

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันความต้องการโปรตีนจากพืชมีมากขึ้นเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ และเพื่อทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์สำหรับมนุษย์ โดยโปรตีนจากพืชที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ ถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (1-3) แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนจากพืชส่วนมากจะมีกรดอะมิโนชนิดจำเป็นอยู่ไม่ครบถ้วน ดังนั้น นักวิจัยจึงมีความพยายามที่จะหาแหล่งของพืชที่มีกรดอะมิโนอยู่สมบูรณ์มากที่สุด ซึ่งเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น เรปซีด และมัสตาร์ด ก็เป็นพืชอีกแหล่งหนึ่งซึ่งนอกจากจะมีปริมาณน้ำมันอยู่สูงแล้ว ยังมีปริมาณโปรตีนอยู่สูงด้วยเช่นกัน อีกทั้งโปรตีนดังกล่าวยังประกอบด้วยชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่ค่อนข้างสมบูรณ์ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการนำมาใช้เป็นแหล่งของโปรตีนสำหรับมนุษย์ (4-11)

1.1 เมล็ดมัสตาร์ด

มัสตาร์ด (mustard) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในสกุลบราสสิก้า (Genus *Brassica*) ในวงศ์ Cruciferae (Family Cruciferae) มีหลาย species ด้วยกัน ที่พบมากได้แก่ White mustard (*Brassica hirta*), Black mustard (*Brassica nigra*) และ Indian หรือ leaf mustard (*Brassica juncea*) มัสตาร์ดจัดเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับเรปซีด (Rapeseed; *Brassica napus* หรือ *Brassica campestris*) (1-2)

ทั้งมัสตาร์ดดำ (*Brassica nigra*) และมัสตาร์ดขาว (*Brassica hirta*) มีต้นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน หรือตะวันออกกลาง มีการเพาะปลูกมาเป็นเวลานานกว่า 2,000 ปีแล้ว และขยายอาณาเขตการเพาะปลูกไปในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิปานกลางทั่วโลก ส่วนมัสตาร์ดอินเดีย (*Brassica juncea*) คาดว่ามีถิ่นกำเนิดในแอฟริกา ปัจจุบันได้ขยายมาถึงในเอเชีย มัสตาร์ดดำ ปัจจุบันปลูกมากในเนเธอร์แลนด์ อิตาลี อังกฤษ และอเมริกาตามลำดับ มีความสูง 10-16 ฟุต เมล็ดเป็นทรงกลม มีสีออกแดงคล้ำถึงสีน้ำตาลอ่อน เมล็ดที่ถูกบดละเอียดมีกลิ่นหอมอ่อนๆ เมื่อผงนี้เปียกจะมีกลิ่นฉุนและให้รสเผ็ดร้อนทำให้เคืองตาได้ สามารถใช้เป็นเครื่องเทศที่ให้กลิ่นและรส เมล็ดทั้งหมดใช้ในการดองผักและทำสลัด เมล็ดที่บดละเอียดใช้ผสมกับเกลือ น้ำส้ม และเครื่องเทศอื่นๆ ในการทำแซนวิช รสและกลิ่นฉุนของมัสตาร์ดดำเกิดจากสาร allyl isothiocyanate ซึ่งเกิดจากการ hydrolysis ของสาร sinigrin โดยเอนไซม์ myrosinase ที่มีอยู่ในเมล็ดของมันเอง สำหรับมัสตาร์ดขาว ปัจจุบันปลูกมากในทวีปยุโรปและอเมริกา ลำต้นสูง 2 ฟุต มีดอกสีเหลือง

เมล็ดเป็นรูปทรงกลมสีเหลืองซีดขนาดใหญ่กว่าเมล็ดสีดำ เมล็ดที่บดละเอียดจะมีรสเผ็ดเล็กน้อย ส่วนประกอบสำคัญของเมล็ดดำขาว คือ ไกลโคไซด์ ซินาลบิน (sinabin glycoside) และเอนไซม์ ไมโรซิน (myrosin) (1)

เมล็ดมัสตาร์ดมี endosperm ขนาดใหญ่กว่าเมล็ดธัญพืชอื่นๆ แต่มีขนาดใกล้เคียงกับเรปซิด ผนังหุ้มเมล็ด (seed coat) ประกอบด้วยผนังชั้นนอก (outer epidermis) ชั้น palisade ซึ่งเป็นเซลล์รูปร่าง columnar ผนังหนา และชั้น parenchyma อัดแน่น ในส่วนของ endosperm จะเป็นเซลล์ aleurone แถวเดียว และมีชั้น parenchyma อัดแน่นแยกออกจาก embryo สีของเมล็ดเมื่ออ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีเหลืองหรือน้ำตาลซึ่งจะแล้วแต่สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีเหลืองจะมีปริมาณน้ำมันและโปรตีนอยู่สูงกว่า แต่จะมีเยื่อใต้ง่ากว่าสายพันธุ์เมล็ดสีน้ำตาล สำหรับขนาดของเมล็ดมัสตาร์ดเมื่อเทียบกับเรปซิด จะมีน้ำหนักต่ำกว่าเรปซิดเล็กน้อย (2.8-3.5 และ 3.5-5.5 กรัม/1,000 seeds ตามลำดับ) (2)

มัสตาร์ดจัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย เช่น ที่หนาวเย็นและแห้งแล้ง นิยมปลูกในแถบอบอุ่นเช่นเดียวกับ rapeseed หรือ canola โดยการเพาะปลูกมัสตาร์ดในเขตอบอุ่นจะปลูกเฉพาะฤดูร้อน ส่วนในเอเชียใต้ เช่น อินเดีย จะนิยมปลูกในเดือนตุลาคมหรือธันวาคม แล้วจะไปเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมีนาคมหรือเมษายนของปีถัดไป ในทวีปยุโรปและอเมริกาจะปลูกมัสตาร์ดแบบหยอดหลุมเป็นแถว โดยใช้เมล็ดพันธุ์ในอัตราส่วน 5-8 กก./เฮกเตอร์ (ha) ในประเทศอินเดียและปากีสถาน ใช้วิธีหว่านเมล็ดแล้วไถกลบ ส่วนประเทศจีนและญี่ปุ่น เพาะเมล็ดก่อน จากนั้นจะย้ายไปปลูกในแปลงข้าวหลังจากเก็บเกี่ยวข้าวเสร็จแล้ว ในประเทศแคนาดาจะได้ผลผลิตเมล็ดมัสตาร์ดประมาณ 1,320 กก./ha ส่วนที่ปากีสถานได้ผลผลิตประมาณ 400-600 กก./ha อย่างไรก็ตาม การปลูกมัสตาร์ดในเขตชลประทานของทั้งสองประเทศจะได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 2,000-2,500 กก./ha (2)

