารัตน์ อิทธิโสภณกุล, 2543) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว กข 6 และ ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้ เพื่อประโยชน์ในการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระดับอุตสาหกรรม และเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้แก่กากรำข้าวอีกทางหนึ่งด้วย

**วิธีดำเนินการวิจัย**

ตัวอย่าง

ตัวอย่างรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 ชนิดละเอียด เก็บจากโรงสีข้าวแห่งหนึ่งในตำบลบ้านด่าน อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ ประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วนำไปแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

1. การศึกษาตัวทำละลายและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันออกจากรำข้าวเหนียวขาว

ชั่งรำข้าวเหนียวขาว 0.05 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ 5 ใบ เติมตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ ไดเอทิลอีเทอร์ เพนทานอล บิวทานอล เฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม อย่างละ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้กากรำข้าวเหนียวขาวตกตะกอน แล้วดูดตัวทำละลายทิ้งไป นำตะกอนที่ได้ไปเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเดิม แล้วทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส จากนั้นเลือกเฉพาะตัวทำละลายที่ทำให้เอนไซม์ไลเปสมีแอคติวิตีสูงที่สุดมาใช้ในการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันออกจากเอนไซม์ โดยทำการทดลองเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนเวลาจาก 10 นาที เป็น 20, 30 และ 40 นาที ตามลำดับ

2. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

ชั่งรำข้าวเหนียวขาว 0.05 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ 3 ใบ นำไปสกัดไขมันออกก่อนโดยแช่ในไดเอทิลอีเธอร์ เป็นเวลา 30 นาที (ข้อ 2.1) เมื่อผึ่งกากรำข้าวเหนียวขาวให้แห้งแล้ว ให้เติมสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่แต่ละใบ แล้วนำขวดรูปชมพู่ทั้ง 3 ใบ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่เวลาต่างกันคือ 20 นาที (ขวดใบที่ 1), 40 นาที (ขวดใบที่ 2) และ 60 นาที (ขวดใบที่ 3) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมขวดรูปชมพู่ 2 ใบ เติมสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 0.30 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำมันปาล์ม 0.50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1 ส่วนขวดรูปชมพู่ใบที่ 2 ใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบไม่ต้องเติมเอนไซม์ นำขวดรูปชมพู่ทั้ง 2 ใบไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายผสมของอะซิโตนและเอทานอล (ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร10 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร ลงในขวดเปรียบเทียบ นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ทั้ง 2 ใบ ไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ กำหนดให้ 1 ยูนิต ของไลเปส คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ ใช้วิธีการของลาวรี (Lowry, et al., 1951) ใช้เซรั่มอัลบูมินจากวัว (Bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากกากรำข้าวเหนียวขาว

1. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส โดยทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ดังข้อ 3 ที่อุณหภูมิต่างๆ

2. การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ (1) สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 5 (2) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 6 (3) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 (4) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2 (5) สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 8.6 และ(6) สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 9 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากกากรำข้าวเหนียวขาวที่พีเอชต่างๆทำได้โดย เตรียมสารละลายผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ 0.30 มิลลิลิตร และน้ำมันปาล์ม 0.50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายผสมของอะซิโตนและเอทานอล (อัตราส่วน 1:1) เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

3. การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของไลเปส

เตรียมสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิ-โมลาร์ 0.30 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร และน้ำมันปาล์ม 0.50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 14 ชุด เติมสารละลายไลเปส (0.50 มิลลิลิตร) อุ่นที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ลงในสารละลายสับสเตรทที่เตรียมไว้ในชุดที่ 1-7 ตามลำดับ นำสารละลายสับสเตรททั้ง 14 ชุด ไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนและเอทานอล (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส (0.50 มิลลิลิตร)

ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ลงในสารละลายสับสเตรทชุดที่ 8-14 ตามลำดับ นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

4. การศึกษาความเสถียรต่อพีเอชของไลเปส

บ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ พีเอช 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

5. การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันรำข้าว

เตรียมสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 0.30 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร และ น้ำมันรำข้าว 0.50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 มิลลิลิตร เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เก็บสารละลายปฏิกิริยาที่เวลา 0 (เวลาเริ่มต้น), 1, 3 และ 5 ชั่วโมง เติมคลอโรฟอร์ม 4 มิลลิลิตร ลงในสารละลายปฏิกิริยาที่เก็บได้ นำไปใส่ในกรวยแยกเพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างคลอโรฟอร์มกับสารละลายปฏิกิริยา นำชั้นคลอโรฟอร์มมาระเหยเอาตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคทินแลเยอร์-โครมาโตกราฟี (Thin layer chromatography, TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และ กรดแอซิติก ในอัตราส่วน 90:10:1 ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่น TLC มาตรวจสอบด้วยไอของไอโอดีน แล้วหาค่า $R_f$ ขององค์ประกอบแต่ละชนิดเทียบกับค่า $R_f$ ของสารมาตรฐาน

6. การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่นของน้ำมันรำข้าวด้วยไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

เตรียมสารละลายปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยน้ำมันรำข้าว 1 กรัม และ เมทานอล 10 มิลลิลิตร เติมกาก รำข้าวเหนียวขาวที่สกัดไขมันออกแล้ว 1 กรัม เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำสารละลายตัวอย่าง 0.3 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และ กรดแอซิติก ในอัตราส่วน 90:10:1 ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่น TLC มาตรวจสอบด้วยไอของไอโอดีน แล้วหาค่า $R_f$ ขององค์ประกอบแต่ละชนิดเทียบกับค่า $R_f$ ของสารมาตรฐาน

**ผลการวิจัย**

1. การศึกษาการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว

1.1 การศึกษาตัวทำละลายและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว

ผลของการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิด คือ ไดเอทิลอีเทอร์ เพนทานอล บิวทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ที่มีผลต่อการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว พบว่า ไดเอทิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว (ตารางที่ 1) สำหรับผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดไขมันออกจากรำข้าวเหนียว พบว่า การแช่กากรำข้าวเหนียวขาวในไดเอทิลอีเทอร์เป็นเวลา 30 นาที จะทำให้การสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวเกิดขึ้นได้ดีที่สุด (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 1** ผลการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ

| ตัวทำละลายอินทรีย์ | แอคติวิตีของไลเปส (ยูนิต/มล. เอนไซม์) |
|---|---|
| การรำข้าวเหนียวขาว | 1.50 ± 0.08 |
| กากรำข้าวเหนียวขาว + ไดเอทิลอีเทอร์ | 12.41 ± 0.62 |
| กากรำข้าวเหนียวขาว + เพนทานอล | 8.50 ± 0.42 |
| กากรำข้าวเหนียวขาว + บิวทานอล | 1.70 ± 0.09 |
| กากรำข้าวเหนียวขาว + เฮกเซน | 7.94 ± 0.39 |
| กากรำข้าวเหนียวขาว + คลอโรฟอร์ม | 3.96 ± 0.19 |

**ตารางที่ 2** ผลการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวโดยใช้ไดเอทิลอีเทอร์ ที่เวลาต่างๆ

| เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที) | แอคติวิตีของไลเปส (ยูนิต/มล.เอนไซม์) |
|---|---|
| 10 | 12.41 ± 0.62 |
| 20 | 36.60 ± 1.83 |
| 30 | 72.75 ± 3.63 |
| 40 | 68.71 ± 3.43 |

1.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

ผลของการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว คือ 20 นาที โดยให้ค่าแอคติวิตีของไลเปสเท่ากับ 75.35 ± 3.76 ยูนิตต่อมล. เอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ผลการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่เวลาต่างๆ

| เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที) | แอคติวิตีของไลเปส (ยูนิต/มล. เอนไซม์) |
|---|---|
| 20 | 75.35 ± 3.76 |
| 40 | 55.91 ± 2.79 |
| 60 | 28.37 ± 1.41 |

