

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Acetic acid	Merck
Acetone	Merck
Acrylamine	Pharmacia Biotech
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Fluka
Benzene	Merck
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	BDH
n-Butanol	BDH
Caffeic acid	Fluka
Calcium chloride	Carloerba
Carbonic anhydrase	Pharmacia
Chlorogenic acid	Fluka
Citric acid	BDH
CM Sephadex	Pharmacia
Coomassie brilliant blue R 250	Sigma
Con A Sepharose	Pharmacia
Copper sulphate	Fluka
Coumaric acid	Sigma
p-Cresol	BDH
Cysteine	BDH
DEAE Sepharose	Pharmacia

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Diethyl ether	Merck
3,4-Dihydroxyphenylalanine	Sigma
Disodium hydrogenphosphate	Fluka
Disodium valibdate	Merck
Ethanol	Carloerba
Ethyl acetate	J.T.Baker
Ferulic acid	Fluka
Folin-ciocalteau ' phenol reagent	Merck
Gallic acid	Merck
Glucose	Merck
Glycine	Fluka
Hexane	J.T.Baker
Hydrochloric acid	Merck
Hydroquinone	Fluka
Lactalbumin	Pharmacia
Manganese chloride	Fluka
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
N,N' - Methylene bis acrylamine	BDH
p-Nitroaniline	Fluka
Ovalbumin	Pharmacia
Phosphomolybdic acid	Fluka
Ortho Phosphoric acid	Prolabo
Potassium bisulfite	BDH
Potassium dihydrogen phosphate	Fluka
Potassium hydrogen phthalate	BDH

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Potassium metabisulphite	BDH
Potassium sulphate	RDH
Protocatechuic acid	Sigma
Pyrocatechol	BDH
Pyrogallol	Merck
Ribonuclease b	Pharmacia
Silica gel	Merck
Sinapic acid	Fluka
Sodium acetate	Merck
Sodium carbonate	Carloerba
Sodium chloride	Carloerba
Sodium dodecylsulphate	Fluka
Sodium hexametaphosphate	Carloerba
Sodium hydroxide	Carloerba
Sodium nitrite	Fluka
Sodium potassium tartate	Fluka
Sulfuric acid	Carloerba
Syringic acid	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	BDH
Tris hydroxymethylaminomethane	Merck
Trypsin inhibitor	Pharmacia
Tyrosine	BDH

2.2 เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	บริษัทที่ผลิต
Analytical balance	Sartorius
Centrifuge	Hettich EBA 12 R
Column	Pharmacia
Electrophoresis	Hoefer mini VE
Fraction collector	Pharmacia FRAC-100
Heating mantle	Whatman
Hot plate stirrer	PMC 502 Series
Micropipet	Biohit
Muffle furnace	Carbolite
Oven	Cenco
Peristaltic pump	Pharmacia
pH meter	Radiometer Copenhagen
Power supply	Hoefer
Soxhlet apparatus	Quickfit
Spectronic 21	Mioton Roy Company
Ultrafiltration apparatus	Amicon
UV light	DESAGA UVIS
UV spectrophotometer	HITACHI U 2000
Vacuum evaporator	Buchi 461
Water bath	Meyer

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

นำกากมัสตาร์ดมาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 100 กรัม) แล้วเทใส่ใน thimble จากนั้นนำไปสกัดไขมันโดยใช้ชุด soxhlet extractor โดยใช้ hexane ปริมาตร 2 ลิตร เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดโดยให้ความร้อนจาก heating mantle จนกระทั่ง hexane เดือด เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดให้ความร้อน นำ hexane ที่มีไขมันอยู่ด้วยมาระเหยด้วยเครื่อง vacuum evaporator จนกระทั่ง hexane ระเหยออกไปหมด จากนั้นระเหย hexane ออกอีกครั้งด้วยเครื่อง vacuum ที่ใช้น้ำแข็งแห้งเป็นตัวจับ hexane ซึ่งหาน้ำหนักของไขมันที่ได้

เปอร์เซ็นต์ของไขมัน = $(\text{น้ำหนักของไขมันที่ได้} \times 100) / \text{น้ำหนักของกากมัสตาร์ดเริ่มต้น}$

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl โดยนำกากมัสตาร์ดมาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 0.50 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มล. ใส่ boiling chip ลงไป 2-3 เม็ด เติม copper sulphate และ potassium sulphate ลงไปอย่างละ 0.5 กรัม จากนั้นค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 20 มล. reflux ส่วนผสมทั้งหมดนี้ในตู้ควั่นจนกระทั่งได้สารละลายใส ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่องยให้สารละลายใสที่ได้เย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 100 มล. ถ่ายสารละลายที่ได้นี้ลงในขวดก้นกลม 2 หัว ขนาด 500 มล. โดยล้างสารละลายที่ติดกันขวดก้นกลมเดิมด้วยน้ำกลั่นและเติม boiling chip ลงไป 2-3 เม็ด

นำขวดก้นกลมที่บรรจุสารละลายที่ได้นี้ไปวางใน heating mantle พร้อมต่อเข้ากับเครื่องกลั่น โดยให้ปลายของเครื่องกลั่นจุ่มอยู่ในสารละลายที่เกินพอของ 0.1 M HCl ปริมาตร 50 มล. ค่อยๆ เติมสารละลาย 50% NaOH ลงไปทางหัวเล็กของขวดก้นกลมปริมาตร 75 มล. แล้วปิดฝาจากทันที กลั่นจนกระทั่งแอมโมเนียออกมาหมดซึ่งทดสอบโดยการนำกระดาษลิตมัสสีแดงที่ขึ้นมาถึงที่ปลายเครื่องกลั่น ถ้ากระดาษไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าแอมโมเนียออกมาหมดแล้ว

นำสารละลาย 0.1 M HCl ที่ได้มาไทเทรตกับสารละลาย 0.5 M NaOH โดยใช้ฟีนอล์ฟธาลีน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้

ไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH ด้วยสารละลายมาตรฐาน KHP (Potassium Hydrogen Phthalate) 0.1055 M จากนั้นไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย HCl ด้วยสารละลาย NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนนี้

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนจากสูตร

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = [(A-B) \times 1.4] / W$$

โดย A = ปริมาตรของสารละลาย HCl ที่เกินพอ $\times$ ความเข้มข้นของสารละลาย HCl

B = ปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ไทเทรตกับสารละลาย HCl ที่เกินพอ $\times$ ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

$$\% \text{ โปรตีน} = 6.25 \times \% \text{ ไนโตรเจน}$$

2.4 การสกัดและตกตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ด

2.4.1 การเตรียมกากมัสตาร์ดที่ปราศจากไขมัน

ชั่งกากมัสตาร์ดประมาณ 100 กรัม บดให้ละเอียดด้วย mortar แล้วเทใส่ใน thimble จากนั้นนำไปสกัดไขมันโดยใช้ชุด soxhlet extractor โดยใช้ hexane ปริมาตร 2 ลิตร เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดโดยให้ความร้อนจาก heating mantle จนกระทั่ง hexane เดือด เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดให้ความร้อนแล้วนำกากมัสตาร์ดออกจาก thimble ปล่อยให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียดอีกครั้งหนึ่ง

2.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

2.4.2.1 การหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลาย 2% Na_2CO_3 ในการสกัด

ชั่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 50.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 6 ใบ เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มล. ลงในขวดแต่ละใบ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้มา

เติมสารละลาย 7.2 M HCl ที่ละน้อยจนกระทั่งวัด pH ได้ 3.8 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งสนิท ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.2.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

ซึ่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 50.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 7 ใบ เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ลงในแต่ละขวดแต่ละใบ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้แตกต่างกันที่ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลาย 7.2 M HCl ที่ละน้อยจนกระทั่งวัด pH ได้ 3.8 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งสนิท ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.2.3 การหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ซึ่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 50.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 6 ใบ เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ลงในแต่ละขวดแต่ละใบ นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาแตกต่างกันที่ 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลาย 7.2 M HCl ที่ละน้อยจนกระทั่งวัด pH ได้ 3.8 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งสนิท ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.3 การหา pH ที่เหมาะสมของสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ด

ซึ่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 25.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 13 ใบ เติมสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ ซึ่งปรับ pH เป็น 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ (โดย pH 1-5 ปรับด้วยสารละลาย 7.2 M HCl ในขณะที่ pH 6-12 ปรับด้วยสารละลาย 6 M NaOH) ลงไปในขวดแต่ละใบ 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking

Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้ซึ่งสกัดด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 1-7 มาค่อยๆเติมสารละลาย 6 M NaOH จนกระทั่งวัด pH ได้ 8.3 ส่วนสารละลายที่กรองได้ซึ่งสกัดด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 8-12 ให้ค่อยๆเติมสารละลาย 7.2 M HCl จนกระทั่งวัด pH ได้ 3.8 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งสนิท ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆

pH 1

2.4.4.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

ซึ่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 25.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 7 ใบ เติมสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ ซึ่งปรับ pH เป็น 1 ด้วยสารละลาย 7.2 M HCl ลงไปในขวดแต่ละใบ 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้แตกต่างกันที่ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลาย 6 M NaOH ที่ละน้อยจนกระทั่งวัด pH ได้ 8.3 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้ง ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.4.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

ซึ่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 25.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร จำนวน 6 ใบ เติมสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ ซึ่งปรับ pH เป็น 1 ด้วยสารละลาย 7.2 M HCl ลงไปในขวดแต่ละใบ 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาแตกต่างกันที่ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบางหลายชั้นเพื่อเอากากมัสตาร์ดทิ้งไป นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลาย 6 M NaOH ที่ละน้อยจนกระทั่งวัด pH ได้ 8.3 กรองตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยกระดาษ Whatman No 1 แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 95% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้ง ซึ่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่ได้

2.4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่ได้จากกากมัสตาร์ด

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ด 50 กรัมด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ปริมาตร 500 มล. ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 ปริมาตร 500 มล. ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.4.5.1 การหาปริมาณไขมัน (56)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 1.00 กรัม แล้วห่อด้วยกระดาษกรอง นำไปใส่ใน thimble จากนั้นใส่ thimble ลงไปในชุด soxhlet extractor ใส่ hexane ประมาณ 150 มล. ลงในขวดก้นแบนขนาด 250 มล. แล้วนำไปวางบน heating mantle จากนั้นนำชุด soxhlet extractor มาต่อกับขวดก้นแบน พร้อมกับต่อ condenser เข้ากับชุด soxhlet extractor เริ่มให้ความร้อนจนกระทั่ง hexane เดือด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดให้ความร้อน นำเอา hexane ที่มีไขมันอยู่ด้วยมาระเหยเอา hexane ออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator จนกระทั่ง hexane ระเหยออกไปหมด จากนั้นระเหย hexane ออกอีกครั้งด้วยเครื่อง vacuum ที่ใช้น้ำแข็งแห้งเป็นตัวจับ hexane ซึ่งหาน้ำหนักของไขมันที่ได้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของไขมัน} = (\text{น้ำหนักของไขมันที่ได้} \times 100) / \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีน}$$

2.4.5.2 การหาปริมาณความชื้น (56)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 1.00 กรัม ใส่ในถ้วย crucible พร้อมฝาที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ซึ่งน้ำหนักที่เหลือของตะกอนโปรตีนที่อยู่ในถ้วย crucible พร้อมฝา แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = (\text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่หายไป} \times 100) / \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีน}$$

$$\text{น้ำหนักที่หายไป} = \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีนก่อนอบ} - \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีนหลังอบ}$$

2.4.5.3 การหาปริมาณเถ้า (56)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 1.00 กรัม ใส่ในถ้วย crucible พร้อมฝาที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปเผาด้วยตะเกียงเบนเซนจนกระทั่งไม่มีควันดำ จากนั้นนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ซึ่งน้ำหนักของเถ้าซึ่งอยู่ในถ้วย crucible พร้อมฝาที่ได้ แล้วคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\% \text{ เถ้า} = (\text{น้ำหนักเถ้าที่ได้} \times 100) / \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีน}$$

2.4.5.4 การหาปริมาณไฟเบอร์ (56)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 1.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. เติมสารละลาย 0.1275 M H_2SO_4 ปริมาตร 200 มล. นำไปวางบน hot plate แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารผสมที่ได้มากรองด้วยระบบ suction ผ่านกรวยกรองที่มีกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ล้างตะกอนที่ติดบนกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งไม่มีกรดเหลืออยู่ ซึ่งตรวจสอบได้โดยการใช้กระดาษลิตมัส เทตะกอนที่ติดบนกระดาษกรองลงในขวดรูปชมพู่เดิมแล้วเติมสารละลาย 0.313 M NaOH ปริมาตร 200 มล. ลงไป ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารผสมที่ได้มากรองด้วยระบบ suction ผ่านกรวยกรองที่มีกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ล้างตะกอนที่ติดบนกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งไม่มีด่างเหลืออยู่ ซึ่งตรวจสอบได้โดยการใช้กระดาษลิตมัส ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 1 % HCl 100 มล. 2 ครั้ง น้ำร้อน 100 มล. 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย 95% ethanol 100 มล. 2 ครั้ง diethyl ether 100 มล. 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ซึ่งน้ำหนักของตะกอนที่ได้ นำตะกอนที่ได้ไปเผาด้วยเตาเผาที่ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปลอ่ยให้เย็นใน desiccator ซึ่งหาน้ำหนักของเถ้าที่ได้

$$\% \text{ เส้นใย} = [(\text{น้ำหนักแห้งของตะกอน} - \text{น้ำหนักเถ้า}) \times 100] / \text{น้ำหนักของตะกอนโปรตีน}$$

2.4.5.5 การหาปริมาณโปรตีน (56)

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มาบดให้ละเอียดด้วย mortar ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 0.50 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มล. ใส่ boiling chip ลงไป 2-3 เม็ด ย่อยโปรตีนและกลั่นหาแอมโมเนีย ดังวิธีการข้อ 2.3.2 โดยย่อยโปรตีนให้ได้เป็นสารประกอบไนโตรเจนด้วยสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น แล้วกลั่นหาแอมโมเนียที่ปล่อยออกมาเมื่อเติมสารละลาย NaOH จากนั้นไทเทรตหาปริมาณสารละลาย HCl ที่เหลืออยู่หลังทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียที่ปล่อยออกมาด้วยสารละลาย NaOH แล้วไทเทรตหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH กับสารละลาย HCl

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนจากสูตร

$$\% \text{ไนโตรเจน} = [(A-B) \times 1.4] / W$$

โดย A = ปริมาตรของสารละลาย HCl ที่เกินพอ $\times$ ความเข้มข้นของสารละลาย HCl

B = ปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ไตเตรตกับสารละลาย HCl ที่เกินพอ $\times$ ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH

W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม)

$$\% \text{โปรตีน} = 6.25 \times \% \text{ไนโตรเจน}$$

2.4.5.6 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (57)

เตรียมสารสำหรับหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต ดังนี้

ก. การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 0.1250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มล.

ข. การเตรียมสารละลาย 5% Phenol

ตวงสารละลาย phenol 5 มล. เติมน้ำกลั่น 95 มล. ผสมให้เข้ากัน

เตรียมทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของคาร์โบไฮเดรต โดยการเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2.1 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

สารที่ใช้	ปริมาตร (มล.)				
	blank	1	2		10
-สารละลายน้ำตาลกลูโคส (0.125 กรัม/25 มล.)	-	0.1	0.2		1.0
-น้ำกลั่น	1.0	0.9	0.8		-
-สารละลาย 5% phenol	1.0	1.0	1.0		1.0
-สารละลาย sulfuric acid (conc)	5.0	5.0	5.0	...	5.0
-ทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่า OD ที่ 490 nm					

2.4.6 การหาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนที่สกัดจากกากมันสำปะหลัง

ได้ส่งตัวอย่างตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมันสำปะหลัง 50 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในตะกอนโปรตีนทั้งสามที่ สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.5 การตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ดและสารสกัดโปรตีนของกากและเมล็ดมัสตาร์ด

2.5.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก

ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ด และจากสารสกัดโปรตีนของกากและเมล็ดมัสตาร์ด

2.5.1.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ด

ชั่งกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดเอาไขมันออกแล้วโดยชุด soxhlet apparatus ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมสารละลายผสมของ methanol-acetone-water (อัตราส่วน 7: 7: 6 โดยปริมาตร) 40 มล. คนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารผสมที่ได้มาทำการเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนสารละลายใสไว้ ส่วนกากที่เหลือนำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ methanol-acetone-water อีก 2 ครั้ง เก็บรวมสารละลายใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไว้ด้วยกัน เพื่อใช้ศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ และเอสเทอร์ ส่วนกากที่เหลือจากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง ให้เก็บรวมกันไว้เพื่อศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่จับกับกาก