ส่วนต่างๆ ของมัสตาร์ดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ในบันทึกของชาวกรีกและโรมันได้นำมัสตาร์ดไปใช้ทำยาก่อนสมัย Hippocrates ใบของมัสตาร์ดนำมาใช้เป็นผักรับประทานได้ ในส่วนของเมล็ดมัสตาร์ดก็นำมาบดใช้เป็นเครื่องเทศ สำหรับเมล็ดมัสตาร์ดเป็นส่วนที่มีน้ำมันอยู่สูงจึงสามารถสกัดเอาน้ำมันที่มีอยู่มาใช้รับประทานได้ แต่โดยมากมักใช้เป็นเชื้อเพลิง ทำสบู่ หรือใช้แทนยางในหัตถกรรมเครื่องหนังและไม้ นอกจากนี้ยังใช้หล่อเย็นแผ่นเหล็กและในงานเทคนิคอื่นๆ ส่วนเมล็ดมัสตาร์ดดำสามารถนำมาใช้ในการดองผักและทำสลัด และเมล็ดที่บดละเอียดใช้ผสมกับเกลือ และเครื่องเทศอื่นๆ ในการทำแซนวิชได้ ในทางการแพทย์จะใช้ผงมัสตาร์ดผสมกับแป้งชนิดอื่นเพื่อควบคุมฤทธิ์สับสน และผสมน้ำเพื่อทำให้เป็นยางเหนียว ใช้เป็น

ยาแก้พิษแสบคันได้ ส่วนกากนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้เมล็ดบางจีนจะปลูกไว้เพื่อใช้เป็นพืชคลุมดิน และทำปุ๋ยมากกว่าจะใช้เป็นพืชเศรษฐกิจ (1-2)

สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดและกากมัสตาร์ด (*Brassica juncea*) ตามรายงานของ Gohl (1), Zhou et al. (12) และ Ahmad et al. (13) (ดังตารางที่ 1.1) พบว่า ในส่วนของเมล็ดมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และ คาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 23.40-28.35, 32.42-46.70, 8.60, 4.23-5.10 และ 25.92-30.46% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนกากจะมีองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวเท่ากับ 37.84-47.80, 2.30-10.70, 3.50-18.20, 6.39-9.90 และ 39.40-45.07% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองแล้ว กากมัสตาร์ดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า 11-23% แต่มีไขมันสูงกว่ากากถั่วเหลือง 3-11 เท่า ขึ้นกับกรรมวิธีการสกัดน้ำมันและหรือการปะปนของเปลือกหุ้มเมล็ด สำหรับปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น พบว่า กรดอะมิโนชนิดที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ (methionine และ cysteine) ในกากมัสตาร์ดมีสูงกว่า (2.21 ต่อ 1.44%) ในขณะที่ปริมาณกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ มีต่ำกว่ากากถั่วเหลือง (2)

ตารางที่ 1.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดและกากมัสตาร์ดเทียบกับกากถั่วเหลือง (1,12,13)

องค์ประกอบ (น้ำหนักแห้ง)	วัตถุดิบ		
	เมล็ดมัสตาร์ด	กากมัสตาร์ด	กากถั่วเหลือง
ความชื้น	6.24-8.30	11.80	11.00
โปรตีน	23.40-28.35	37.84-47.8	49.40
ไขมัน	32.42-46.7	2.30-10.70	0.90
ไฟเบอร์	8.60	3.50-18.20	7.90
เถ้า	4.23-5.10	6.39-9.90	-
คาร์โบไฮเดรต	25.92-30.46	39.40-45.07	-
กรดอะมิโนจำเป็น			
Lysine	-	2.22	3.02
Methione	-	0.95	0.70
Cystine	-	1.26	0.74
Tryptophan	-	0.44	0.83
Threonine	-	1.72	1.93
Leucine	-	2.90	3.81
Isoleucine	-	1.39	2.20
Valine	-	1.55	2.32
Histidine	-	1.64	1.31
Phenylalanine+	-	3.85	4.58
Tyrosine	-	-	-
เกลือแร่ (ppm)			
Fe	95-120	141-181	-
Mn	40.4-43.0	61.4-66.6	-
Zn	33.9-38.4	51.3-59.5	-
Cu	7.72-8.41	11.95-12.79	-
วิตามิน (ppm)			
Riboflavin	5.44-5.81	9.02-9.51	-

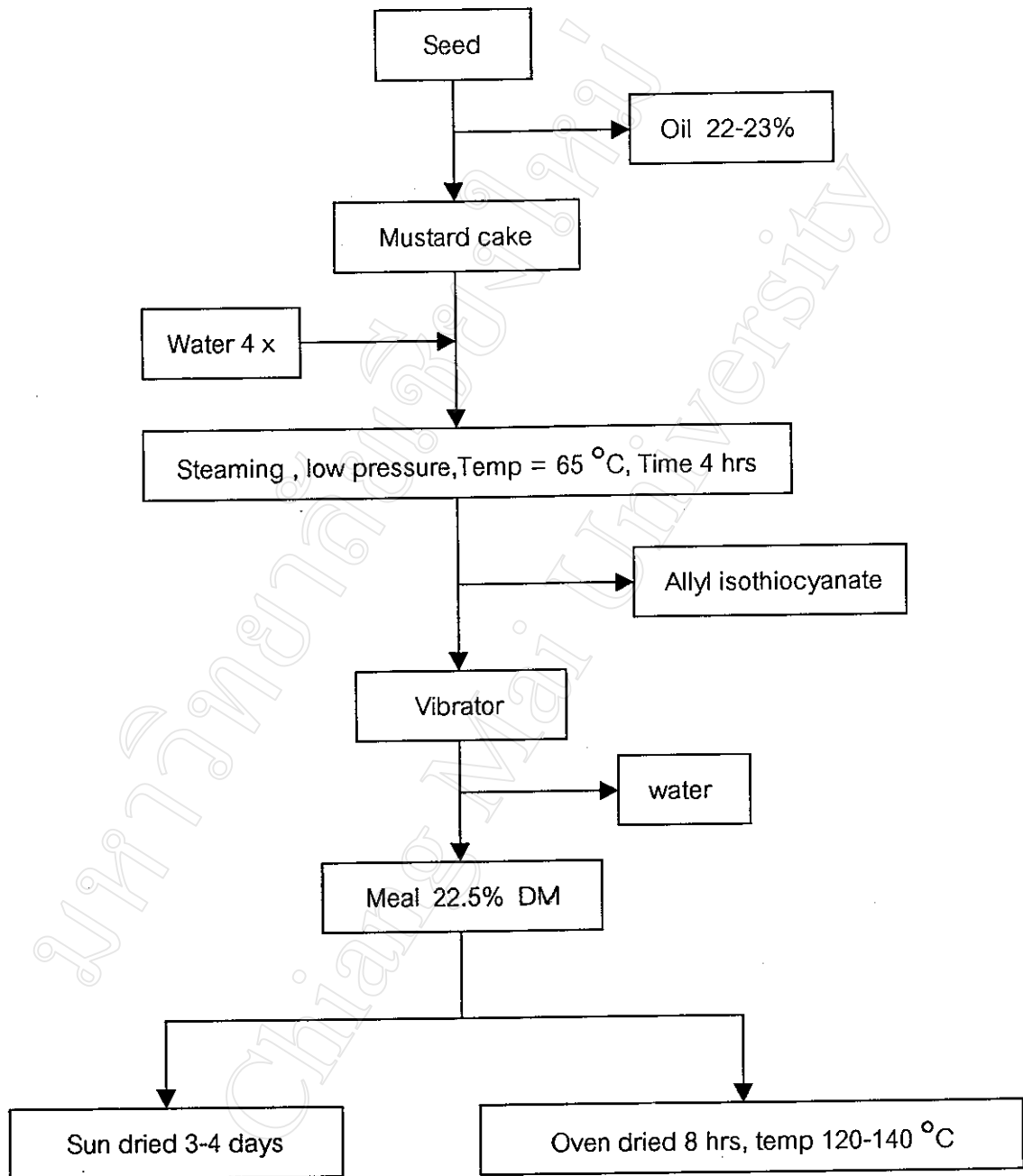
จากตารางที่ 1.1 จะเห็นว่าเมล็ดมัสตาร์ดเป็นพืชที่มีปริมาณน้ำมันและโปรตีนสูง โดยมีปริมาณน้ำมันอยู่ถึง 30-50 % และปริมาณโปรตีน 20-30% จึงเหมาะที่จะเป็นแหล่งของไขมันและโปรตีน ซึ่งโดยทั่วไป เมื่อสกัดน้ำมันจากเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น rapeseed แล้ว กากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันออกไปแล้วส่วนใหญ่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ทั้งที่ในส่วนของกากนี้มีปริมาณโปรตีนอยู่สูง อีกทั้งมีชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนอยู่ค่อนข้างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากเมล็ดพืชน้ำมันส่วนมากรวมทั้งมัสตาร์ดมีสารที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็น antinutritional factors เช่น กลูโคซิโนเลต (glucosinolate) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และกรดไฟติก (phytic acid) อยู่ด้วย (5,9) โดยกลูโคซิโนเลตเมื่อถูกไฮโดรไลสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลไปรบกวนการทำงานของต่อมไทรอยด์ ทำให้ลดการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลองได้ (5) ส่วนสารประกอบฟีนอลิกเมื่อถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบควิโนน ซึ่งสามารถจะจับกับหมู่อะมิโน หรือ ไฮดรอกซิลของโปรตีน ทำให้โปรตีนนั้นนำมาใช้ประโยชน์ไม่ได้ (13-18) กรดไฟติกเองก็จะจับกับพวก mono และ divalent metal ion เช่น Ca, Zn, Mg และ Fe ทำให้ร่างกายนำโลหะพวกนี้ไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ (13,19-20) ในเมล็ดมัสตาร์ดมีกรดไฟติกและสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในปริมาณ 2.56-3.58 และ 0.91-1.08% ตามลำดับ ในขณะที่กากมัสตาร์ดจะมีปริมาณ กลูโคซิโนเลต กรดไฟติก และสารประกอบฟีนอลิก 0.02, 3.79-5.44 และ 1.38-1.67% ตามลำดับ (13) อย่างไรก็ตาม หากกากมัสตาร์ดที่มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงนี้ถูกนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆของการแยกโปรตีนออกจากกากแล้ว ปริมาณของกลูโคซิโนเลต สารประกอบฟีนอลิก และกรดไฟติก น่าจะลดลงจนสามารถนำโปรตีนที่ได้มาใช้ประโยชน์ต่อไป

