

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด

เมื่อนำกากมัสตาร์ดมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและไขมัน ได้ค่าดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลปริมาณโปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบในกากมัสตาร์ด

องค์ประกอบที่วิเคราะห์	ปริมาณ (%)
โปรตีน	19.34
ไขมัน	18.37

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่ากากมัสตาร์ดที่ได้หลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดมัสตาร์ด ยังคงมีปริมาณของโปรตีนและไขมันอยู่ค่อนข้างสูง คือ มีปริมาณโปรตีนอยู่ 19.34% และปริมาณไขมัน 18.37% จึงน่าจะเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นอาหารของคนหรือสัตว์

3.2 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและตกตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ด

3.2.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

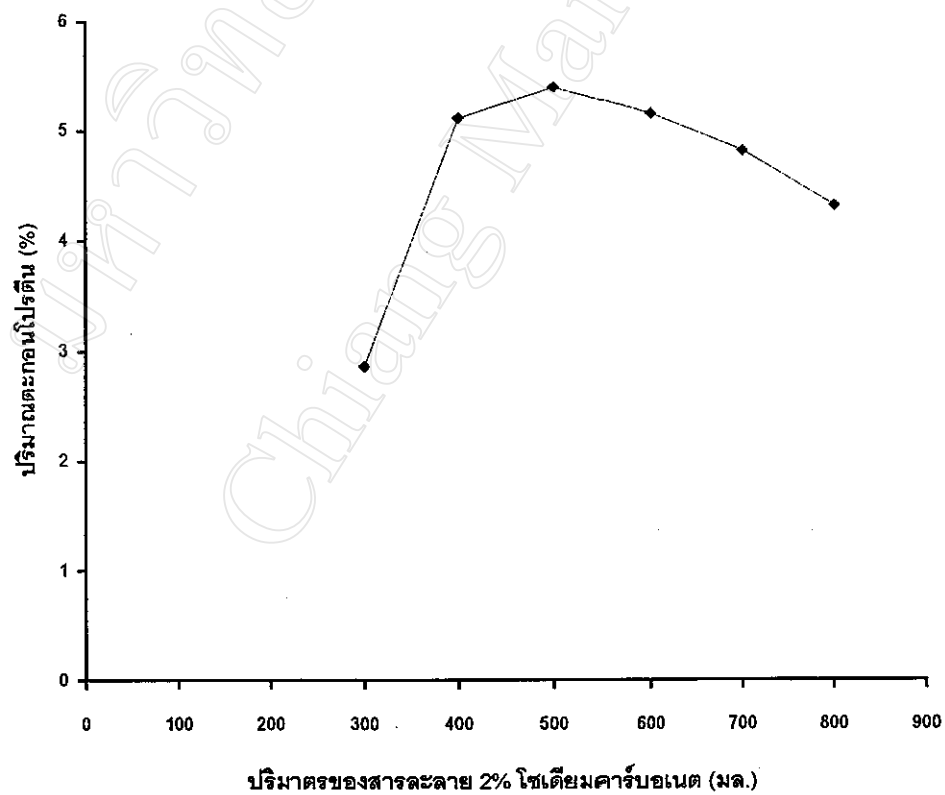
3.2.1.1 ผลการหาปริมาณของสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

เมื่อสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ด 50.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตรต่างๆ กัน คือ 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มล. แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 7.2 M HCl ได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.2

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.2 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.1 ซึ่งจะพบว่า เมื่อใช้สารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ในการสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ดจะได้ตะกอนโปรตีนออกมาในปริมาณมากที่สุด คือประมาณ 5.40% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งคิดเป็น 27.92% ของโปรตีนที่มีในกากมัสตาร์ด โดยปริมาตรขนาดนี้เพียงพอที่จะท่วมกากมัสตาร์ดได้หมดพอดี

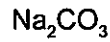
ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ในปริมาตรต่างๆ กัน

ปริมาตรของ 2% Na_2CO_3 (ml)	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
300	2.86	14.79
400	5.12	26.47
500	5.40	27.92
600	5.15	26.63
700	4.81	24.87
800	4.31	22.28



รูปที่ 3.1 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ในปริมาตรต่างๆ กัน

3.2.1.2 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2%

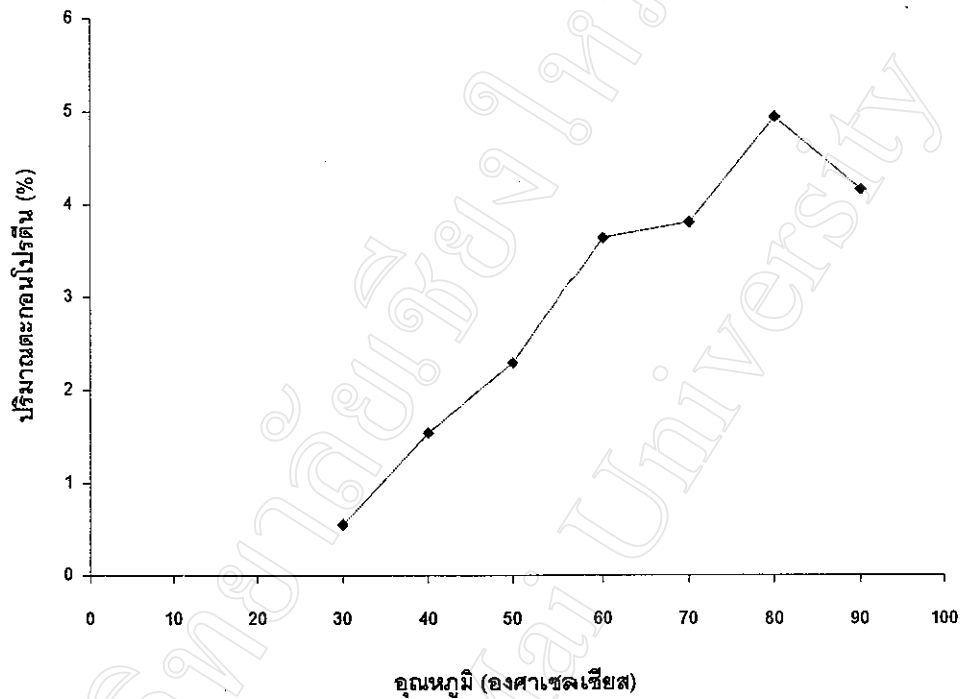


เมื่อสกัดกากมัสตาร์ด 50.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 7.2 M HCl ได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน

อุณหภูมิ (°C)	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
30	0.55	2.84
40	1.54	7.96
50	2.29	11.84
60	3.63	18.77
70	3.80	19.65
80	4.93	25.49
90	4.15	21.46

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.3 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.2 ซึ่งจะพบว่าเมื่อสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่อุณหภูมิสูงจะได้ตะกอนโปรตีนออกมาในปริมาณที่มากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ โดยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมามากที่สุดคือ 4.93% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งคิดเป็น 25.49% ของโปรตีนที่มีในกากมัสตาร์ด แต่ถ้าทำการสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง



รูปที่ 3.2 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน

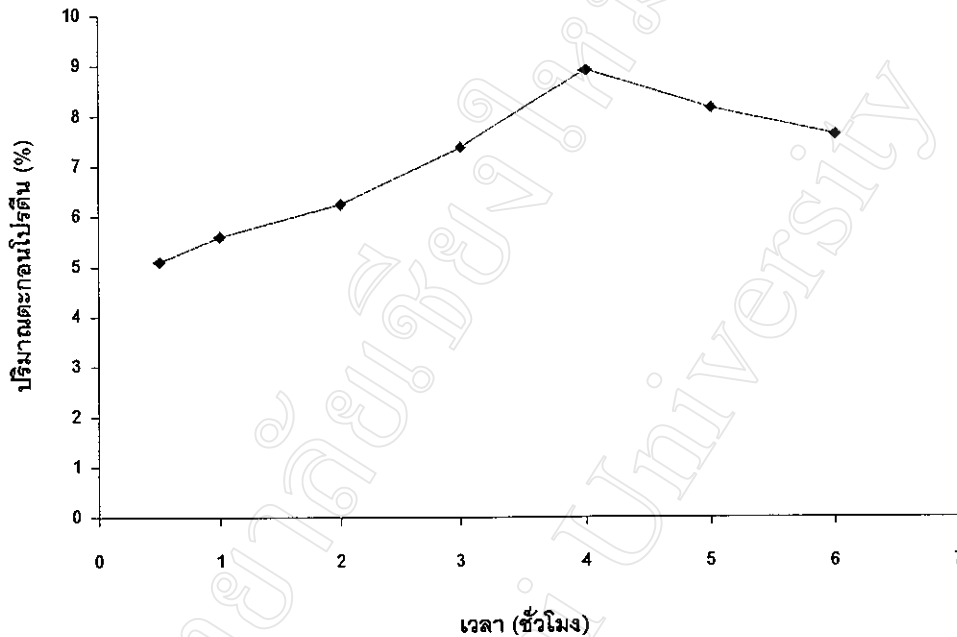
3.2.1.3 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

เมื่อสกัดกากมัสตาร์ด 50.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ที่ 80 องศาเซลเซียส ด้วยระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ที่เวลาต่างๆ กัน

เวลา (hr)	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
0.5	5.10	26.37
1	5.60	28.96
2	6.25	32.32
3	7.38	38.16
4	8.90	46.02
5	8.15	42.14
6	7.61	39.35

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.4 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.3 ซึ่งจะพบว่า ยิ่งถ้าสกัดโปรตีนเป็นเวลานานมากขึ้น ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะมากขึ้นตามจนกระทั่งถึงเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมาในปริมาณมากที่สุด คือ 8.90% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งคิดเป็น 46.02% ของโปรตีนที่มีอยู่ในกากมัสตาร์ด หลังจากนั้นหากใช้เวลาในการสกัดมากกว่านี้ ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะเริ่มลดลงตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเมื่อสกัดที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานเกินไป



รูปที่ 3.3 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่เวลาต่างๆ

3.2.2 ผลการหา pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$

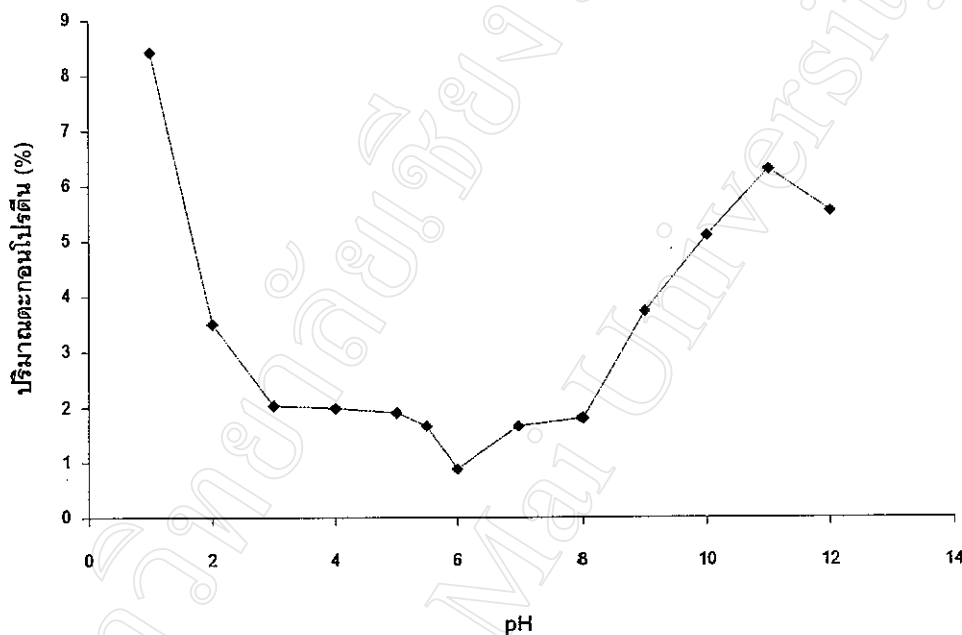
เมื่อสกัดกากมัสตาร์ด 25.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ซึ่งปรับ pH เป็น 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ปริมาตร 250 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 7.2 M HCl (สำหรับ pH 8-12) และ 6 M NaOH (สำหรับ pH 1-7) จะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่ pH ต่างๆ

pH	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
1	8.42	43.54
2	3.50	18.10
3	2.03	10.50
4	1.99	10.29
5	1.91	9.88
5.5	1.67	8.63
6	0.88	4.55
7	1.67	8.63
8	1.80	9.31
9	3.72	19.23
10	5.10	26.37
11	6.29	32.52
12	5.53	28.59