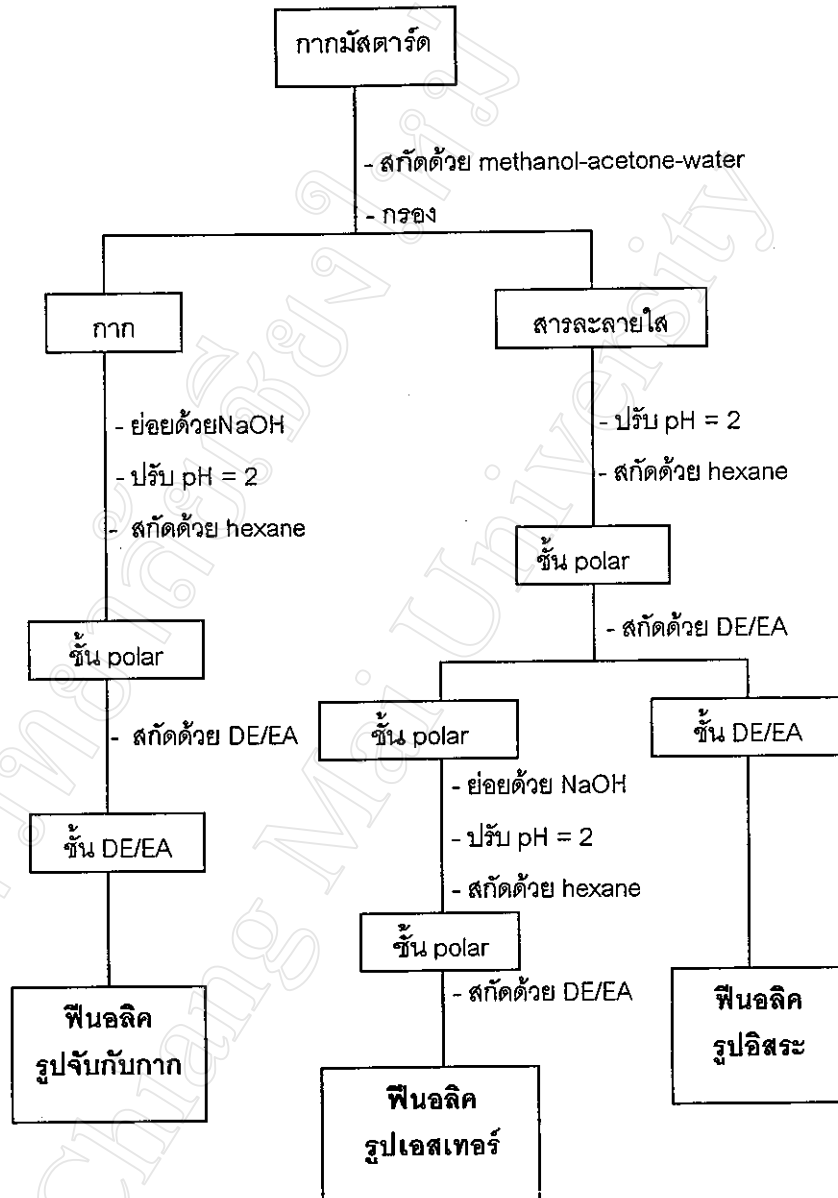
นำส่วนสารละลายใสที่ได้ดังกล่าวข้างต้น มาระเหยด้วยเครื่อง vacuum evaporator ให้เหลือปริมาตรประมาณ 45 มล. ปรับ pH ของสารละลายนี้ให้ได้ 2 ด้วยสารละลาย 6 M HCl เหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารละลายใสมาสกัดเอาไขมันออกโดยการเติม hexane ในปริมาตร 1: 1 เขย่าแยกไขมันในกรวยแยกเป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนของไขมันที่อยู่ชั้นบนทิ้งไป เก็บส่วนชั้นล่างมาแยกไขมันออกด้วย hexane อีก 2 ครั้ง เก็บรวมส่วนชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่างที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน แล้วนำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate (อัตราส่วน 1: 1) โดยเติมในอัตราส่วน 1: 1 เขย่าแยกในกรวยแยกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกส่วนชั้นสารอินทรีย์ซึ่งอยู่ชั้นบนไว้ ส่วนชั้นล่างให้นำมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate อีก 2 ครั้ง แล้วเก็บรวบรวมส่วนของชั้นสารอินทรีย์ซึ่งอยู่ชั้นบนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน เก็บไว้ศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ พร้อมกันนี้ก็เก็บรวบรวมชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน เพื่อศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปเอสเทอร์

นำส่วนสารละลายชั้นบนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate ข้างต้น มาระเหยเอาตัวทำละลายออกไปบน water bath จนแห้ง ละลายส่วนผสมที่แห้งนี้ด้วยสารละลาย 95% ethanol จนปรับปริมาตรได้ 5 มล. สารละลายที่ได้นี้จะเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ

สำหรับสารละลายชั้นล่างหลังการสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate ให้นำมาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 50 มล. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยการคนด้วย magnetic stirrer แล้วปรับ pH ของสารละลายผสมให้ได้ 2 ด้วยสารละลาย 6 M HCl เหยี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำเช่นเดียวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ โดยการสกัดไขมันออกด้วย hexane และสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยตัวทำละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate แล้วระเหยตัวทำละลายผสมให้แห้งพร้อมกับละลายด้วยสารละลาย 95 % ethanol จนปรับปริมาตรได้ 5 มล. สารละลายที่ได้นี้จะเป็สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปเอสเทอร์

สำหรับกากมัสตาร์ดที่เหลือตั้งแต่ตอนต้น ให้ทำเช่นเดียวกันกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปเอสเทอร์ โดยนำกากมาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 20 มล. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปรับ pH ของสารละลายผสมเป็น 2 แล้วเหยี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไป นำส่วนสารละลายใสมาสกัดเอาไขมันออกด้วย hexane จากนั้นสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate ระเหยเอาตัวทำละลายออกไปจนแห้งแล้วละลายด้วยสารละลาย 95 % ethanol จนปรับปริมาตรได้ 5 มล. สารละลายที่ได้นี้จะเป็สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่จับกับกาก

วิธีการโดยสรุปสำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกากของกากมัสตาร์ดแสดงได้ดังรูปที่ 2.1



DE = diethyl ether , EA= ethyl acetate

รูปที่ 2.1 แสดงการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกาก
จากกากมัสตาร์ด

2.5.1.2 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากและเมล็ด มัสตาร์ด

สกัดโปรตีนจากกากและเมล็ดมัสตาร์ดก่อน แล้วจึงสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนที่ได้ ซึ่งการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ดนั้น ได้ทำการทดลอง 2 วิธี

ก. เป็นการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ด ทำโดยชั่งกากมัสตาร์ดให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 50.00 กรัม เติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 500 มล. นำไปเขย่าด้วย shaking water bath ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อนำกากทิ้งไป ค่อยๆ เติมสารละลาย 7.2 M HCl จนวัด pH ได้ 3.8 เหยี่ยแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารละลายใส่นำมาเติม 20% ammonium sulphate โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหยี่ยแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารละลายใสมาเติม ethyl acetate ในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร พร้อมกับเติม 0.05 % potassium bisulfite ลงไป นำไปคนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แยกชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของสารอินทรีย์ออกมาโดยผ่านกรวยแยก แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้งบนอ่างน้ำร้อน ละลายตะกอนที่แห้งด้วย 95 % ethanol โดยปรับปริมาตรเป็น 5 มล. แล้วตรวจสอบชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ด้วยโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง

ข. เป็นวิธีที่จะใช้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากทั้งกากและเมล็ดมัสตาร์ด โดยชั่งกากและเมล็ดมัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้ว 25.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 250 มล. โดยนำไปเขย่าด้วย shaking water bath ที่ความเร็วรอบ 170 รอบ/ นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส นำมาเหยี่ยด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จะได้ส่วนกากและส่วนสารละลายใส ส่วนกากให้นำมาผึ่งให้แห้งพร้อมกับบดให้ละเอียดชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 กรัม แล้วทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.5.1.1 โดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 20 มล. จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 2 ด้วยสารละลาย 6 M HCl เหยี่ยด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาตะกอนทิ้งไป นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane 3 ครั้ง แยกส่วนสารละลายชั้นล่างมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสารละลายชั้นบนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้ว