1.2 น้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดมัสตาร์ด

มัสตาร์ดน้ำตาล (*Brassica juncea*) จะมีสารประกอบไกลโคไซด์ที่มีชื่อว่า glucosinolate ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ myrosinase ที่มีอยู่ในเมล็ดมัสตาร์ดแล้ว จะได้ผลผลิตเป็นน้ำมันหอมระเหย ที่มีชื่อว่า allyl isothiocyanate ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นส่วนประกอบของกลิ่นในอุตสาหกรรมยาและอาหาร (1-2)

สำหรับกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากเมล็ดมัสตาร์ดของบริษัท ลานนาโปรดักส์ (Lanna Product Co.,Ltd) มีกรรมวิธีการผลิตโดยย่อดังรูปที่ 1.1 โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ

นำเมล็ดมัสตาร์ดมาผ่านตะแกรงร่อนเพื่อแยกเอาสิ่งปลอมปนออก จากนั้นนำไปบิบน้ำมันโดยใช้แรงอัด จะมีน้ำมันออกมาประมาณ 22-23% นากากที่ได้ไปผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:4 แล้วให้ความร้อนด้วยไอน้ำภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อสกัดน้ำมันหอมระเหย (isothiocyanate, nitrile และสารกลุ่ม indoles อื่นๆ) ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของ glucosinolates ทำให้กากที่เหลือมีปริมาณของสารพิษ glucosinolates ซึ่งเป็นสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ของไอโอดีน และสารที่ก่อให้เกิดคอพอก (goitrogen) ลดลง อย่างไรก็ตาม สารที่เกิดจากการสลายตัวของ glucosinolates ที่ไม่ระเหย เช่น hydroxynitriles ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้ดับไฟ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และ erucic acid ซึ่งเป็นสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ทางโภชนาการอีกชนิดหนึ่งที่สามารถถูกทำลายได้ด้วยการต้ม หรือผ่านไอน้ำร้อนยังมีเหลืออยู่บ้าง สำหรับกากมัสตาร์ดที่ผ่านจากเครื่องสั่น (vibrator) จะมีน้ำส่วนหนึ่งแยกออกมา กากจึงมีความชื้นลดลง แต่ก็ยังอยู่ในระดับที่สูงมาก (77.5%) กากนี้จะนำมาทำให้แห้งโดยการนำไปตากแดด ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน หรือนำไปอบในเครื่องอบที่ใช้แก๊สเป็นแหล่งของความร้อน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง กากจึงจะแห้ง



รูปที่ 1.2 แสดงกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย Allyl isothiocyanate จากเมล็ดมัสตาร์ด

1.3 โปรตีนในเมล็ดมัสตาร์ด

เรปซิดและมัสตาร์ดเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงถึง 20-30% ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีความพยายามที่จะสกัดและแยกโปรตีนที่มีอยู่ในเมล็ดพืชน้ำมันเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนของมนุษย์ การสกัดและแยกโปรตีนออกมาจากเมล็ดพืชน้ำมันนั้นมักนิยมสกัดโปรตีนออกมาด้วยสารละลายต่าง เช่น NaOH จากนั้นแยกโปรตีนที่สกัดได้โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายกรด เช่น HCl ดังเช่นการทดลองของ Bhatti et al. (4) ซึ่งได้สกัดโปรตีนจากเรปซิดและมัสตาร์ดด้วยสารละลาย NaOH ซึ่งมี pH 12 พบว่า การสกัดด้วยสารละลาย NaOH จะสามารถละลายไนโตรเจนออกมาจากมัสตาร์ดได้ 68.7% ของไนโตรเจนในมัสตาร์ด Gillberg et al. (5) ได้ศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเรปซิดต่อปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่ได้จากการสกัด พบว่า การสกัดด้วยสารละลาย HCl ในช่วง pH 1-4 ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายออกมาจะมีปริมาณลดลงเมื่อ pH ที่ใช้ในการสกัดเพิ่มขึ้น โดยลดลงจาก 75% เป็น 40% แต่เมื่อสกัดด้วยสารละลาย NaOH ในช่วง pH 9-12 จะได้ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายออกมาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จาก 70% ที่ pH 9 เป็น 90% ที่ pH 12 ซึ่งให้ค่าการละลายของไนโตรเจนออกมามากที่สุด การที่ค่าการละลายของไนโตรเจนที่ได้นี้ไม่มีแบบแผนที่แน่นอนเนื่องมาจากการที่เรปซิดมีโปรตีนที่ค่อนข้างซับซ้อนและมีค่า isoelectric point ตั้งแต่ 4-11 นอกจากนี้ Gillberg (5) ยังพบว่า กรดไฟติกละลายออกมาได้น้อยในช่วง pH 10-12 จึงได้สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย NaOH pH 11 แล้วตกตะกอนโดยการปรับ pH ให้มีค่า 4-7 พบว่า ตะกอนที่ได้มีปริมาณไนโตรเจนอยู่เพียง 40-50% ของไนโตรเจนที่สกัดได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม sodium phytate ลงไป 5% ของไนโตรเจนที่สกัดได้ สามารถเพิ่ม yield ของไนโตรเจนได้เป็น 70-80% ดังนั้นต่อมา Gillberg et al. (6) จึงได้ศึกษาผลของ polyacids ที่มีต่อการตกตะกอนของโปรตีน พบว่า polyacids เช่น hexametaphosphate, carboxymethylcellulose, polygalacturonic acid และ alginate ช่วยเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนภายหลังการตกตะกอนได้ถึง 80-90%