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.5 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.4 ซึ่งจะพบว่า การสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่ปรับ pH ก่อนไปทางกรดหรือด่าง จะให้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมามากกว่าการสกัดที่ pH เป็นกลาง โดยการสกัดในช่วงพีเอชที่เป็นกรด จะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนมากที่สุดเมื่อสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่ปรับ pH เป็น 1 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 8.42% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด คิดเป็น 43.54% ของโปรตีนที่มีอยู่ในกากมัสตาร์ด จากนั้นปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น จนกระทั่งถึง pH 6 ซึ่งจะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมาน้อยสุด จากนั้นตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตาม pH ที่สูงขึ้นจนกระทั่งถึง pH 11 ซึ่งได้ปริมาณโปรตีน 6.29% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด คิดเป็น 32.52% ของโปรตีนที่มีอยู่ในกากมัสตาร์ด ซึ่งจากผลการทดลองที่พบว่าการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่ปรับ pH เป็น 1 ให้ปริมาณตะกอนโปรตีนสูงสุด อีกทั้งตะกอนที่ได้

ก็มีลักษณะค่อนข้างแห้งและมีสีขาวต่างจากการสกัดด้วยสภาวะที่เป็นต่างซึ่งได้ตะกอนโปรตีนที่มีลักษณะค่อนข้างชื้นและมีสีดำ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ ที่ปรับ pH เป็น 1



รูปที่ 3.4 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2 % (NaPO_3)₆ ซึ่งปรับ pH ต่างๆ

3.2.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2 % (NaPO_3)₆ pH 1

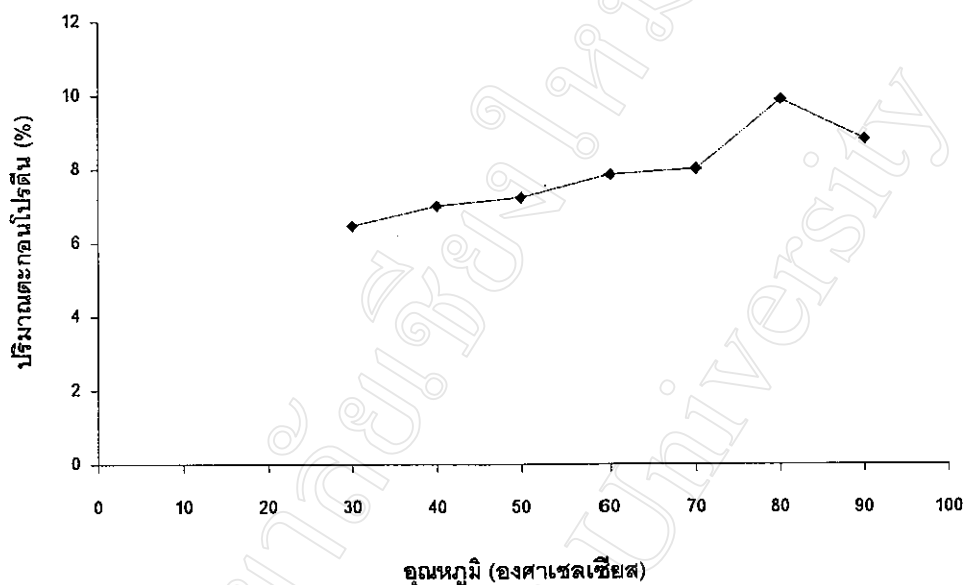
3.2.3.1 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2 % (NaPO_3)₆ pH 1

เมื่อสกัดกากมัสตาร์ด 25.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2 % (NaPO_3)₆ ซึ่งปรับ pH เป็น 1 ปริมาตร 250 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 6 M NaOH ได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
30	6.45	33.35
40	7.00	36.19
50	7.23	37.38
60	7.83	40.49
70	8.00	41.36
80	9.88	51.08
90	8.80	45.50

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.6 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.5 ซึ่งจะพบว่า การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 1 ที่อุณหภูมิสูงจะให้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมามากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ โดยตะกอนโปรตีนที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น จนสูงที่สุดที่ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้ปริมาณโปรตีน 9.88% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งคิดเป็น 51.08% ของโปรตีนที่มีอยู่ในกากมัสตาร์ด แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดให้สูงกว่านี้แล้ว ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะเริ่มลดลง



รูปที่ 3.5 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมันฝรั่งด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.2.3.2 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2%

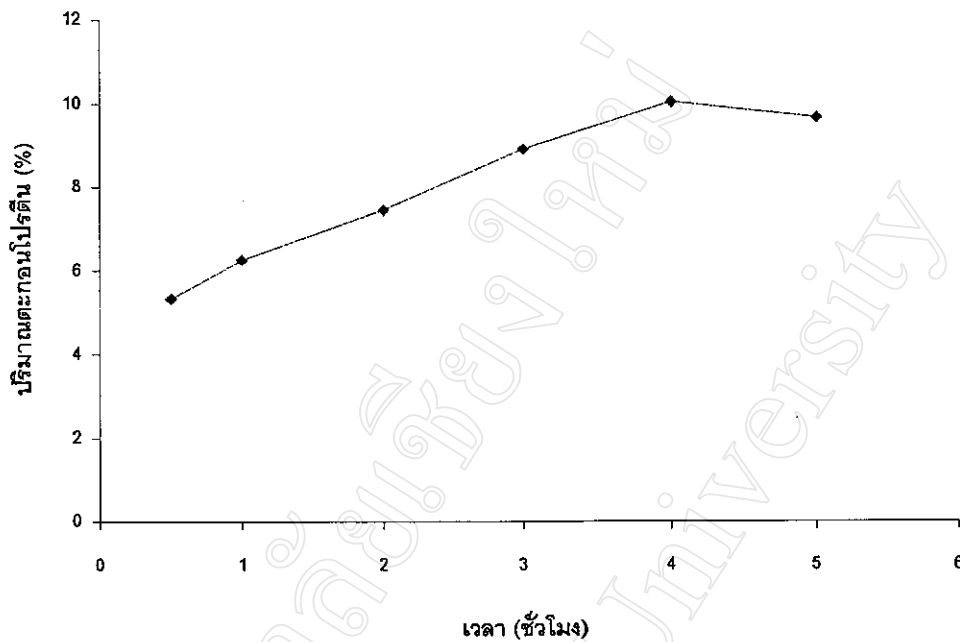
$(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1

เมื่อสกัดกากมันฝรั่ง 25.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2 % $(\text{NaPO}_3)_6$ ซึ่งปรับ pH เป็น 1 ปริมาตร 250 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน คือ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 6 M NaOH ได้ปริมาณตะกอนโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	% โปรตีน (เทียบกับน้ำหนักกาก)	% โปรตีน (เทียบกับโปรตีนในกาก)
0.5	5.33	27.56
1	6.25	32.32
2	7.44	38.47
3	8.90	46.02
4	10.02	51.81
5	9.63	49.79

จากตารางที่ 3.7 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.6 ซึ่งจะพบว่าหากใช้เวลาในการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 นานขึ้น ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึงเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ปริมาณตะกอนโปรตีนออกมามากที่สุด คือ ประมาณ 10.02% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งคิดเป็น 51.81% ของโปรตีนที่มีอยู่ในกากมัสตาร์ด จากนั้น หากเพิ่มเวลาในการสกัด ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ก็จะลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเมื่อสกัดที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานเกินไป



รูปที่ 3.6 แสดงปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ที่เวลาต่างๆ

3.2.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนจากกากมัสตาร์ด

3.2.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

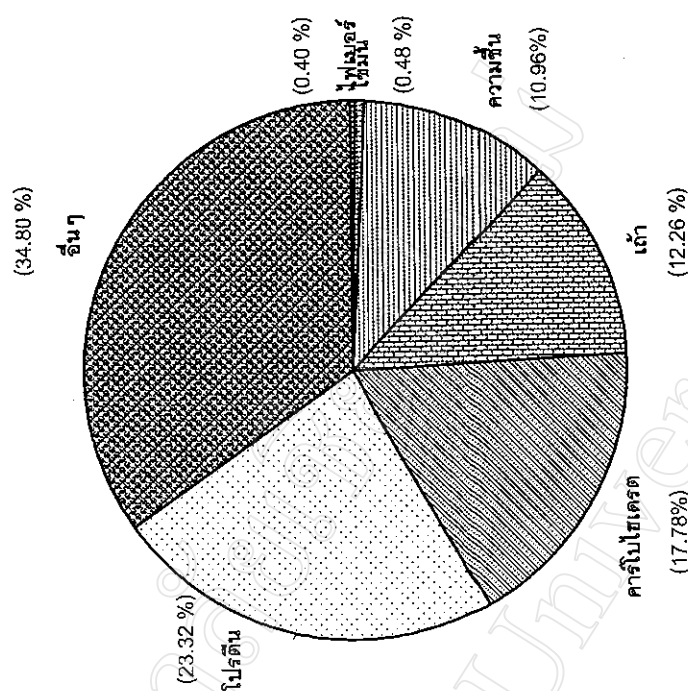
เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ด 50.00 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไฟเบอร์ ไขมัน และโปรตีน ได้ผลดังตารางที่

3.8

ตารางที่ 3.8 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่ได้จากตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ดที่สกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	10.96
เถ้า	12.26
ไฟเบอร์	0.40
ไขมัน	0.48
โปรตีน	23.32
คาร์โบไฮเดรต	17.78

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.8 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.7 ซึ่งจะพบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณที่สูงสุด คือประมาณ 23.32% ของน้ำหนักตะกอนโปรตีน รองลงมาก็เป็นคาร์โบไฮเดรต เถ้า และความชื้น ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 17.78, 12.26 และ 10.96% ตามลำดับ นอกจากนี้ก็ยังมีไขมันและไฟเบอร์อยู่ด้วยในปริมาณที่น้อยมากคือ 0.48 และ 0.40% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า ผลรวมขององค์ประกอบที่วิเคราะห์ทั้งหมดนี้คิดเป็น 65.2 % ของน้ำหนักตะกอนโปรตีนเท่านั้น แสดงว่าอาจจะมีการสูญหายไปขององค์ประกอบบางอย่างในระหว่างการวิเคราะห์ได้



รูปที่ 3.7 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่วิเคราะห์จากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมันสำปะหลังด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