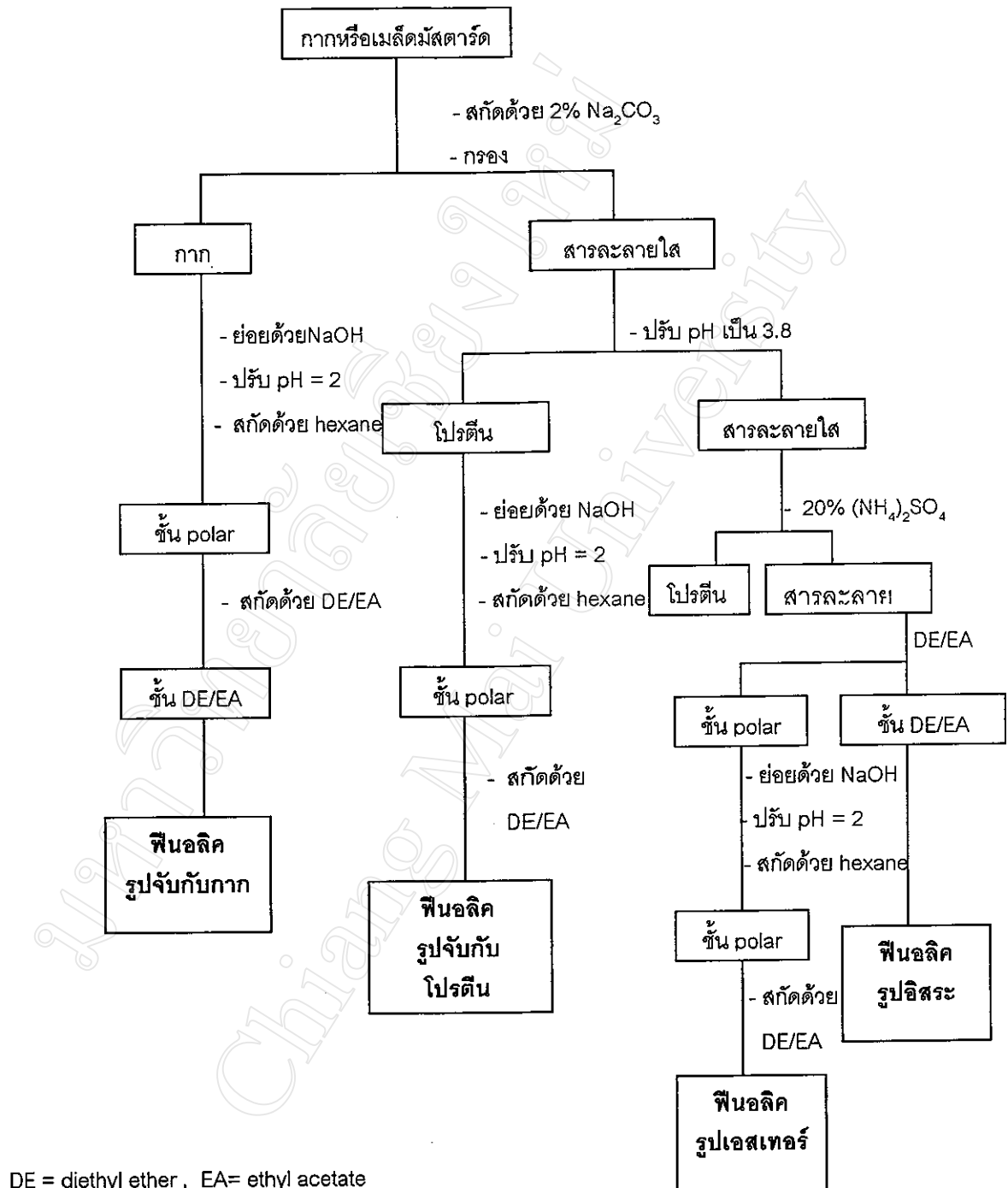
ระเหยให้แห้งด้วย water bath แล้วละลายด้วยสารละลาย 95% ethanol ปริมาตรเป็น 5 มล. จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่จับกับกาก

ส่วนสารละลายหลังแยกกากออกไปแล้วให้นำมาตกตะกอนโปรตีนโดยเติมสารละลาย 7.2 M HCl จนวัด pH ได้ 3.8 เหยี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แยกตะกอนโปรตีนที่ได้ไปผึ่งให้แห้งแล้วบดให้ละเอียด ซึ่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำมาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 15 มล. ปรับ pH ให้ได้ 2 ด้วยสารละลาย 6 M HCl เหยี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไป นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane 3 ครั้ง แยกส่วนสารละลายชั้นล่างมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสารละลายชั้นบนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วระเหยให้แห้งด้วย water bath แล้วละลายด้วยสารละลาย 95% ethanol ปริมาตรเป็น 5 มล. จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่จับกับโปรตีน

นำส่วนสารละลายใสที่ได้หลังจากตกตะกอนโปรตีนมาแยกสารประกอบฟีนอลิกออกมาโดยทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.5.1.1 โดยเริ่มด้วยการสกัดเอาไขมันออกด้วย hexane 3 ครั้ง เก็บส่วนชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำจากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate 3 ครั้ง เก็บรวบรวมสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นสารอินทรีย์จากทั้ง 3 ครั้งไว้ด้วยกัน ระเหยให้แห้งด้วย water bath ละลายด้วยสารละลาย 95% ethanol ปริมาตรเป็น 5 มล. จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ

นำส่วนสารละลายชั้นล่างหลังสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate มาแยกสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปเอสเทอร์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.5.1.1 โดยเริ่มต้นด้วยการไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 80 มล. จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 2 ด้วยสารละลาย 6 M HCl เหยี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไป นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane 3 ครั้ง แยกส่วนสารละลายชั้นล่างมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสารละลายชั้นบนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วระเหยให้แห้งด้วย water bath แล้วละลายด้วยสารละลาย 95% ethanol ปริมาตรเป็น 5 มล. จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปเอสเทอร์

วิธีการโดยสรุปสำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากของสารสกัดโปรตีนจากกากและเมล็ดมัสตาร์ด แสดงได้ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงการสกัดโปรตีนและแยกสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากจากสารสกัดโปรตีนของกากและเมล็ดมัสตาร์ด

โดยสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากของสารสกัดโปรตีนจากกากและเมล็ดมีสตาร์ทข้างต้น จะนำไปตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

2.5.2 การตรวจสอบชนิดของสารประกอบฟีนอลิก

2.5.2.1 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

เตรียมแผ่นกระจกสำหรับทำโครมาโทกราฟีแบบผิวบางมาเคลือบด้วยซิลิกาเจลที่เรืองแสง 60 F 254 พร้อมกับเตรียมสารละลายของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), ferulic acid, gallic acid, hydroquinone, protocatechuic acid, pyrocatechol, pyrogallol, sinapic acid และ syringic - ความเข้มข้น 0.01 M

หยดสารละลายของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน และสารประกอบฟีนอลิกตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก ลงบนแผ่นซิลิกาเจล นำไปจุ่มในแทงค์ที่มีตัวทำละลายผสม (ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ซึ่งประกอบด้วย benzene-methanol-acetic acid (อัตราส่วน 20: 4: 1 โดยปริมาตร) จนกระทั่งตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบบนของแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล แล้วทำเครื่องหมายไว้ นำแผ่นกระจกออกมาจากแทงค์แล้วเป่าด้วยลมร้อนจนซิลิกาเจลแห้ง นำไปส่องดูการเรืองแสง ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต บันทึกสีที่เห็นพร้อมกับทำเครื่องหมายตรงตำแหน่งที่เห็นสี คำนวณค่า R_f จากระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากนั้นนำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลมาพ่นด้วยสารละลายผสม 2 ชุด คือ

- ก. p-nitroaniline ซึ่ง ประกอบด้วย 0.5 % p-nitroaniline ใน 2 M HCl, 5% sodium nitrite และ 20% sodium acetate ในอัตราส่วน 1.5: 0.5: 20 โดยปริมาตร
 - ข. Hoepfner ประกอบด้วย 1% sodium nitrite ใน 10% acetic acid
- จากนั้นเป่าด้วยลมร้อนให้แห้ง บันทึกสีที่มองเห็น

2.5.2.2 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง

เตรียมกระดาษโครมาโทกราฟี โดยใช้กระดาษ Whatman ตัดให้ได้ขนาด 20×20 ซม. พร้อมกันนี้ก็เตรียมสารละลายมาตรฐาน sinapic acid ความเข้มข้น 0.01 M

นำสารมาตรฐาน sinapic acid และสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ มาหยดบนกระดาษโครมาโทกราฟี นำกระดาษโครมาโทกราฟีนี้ไปจุ่มในแทงค์ที่มีสารละลาย 2% acetic acid ซึ่งเป็น

ตัวทำละลายเคลื่อนที่ รวจนสารละลาย 2% acetic acid เคลื่อนใกล้ถึงของกระดาดจึงนำกระดาดออกมาจากแท่งค์ พร้อมกับทำเครื่องหมายแสดงจุดที่สารละลาย 2% acetic acid เคลื่อนถึง นำมาเป่าด้วยลมร้อนจนแห้ง จากนั้นนำมาส่องดูการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต วงตำแหน่งที่เห็นการเรืองแสงพร้อมกับบันทึกสีที่เห็น แล้วพ่นด้วยสารละลาย p-nitroaniline และสารละลาย Hoepfner บันทึกสีที่เห็นดังเช่นข้อ 2.5.2.1