Xu et al. (11) ได้สกัดโปรตีนจาก Chinese rapeseed โดยใช้สารละลาย NaOH ที่ pH 10.5-12.5 พบว่า การละลายของไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นตาม pH ที่ใช้ในการสกัด และมีค่าคงที่ที่ pH 12 ซึ่งสามารถสกัดไนโตรเจนได้ประมาณ 70% เมื่อนำสารที่สกัดได้จาก pH 12 มาตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 3-9 ด้วยสารละลาย HCl พบว่า ในช่วง pH 5.5-8.0 จะได้โปรตีนออกมามากสุดที่ประมาณ 50% ของโปรตีนที่สกัดได้ ในขณะที่ Zhou et al. (12) ได้สกัดโปรตีนจาก Chinese rapeseed (*Brassica juncea*) ด้วยสารละลาย NaOH ที่ pH 13 พบว่าสามารถสกัดโปรตีนได้ 94% ของโปรตีนทั้งหมดและเมื่อนำมาตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 4 จะได้โปรตีนประมาณ 50% ของโปรตีนทั้งหมดเช่นกัน

นอกจากโปรตีนจากเรปซิดสามารถสกัดด้วยสารละลาย NaOH แล้ว พบว่า สารละลาย 2% sodium hexametaphosphate สามารถนำมาสกัดโปรตีนได้เช่นกัน (21) ซึ่งเมื่อตกตะกอนด้วยสารละลายกรดที่ pH 2.5 จะให้ปริมาณของไนโตรเจนประมาณ 60% ของไนโตรเจนทั้งหมด นอกจากนี้พบว่า การล้างตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลายแอลกอฮอล์หลายๆครั้ง หรือการเติม 2% sodium metabisulphite ลงในสารสกัดก่อนตกตะกอนโปรตีน จะช่วยให้ตะกอนโปรตีนที่ได้มีสีที่อ่อนลง

จิราพร (1) ได้สกัดและตกตะกอนโปรตีนจากกากมันสตาร์ด โดยศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัด ผลของ pH ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน รวมถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากกากมันสตาร์ด คือ การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH เป็น 3.8 ด้วยสารละลาย 7.2 M HCl พบว่า สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ 30% ของปริมาณโปรตีนในกากมันสตาร์ด

1.4 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายได้ในน้ำ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) (22)

สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน เท่าที่ศึกษาแล้วขณะนี้มากกว่า 1,000 ชนิด ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (22) การจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจะแตกต่างกันไป โดยในที่นี้สามารถจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชน้ำตามโครงสร้างพื้นฐานได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ hydroxylated derivatives ของ benzoic และ cinnamic acids, coumarins, flavonoids และ polyphenolic tannins และ lignin (18)

(1) Hydroxylated derivatives ของ benzoic และ cinnamic acids

ได้แก่สารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นพวก phenolic acids ได้แก่ benzoic acids ซึ่งมีโครงสร้างเป็น C6-C1 และ cinnamic acids ซึ่งมีโครงสร้างเป็น C6-C3 ดังแสดงในรูปที่ 1.2 โดย benzoic acids จะพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, gallic, syringic, *O*-hydroxy salicylic และ gentisic acids ส่วน cinnamic acids เช่น *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid และ sinapic acid จะพบมากในพวกพืชน้ำมัน ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปเอสเทอร์กับ quinic acid หรือน้ำตาล

(2) Coumarins

เป็นพวกที่มีโครงสร้างเป็น C6-C3 เหมือน cinnamic acid แต่ C3 จะเกิดเป็น oxygen heterocycle ดังแสดงในรูปที่ 1.2 coumarin จะพบอยู่ค่อนข้างน้อยในส่วนของเมล็ด และโดยมากจะพบในรูปของ glucoside

(3) Flavonoids

เป็นสารประกอบฟีนอลิคหลักที่พบในพืช โดยมีโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 ดังแสดงในรูปที่ 1.2 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามความแตกต่างของ C3 ได้เป็น flavones, flavonols, flavanols, anthocyanidins, chalcones และ aurones เป็นต้น