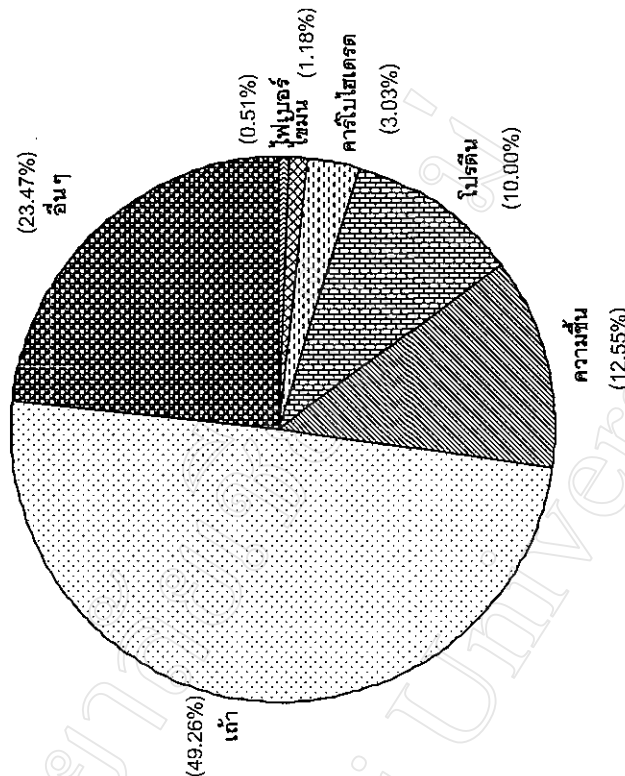
3.2.4.1 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1

เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมันสำปะหลัง 50 กรัม ด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไฟเบอร์ ไขมัน และโปรตีน ได้ผลดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่ได้จากตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ดที่สกัดด้วยสารละลาย 2%(NaPO₃)₆ pH 1

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	12.55
เถ้า	49.26
ไฟเบอร์	0.51
ไขมัน	1.18
โปรตีน	10.00
คาร์โบไฮเดรต	3.03

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.9 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.8 ซึ่งจะพบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2%(NaPO₃)₆ pH 1 ประกอบด้วยเถ้าในปริมาณสูงที่สุด คือ 49.26% รองลงมาเป็นความชื้น 12.55% ในขณะที่มีโปรตีนอยู่เพียง 10.00% เท่านั้น ส่วนคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และไฟเบอร์มีอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย คือ 3.03, 1.18 และ 0.51% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าผลรวมขององค์ประกอบที่วิเคราะห์ทั้งหมดนี้คิดเป็น 76.53% ของน้ำหนักตะกอนโปรตีนเท่านั้น



รูปที่ 3.8 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆที่วิเคราะห์จากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2%(NaPO₃)₆ pH 1

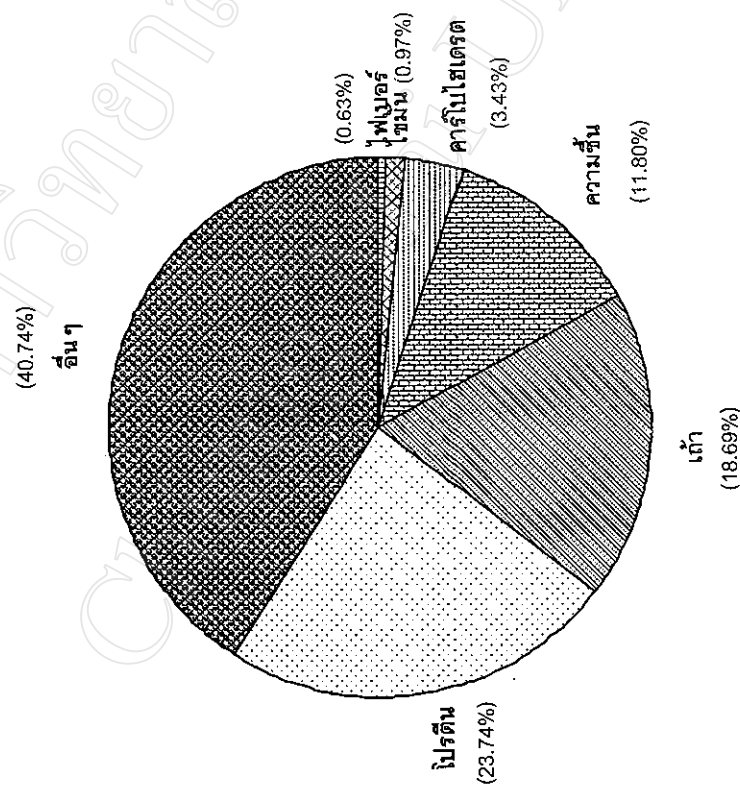
3.2.4.2 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลาย 2% (NaPO₃)₆ pH 11

เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ด 50 กรัม ด้วยสารละลาย 2% (NaPO₃)₆ pH 11 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ความชื้น แก้ว ไฟเบอร์ ไขมัน และโปรตีน ได้ผลดังตารางที่ 3.10

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.10 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.9 ซึ่งจะพบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2%(NaPO₃)₆ pH 11 ประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณสูงสุด คือ 23.74% ของน้ำหนักตะกอนโปรตีน รองลงมาเป็น แก้ว และความชื้น ประมาณ 18.69 และ 11.80% ตามลำดับ ส่วนคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และไฟเบอร์มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก คือ 3.43, 0.97 และ 0.63% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่า ผลรวมขององค์ประกอบทั้งหมดที่วิเคราะห์นี้คิดเป็น 59.26% ของน้ำหนักตะกอนโปรตีนเท่านั้น

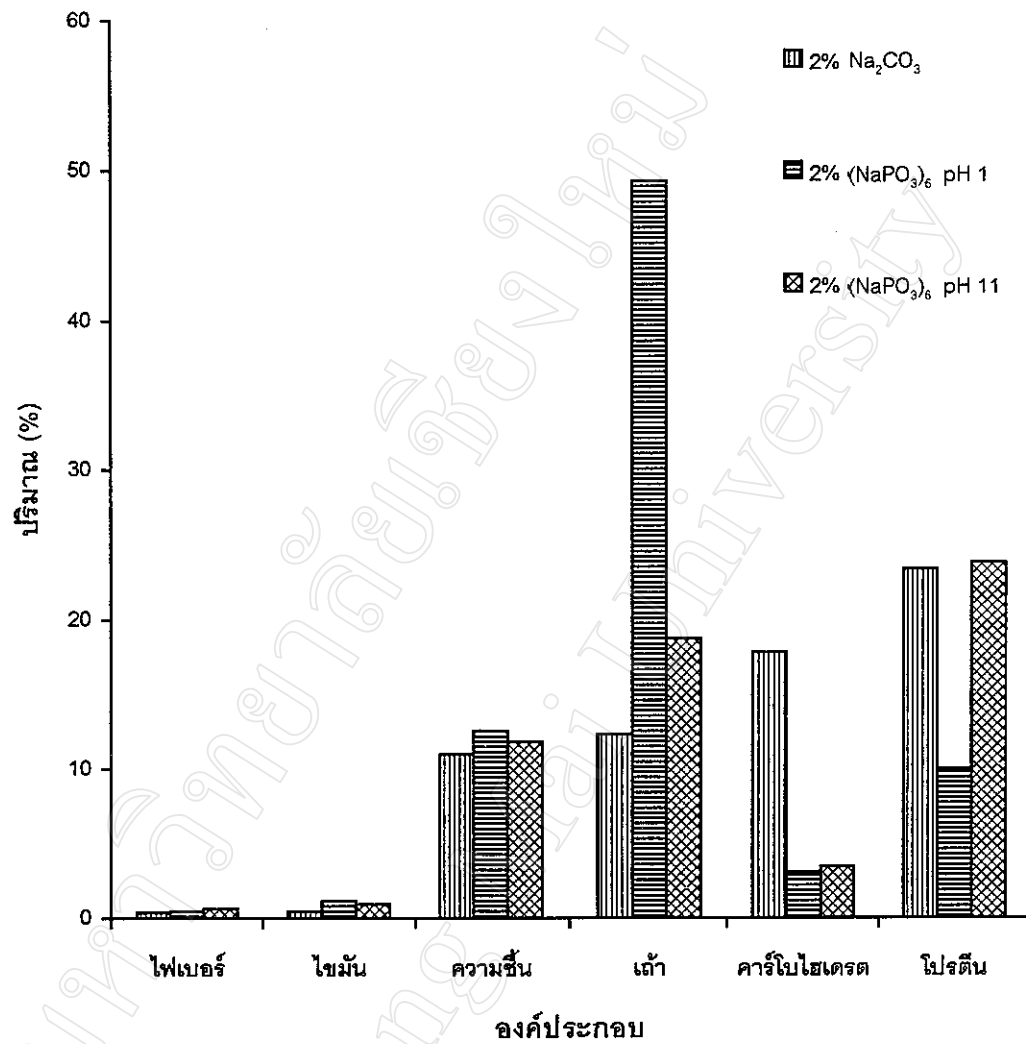
ตารางที่ 3.10 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่ได้จากตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ดที่สกัดด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 11

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	11.80
เถ้า	18.69
ไฟเบอร์	0.63
ไขมัน	0.97
โปรตีน	23.74
คาร์โบไฮเดรต	3.43



รูปที่ 3.9 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ ที่วิเคราะห์จากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% (NaPO_3)₆ pH 11

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบต่างๆ คือ ความชื้น เถ้า ไฟเบอร์ ไขมัน และโปรตีน ของ ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมีสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.10 ซึ่งจะพบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดทั้งสามแบบ มีปริมาณโปรตีนอยู่จริงค่อนข้างน้อย คือประมาณ 23.32, 10.00 และ 23.74% ของน้ำหนักตะกอนโปรตีน ตามลำดับ โดยเฉพาะตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 พบว่ามีเถ้าอยู่ในปริมาณที่มากกว่าโปรตีนด้วยโดยมีถึง 49.26% ส่วนปริมาณความชื้นของตะกอนโปรตีนทั้งสามแบบจะใกล้เคียงกันโดยเฉลี่ยประมาณ 11.77% สำหรับไขมันและไฟเบอร์นั้นก็จะมีปริมาณใกล้เคียงกันและค่อนข้างน้อยมากโดยเฉลี่ย 0.88 และ 0.51% ตามลำดับ สำหรับปริมาณเถ้า นั้นจะพบว่า การสกัดกากมีสตาร์ดด้วยสารละลายที่มี pH ค่อนไปทางเบสคือสกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ซึ่งมี pH ประมาณ 10 และสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 จะได้ตะกอนโปรตีนที่มีปริมาณเถ้าที่ใกล้เคียงกันและน้อยกว่าการสกัดด้วยสภาวะที่เป็นกรด คือโดยเฉลี่ยประมาณ 15.48% ส่วนการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ซึ่งมีความเป็นกรดสูง จะได้ตะกอนโปรตีนที่มีปริมาณเถ้าอยู่สูงมากถึง 49.26% สำหรับคาร์โบไฮเดรตนั้น พบว่า การสกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ค่อนข้างสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ คือ ประมาณ 17.78% ส่วนการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ pH 11 จะได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ใกล้เคียงกันและค่อนข้างน้อย คือโดยเฉลี่ยประมาณ 3.23%



รูปที่ 3.10 แสดงปริมาณขององค์ประกอบต่างๆที่วิเคราะห์จากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมันต์ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11