เตรียมกระดาดโครมาโทกราฟีอีกสองแผ่น แผ่นหนึ่งหยดสารมาตรฐานและอีกแผ่นหยดสารตัวอย่าง จากนั้นนำไปจุ่มในแท่งค์ที่มีสารละลาย 2% acetic acid รวจนสารละลาย 2% acetic acid เคลื่อนใกล้ถึงของกระดาดจึงนำกระดาดออกมาจากแท่งค์ เป่าด้วยลมร้อนให้แห้ง จากนั้นกลับกระดาด 90 องศา ทวนเข็มนาฬิกาให้จุดที่หยดสารอยู่ส่วนล่างของกระดาด นำไปจุ่มในแท่งค์ที่มีสารละลายผสมของ n-butanol-acetic acid-water ในอัตราส่วน 6: 1: 2 โดยปริมาตร รวจนตัวทำละลายผสมเคลื่อนถึงขอบกระดาดจึงนำกระดาดออกมาพร้อมทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่เคลื่อนถึง เป่ากระดาดด้วยลมร้อนจนแห้ง แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสง ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต วงตำแหน่งที่เห็นการเรืองแสงพร้อมกับบันทึกสีที่เห็น จากนั้นพ่นด้วยสารละลาย p-nitroaniline และสารละลาย Hoepfner บันทึกสีที่เห็นเช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.1

นอกจากนี้ ให้นำสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ดซึ่งอยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก พร้อมทั้งสารละลายมาตรฐาน sinapic acid ไป scan ดูค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ตั้งแต่วิทยาวัดคลื่น 200-800 nm

2.5.3 การหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (58)

เตรียมสารสำหรับหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกดังนี้

ก. การเตรียม 0.01 M pyrocatechol

ซึ่ง pyrocatechol 0.1101 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

ข. การเตรียมสารละลาย Folin-denis

ซึ่ง $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50.00 กรัม และ phosphomolybdic acid 10.00 กรัม ใส่สารทั้งสองลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 375 มล. บีบเปิด orthophosphoric acid 25 มล. ลงไป แล้วใส่เม็ด boiling chip 2-3 เม็ด นำไป reflux ทันทีเป็น

เวลา 2 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 500 มล. แล้วเก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชา

ค. การเตรียมสารละลายอิมตัวของ Na_2CO_3

นำ Na_2CO_3 มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. คนตลอดเวลา แล้วเติม Na_2CO_3 เรื่อยๆ จนกระทั่งสารไม่สามารถละลายในน้ำกลั่นได้อีกต่อไป

เตรียมทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยนำสารละลาย pyrocatechol ความเข้มข้น 0.15, 0.25, ..., 0.95 mM มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-denis วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 640 nm โดยขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการเตรียมสารละลาย pyrocatechol ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สารที่ใช้	ปริมาตร (มล.)				
	blank	1	2		10
-สารละลาย pyrocatechol 0.01 M ปิเปตใส่ขวดปริมาตร 10 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด	-	0.15	0.25		0.95
-ปิเปตจากขวดปริมาตรลงในหลอดทดลองขนาดกลาง	-	1.0	1.0		1.0
-น้ำกลั่น	1.0	-	-		-
-deionized water	10	10	10		10
-สารละลาย Folin-denis	2	2	2		2
-ทิ้งไว้ 5 นาที					
-สารละลายอิมตัวของ Na_2CO_3	2	2	2		2
-ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่า OD ที่ 640 nm					

ปีเปตสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากใ้ในหลอดทดลองขนาดกลาง เติมสารสำหรับหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกข้างต้น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm คำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในรูปต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

2.6 การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติบางประการ

2.6.1 การเตรียมเมล็ดมัสตาร์ดที่ปราศจากไขมัน

นำเมล็ดมัสตาร์ดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงเพื่อแยกเอาเปลือกออก จากนั้นสกัดไขมันออกโดยการนำเมล็ดมัสตาร์ดที่ร่อนผ่านตะแกรงแล้วไปใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร เติม hexane ลงไปประมาณ 10 เท่าของน้ำหนักเมล็ดมัสตาร์ด คนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยกเอา hexane ออกแล้วสกัดซ้ำด้วย hexane ใหม่อีกครั้งหนึ่ง นำเมล็ดมัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้วนี้มาผึ่งให้แห้งเพื่อให้ hexane ระเหยไปหมด จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วย mortar แล้วร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้งหนึ่ง

2.6.2 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ยังไม่บริสุทธิ์

2.6.2.1 วิธีการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

การเตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ก. การเตรียมสารละลาย 0.1 M KH_2PO_4 -0.1 M NaOH pH 7

ปีเปตสารละลาย 0.1 M KH_2PO_4 29.1 มล. ผสมกับสารละลาย 0.1 M NaOH ปริมาตร 50 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

ข. การเตรียมสารละลาย 10 mM gallic acid

ชั่ง gallic acid 0.1881 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น โดยการเตรียมสารละลาย gallic acid ให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้

สำหรับวิธีการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะเป็นไป
ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงวิธีการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

สาร	ปริมาตร (ml)	
	Blank	Sample
0.1 M KH_2PO_4 -0.1 M NaOH pH 7	2.0	1.95
10 mM gallic acid	1.0	1.0
สารละลายเอนไซม์	-	0.05
ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่ 45 °C รับวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 5 นาที		

การวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส คำนวณได้จากค่า
การดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา โดย 1 unit ของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการ
ดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป 0.001 หน่วยต่อนาที

2.6.2.2 การหาปริมาณโปรตีน (59)

การเตรียมสารสำหรับหาปริมาณโปรตีน

ก. การเตรียม bovine serum albumin 250 µg/ml

ชั่ง bovine serum albumin 0.0125 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 50 มล.

ข. การเตรียมสารละลาย A

ชั่ง Na_2CO_3 5 กรัม ละลายด้วยสารละลาย NaOH 0.1 M แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มล. ด้วย 0.1 M NaOH

ค. การเตรียมสารละลาย B

ชั่ง CuSO_4 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 40 มล. และชั่ง Na,K tartate 1.00 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 40 มล. แล้วนำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกัน พร้อมกับปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

ง. การเตรียมสารละลาย C

นำสารละลาย A 250 มล. ผสมกับสารละลาย B 5 มล. จะได้สารละลาย C (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้)

จ. การเตรียมสารละลาย D

นำสารละลาย stock ของ Folin-ciocalteu 's phenol reagent ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

ทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงการเตรียมสารละลาย bovine serum albumin ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีน

สารที่ใช้	ปริมาตร (ml)				
	Blank	1	2		10
-สารละลาย BSA (250 µg/ml)	-	0.1	0.2		1.0
-น้ำกลั่น	1.0	0.9	0.8		-
-สารละลาย C	5	5	5		5
ทิ้งไว้ 10 นาที					
-สารละลาย D	0.5	0.5	0.5		0.5
เขย่าแล้วทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัด OD 750 nm					

สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างก็ทำได้โดยใช้สารตัวอย่างในความเข้มข้นที่เหมาะสมใส่แทน bovine serum albumin แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm

2.6.2.3. การหาลับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ซึ่งเมล็ดมัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลาย 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na₂HPO₄ pH 7 ปริมาตร 20 มล. ลงไป คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้นี้ไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เตรียมลัษสเตรทซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ caffeic acid, chlorogenic acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), gallic acid, hydroquinone, p-cresol, pyrocatechol, pyrogallol และ tyrosine ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM

วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสดังวิธีการทดลองข้อ

2.6.2.1 โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆข้างต้นแทน gallic acid โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ

ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	ความยาวคลื่น (nm)
caffeic acid	326
cholrogenic acid	326
DL-DOPA	460
gallic acid	600
hydroquinone	400
p-cresol	400
pyrocatechol	400
pyrogallol	334
tyrosine	472

2.6.2.4 การหา pH ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส
เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆกันดังนี้

ก. การเตรียม 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na_2HPO_4 pH 3

ปิเปต 0.1 M citric acid มา 79.45 มล. ผสมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 20.55 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 3 ด้วย citric acid หรือ Na_2HPO_4

ข. การเตรียม 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na_2HPO_4 pH 4

ปิเปต 0.1 M citric acid มา 61.45 มล. ผสมกับ 0.2 M Na_2HPO_4 38.55 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 4 ด้วย citric acid หรือ Na_2HPO_4

ค. การเตรียม 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na₂HPO₄ pH 5

ปิเปต 0.1 M citric acid มา 48.50 มล. ผสมกับ 0.2 M Na₂HPO₄ 51.50 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 5 ด้วย citric acid หรือ Na₂HPO₄

ง. การเตรียม 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na₂HPO₄ pH 6

ปิเปต 0.1 M citric acid มา 36.85 มล. ผสมกับ 0.2 M Na₂HPO₄ 63.15 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 6 ด้วย citric acid หรือ Na₂HPO₄