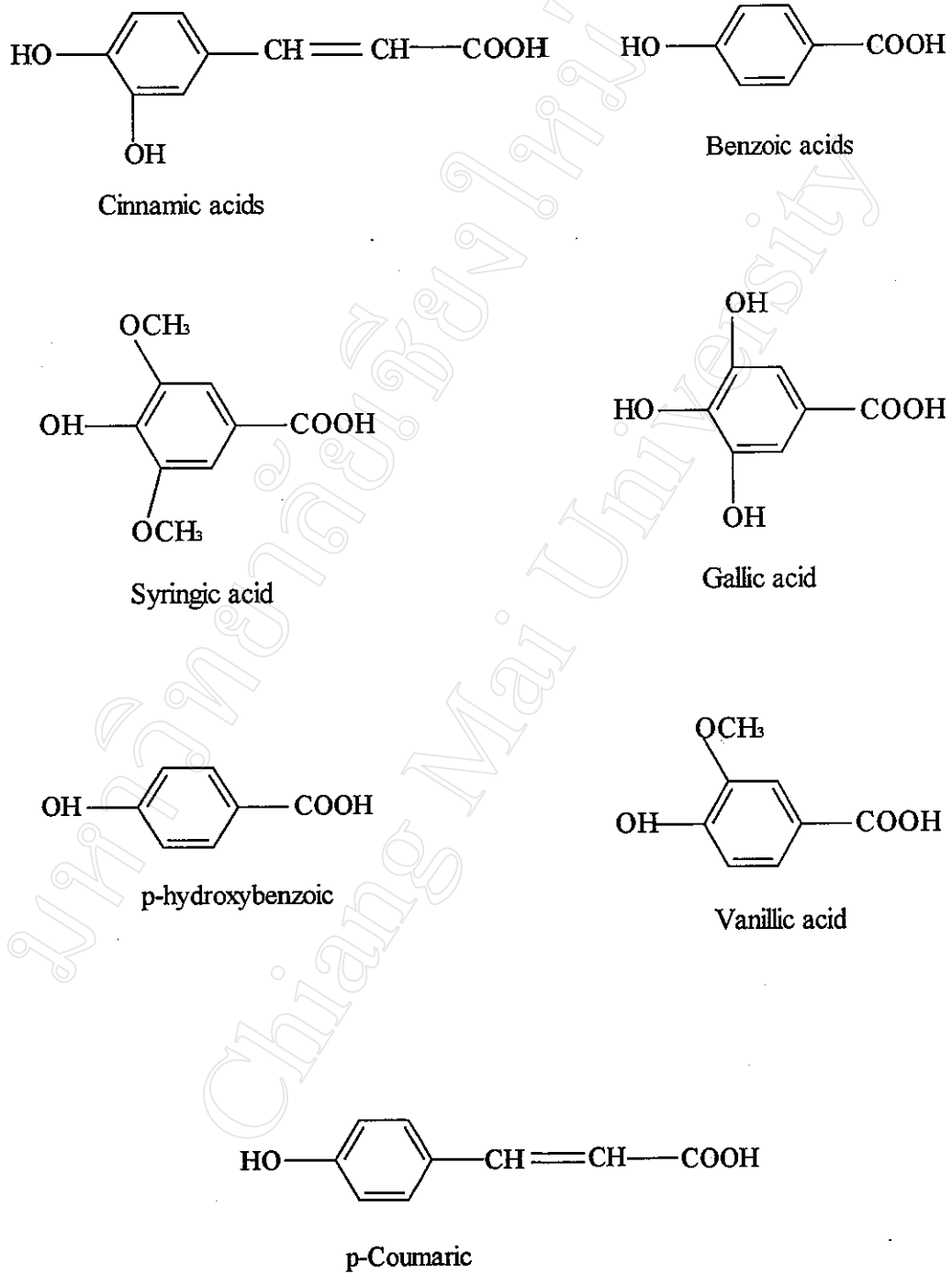
(4) Polyphenolic tannins และ lignin

Polymeric phenols สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากให้ความร้อนด้วยกรด หรือด่าง คือ

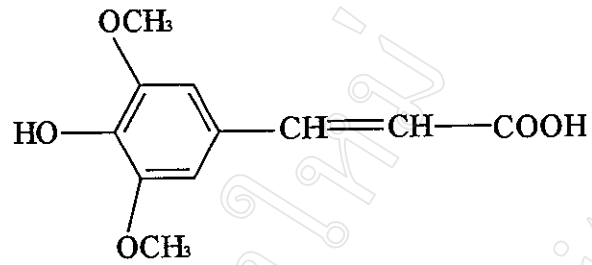
ก. Hydrolyzable tannins เมื่อถูกไฮโดรไลสด้วยกรดจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น phenolic acids กับ glucose

ข. Condensed tannins เมื่อถูกไฮโดรไลสด้วยกรดจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น flavanols กับ สารสีน้ำตาล

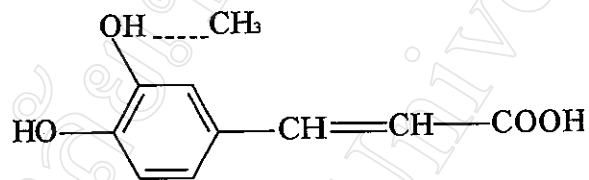
ค. Lignin เมื่อถูกไฮโดรไลสด้วยด่างจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ benzoic และ cinnamic acid



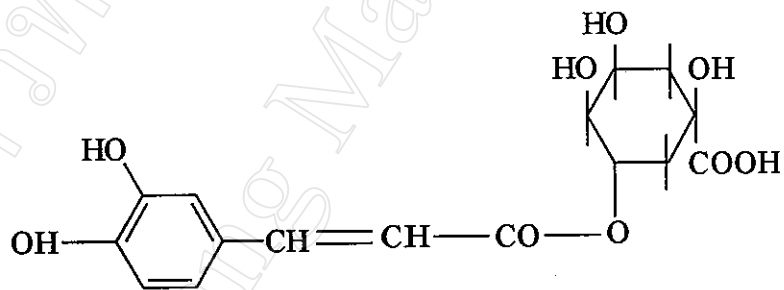
รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด



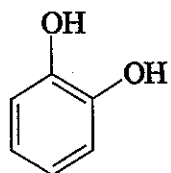
Sinapic acid



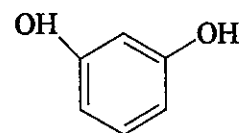
Caffeic.....ferulic



Chlorogenic acid

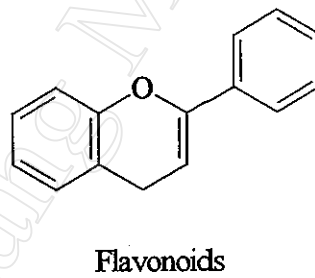
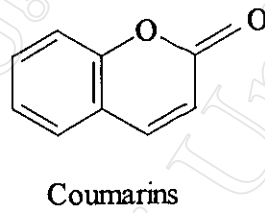
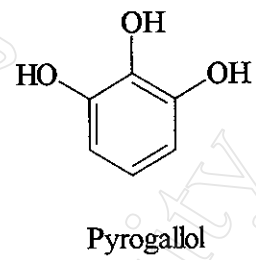
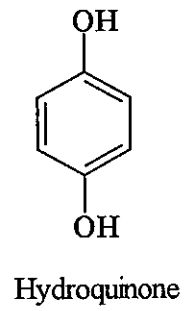


Catechol



Resorcinol

รูปที่ 1.2 (ต่อ) แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด



รูปที่ 1.2 (ต่อ) แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด

หน้าที่ของสารประกอบฟีนอลิกในพืชเท่าที่ทราบ มีตัวอย่างดังนี้ lignin ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์พืช anthocyanin เป็นสารให้สีในดอกไม้ flavonols มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของพืชจำพวกถั่ว มีส่วนช่วยในขบวนการสังเคราะห์แสงของพืชพวกผักขม (22) flavone, flavonols มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial, tonifying action และ antioxidant (23) salicylic acid ใน *Quercus falcata* เป็น allelopathic agent tannin เป็น feeding deterrents luteone ใน lupin เป็น antimicrobial agent orchinol ใน *Orchia militaris* เป็น phytoalexins (24)

การศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลิกของเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น rapeseed ในช่วงแรกได้สกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น methanol, acetone, diethyl ether และ ethyl acetate (14, 25-28) ซึ่งบางครั้งต้องใช้ระยะเวลานานเป็นวันต่อมาได้มีการศึกษาพบว่า การใช้ตัวทำละลายผสมของ methanol-acetone-water จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพียงชนิดเดียว (27) นอกจากนี้ การใช้ตัวทำละลายผสมของ diethyl ether กับ ethyl acetate ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดผสมข้างต้น จะให้ผลดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง และยังช่วยลดเวลาในการสกัดจากเดิมซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงให้สามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้โดยการเขย่าในกรวยแยกเป็นเวลา 5 นาที 5-6 ครั้ง (27)