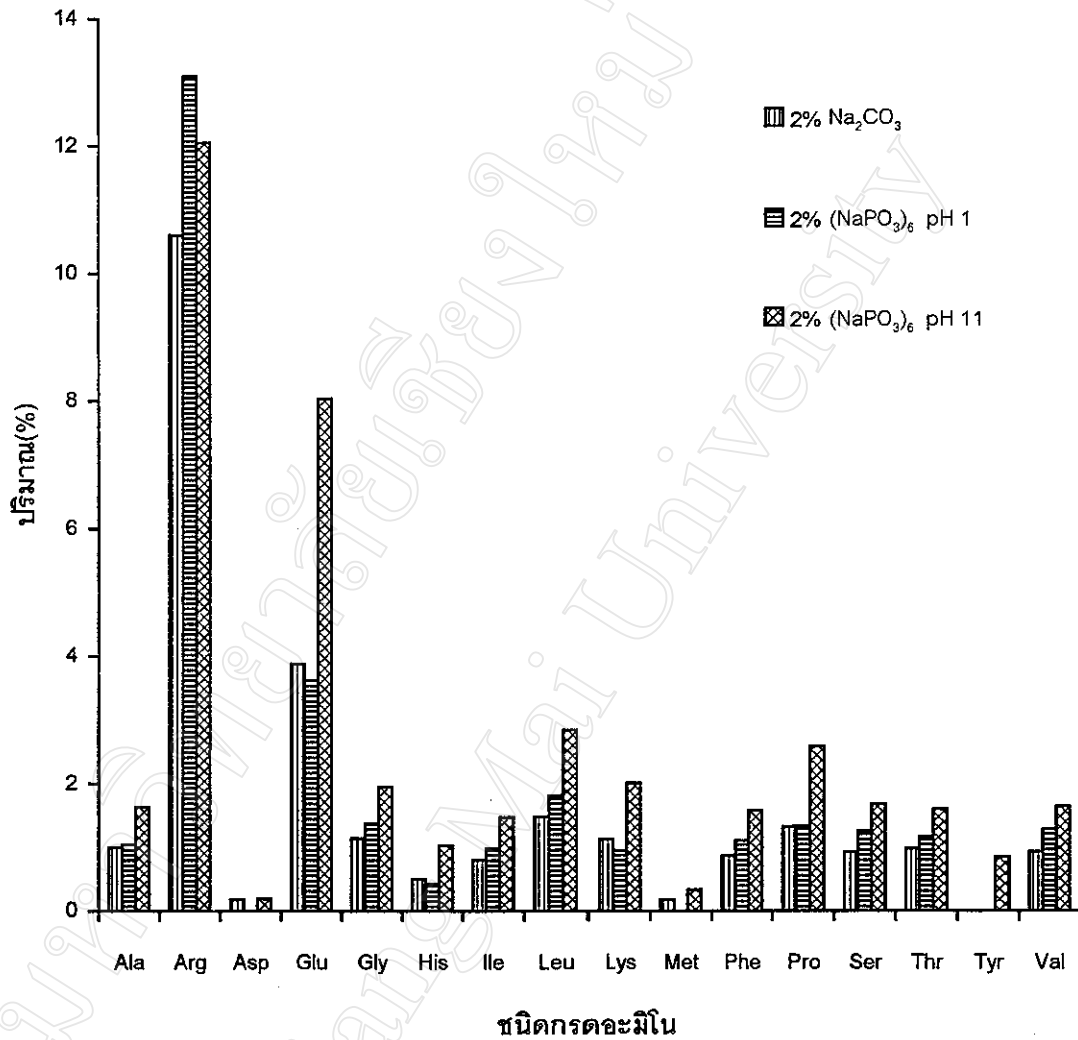
3.2.5 ผลการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน จากกากมัสตาร์ด

เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ด 50 กรัม ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ปริมาตร 5000 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 ปริมาตร 500 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ในตะกอนโปรตีนนั้นๆ ได้ผลดังตารางที่ 3.11

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.11 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.11 ซึ่งจะพบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 มีกรดอะมิโนอยู่เกือบครบถ้วน ขาดเพียง Cysteine ที่ไม่พบอยู่ในตะกอนโปรตีนทั้งสาม นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอะมิโนที่พบมากที่สุด ในตะกอนโปรตีนทั้งสามแบบจะเป็นชนิดเดียวกัน คือ Arginine รองลงมาได้แก่ Glutamic acid ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ จะพบในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตารางที่ 3.11 แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ในตะกอนโปรตีนที่ได้
จากการสกัดกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1
และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณของกรดอะมิโน (g/100g)		
	2% Na_2CO_3	2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1	2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11
Alanine	1.00	1.04	1.63
Arginine	10.60	13.1	12.05
Aspartic acid	0.18	-	0.19
Cysteine	-	-	-
Glutamic acid	3.88	3.62	8.04
Glycine	1.14	1.37	1.95
Histidine	0.50	0.42	1.03
Isoleucine	0.81	0.98	1.47
Leucine	1.48	1.81	2.84
Lysine	1.13	0.95	2.01
Methionine	0.18	-	0.33
Phenylalanine	0.87	1.10	1.57
Proline	1.32	1.33	2.58
Serine	0.93	1.25	1.67
Threonine	0.98	1.16	1.59
Tyrosine	-	-	0.85
Valine	0.93	1.28	1.63



รูปที่ 3.11 แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ในตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากกล้ามเนื้อสัตว์ด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11

3.3 ผลการตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ด และ สารสกัดโปรตีนจากกากและเมล็ดมัสตาร์ด

3.3.1 คุณสมบัติต่างๆของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA), ferulic acid, gallic acid, hydroquinone, protocatechuic acid, pyrogallol, sinapic acid และ syringic acid มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้น 0.01 M แล้วหยดบนโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ benzene-methanol-acetic acid เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ แล้วตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ การเรืองแสงภายใต้รังสีอุลตราไวโอเลต ค่า R_f และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.12 แสดงผลการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน

ชนิดของ สารประกอบฟีนอลิก	คุณสมบัติ			
	R_f	สีที่เห็นภายใต้ รังสีอุลตรา ไวโอเลต	สีที่เห็นเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารต่างๆ	
			p-nitroaniline	Hoepfner
caffeic acid	0.12	น้ำเงิน	น้ำตาล	น้ำตาล
chlorogenic acid	-	เขียว	-	-
coumaric acid	0.29	เขียว	เหลืองส้ม	เหลือง
DOPA	0.39	ดำ	-	-
ferulic acid	0.42	น้ำเงิน	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม
gallic acid	0.05	ดำ	เทา	น้ำตาล
hydroquinone	0.22	ดำ	น้ำตาล	น้ำตาล
protocatechuic acid	0.09	ดำ	น้ำตาล	เหลืองส้ม
pyrocatechol	0.40	ดำ	เทา	น้ำตาล
pyrogallol	0.18	ดำ	น้ำตาล	น้ำตาล
sinapic acid	0.43	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.48	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
syringic acid	0.37	ดำ	เหลืองส้ม	เหลือง

3.3.2 ผลการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกตัวอย่างที่ได้จากการสกัดกากมัสตาร์ด (รูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกาก) มาตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบค่า R_f การเรืองแสงภายใต้รังสีอุลตราไวโอเลต และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแล้ว ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.13

ตารางที่ 3.13 แสดงผลการตรวจสอบสมบัติต่างๆของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกากมัสตาร์ด

สารประกอบฟีนอลิก	คุณสมบัติ			
	R_f	สีที่เห็นภายใต้รังสีอุลตราไวโอเลต	สีที่เห็นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ	
			p-nitroaniline	Hoepfner
รูปอิสระ	0.12	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.49	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.54	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปเอสเทอร์	0.12	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.49	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.54	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปจับกับกาก	0.11	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.48	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.13 เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแล้ว จะพบ sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในกากมัสตาร์ดทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกาก โดยจะมีอยู่สอง isoform คือ cis และ trans นอกจากนี้ในกากมัสตาร์ดยังประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่สามารถตรวจสอบได้อีกหนึ่งชนิดด้วย

3.3.3 ผลการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมันสตาร์ต

3.3.3.1 ผลการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมันสตาร์ตโดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง

เมื่อนำสารละลายที่ได้หลังการสกัดและตกตะกอนโปรตีนจากกากมันสตาร์ตออกไปแล้ว มาสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยสารละลาย ethyl acetate แล้วตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบค่า R_f การเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆ กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแล้ว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.14

ตารางที่ 3.14 แสดงผลการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดโปรตีนของกากมันสตาร์ต โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง

สารประกอบฟีนอลิก	คุณสมบัติ					
	R_f		สีที่เห็นภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต	สีที่เห็นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ		
	1 st	2 nd		NH ₃	p-nitroaniline	Hoepfner
ตัวอย่าง	0.28	0.85	น้ำเงิน	น้ำตาล	ชมพู	ชมพู
sinapic acid	0.52	0.85	น้ำเงิน	น้ำตาล	ชมพู	ชมพู
	0.28	0.85	น้ำเงิน	น้ำตาล	ชมพู	ชมพู
	0.53	0.85	น้ำเงิน	น้ำตาล	ชมพู	ชมพู

1st = เมื่อใช้สารละลาย 2% acetic acid เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่

2nd = เมื่อใช้สารละลาย n-butanol-acetic acid-water (6:1:2 v/v/v) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่

p-nitroaniline = 0.5% p-nitroaniline ในสารละลาย 2 N HCl : สารละลาย 5% sodium nitrite : สารละลาย 20% sodium acetate เท่ากับ 1.5 : 0.5 : 20 v/v/v

Hoepfner = สารละลาย 1% sodium nitrite ในสารละลาย 10% acetic acid

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.14 จะพบว่า sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในกากมัสตาร์ดภายหลังจากแยกโปรตีนออกไปแล้ว โดย sinapic acid ที่พบจะมีอยู่ 2 isoform

3.3.3.2 ผลการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ด โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกตัวอย่างที่ได้จากกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 (รูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก) มาตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบค่า R_f การเรืองแสงภายใต้รังสีอุลตราไวโอเลต และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแล้ว ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.15