จ. การเตรียม 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na₂HPO₄ pH 7

ปิเปต 0.1 M citric acid มา 17.65 มล. ผสมกับ 0.2 M Na₂HPO₄ 82.35 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 7 ด้วย citric acid หรือ Na₂HPO₄

ฉ. การเตรียม 0.1 M Tris-HCl pH 8

ปิเปต 0.1 M Tris มา 50 มล. ผสมกับ 0.1 M HCl 29.5 มล. เติมน้ำกลั่นอีก 10 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 8 ด้วย tris หรือ HCl

ช. การเตรียม 0.2 M Glycine-0.2 M NaOH pH 9

ปิเปต 0.2 M glycine มา 25 มล. ผสมกับ 0.2 M NaOH 4.4 มล. เติมน้ำกลั่นอีก 60 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 9 ด้วย glycine หรือ NaOH

ซ. การเตรียม 0.2 M Glycine- 0.2 M NaOH pH 10

ปิเปต 0.2 M glycine มา 25 มล. ผสมกับ 0.2 M NaOH 16.0 มล. เติมน้ำกลั่นอีก 50 มล. นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ 10 ด้วย glycine หรือ NaOH

สกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ โดยขังเมล็ด มัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆกัน คือสารละลาย 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na₂HPO₄ pH 3-7, 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.2 M Glycine- 0.2 M NaOH pH 9 และ 10 ปริมาตร 20 มล.ลงไป คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสาร

ละลายส่วนโสมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ นี้ไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีน

2.6.2.5 การหาความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ จากข้อ 2.6.2.4 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีน หลังจากเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ 24 และ 36 ชั่วโมง

2.6.2.6 การหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

ซึ่งเมล็ดมัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 20 มล. ลงไป คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm , 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนโสมที่ได้จากการสกัดที่เวลาต่างๆ กันไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีน

2.6.3 วิธีการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์

2.6.3.1 การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แบบไม่ต่อเนื่อง

ซึ่งเมล็ดมัสตาร์ดที่สกัดไขมันออกแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 18.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 180 มล. คนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาตรของสารละลายโสมที่ได้ แบ่งสารละลายโสมที่ได้มา 10 มล. จำนวน 10 ชุด ใส่ในขวดรูปชมพู่ เพื่อตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-100% saturation โดยแต่ละชุด ให้ค่อยๆ เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ละน้อยจนได้ % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ตามต้องการ โดยปริมาณของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติมแสดงดังตารางที่ 2.6 คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที โดยทำในถังที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเอาตะกอนโปรตีนออกมาด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้

ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะละลายได้ แล้วปรับให้ทราบปริมาณที่แน่นอน วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีนที่ได้

ตารางที่ 2.6 แสดงปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติมแบบไม่ต่อเนื่องเพื่อให้ได้สารละลายที่มี % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ตามต้องการ

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation	ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติม (กรัม)
10	5.2
20	10.7
30	16.6
40	22.9
50	29.5
60	36.6
70	44.2
80	52.3
90	61.1
100	70.7

2.6.3.2 การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แบบต่อเนื่อง

ซึ่งเมล็ดมีสตาร์ดที่เอาไขมันออกแล้วให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนมา 12.00 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 120 มล. คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไปด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาณของสารละลายใสที่ได้ แบ่งสารละลายใสที่ได้มา 80 มล. แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 80 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ ค่อยๆ เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ลงไปให้ได้ 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที ในถังที่บรรจุน้ำแข็ง จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนและสารละลายใสด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนของตะกอนโปรตีนที่ได้ให้ละลายด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาณน้อยที่สุด แล้วปรับให้ทราบปริมาตรที่แน่นอน ส่วนสารละลายใสให้นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วค่อยๆเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ลงไปจนได้ 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาทีในถังที่บรรจุน้ำแข็ง จากนั้นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนกับสารละลายใสด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนตะกอนโปรตีนที่ได้ให้ละลายด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาณน้อยที่สุด แล้วปรับให้ทราบปริมาตรที่แน่นอน ส่วนของสารละลายใสให้นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วค่อยๆเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จนได้ 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนได้ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 10-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ไป dialyse เอาเกลือออก โดยใส่ใน dialysis bag ที่มีขนาดโมเลกุล 12,000 แล้ว dialyse ข้ามคืนด้วยน้ำกลั่น และสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 วัดปริมาตรของสารละลายหลัง dialyse แล้วนำไปวัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

สำหรับปริมาณของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติมในสารละลายเพื่อให้ได้ 10-80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation แสดงได้ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติมแบบต่อเนื่องเพื่อให้ได้ % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ตามต้องการ

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation	ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เติม (กรัม)
10	5.2
20	5.4
30	5.6
40	5.7
50	5.9
60	6.1
70	6.3
80	6.6

2.6.3.3 การแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ DEAE Sepharose (Anion Exchanger)

ทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับ DEAE Sepharose โดยเริ่มจากการเตรียมคอลัมน์ โดยนำ DEAE Sepharose มาทำให้พองตัวในสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ทิ้งไว้ 36 ชั่วโมง จากนั้นใช้ dropper ดูดเอา DEAE Sepharose ที่พองตัวดีแล้วนี้ไปใส่ในคอลัมน์ซึ่งเป็นเข็มฉีดยาที่รองกันด้วยสำลี ให้ได้ปริมาตรประมาณ 10 มล. ล้างคอลัมน์นี้หลายๆครั้งด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จนวัด pH ของสารละลายที่ออกมาได้เท่ากับ 7 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ได้เท่ากับสารละลายเริ่มต้น

ปิเปตเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีแอกติวิตี 98 units/ml ปริมาตร 1.0 มล. ใส่ในคอลัมน์ที่ได้เตรียมไว้แล้ว รอจนเอนไซม์เคลื่อนลงไปในเจลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จากนั้นทำการชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M NaCl โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล.

นำสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

2.6.3.4 การแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ CM Sephadex (Cation Exchanger)

ทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับ CM Sephadex โดยเริ่มจากการเตรียมคอลัมน์ โดยนำ CM Sephadex มาทำให้พองตัวในสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ทิ้งไว้ 36 ชั่วโมง จากนั้นใช้ dropper ดูดเอา CM Sephadex ที่พองตัวดีแล้วนี้ไปใส่ในคอลัมน์ซึ่งเป็นเข็มฉีดยาที่รองกันด้วยสำลี ให้ได้ปริมาตรประมาณ 10 มล. ล้างคอลัมน์นี้หลายๆครั้งด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จนวัด pH ของสารละลายที่ออกมาได้เท่ากับ 7 และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ได้เท่ากับสารละลายเริ่มต้น

ปิเปตเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีแอกติวิตี 98 units/ml ปริมาตร 1.0 มล. ใส่ในคอลัมน์ที่ได้เตรียมไว้แล้ว รอจนเอนไซม์เคลื่อนลงไปในเจลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับ

คอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M NaCl โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล.

นำสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

เพื่อเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับคอลัมน์ CM Sephadex ได้ทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับ CM Sephadex ที่ equilibrate ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH ต่างๆ ซึ่งได้แก่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยเริ่มจากการเตรียมคอลัมน์ โดยนำ CM Sephadex มาทำให้พองตัวในสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH ต่างๆ ซึ่งได้แก่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ทิ้งไว้ 36 ชั่วโมง จากนั้นใช้ dropper ดูดเอา CM Sephadex ที่พองตัวดีแล้วนี้ไปใส่ในคอลัมน์ซึ่งเป็นเข็มฉีดยาที่รองกันด้วยสำลี ให้ได้ปริมาตรประมาณ 5 มล. ล้างคอลัมน์นี้หลายครั้งด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH ต่างๆ ซึ่งได้แก่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จนวัด pH ของสารละลายที่ออกมานี้ได้เท่ากับ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ได้เท่ากับสารละลายเริ่มต้น

ปิเปตเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีแอกติวิตี 100 units/ml ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในคอลัมน์ที่ได้เตรียมไว้แล้ว รอจนเอนไซม์เคลื่อนลงไปใกล้เจลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M NaCl โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล.

นำสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ซึ่ง equilibrate ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH ต่างๆ นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

2.6.3.5 การแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ Con A Sepharose

เตรียมคอลัมน์โดยนำเอาคอลัมน์สำเร็จรูปซึ่งบรรจุ Con A Sepharose มาล้างหลายๆ ครั้งด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 และ 1 mM CaCl_2 pH 7.4 จนกระทั่งวัด pH ของสารละลายที่ออกมาได้เท่ากับ 7.4

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ CM Sephadex ซึ่งมีแอกติวิตี 80 units/ml ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในคอลัมน์โดยผ่านทาง peristatic

pump รวบรวมเอนไซม์เคลื่อนลงไปโหลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM $MnCl_2$ และ 1 mM $CaCl_2$ pH 7.4 จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M glucose, 20 mM Tris-HCl และ 0.5 M NaCl pH 7.4 โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล.

นำสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

2.6.3.6 การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอน

ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ และแยกโดยใช้คอลัมน์ CM Sephadex และ

Con A Sepharose

ก. การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอน

ด้วย $(NH_4)_2SO_4$

สกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งที่สกัดไขมันออกแล้ว โดยชั่งเมล็ดมันฝรั่ง 12.00 กรัม เติมสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 120 มล. คนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm , 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที รินส่วนสารละลายใสออกมา วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ พร้อมกับแบ่งสารละลายไว้บางส่วนเพื่อหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน นำสารละลายที่เหลือมาค่อยๆ เติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ละน้อย จนกระทั่งได้ 80% $(NH_4)_2SO_4$ saturation คนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm , 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที รินส่วนสารละลายใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมดจากนั้นนำไปใส่ใน dialysis bag ขนาดโมลโมเลกุล 12,000 แล้ว dialyse ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 1 ครั้ง dialyse ต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนมาทำการ dialyse ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้หลังจาก dialyse แล้ว แบ่งสารละลายไว้ส่วนหนึ่งเพื่อหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ส่วนที่เหลือนำไปผ่าน CM Sephadex chromatography

ข. การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย CM Sephadex

เตรียมคอลัมน์ โดยนำ CM Sephadex มาทำให้พองตัวในสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 โดยทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง นำไปใส่ภาภาคอกโดยใช้ปั๊ม บรรจ CM Sephadex นี้ลงในคอลัมน์ ให้ได้ปริมาตรประมาณ 150 มล. ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 จนวัด pH ของสารละลายที่ออกมาได้เท่ากับ 6.5 และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับสารละลายตั้งต้น แล้วต่อคอลัมน์เข้ากับ peristaltic pump และ fraction collector

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ปริมาตร 18.5 มล. ซึ่งมีแอกติวิตี 110 units/ml ใส่ในคอลัมน์ผ่านทาง peristaltic pump โดยใช้ อัตราการไหล 40 มล./ ชั่วโมง รอจนเอนไซม์เคลื่อนลงไปในเจลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับ คอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ ออกมาด้วยสารละลาย gradient 0-1 M NaCl 500 มล. โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ ด้วย fraction collector ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 18 มล. สำหรับการล้างโปรตีนที่ไม่ จับกับคอลัมน์ และ หลอดละ 10 มล. สำหรับการชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์

นำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 280 nm และค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

รวมสารละลายที่ได้จากการชะด้วย gradient NaCl ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของ เอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน ultrafiltration membrane ที่มี MW cutoff = 12,000 จากนั้น นำไป dialyse ในน้ำกลั่น พร้อมกับแบ่งสารละลายที่ได้ไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของ เอนไซม์และปริมาณโปรตีน ส่วนที่เหลือนำไปผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose

ค. การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย Con A Sepharose

เตรียมคอลัมน์โดยนำเอาคอลัมน์สำเร็จรูปซึ่งบรรจุ Con A Sepharose มาล้างหลายๆ ครั้งด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 และ 1 mM CaCl_2 pH 7.4 จนกระทั่งวัด pH ของสารละลายที่ออกมาได้เท่ากับ 7.4

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ CM Sephadex แล้วมาปริมาตร 0.5 มล. ซึ่งมีแอกติวิตี 88 units/ml ใส่ในคอลัมน์โดยผ่านทาง peristaltic pump รอจนเอนไซม์เคลื่อนลงไปในเจลจนหมด จึงล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย สารละลาย 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 และ 1 mM CaCl_2 pH 7.4 จากนั้น

ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M glucose, 20 mM Tris-HCl และ 0.5 M NaCl pH 7.4 โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล.

นำสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (ทั้งที่จับและไม่จับกับคอลัมน์) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ CM Sephadex ที่เหลือมาผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose อีกหลายครั้ง จนกว่าสารละลายเอนไซม์จะหมด จากนั้นรวมสารละลายเอนไซม์ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์หลังจากผ่าน Con A Sepharose ทั้งหมดมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration membrane แล้วนำไป dialyse ด้วยน้ำกลั่น และสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์พร้อมทั้งปริมาณโปรตีนที่ได้

2.6.3.7 การทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยการทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration และแยกโดยใช้คอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose

สกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งที่สกัดไขมันออกแล้ว โดยซึ่งเมล็ดมันฝรั่ง 10.00 กรัม เติมสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ปริมาตร 100 มล. คนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 6,000 rpm , 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที รินส่วนสารละลายใสออกมา วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ พร้อมกับแบ่งสารละลายไว้บางส่วนเพื่อหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน นำสารละลายที่เหลือมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน ultrafiltration membrane จนได้สารละลายปริมาตรประมาณ 30 มล. นำสารละลายที่เข้มข้นขึ้นแล้วนี้ไป dialyse ที่ 12 ชั่วโมงในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 1 ครั้ง dialyse ต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนมาทำการ dialyse ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้หลังจาก dialyse แล้ว แบ่งสารละลายไว้ส่วนหนึ่งเพื่อหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ส่วนที่เหลือนำไปผ่าน CM Sephadex chromatography

สำหรับขั้นตอนการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย CM Sephadex นั้นก็ให้ทำเช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 2.6.3.6 โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วด้วย ultrafiltration membrane ปริมาตร 34.5 มล. ซึ่งมีแอกติวิตี 80 units/ml ผ่านลงในคอลัมน์ CM

Sephadex แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง หลอดละ 20 มล. สำหรับการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และ 10.8 มล. สำหรับโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ วัดค่าการดูดกลืนแสงและค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์ทั้งหมด จากนั้นรวบรวมเอาสารละลายที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อยู่มาทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วนำไป dialyse แบ่งสารละลายที่ได้ไว้บางส่วนเพื่อหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ส่วนที่เหลือให้นำไปผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose

สำหรับขั้นตอนการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย Con A Sepharose นั้นก็ให้ทำเช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 2.6.3.6 โดยนำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ CM Sephadex มา 2 มล. ซึ่งมีแอกติวิตี 82 units/ml ผ่านลงในคอลัมน์ Con A Sepharose แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ไว้ในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงและค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์ทั้งหมด นำเอนไซม์ที่เหลือหลังจากผ่าน CM Sephadex มาผ่าน Con A Sepharose หลายๆ ครั้งจนหมด จากนั้นรวบรวมเอาสารละลายที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อยู่มาทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วนำไป dialyse วัดค่าการดูดกลืนแสงและค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ได้

2.6.3.8 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย SDS-PAGE (60)

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับทำ electrophoresis

ก. การเตรียม 1 M Tris-HCl pH 8.8

ซึ่ง tris(hydroxymethyl)aminomethane 12.114 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น แล้วปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ให้ครบ 100 มล.

ข. การเตรียม 0.3 M Tris-HCl pH 6.8

ซึ่ง tris(hydroxymethyl)aminomethane 3.6342 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มล. ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น แล้วปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ให้ครบ 100 มล.

ค. การเตรียม 30% bis-acrylamine

ชั่ง acrylamine 30 กรัม และ bisacrylamine 0.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

ง. การเตรียม 10% ammonium persulphate

ชั่ง ammonium persulphate 0.01 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มล. โดยให้เตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้

จ. การเตรียม 0.5% TEMED

ปิเปต stock solution ของสารละลาย TEMED 0.5 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

ฉ. การเตรียม 10% SDS

ชั่ง sodium dodecylsulphate 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

ช. การเตรียม 0.1% bromophenol blue

ชั่ง bromophenol blue 0.005 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 5 มล.

ซ. การเตรียม electrode buffer

ชั่ง tris 3.0285 กรัม glycine 14.4134 กรัม และ sodium dodecylsulphate 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล.