ผลจากการนำรำข้าวเหนียวขาวไปสกัดไขมันออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ แล้วสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์อยู่ด้วย เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีและโปรตีนของไลเปส ให้ผลแสดงในตารางที่ 4 และคำนวณเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะ และผลผลิต แสดงไว้ในตารางเดียวกัน จากตารางจะเห็นได้ว่าการสกัดไขมันออกจากรำข้าวเหนียวขาวจะทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตีถึง 61.2% และในการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวจะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเหลืออยู่เพียง 6.37%

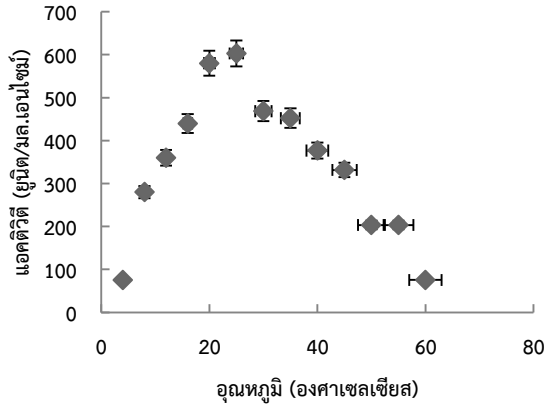
**ตารางที่ 4** การสกัดแยกไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวที่สกัดไขมันออกแล้ว

| ขั้นตอน | ปริมาณ | แอคติวิตี (ยูนิต) | โปรตีน (มก) | แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก โปรตีน) | ผลผลิต (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| รำข้าวเหนียวขาว (กรัม) | 100 | 15000 | 5882 | 2.55 | 100 |
| กากรำข้าวที่สกัดไขมัน (กรัม) | 80 | 5820 | 1462 | 3.98 | 38.8 |
| สารละลายไลเปส (มล) | 64 | 4822 | 956 | 5.04 | 6.37 |

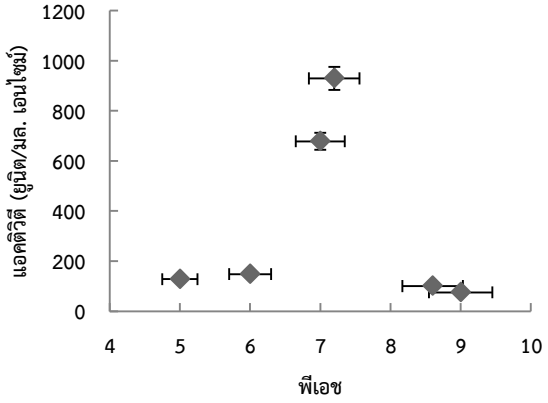
2. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

2.1 ผลของการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ในการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากกากรำข้าวเหนียวขาว ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อยู่ด้วย ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากกากรำข้าวเหนียวขาวมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 602.80 $\pm$ 30.14 ยูนิต/มล. เอนไซม์ (ภาพที่ 1) สำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มที่พีเอชต่างๆ คือ 5, 6, 7, 7.2, 8.6 และ 9 ของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากกากรำข้าวเหนียวขาว พบว่า เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.2 (929.46 $\pm$ 46.47 ยูนิต/มล. เอนไซม์) (ภาพที่ 2)