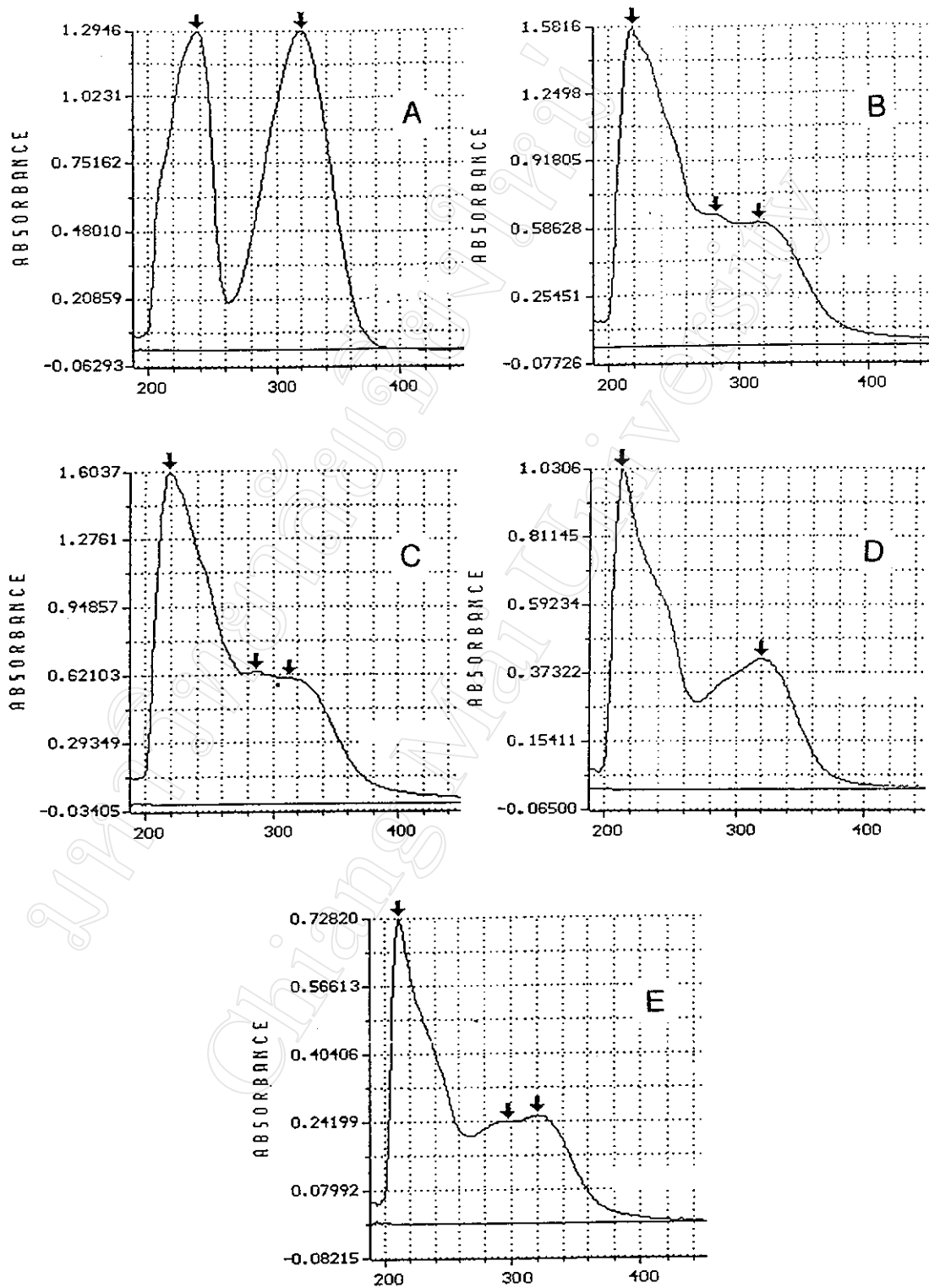
จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.15 จะพบว่า sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนออกไปแล้ว ทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิกอีกหนึ่งชนิดที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วย

ตารางที่ 3.15 แสดงผลการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดโปรตีนของกากมันสตาร์ด โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

สารประกอบฟีนอลิก	คุณสมบัติ			
	R _f	สีที่เห็นภายใต้รังสีอุลตราไวโอเลต	สีที่เห็นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ	
			p-nitroaniline	Hoepfner
รูปอิสระ	0.10	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.44	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.48	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปเอสเทอร์	0.10	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.42	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.50	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปจับกับโปรตีน	0.10	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.42	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปจับกับกาก	0.10	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.42	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู

3.3.3.3 ผลการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดโปรตีนของกากมันสตาร์ด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกากมันสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na₂CO₃ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 200-800 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.13 ซึ่งจะพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งที่อยู่ในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ประมาณ 220 nm นอกจากนี้ยังให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 nm ซึ่งจะตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน sinapic acid ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 และ 320 nm



รูปที่ 3.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกาก
มัสตาร์ด (A) Sinapic acid (B) รูปอิสระ (C) รูปเอสเทอร์ (D) รูปจับกับโปรตีน (E) รูปจับกับกาก

3.3.4 ผลการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของเมล็ดมันสำปะรด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกตัวอย่างที่ได้จากเมล็ดมันสำปะรดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 (รูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก) มาตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบค่า R_f การเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานแล้ว ได้การทดลองแสดงดังตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 แสดงผลการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดโปรตีนของเมล็ดมันสำปะรดโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

สารประกอบฟีนอลิก	คุณสมบัติ			
	R_f	สีที่เห็นภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต	สีที่เห็นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ	
			p-nitroaniline	Hoepfner
รูปอิสระ	0.11	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.41	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.46	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปเอสเทอร์	0.11	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.40	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
	0.46	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปจับกับโปรตีน	0.11	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.40	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู
รูปจับกับกาก	0.11	เขียว	น้ำตาล	น้ำตาล
	0.42	น้ำเงิน	ชมพู	ชมพู

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.16 จะพบ sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในเมล็ดมัสตาร์ดทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก นอกจากนี้ยังพบสารประกอบฟีนอลิกอีกตัวหนึ่งที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วย

จากผลการทดลองหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากกากมัสตาร์ด เมล็ดมัสตาร์ดและกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ดังตารางที่ 3.13-3.16 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f การเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากทั้งสามแหล่งข้างต้น ไม่ว่าจะด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง หรือโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง จะพบ sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก โดยจะให้คุณสมบัติต่างๆที่เหมือนกับสารประกอบมาตรฐาน sinapic acid คือ จะมีค่า R_f อยู่ 2 ค่า ที่ประมาณ 0.43 และ 0.48 ซึ่งเป็น cis และ trans form จะเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และจะให้สีชมพูเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner อย่างไรก็ตามยังมีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเรืองแสงสีเขียวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และให้สีน้ำตาลเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner ที่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้เมื่อเทียบกับสารประกอบฟีนอลมาตรฐานที่มีอยู่

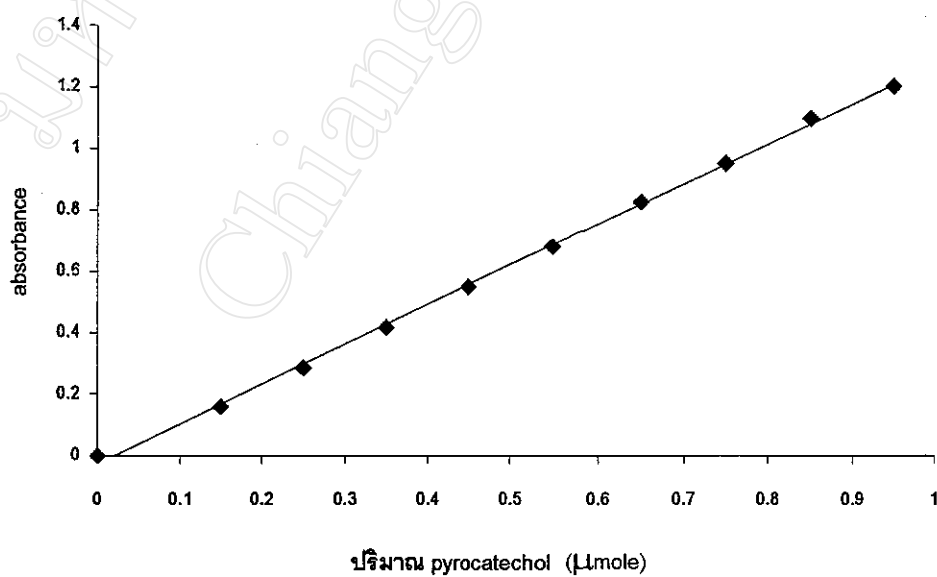
3.3.5 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

เมื่อนำสารละลาย pyrocatechol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังจากการเติมสารละลาย Folin-denis และสารละลายยิมตัวของ Na_2CO_3 ดังตารางที่ 2.2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 แสดงผลการทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย pyrocatechol

ปริมาตรของ pyrocatechol (มล.)	ปริมาณของ pyrocatechol (μmole)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.15	15	0.160
0.25	25	0.285
0.35	35	0.415
0.45	45	0.550
0.55	55	0.680
0.65	65	0.825
0.75	75	0.950
0.85	85	1.095
0.95	95	1.200

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.17 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 แสดงผลการทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย pyrocatechol

3.3.6 ผลการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกากจากกากมัสตาร์ดไปเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2.2 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย pyrocatechol ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.18

ตารางที่ 3.18 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกากจากกากมัสตาร์ด

สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณ (mg/100 g meal)	ปริมาณ (mg/100 g กาก)
รูปอิสระ	60.78	-
รูปเอสเทอร์	28.97	-
รูปจับกับกาก	22.60	26.93

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.18 จะพบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกากมัสตาร์ด จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระมากที่สุด คือ 60.78 mg/100 g meal ส่วนรูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกากจะมีปริมาณใกล้เคียงกันโดยมีเพียงประมาณครึ่งหนึ่งของรูปอิสระ คือ 28.97 และ 22.60 mg/100 g meal ตามลำดับ

3.3.7 ผลการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีนและรูปที่จับกับกากจากกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วย 2% Na_2CO_3 ไปเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2.2 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย pyrocatechol ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.19

ตารางที่ 3.19 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากจากสารสกัดโปรตีนของกากมัสตาร์ด

สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณ (mg/100 g meal)	ปริมาณ (mg/100 g โปรตีนหรือกาก)
รูปอิสระ	37.9	-
รูปเอสเทอร์	15.1	-
รูปจับกับโปรตีน	7.7	158.5
รูปจับกับกาก	36.7	39.5

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.19 จะพบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระมากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับรูปที่จับกับกาก คือ 37.9 และ 36.7 mg/100 g meal ตามลำดับ ส่วนรูปเอสเทอร์จะพบประมาณครึ่งหนึ่งของรูปอิสระและรูปที่จับกับกาก คือ 15.1 mg/100 g meal ในขณะที่รูปที่จับกับโปรตีนจะพบในปริมาณค่อนข้างน้อยเพียง 7.7 mg/100 g meal แต่ถ้าเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปจับกับโปรตีนกับโปรตีนที่สกัดได้จากกากมัสตาร์ดแล้ว จะพบว่า โปรตีนที่สกัดได้นั้นมีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 158.5 mg/100 g ของโปรตีนที่แยกได้นั้น

3.3.8 ผลการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดโปรตีนของเมล็ดมัสตาร์ด

เมื่อนำสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีนและรูปที่จับกับกากจากเมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ไปเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2.2 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย pyrocatechol ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.20

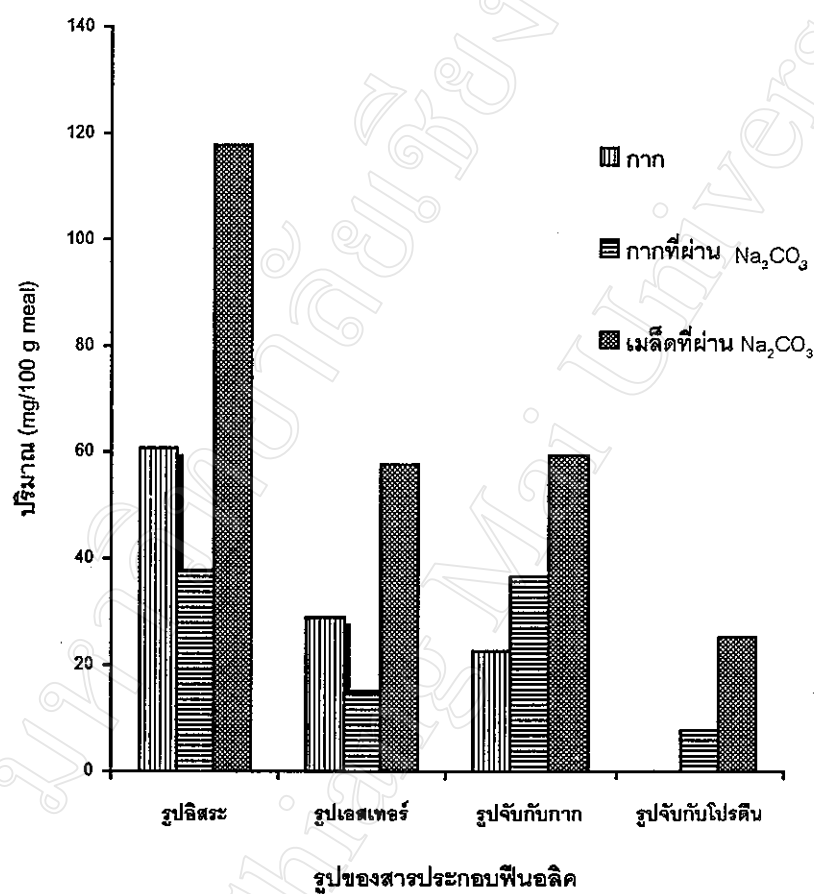
ตารางที่ 3.20 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากจากสารสกัดโปรตีนของเมล็ดมัสตาร์ด

สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณ (mg/100 g เมล็ด)	ปริมาณ (mg/100 g โปรตีนหรือกาก)
รูปอิสระ	117.8	-
รูปเอสเทอร์	57.6	-
รูปจับกับโปรตีน	25.2	239.7
รูปจับกับกาก	59.3	106.8

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.20 จะพบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากเมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระมากที่สุด คือ 117.8 mg/100 g เมล็ด รองลงมาคือรูปที่จับกับกากและรูปเอสเทอร์ ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันประมาณครึ่งหนึ่งของรูปอิสระ คือ 59.3 และ 57.6 mg/100 g เมล็ด ตามลำดับ ในขณะที่รูปที่จับกับโปรตีนจะพบในปริมาณน้อยที่สุด คือ 25.2 mg/100 g เมล็ด แต่หากเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปจับกับโปรตีนกับโปรตีนที่สกัดได้แล้ว จะพบว่าโปรตีนที่แยกออกมาได้นั้น มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ด้วยในปริมาณ 239.7 mg/100 g ของโปรตีนที่แยกได้ ส่วนกากจะมีสารประกอบฟีนอลิก 106.8 mg/100 g ของกาก

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.18 , 3.19 และ 3.20 สามารถนำมาแสดงเปรียบเทียบเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.14 ซึ่งจะพบว่า เมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทุกรูปมากที่สุด คือ 259 mg/100 g seed รองลงมาคือกากมัสตาร์ด ซึ่งมีปริมาณ 112.35 mg/100 g meal และสุดท้ายคือ กากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ซึ่งมีปริมาณ 97.7 mg/100 g meal ซึ่งจากผลการทดลองที่กากมัสตาร์ดทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการสกัดโปรตีนออกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และน้อยกว่าเมล็ดมัสตาร์ดอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งนั้นแสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่ใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย allyl isothiocyanate จนได้กากมัสตาร์ดเป็นของเหลือมานี้ มีผลทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในกากมัสตาร์ดลดลงกว่าในเมล็ดมัสตาร์ดถึงประมาณหนึ่งเท่าตัว

นอกจากนี้พบว่า โปรตีนที่สกัดจากกากและเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลาย Na_2CO_3 มีสารประกอบฟีนอลิครวมอยู่ด้วยในปริมาณ 158.5 และ 239.7 mg/100 g ของโปรตีนตามลำดับ ซึ่งอาจมีผลทำให้โปรตีนที่ได้นี้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่



รูปที่ 3.14 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก จากกากมัสตาร์ด เมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 และกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3

3.4 ผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการ

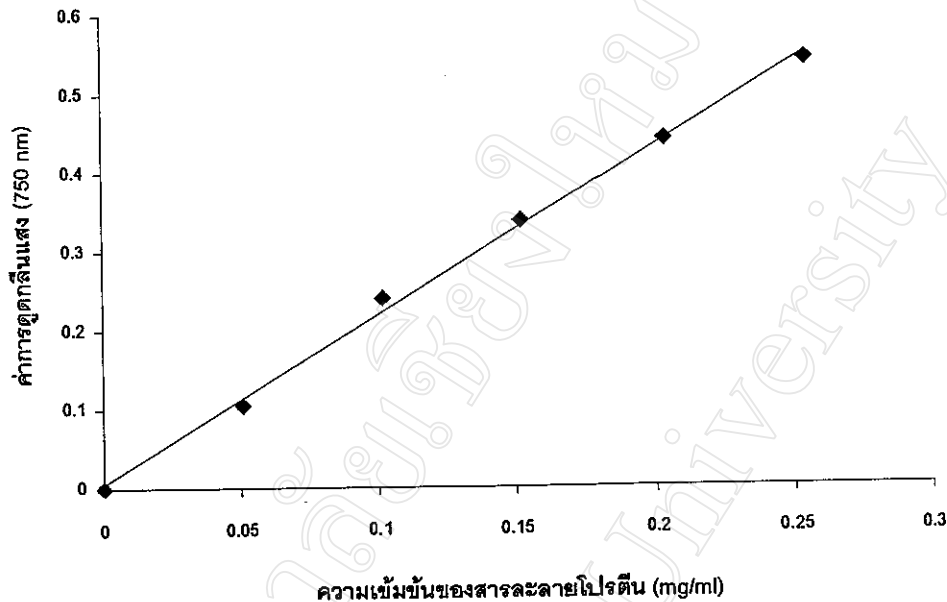
3.4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ได้กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin ดังแสดงในตารางที่ 3.21

ตารางที่ 3.21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm สำหรับหาปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum albumin ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm
0	0
50	0.105
100	0.240
150	0.338
200	0.440
250	0.540

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.21 สามารถนำไปเขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนได้ดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.15 แสดงผลการทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนของสารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ยังไม่บริสุทธิ์

3.4.2.1 ผลการศึกษาหาสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ caffeic acid, chlorogenic acid, DOPA, gallic acid, hydroquinone, pyrogallol, pyrocatechol, p-cresol, tyrosine ได้ค่าประสิทธิภาพการทำงานดังแสดงในตารางที่ 3.22 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดเมื่อใช้ pyrogallol เป็นสับสเตรท รองลงมาคือ gallic acid ซึ่งจะพบว่าสับสเตรททั้งสองเป็นสารประกอบฟีนอลิกประเภท polyphenol สำหรับสับสเตรทประเภท diphenol ซึ่งได้แก่ hydroquinone, DOPA, pyrocatechol, caffeic acid เอนไซม์ก็พอจะทำงาน

ได้บ้าง แต่สำหรับสับสเตรทประเภท monophenol ซึ่งได้แก่ p-cresool และ tyrosine นั้น เอนไซม์ไม่สามารถทำงานเร่งปฏิกิริยาได้เลย ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกเอา gallic acid มาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เนื่องจาก pyrogallol ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงมาก และไม่ค่อยเสถียร

ตารางที่ 3.22 แสดงผลของสับสเตรทชนิดต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ชนิดของสับสเตรท	Activity (units/ml)
Caffeic acid	10
Cholrogenic acid	0
DOPA	24
Gallic acid	84
Hydroquinone	20
Pyrogallol	234
Pyrocatechol	16
p-cresol	0
Tyrosine	0

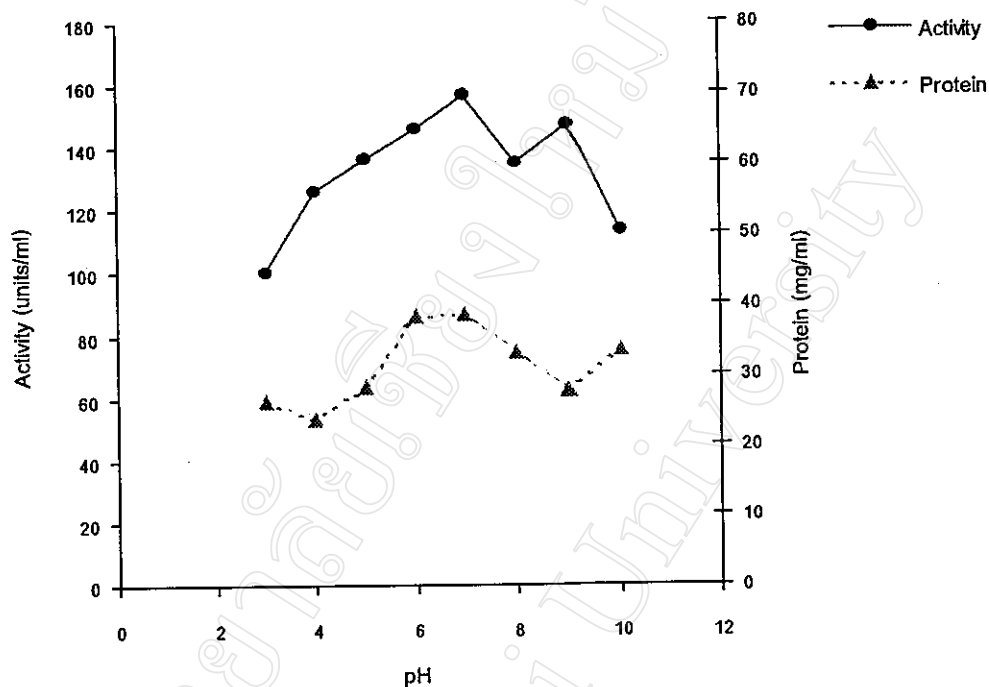
3.4.2.2 ผลการหา pH ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ กันได้แก่ สารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 3, 4, 5, 6 และ 7, 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.2 M Glycine-NaOH pH 9 และ 0.2 M Glycine-NaOH pH 10 แล้วเปรียบเทียบวัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ พร้อมทั้งหาค่า specific activity ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.23

ตารางที่ 3.23 แสดงผลของ pH ที่ใช้สกัดต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ชนิดและ pH ของสารละลาย บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด	Activity (units/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 3	100	26.38	3.79
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 4	126	23.64	5.33
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 5	136	28.24	4.82
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6	146	38.39	3.80
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7	157	38.66	4.06
Tris-HCl pH 8	135	33.18	4.06
Glycine-NaOH pH 9	147	27.64	5.32
Glycine-NaOH pH 10	113	33.38	3.38

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.23 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.16 โดยจะพบว่า การสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด ส่วนการสกัดด้วยสารละลายที่มีสภาพเป็นกรดหรือเบสสูง คือ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 3, 4 และ 0.2 M Glycine-NaOH pH 10 จะให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ต่ำกว่าการสกัดในสภาพอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจะใช้สารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส



รูปที่ 3.16 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ

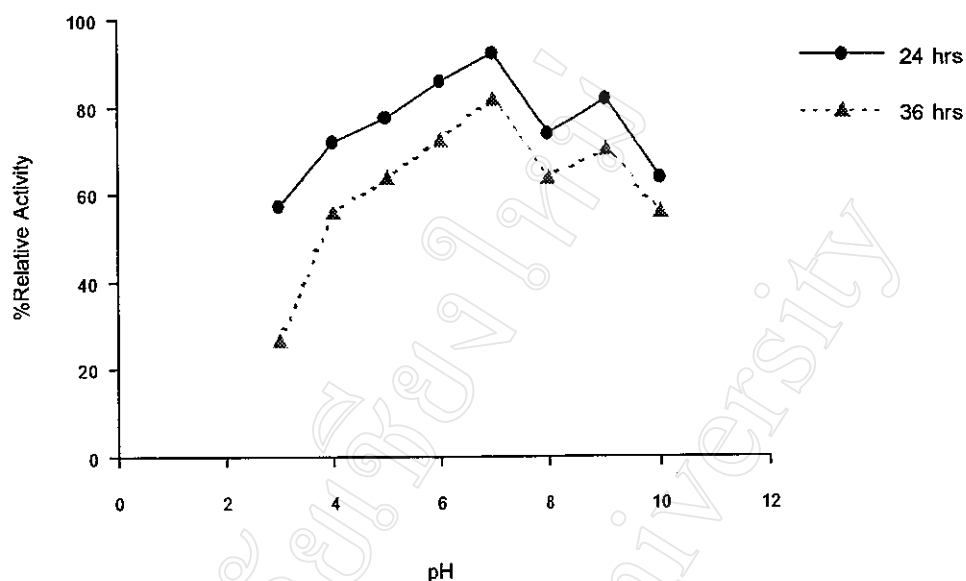
3.4.2.3 ผลการหาความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อ pH

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ กันได้แก่ สารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 3, 4, 5, 6 และ 7, 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.2 M Glycine-NaOH pH 9 และ 0.2 M Glycine-NaOH pH 10 ไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบวัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.24

ตารางที่ 3.24 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดด้วยสารละลาย
บัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง

ชนิดของ สารละลาย บัฟเฟอร์	เวลา 24 ชั่วโมง		เวลา 36 ชั่วโมง	
	Activity (units/ml)	%Relative activity	Activity (units/ml)	%Relative activity
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 3	90	57.32	42	26.75
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 4	113	71.97	88	56.05
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 5	122	77.71	100	63.69
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6	135	85.99	114	72.61
Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7	145	92.36	128	81.53
Tris-HCl pH 8	116	73.89	100	63.69
Glycine-NaOH pH 9	128	81.53	110	70.06
Glycine-NaOH pH 10	100	63.69	88	56.05

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.24 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.17 ซึ่ง
จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีความคงตัวต่อสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M
 Na_2HPO_4 pH 7 ที่ใช้ในการสกัดได้ดี โดยยังคงมีประสิทธิภาพการทำงานอยู่ถึง 80% หลังการสกัด
เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แต่เอนไซม์จะไม่คงตัวต่อสภาพกรดหรือด่างสูงที่ pH 3 และ 10 โดยค่า
ประสิทธิภาพการทำงานจะลดไปเกือบ 50% หลังการสกัด 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.17 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ต่างๆ หลังจากผ่านไป 24 และ 36 ชั่วโมง

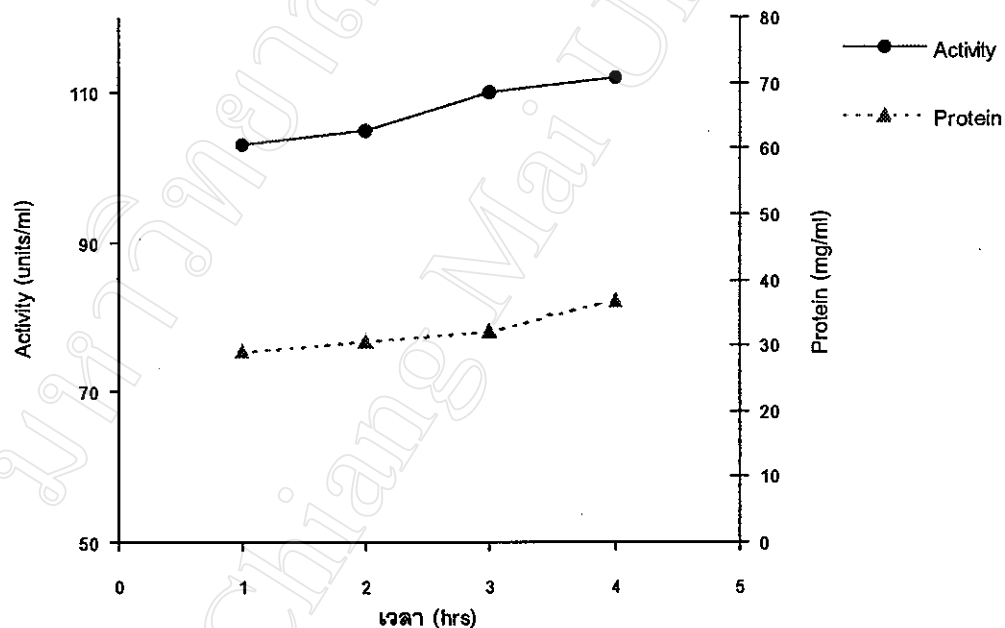
3.4.2.4 ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 เป็นเวลาต่างๆ กัน ได้แก่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ พร้อมทั้งหาค่า specific activity ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.25

ตารางที่ 3.25 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดด้วยเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	Activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)
1	103	29.25	3.52
2	105	30.64	3.43
3	110	32.31	3.40
4	112	36.82	3.04

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.25 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.18 ซึ่งจะพบว่า ในช่วงของการใช้เวลาในการสกัด 1-4 ชั่วโมง นั้น หากใช้เวลาในการสกัดมากขึ้นเท่าใด ก็จะทำให้ได้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งก็จะได้ปริมาณโปรตีนมากตามไปด้วย แต่หากนำมาคำนวณหาค่า specific activity จะพบว่า การใช้เวลาในการสกัด 1 ชั่วโมงจะได้ค่า specific activity มากที่สุด ในขณะที่ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ก็ไม่แตกต่างกันจากการใช้เวลาในการสกัดนานกว่านี้เท่าใดนัก ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไป จะใช้เวลาในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 ชั่วโมง



รูปที่ 3.18 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดด้วยเวลาต่างๆ

3.4.3 ผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์

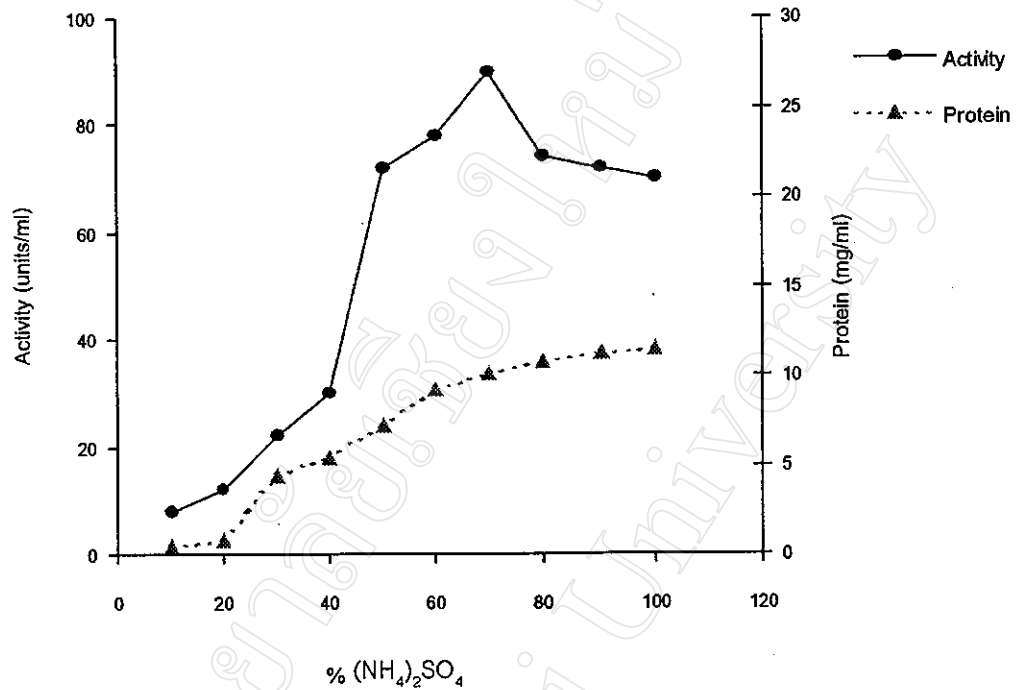
3.4.3.1 ผลการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แบบไม่ต่อเนื่อง

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วแบ่งส่วนสารละลายใสที่ได้หลังการเหวี่ยงมาตกตะกอนด้วย 10-100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน พร้อมทั้งคำนวณค่า specific activity ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.26

ตารางที่ 3.26 แสดงผลของการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-100% saturation แบบไม่ต่อเนื่อง

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation	Activity (units/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)
10	8	0.442	18.10
20	12	0.791	15.17
30	22	4.354	5.05
40	30	5.377	5.58
50	72	7.238	9.95
60	78	9.259	8.42
70	90	10.136	8.88
80	74	10.837	6.83
90	72	11.188	6.44
100	70	11.480	6.10

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.26 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและปริมาณโปรตีน เมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-100% saturation แบบไม่ต่อเนื่อง

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.26 จะพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส สามารถตกตะกอนได้ในเกือบทุกช่วง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-100% saturation โดยเอนไซม์จะตกตะกอนออกมามากในช่วงประมาณ 50-70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation

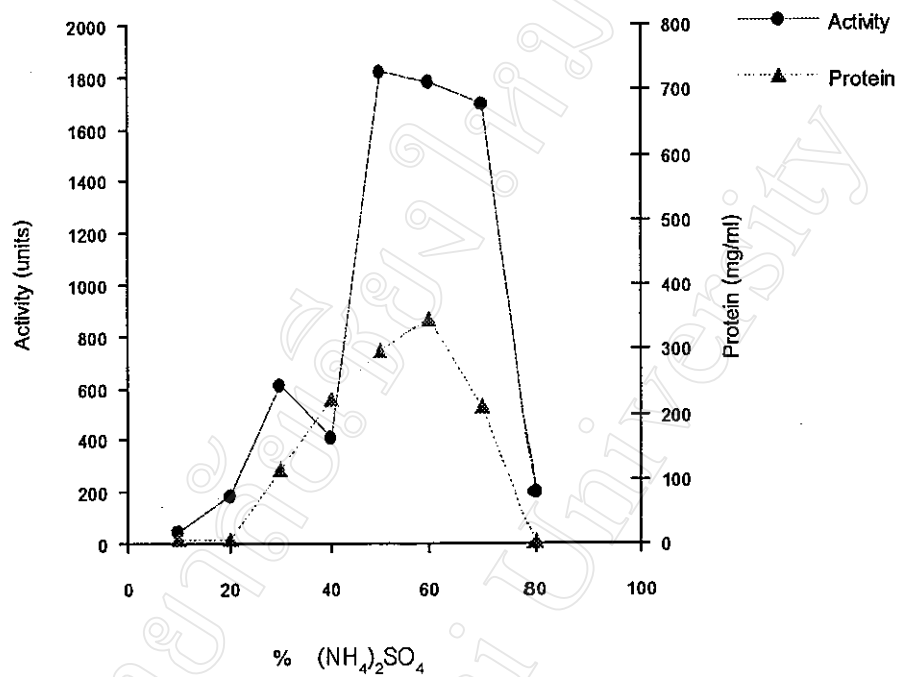
3.4.3.2 ผลการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แบบต่อเนื่อง

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วแบ่งส่วนสารละลายใส่ที่ได้หลังการเหวี่ยงมาตกตะกอนด้วย 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation จากนั้นนำส่วนสารละลายใส่ที่ได้หลังการเหวี่ยงมาตกตะกอนด้วย 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation ทำเช่นนี้ไปจนครบ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation แล้ววัดหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน พร้อมทั้งคำนวณค่า specific activity ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.27