ณ. การเตรียม sample buffer (0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)

sample buffer ประกอบด้วยส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ 12.5 มล. ของ 0.5 M tris-HCl, 2 กรัม ของ sodium dodecylsulphate, 10 มล. ของ glycerol, 5 มล. ของ 2-mercaptoethanol และ 1 มล. ของ 0.1% bromophenol blue

ญ. การเตรียม Straining solution (0.025% Coomassie Brilliant blue R 250, 40% methanol, 7% acetic acid)

ซึ่ง Coomassie Brilliant blue R 0.125 กรัม เติม methanol 200 มล. คนจนสารละลายหมด จากนั้นจึงเติม glacial acetic acid 35 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มล. ด้วยน้ำกลั่น

ฎ. การเตรียม Destaining solution (40% methanol, 7% acetic acid)

ตวง methanol 400 มล. ผสมกับ glacial acetic acid 70 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 10% separating gel

10% separating gel สามารถเตรียมได้จากการผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 แสดงการเตรียม 10% separating gel

สาร	ปริมาตร (มล.)
น้ำกลั่น	2.10
1 M tris-HCl pH 8.8	3.75
10% SDS	0.10
30% bis-acrylamine	3.30
10% APS	0.05
0.5% TEMED	0.70

การเตรียม 3% stacking gel

3% stacking gel สามารถเตรียมได้จากการผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 แสดงการเตรียม 3% stacking gel

สาร	ปริมาตร (มล.)
น้ำกลั่น	1.75
0.3 M tris-HCl pH 6.8	2.10
10% SDS	0.05
30% bis-acrylamine	0.50
10% APS	0.10
0.5% TEMED	0.50

การเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ SDS-PAGE

นำสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์มาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 2 : 1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วเหวี่ยงแยกเอาตะกอนทิ้งไป เก็บสารละลายใส่ไว้ทำ SDS-PAGE

วิธีทำ polyacrylamine gel electrophoresis

เตรียมชุด slab gel ซึ่งประกอบด้วยกระจก 2 บาน ผสม separating gel ตามสูตรข้างต้น แล้วใช้ dropper ดูดเอาสารละลายนี้ใส่เข้าไประหว่างช่องกระจกของชุดเครื่องมือ slab gel โดยค่อยๆหยดลงไป ระมัดระวังให้มีฟองอากาศในสารละลายนี้ โดยให้เหลือช่องสำหรับ stacking gel ด้วย จากนั้นใช้ dropper ดูดน้ำกลั่นหยดลงไปบนผิวหน้าของ gel ด้วยเพื่อป้องกันผิวหน้าของ gel สัมผัสกับอากาศซึ่งจะทำให้ gel ไม่แข็งตัว รอจนสารเกิดการ polymerization สมบูรณ์ประมาณ 30 นาที เทน้ำที่อยู่เหนือ gel ทิ้งไป

ผสม stacking gel ตามสูตรข้างต้น แล้วใช้ dropper ดูดเอาสารละลายนี้ใส่ไปบน separating gel นำ comb เสียบเข้าไปใน stacking gel นี้เพื่อให้เกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างลงไป ทิ้งไว้ให้ gel เกิดการ polymerization จนสมบูรณ์ ประมาณ 30 นาที แล้วค่อยๆดึง comb ออกจาก stacking gel

ในขณะเดียวกันให้นำสารละลายซึ่งเป็น electrode buffer มาเทใส่ใน chamber จนเกือบถึงขีด max นำเอาชุด slab gel มาเปิดส่วนล่างออก แล้วใส่เข้าไปใน chamber ที่มีสาร

ละลายบัฟเฟอร์อยู่ จากนั้นเท electrode buffer ลงไปในช่องส่วนบนของชุด slab gel จนสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมเจล ทำการไล่ฟองอากาศที่อยู่ส่วนล่างของเจลออกให้หมด ปิดฝาชุด chamber พร้อมกับจ่ายกระแสไฟฟ้า 10 mA เพื่อเป็นการ pre-run ประมาณ 10 นาที ปิดสวิตช์จ่ายไฟ แล้วเปิดฝาของชุด chamber ออก ใช้ micropipette ที่ต่อกับเข็มปลายแหลมดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้ว 20 μ l แล้วค่อยๆ ปล่อยเข้าไปในช่องว่างที่เว้นไว้แล้วในส่วน stacking gel ปิดฝาของชุด chamber แล้วเปิดสวิตช์จ่ายไฟโดยปรับกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 20 mA ตลอดการ run รอจนกระทั่งแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนมาจนถึงปลายของ separating gel จึงทำการปิดสวิตช์จ่ายไฟ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

นำชุด slab gel ออกมาจาก chamber แล้วถอดเอาแผ่นเจลออกมาใส่ในกล่องที่มี straining solution อยู่ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

นำแผ่นเจลออกจาก straining solution แล้วใส่เข้าไปในกล่องที่มี destaining solution ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยน destaining solution หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งแผ่นเจลใส สามารถมองเห็นแถบของโปรตีน

2.6.4 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่บริสุทธิ์

ในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่บริสุทธิ์นี้ จะใช้เอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ultrafiltration , CM Sephadex และ Con A Sepharose ตามวิธีการทดลองข้อ 2.6.3.7 ซึ่งมีแอกติวิตี 80 units/ml

2.6.4.1 การหาปริมาณของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เหมาะสมในการทำงาน

ในการหาปริมาณของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เหมาะสมในการทำงานนั้นได้ใช้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังจากผ่าน Con A Sepharose ในปริมาตรต่างๆกัน คือ 30 , 40, 50, 60, 70 และ 80 μ l มาวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยใส่สารละลายเอนไซม์ปริมาตรต่างๆนี้ลงในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 M KH_2PO_4 -0.1 M NaOH ปริมาตร 1.92-1.97 มล. กับ 10 mM gallic acid 1 มล. จากนั้นนำไป incubate ที่ 45 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุกๆ 3 นาที เป็นเวลา 30 นาที

2.6.4.2 การศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose ที่อุณหภูมิต่างกัน ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตเอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.1 M KH_2PO_4 -0.1 M NaOH 1.965 มล. และ 10 mM gallic acid 1 มล. ให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที

2.6.4.3 การศึกษาถึงผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose ที่ pH ต่างๆกัน ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตเอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ คือ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 3, 4, 5, 6, 7, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 , 8, 8.5 และ 0.2 M Glycine-0.2 M NaOH pH 9 ปริมาตร 1.965 มล. และ 10 mM gallic acid ปริมาตร 1 มล. ให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที

2.6.4.4 การหาสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตเอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 1.965 มล. และ สารละลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ซึ่งมีความเข้มข้น 10 mM คือ cholrogenic acid, DOPA, hydroquinone, gallic acid, p-cresol, pyrocatechol, pyrogallol , sinapic acid ปริมาตร 1 มล. ให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ที่เหมาะสม คือ 430, 460, 400, 600, 400, 400 ,600 และ 600 nm ตามลำดับ ทุก 3 นาที เป็นเวลา 12 นาที

2.6.4.5 การศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่มีต่อการทำงานของ เอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส

วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose เมื่อใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตเอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 1.965 มล. และ สารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 และ 40 mM ปริมาตร 1 มล. ซึ่งจะคิดเป็นความเข้มข้นในสารละลายปริมาตร 3 มล. ที่ใช้ในการหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ คือ 0.333, 0.833, 1.667, 2.500, 3.333, 6.667, 10.000 และ 13.333 mM ตามลำดับ ให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก 3 นาที เป็นเวลา 12 นาที

2.6.4.6 การศึกษาถึงผลของสารกระตุ้นและยับยั้งที่มีต่อการทำงานของ เอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส

วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose ต่อสารประกอบชนิดต่างๆ ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตเอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 1.765 มล. , สารละลาย 10 mM gallic acid ปริมาตร 1 มล. และสารประกอบชนิดต่างๆ คือ potassium metabisulphite, 2- mercaptoethanol, citric acid, CaCl_2 , NaCl, cysteine, sinapic acid ปริมาตร 0.2 มล. ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารเป็น 10 mM ให้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก 3 นาที เป็นเวลา 12 นาที

2.6.4.7 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส

ได้ศึกษาถึงความเสถียรของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสต่อ อุณหภูมิ pH และเวลา

ก. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

ปิเปตเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose แล้ว 35 μ l ใส่ในสารละลาย 0.1 M KH_2PO_4 -0.1 M NaOH 1.965 มล. จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยปิเปต gallic acid 1 มล. ใส่ลงไป นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที

ข. การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

ปิเปตเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose แล้ว 35 μ l ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ คือ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 3, 4, 5, 6, 7, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 8, 8.5 และ 0.2 M Glycine-0.2 M NaOH pH 9 ปริมาตร 0.5 มล. จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ดังวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยปิเปตสารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 1.465 มล. และ 10 mM gallic acid ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงไป นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุกๆ 3 นาที เป็นเวลา 12 นาที

ค. การศึกษาผลของเวลาต่อความเสถียรของเอนไซม์

วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่าน Con A Sepharose แล้วทำการแช่แข็งไว้ในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 7 วัน ตามวิธีการทดลองข้อ 2.6.2.1 โดยใช้เอนไซม์ 35 μ l ใส่ในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 1.965 มล. และสารละลาย 10 mM gallic acid ปริมาตร 1 มล. incubate ที่ 55 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 3 นาที เป็นเวลา 12 นาที