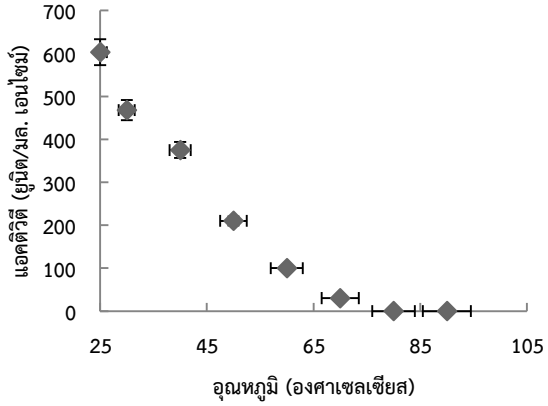

**ภาพที่ 1** แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ณ อุณหภูมิต่างๆ




**ภาพที่ 2** ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอชต่างๆ

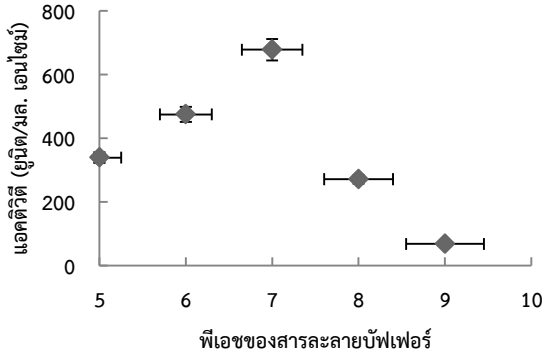
2.2 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของไลเปส

จากการอุ่นสารละลายไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของน้ำมันปาล์ม แล้วคำนวณหาแอคติวิตีไลเปส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังจากอุ่นสารละลายไลเปสไว้ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ไลเปสมีแอคติวิตีลดลงเหลือประมาณ 60% และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของไลเปสลดลงอีกเหลือแอคติวิตี 35% เมื่ออุณหภูมิที่อุ่นไลเปสสูงขึ้นพบว่าแอคติวิตีของไลเปสยิ่งลดลงจนกระทั่งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ไม่พบแอคติวิตีของไลเปส




**ภาพที่ 3** แอคติวิตีที่เหลืออยู่ของไลเปสหลังจากอุ่นไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการบ่มสารละลายไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของน้ำมันปาล์มแล้วคำนวณหาแอคติวิตีไลเปส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไลเปสมีเสถียรภาพค่อนข้างดีในช่วงพีเอช 6-7 เมื่อบ่มไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 เอนไซม์มีแอคติวิตีเหลืออยู่ครึ่งหนึ่ง เมื่อสารละลายบัฟเฟอร์มีพีเอชเพิ่มขึ้นมากกว่า 7 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีของไลเปสลดลง ตามลำดับ




**ภาพที่ 4** แอคติวิตีที่เหลืออยู่ของไลเปสหลังจากบ่มไว้ที่สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

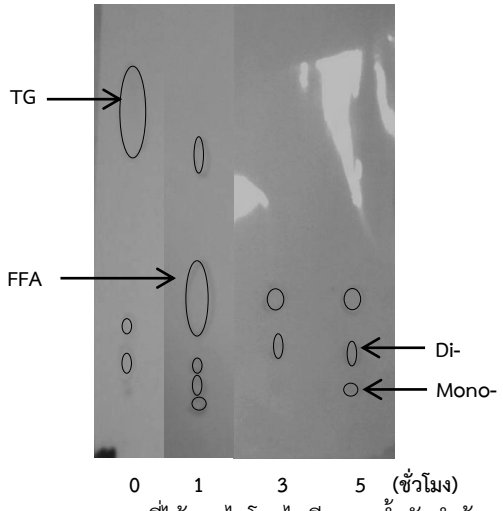
2.3 ผลการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว

ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาโฮโดรไลซิสน้ำมันรำข้าวของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวที่สกัดได้ ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่าไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันรำข้าวได้หมด ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันทั้งหมด (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 5)

**ตารางที่ 4** สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันรำข้าว

| เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (ชั่วโมง) | ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น |
|---|---|
| 0 | Mono/Di- และ TG |
| 1 | Mono/Di-, FFA และ TG |
| 3 | Mono/Di- และ FFA |
| 5 | Mono/Di- และ FFA |

หมายเหตุ: FFA คือกรดไขมันอิสระ; Mono/Di- คือโมโนกลีเซอไรด์/ ไดกลีเซอไรด์; TG คือไตรกลีเซอไรด์