วิธีการที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของสารประกอบฟีนอลิกนั้น มีตั้งแต่วิธีที่ง่ายแต่ตรวจสอบชนิดของสารประกอบฟีนอลิกได้ค่อนข้างน้อย ได้แก่ การใช้โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ซึ่งอาจทำได้โดยใช้การแยกเพียงทิศทางเดียวหรือมีการดัดแปลงใช้การแยกแบบ 2 ทิศทางก็ได้ (28) ถ้าต้องการแยกสารประกอบฟีนอลิกให้ได้มากขึ้นก็จะใช้โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography) (25-27) ซึ่งมักจะเป็น silica gel ที่เคลือบด้วยสารที่เรืองแสง ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ใช้ก็ได้หลายชนิด เช่น toluene-acetic acid-water, 2 หรือ 6% acetic acid, benzene-propionic acid-water, butanol-acetic acid-water และ benzene-methanol-acetic acid (25-28) จากนั้นจะตรวจสอบชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่แยกได้โดยการเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานไม่ว่าจะเป็นการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ค่า R_f และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายบางชนิด ซึ่งสารละลายที่ใช้เพื่อทำให้เกิดสีนี้ก็มียหลายชนิด เช่น diazotized sulfanilic acid, สารละลายผสมของ 10% sodium tungstate - 5% trichloroacetic acid - 0.5 M HCl -

5% sodium nitrite (25) 1% ของ FeCl_3 ใน $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, สารละลาย NaOH (26) สารละลายเอธานอลที่มี bromecresol green เป็นส่วนผสม (27) p-nitroaniline ซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลายผสมของ 0.5% p-nitroaniline ใน 2 M HCl – 5% sodium nitrite – 20% sodium acetate, Hoepfner ซึ่งประกอบด้วย 1% sodium nitrite ใน 10% acetic acid (28) นอกจากนี้ gas chromatography ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ยิมนำมาใช้ตรวจสอบชนิดและหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากเรซินและไม้สตาร์ด โดยเริ่มต้นด้วยการเตรียมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ trimethylsilyl acetamide ก่อน ด้วยการทำปฏิกิริยากับ N_2O bis(trimethylsilyl) acetamide จากนั้นแยกสารประกอบฟีนอลิกด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ Chromosorb W โดยใช้อุณหภูมิในการแยกเริ่มจาก 120-300 องศาเซลเซียส มีก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพา ด้วยอัตราการไหล 40 มล./นาที่ โดยมี flame ionization เป็น detector แล้วเปรียบเทียบค่า retention time ของสารประกอบฟีนอลิกที่แยกออกมากับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน (14, 26, 27) ส่วนวิธีการสุดท้ายที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้ด้วยก็คือ การใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เช่น Schieber et al. (29) ได้ตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกจาก แอปเปิ้ล และแพร์ โดยใช้คอลัมน์ Aqua 5 μm C18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น gradient ของ 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) acetic acid ในน้ำ (eluent A) และ 0.5 % acetic acid ในน้ำและ acetonitrile (50:50 ปริมาตร/ปริมาตร, eluent B) โดยมี diode array เป็น detector ในขณะที่ Revilla et al. (30) ได้ตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกจากองุ่นและไวน์ โดยใช้คอลัมน์ Waters Nova Pak C18 steel cartridge ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น linear gradient ของ น้ำ-acetonitrile (50:50) ซึ่งปรับ pH เป็น 1.8 ด้วย perchloric acid (ตัวทำละลาย B) ใน น้ำ-acetonitrile (95:5) ซึ่งปรับ pH เป็น 1.8 ด้วย perchloric acid (ตัวทำละลาย A) โดยมี Water 996 photodiode array เป็น detector ในการทดลองครั้งนี้จะเลือกใช้การตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกด้วยโครมาโทกราฟีแบบกระดาษและแบบผิวบาง และหาปริมาณด้วยสารละลาย Folin-denis

1.5 เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

1.5.1 สมบัติทั่วไปของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

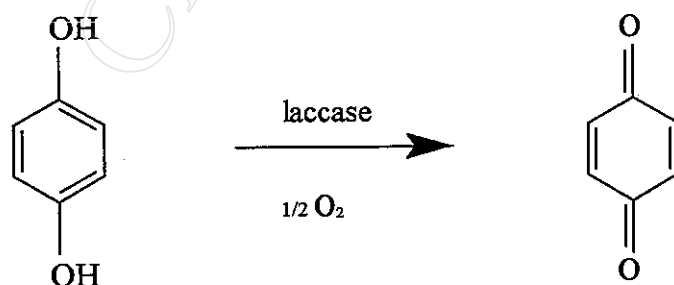
เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม oxidoreductase มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้ ออกซิเจนร่วมด้วย และจะมี Cu เป็นองค์ประกอบอยู่ใน active site ของเอนไซม์ (31-34)

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยในพืช จะพบได้อยู่ทั่วไป แต่ในสัตว์จะพบเฉพาะในส่วนของ ผิวหนัง ผม และตา เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ใน ประเภทเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ซึ่งพบได้ในส่วนของ chloroplast, mitochondria, microsomes, peroxisomes และ cellular plasma โดยอาจอยู่ในรูปที่จับกับ เมมเบรนต่างๆ หรืออยู่ในรูปที่ละลายได้ ในพืชที่อายุน้อยจะพบเอนไซม์อยู่ในปริมาณน้อยเนื่องจากเอนไซม์จะอยู่ในรูปที่จับกับเมมเบรนอย่างแน่นหนา แต่จะพบเอนไซม์ปริมาณมากสุดในช่วง ก่อนที่พืชจะโตเต็มที่ จากนั้นจะลดลงในช่วงที่พืชสุกงอม (31-34)

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถจำแนกได้ 2 ประเภท คือ laccase หรือ *p*-diphenol : oxygen oxidoreductase (E.C. 1.10.3.2) และ catechol oxidase หรือ *o*-diphenol : oxygen oxidoreductase (E.C. 1.10.3.1) (31-34)

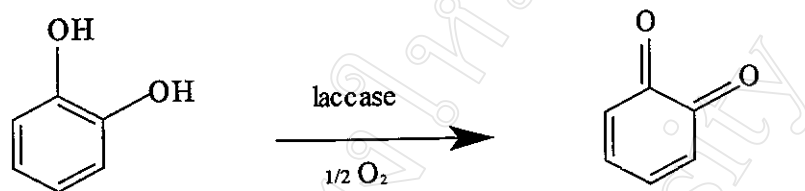
(1) Laccase

สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monophenols, *o*-diphenols, *p*-diphenols, triphenols รวมทั้ง ascorbic acid แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ quinone ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ laccase