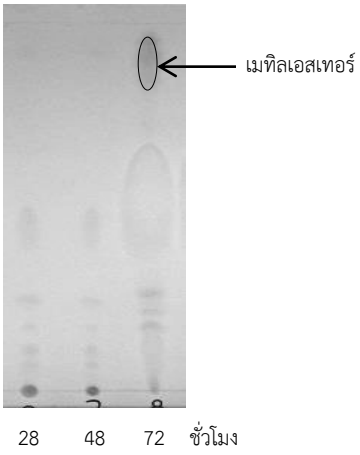

**ภาพที่ 5** โครมาโตรแกรมของ TLC ที่ได้จากไฮโดรไลซีสของน้ำมันรำข้าว

สำหรับการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว ซึ่งเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้จากกากรำข้าวเหนียวขาวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าวกับเมทานอลได้ โดยให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 6)

**ตารางที่ 5** สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันรำข้าว

| เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง) | ชนิดของผลิตภัณฑ์ |
|---|---|
| 0 | Mono/Di- และ TG |
| 24 | Mono/Di-, FFA และ TG |
| 48 | Mono/Di-, FFA และ TG |
| 72 | Mono/Di-, FFA , TG และ ME |

หมายเหตุ: FFA คือกรดไขมันอิสระ; TG คือไตรกลีเซอไรด์; Mono/Di- คือโมโนกลีเซอไรด์/ไดกลีเซอไรด์; ME คือเมทิลเอสเทอร์




**ภาพที่ 6** โครมาโตรแกรมของ TLC ที่ได้จากทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว

**อภิปรายผล**

ในการสกัดไขมันออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าไดเอทิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดไขมันออกจากรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานการใช้เฮกเซนสกัดไขมันออกจากรำข้าวในท้องถิ่นของอินเดีย (Prabhu, et al., 1999) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไดเอทิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้เร็วกว่าเฮกเซนจึงทำให้กำจัดน้ำมันออกจากกากรำข้าวได้ดีกว่าเฮกเซน กากรำข้าวที่สกัดดด้วยไดเอทิลอีเทอร์จึงแสดงแอคติวิตีของไลเปสได้ดีกว่า โดยเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันออกจากรำข้าวคือ 30 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการสัมผัสกันระหว่างเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ และจากการสกัดเอนไซม์ไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาว โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7 ที่มีแคลเซียม-คลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัด คือ 20 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่ารายงานการสกัดสารละลายไลเปสจากกากรำข้าวในท้องถิ่นของอินเดียที่สกัดเอาไขมันออกแล้วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 มิลลิ-โมลาร์ (Prabhu, et al., 1999) ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าในการทดลองนี้ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจึงทำให้ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า นอกจากนี้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7 เป็นสารละลายที่ช่วยรักษาสภาพของโปรตีน หรือเอนไซม์ได้ดีที่สุด (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, ประไพพิศ เดโชดมพันธ์ และสิรี ชัยเสรี, 2540) จากผลการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพีเอชที่ 7.2 จะเหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้ไม่ชอบทำงานที่อุณหภูมิสูงและไม่ทนต่อกรดและเบส ชอบเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นกลางซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสชนิด II ในรำข้าว ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 27 องศาเซลเซียส (ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย, 2552) ในการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของไลเปสที่สกัดได้พบว่า ที่อุณหภูมิสูงขึ้นตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียสเป็นต้นไปเอนไซม์จะมีแอคติวิตีของไลเปสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของไลเปสจากรำข้าว IR-20 (Rajeshwara & Prakash, 1995) จากการสกัดแยกไลเปสออกจากกากรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 ที่สกัดเอาไขมันออกแล้ว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไลเปสที่สกัดได้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นแต่ได้ผลผลิตเหลือเพียง 6.37% ดังนั้นในการทดลองนำไลเปสไปประยุกต์ใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิ-เคชันจึงใช้ไลเปสในรูปของกากรำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 ที่สกัดไขมันออกแล้ว สำหรับการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันรำข้าว พบว่าชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันรำข้าวด้วยเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว คือ กรดไขมันอิสระ และ โมโน/ไดกลีเซอไรด์ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ แต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งได้จากการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ที่มี 3 ลักษณะคือ ความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันหรือชนิดสับสเตรท และความจำเพาะต่อไอโซเมอร์ (Villeneuve, et al., 2000; Ghanem, 2007)

จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสจากกากรำข้าวเหนียวขาว พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันรำข้าวกับเมทานอลได้ แต่จะใช้เวลานานในการเกิดปฏิกิริยาโดยให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันรำข้าวมีการแยกชั้นกันเกิดขึ้นจึงส่งผลทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ไม่ค่อยดีต้องใช้เวลานาน นอกจากนี้เมทานอลมีความเป็นพิษต่อเอนไซม์จึงมีผลไปทำให้บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดได้เสียสภาพไปจึงเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าวได้ไม่เต็มที่ (Lilin, et al., 2006)

**กิตติกรรมประกาศ**

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน (เสนอผ่าน วช)

**เอกสารอ้างอิง**

ธีรารัตน์ อิทธิโสภณกุล. (2543). **การศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสในกากรำข้าว.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย. (2552). **การผลิตน้ำมันรำข้าวเพื่อสุขภาพ โดยการคงสภาพรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบโอห์มมิค และสกัดน้ำมันโดยใช้เอนไซม์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

**ผู้ส่งออกข้าวไทย, สมาคม.** (2556). [Online]. แหล่งที่มา. http://www.thairiceexporters.or.th/Local%20news/News_2013/news_310113-1.html .

สโรธร ตันตสีมันต์, กุลธิดา คชรัตน์ และปิยาภรณ์ ภาษิตกุล. (2552). **การสกัดและการแยกเอนไซม์ไลเปสจากเนื้อมะพร้าวด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค. ในการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์.** วันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2552 (หน้า 1-10). สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, ประไพพิศ เดโชดมพันธ์ และสิรี ชัยเสรี. (2540). การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไลเปสจากรำข้าว. **วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์), 31**(1), 56-71.

Aizono, Y., et al. (1976). Purification and characterization of rice bran lipase II. **Agricultural and Biological Chemistry, 40,** 317-324.

Fujiki, Y., Aizono, Y. & Funatsu, M. (1978). Chemical properties of major subunit of rice bran lipase. **Agricultural and Biological Chemistry, 42**, 599-606.

Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure enriched compounds. **Tetrahedron, 63,** 1721-1754.

Hasan, F., Shah, A.A. & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology, 39**, 235-251.

Houston, D.F. (1972). Rice bran and polish. Minnesota : American Association of Cereal Chemists.

Jaeger, K. & Eggert, T. (2004). Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution, **Current Opinion in Biotechnology, 15,** 305-313.

Kelley, C. (2005). A novel procedure for fat and oil extraction. **Inform, 16,** 76-77.

Lilin, L., et al. (2006). Lipase-catalyzed trans-esterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis. B. Enzymatic, 43,** 58-62.

Pinyaphong, P. & Phutrakul, S. (2009). Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by Carica papaya lipase-catalyzed interesterification. **Chiang Mai Journal Science, 36,** 359-368.

Prabhu, A.V., Tambe, S.P., Gandhi, N.N., Sawant, S.B. & Joshi, J.B. (1999). Rice bran lipase: extraction, activity and stability. **Biotechnology Progess, 15**, 1083-1089.

Rajeshwara, A.N. & Prakash, V. (1995). Purification and Characterization of lipase from rice (Oryza sativa L.) bran. **Nahrung, 39,** 406-418.

Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization and application of lipase. **Biotechnology Advances, 19,** 627-662.

Villeneuve, P., et al. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 9,** 113-148.