หรือ



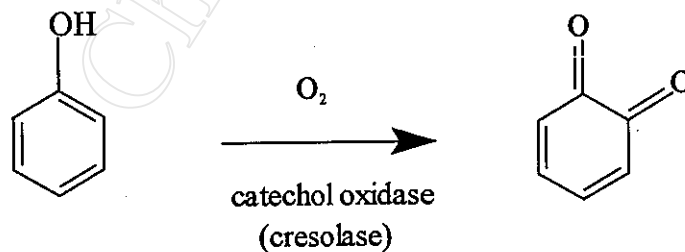
รูปที่ 1.3 (ต่อ) แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ laccase

laccase เป็นเอนไซม์ที่พบมากในเชื้อรา และพบบ้างในพวก Gymnospermae และ Angiospermae ในพืชส่วนมากจะพบเอนไซม์ในส่วน of secretory tissue และเท่าที่มีการศึกษา มาจะพบเอนไซม์อยู่ในรูปที่ละลายได้

(2) Catechol oxidase

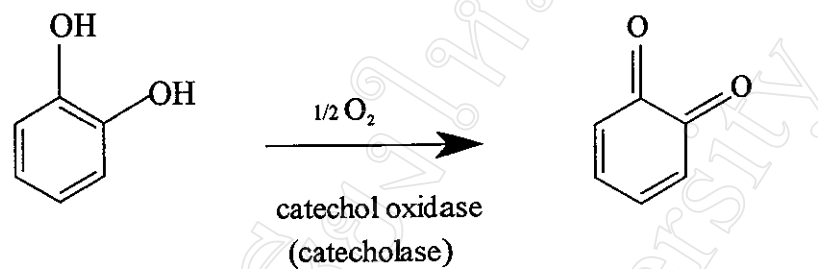
สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 2 ประเภทตามชนิดของสารตั้งต้นที่แตกต่างกันดังนี้

ก. Cresolase activity เป็นการเติมออกซิเจนในตำแหน่ง *ortho* ของหมู่ไฮดรอกซิลที่มี อยู่เดิมของ monophenol แล้วมักตามด้วยออกซิเดชันของ diphenol ที่เกิดให้เป็นสารประกอบ quinone ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ cresolase

ข. Catecholase activity เป็นการเกิดออกซิเดชันของ *o*-diphenol แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ quinone ดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ catecholase

catechol oxidase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในแบคทีเรีย สาหร่าย เชื้อรา Bryophytes, Pteridophytes, Gymnospermae และ Angiospermae ซึ่งในพืชจะพบเอนไซม์ได้เกือบจะทุกส่วนของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ และผล โดยเอนไซม์ที่พบนี้อาจจะอยู่ในรูปที่ละลายได้หรือจับอยู่กับส่วนต่างๆ เช่น chloroplast, mitochondria หรือ microbody

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง laccase และ catechol oxidase ได้จากความสามารถในการออกซิไดส์สับสเตรท โดย laccase สามารถที่จะออกซิไดส์ *p*-diphenol ได้ ในขณะที่ catechol oxidase ไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสองยังมีคุณสมบัติบางประการที่ต่างกัน (33) ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของ laccase และ catechol oxidase (33)

คุณสมบัติ	ชนิดของเอนไซม์	
	Catechol oxidase	Laccase
มวลโมเลกุล	35,000-120,000	60,000-350,000
จำนวน subunit	4	2-4
จำนวน copper/สาย	1 หรือ 2	4
โพลีเปปไทด์		
ความจำเพาะต่อสับสเตรท	mono, diphenol ที่ไม่ใช่ para- และ ascorbic acid	mono (fungi), o หรือ p-diphenol และ ascorbic acid
โครงสร้างของเอนไซม์	polypeptide	glycopolypeptide
pH ที่เหมาะสม	มีความหลากหลาย มักไม่ให้ฟีดที่แหลม	มีความหลากหลาย มักให้ฟีดที่แหลม
ตัวยับยั้ง	ถูกยับยั้งด้วย carbon monoxide และ phenyl hydrazine	ไม่ถูกยับยั้งด้วย carbon monoxide และ phenyl hydrazine

หน้าที่ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในพืชนั้นเท่าที่ทราบมีอยู่หลายประการ เช่น มีส่วนในการสร้าง di-phenol และ metabolite บางชนิด (31, 36) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนถ่ายอิเล็กตรอน ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (31) เกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์แสงของพืช (31, 36) เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างลิกนิน (37) มีบทบาทในขบวนการสร้างราก ทำหน้าที่สร้าง melanin ซึ่งเป็นตัวช่วยเพิ่มความต้านทานของพืชต่อผู้บุกรุก (34) การทำหน้าที่เป็น defensive enzyme เพื่อป้องกันพืชจากการถูกบุกรุกโดยจุลินทรีย์ หรือแมลงต่างๆ (31,34-38) โดยพบว่าเมื่อเกิดบาดแผลจากการถูกบุกรุก จะทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสซึ่งอยู่ในส่วนของ chloroplast จะออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในส่วนของ vacuole ในพืช ได้เป็นสารประกอบควิโนน ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนต่างๆ แล้วทำให้โปรตีนเหล่านั้นถูกนำไปใช้โดยพวกผู้บุกรุกไม่ได้ จึงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของผู้บุกรุกได้

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก เนื่องจากการที่เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก แล้วให้ผลิตภัณฑ์ คือ quinone ซึ่งเป็นสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยามาก สามารถเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็นสารประกอบที่ให้สีน้ำตาล แดง หรือดำ ทำให้สีของวัตถุดิบเปลี่ยนไปซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้ quinone ที่เกิดขึ้นยังสามารถจับกับกรดอะมิโนของโปรตีน ทำให้น้ำโปรตีนนั้นมาใช้ประโยชน์ไม่ได้เนื่องจากจะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของระบบย่อยอาหาร (31-34, 39-42) อย่างไรก็ตามเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสก็ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่นกัน เช่น นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพวงกกาแพ ฆา และโกโก้ เพื่อให้ได้สีและกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (36, 38) การใช้เอนไซม์ในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิกจากแหล่งน้ำเสีย ต่างๆ (43, 44) โดยเมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในแหล่งน้ำนั้นแล้ว จะเกิดเป็นสารประกอบควิโนนซึ่งจะทำปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันต่อไปได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น จึงสามารถแยกออกจากแหล่งน้ำได้ด้วยวิธีการ flocculation การใช้เอนไซม์เป็น biosensor เพื่อตรวจสอบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากแหล่งน้ำทิ้งของโรงงาน อุตสาหกรรม (45) ซึ่งในวิธีการนี้จะตรึงเอนไซม์ไว้ก่อน แล้วปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิกที่ต้องการตรวจสอบ ได้เป็นสารประกอบควิโนน ซึ่งเมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบบางชนิดจะได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ดังนั้น จะสามารถตรวจสอบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

เนื่องจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดสีน้ำตาลในผัก ผลไม้ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นจึงได้มีผู้พยายามหาสารประกอบที่จะสามารถทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งก็พบว่า มีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น antioxidant ช่วยออกซิไดส์สารประกอบควิโนนกลับไปเป็นสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ กรด จะช่วยปรับ pH ของสารละลายให้ต่ำลง ซึ่งจะมีผลไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้เช่นกัน (34, 46) กรดซิตริก (citric acid) มีผลในการช่วยปรับ pH ให้ต่ำซึ่งไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่การใช้กรดซิตริกจะมีผลต่อกลิ่นของผักและผลไม้ด้วย (46) ส่วน aromatic carboxylic acid เช่น benzoic และอนุพันธ์ของ cinnamic acid จะจับกับเอนไซม์ทำให้เกิดขวางการจับของเอนไซม์กับสับสเตรท (34, 47, 48) โซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) และสารประกอบซัลไฟต์ชนิดอื่น จะมีผลในการยับยั้งเอนไซม์ได้โดยการจับกับสารประกอบควิโนน ได้เป็นสารประกอบที่ไวต่อปฏิกิริยาน้อยลง นอกจากนี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็น chelating agent

โดยจะเกิดเป็นสารประกอบกับ Cu ที่อยู่ในเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากขาด Cu (31, 34) cysteine ก็สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลโดยเอนไซม์ได้โดยการจับตัวกับสารประกอบควิโนน เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี (31, 34, 49) เกลือ NaCl มีผลในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ โดยช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อยลงซึ่งไม่ถาวร หากจะยับยั้งได้ถาวรต้องใช้เกลือในปริมาณมาก ซึ่งนำมาใช้รับประทานไม่ได้ (31, 34) สารจากธรรมชาติบางชนิดก็มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ เช่น น้ำผึ้ง (50) นอกจากนี้พบว่า สารประกอบที่ได้จากการเกิด caramelization ของน้ำตาล (51) และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) ระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนบางชนิด เช่น arginine, histidine, cysteine และ lysine (50) ก็สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลโดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ เนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อย่างไรก็ตาม สารประกอบบางชนิดก็สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้เช่นกัน เช่น CaCl_2 และ MnSO_4 (40)

1.5.2 การศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

โดยทั่วไป วิธีการทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสบริสุทธิ์ จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์และความบริสุทธิ์ที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม วิธีการที่มักจะนิยมนำมาใช้ คือ เริ่มต้นด้วยการตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการด้วย protamine sulphate หรือ calcium sulphate หรืออาจแยกด้วยการเติม ammonium sulphate ตามด้วย dialysis หรือ นำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ขึ้นตอนต่อไปในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นมักจะเป็น adsorption, ion exchange, gel filtration และ hydrophobic chromatography หรืออาจใช้หลายวิธีดังกล่าวข้างต้นร่วมกัน นอกจากนี้ affinity chromatography และ isoelectric focusing ก็สามารถนำมาใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นได้ (34)

การศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ทำในพืชหลายชนิด เช่น Raymond et al. (52) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดทานตะวัน (*Helianthus annuus*) ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ SP-Sephadex G-50, DEAE Cellulose, Sephadex G-100 และ Concanavalin A Sepharose พบว่าได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 149 เท่า พร้อมกับผลผลิตเอนไซม์ 5% โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้นนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 7.9 เมื่อใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท ส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ caffeic acid, pyrogallol, chlorogenic acid และ gallic acid ตาม

ลำดับ โดยจะไม่พบ cresolase activity นอกจากนี้ จะพบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียวจากการแยกเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้นนี้ด้วย SDS-PAGE ซึ่งจะมีมวลโมเลกุลประมาณ 42,000 ดาลตัน

Zhou et al. (53) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากแอปเปิ้ลให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate 30-80% อิมัตว จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ Phenyl Sepharose CL-4B จะได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น 161 เท่า โดยมีผลผลิตคิดเป็น 18% สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4.6 เมื่อใช้ 4-methyl catechol เป็นสับสเตรท

Fujuta et al. (54) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์จากกะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* L.) โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate 40-70% อิมัตว แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE Cellulose, CM-Sephadex C-50, Butyl toyopearl 650 M และ Toyopearl HW 55 F พบว่าได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 410 เท่า โดยมีผลผลิตเอนไซม์ 92 % อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 40 องศาเซลเซียส pH 7.6 เมื่อใช้ phloroglucinol เป็นสับสเตรท และจะพบว่า เอนไซม์นี้ไม่สามารถออกซิไดส์ o-diphenol หรือ polyphenol ได้ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE จะพบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียว ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 40,000 ดาลตัน

Partington et al. (41) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากมันฝรั่งให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephacryl HR-200 และ Octyl sepharose พบว่าจะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 110.9 เท่า โดยมีผลผลิตคิดเป็น 24.9% เมื่อตรวจสอบเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE จะพบโปรตีน 2 แถบ ที่มีมวลโมเลกุล 60,000 และ 69,000

Ming et al. (55) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจาก ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate 50-80% อิมัตว แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 21 เท่า โดยมีผลผลิต 5.5% pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์คือ 7 โดยใช้ 4-methylcatechol เป็นสับสเตรท นอกจากนี้จะพบว่าเอนไซม์จะไม่สามารถออกซิไดส์ monophenol ได้

Ming Jiang (40) ได้ทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากลำไย (*Dimocarpus longan* Lour) ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate 50-80% อิมัตว จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G 200 และ Phenyl Sepharose จะได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น 46 เท่า โดยมีผลผลิตคิดเป็น 3.7% สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 6.5 เมื่อใช้ 4-methyl catechol เป็นสับสเตรท ส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการ

ทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ pyrogallol, 4-methyl catechol และ catechol แต่จะไม่มี laccase และ cresolase activity

Ki-Ho (35) ได้ศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากกล้วยไม้ (*Arachnis hooderana*) โดยการสกัดด้วย Triton X-114 แล้วนำมาผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ DE-52, Sephadex G-150 จากนั้นแยกด้วย chromatofocusing ด้วยคอลัมน์ PBE 94 พบว่า จะได้เอนไซม์ 4 isoform ซึ่งมีมวลโมเลกุล 68,000 และ 48,000 โดยมีความบริสุทธิ์ขึ้น 122-250 เท่า และมีผลผลิตคิดเป็น 1-8% pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 7 สับสเตรทที่เหมาะสมในการทำงาน ได้แก่ 4-methyl catechol และ catechol โดยที่เอนไซม์ไม่สามารถออกซิไดส์ monophenol ได้

1.6 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเรื่อง การแยกโปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากมัสตาร์ด มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พีเอช ระยะเวลา อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการสกัดและแยกโปรตีนออกจากกากมัสตาร์ดที่สกัดน้ำมันหอมระเหยอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนต (allyl isothiocyanate, AIT) ออกแล้ว เพื่อให้สามารถแยกโปรตีนออกมาจากกากมัสตาร์ดได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากในมัสตาร์ดจะมีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสามารถจับกับโปรตีนอยู่ด้วย ทำให้ขัดขวางการใช้ประโยชน์ของโปรตีน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในกากและเมล็ดมัสตาร์ดทั้งในแง่ของชนิดและปริมาณ รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในส่วนของโปรตีนที่แยกได้ด้วย เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนจากมัสตาร์ดไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาถึงการแยกและศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมัสตาร์ดควบคู่กันไปด้วย เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จะมีผลต่อการเปลี่ยนสีของทั้งกากและโปรตีนจากมัสตาร์ด ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีที่ไม่ต้องการ