ตารางที่ 3.27 แสดงผลของการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 - 80% saturation แบบต่อเนื่อง

% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Activity (units/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg)	Specific activity (units/mg protein)
10	47.94	6.32	7.58
20	184.00	7.21	25.5
30	611.00	115.15	5.31
40	413.60	222.26	1.86
50	1824.78	298.86	6.10
60	1780.71	346.33	5.14
70	1700.22	211.65	8.03
80	201.86	2.60	77.74

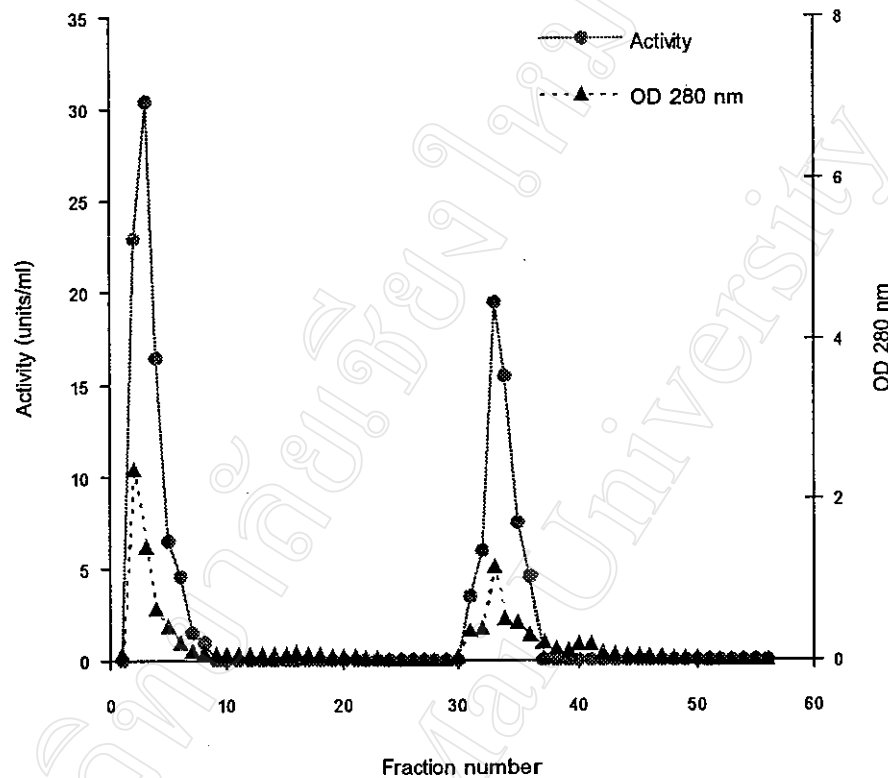
จากผลการทดลองในตารางที่ 3.27 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.20 ซึ่งจะพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะตกตะกอนออกมามากที่สุดเมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50-70 % saturation อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์สามารถตกตะกอนออกมาได้ในทุกช่วงของการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-80 % saturation ดังนั้นจะเลือกเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80 % saturation ในการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส



รูปที่ 3.20 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและปริมาณโปรตีน เมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10-80% saturation แบบต่อเนื่อง

3.4.3.3 ผลการแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ DEAE Sepharose

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดเมล็ดมะสตาร์ดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ซึ่งมีแอกติวิตี 98 units/ml มา 1 ml ผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุ DEAE Sepharose แล้วล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จากนั้นชะเอาโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1 M NaCl ได้ผลการหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ดังแสดงในรูปที่ 3.21

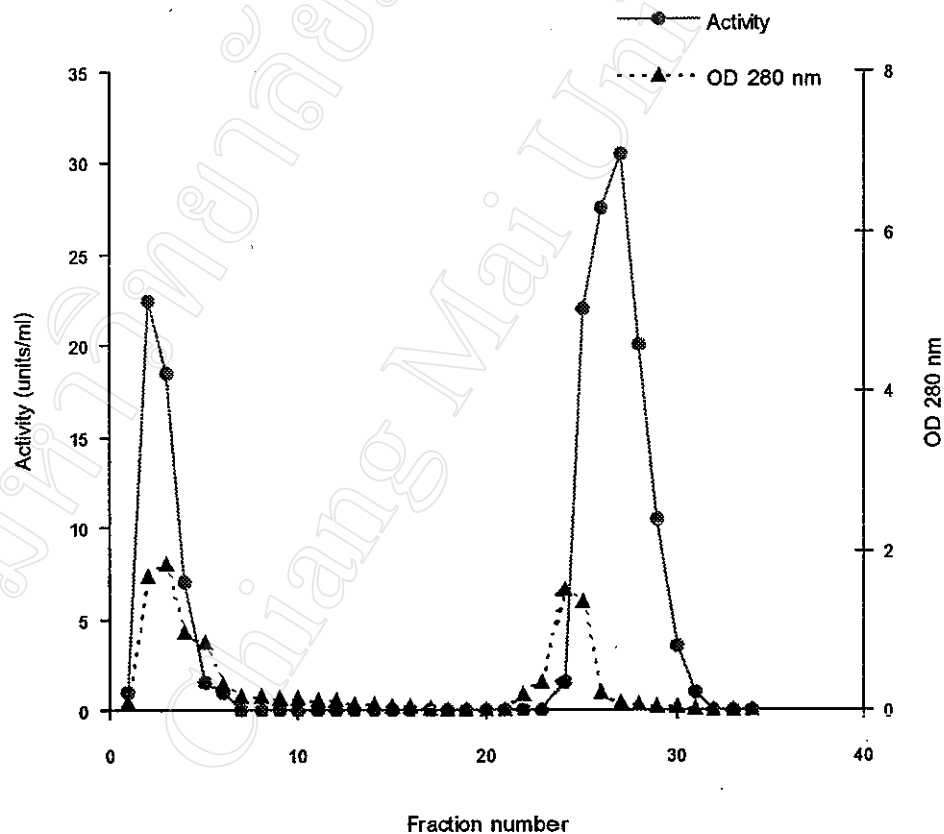


รูปที่ 3.21 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ DEAE Sepharose

จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.21 จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสส่วนมากจะไม่จับกับคอลัมน์ DEAE Sepharose โดยมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่จับกับคอลัมน์ทั้งหมด 83.5 units/ml ในขณะที่เดียวกันก็พบว่ามีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสบางส่วนที่จับกับคอลัมน์ DEAE Sepharose ซึ่งเมื่อถูกชะออกจากคอลัมน์จะมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ 56.5 units/ml แสดงว่าคอลัมน์ DEAE Sepharose ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้จับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเพราะจับเอนไซม์ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์มีอยู่หลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามจะพบว่าเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ทั้งในส่วนที่จับและไม่จับกับคอลัมน์จะมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์ก่อนนำมาผ่านคอลัมน์ถึงประมาณหนึ่งเท่าตัว แสดงว่าตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อาจถูกแยกออกไปในระหว่างผ่านคอลัมน์

3.4.3.4 ผลการแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ CM Sephadex

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ซึ่งมีแอกติวิตี้ 98 units/ml มา 1 ml ผ่านลงในคอลัมน์ ซึ่งบรรจุ CM Sephadex แล้วล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 จากนั้นชะเอาโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1 M NaCl ได้ผลการหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.22

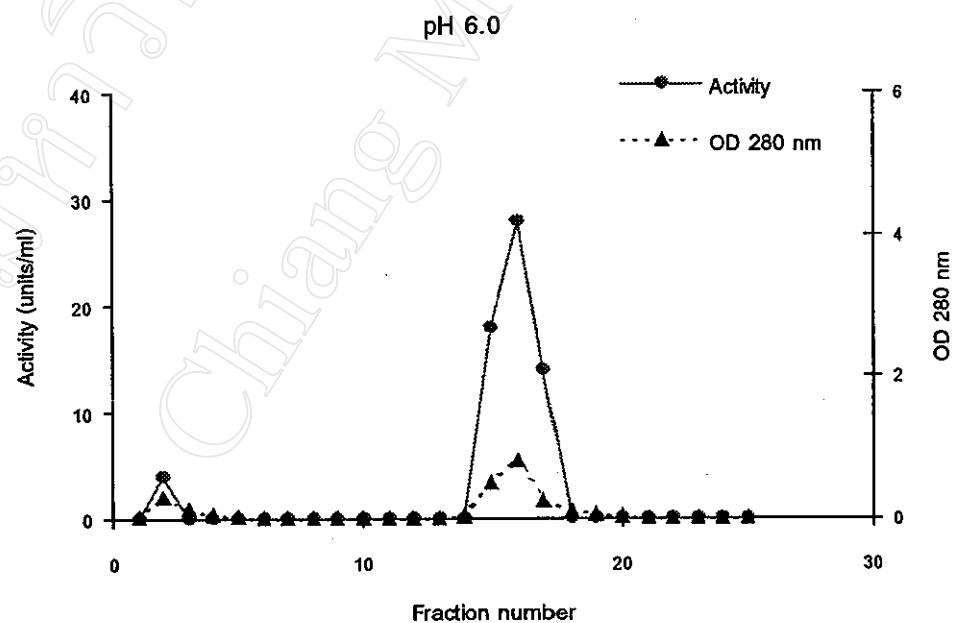
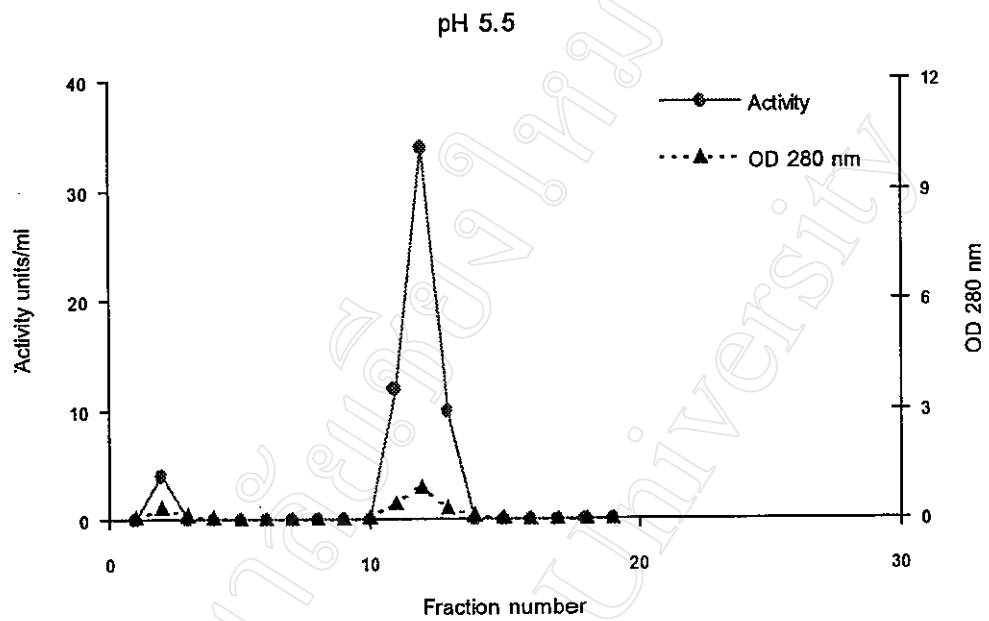


รูปที่ 3.22 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex

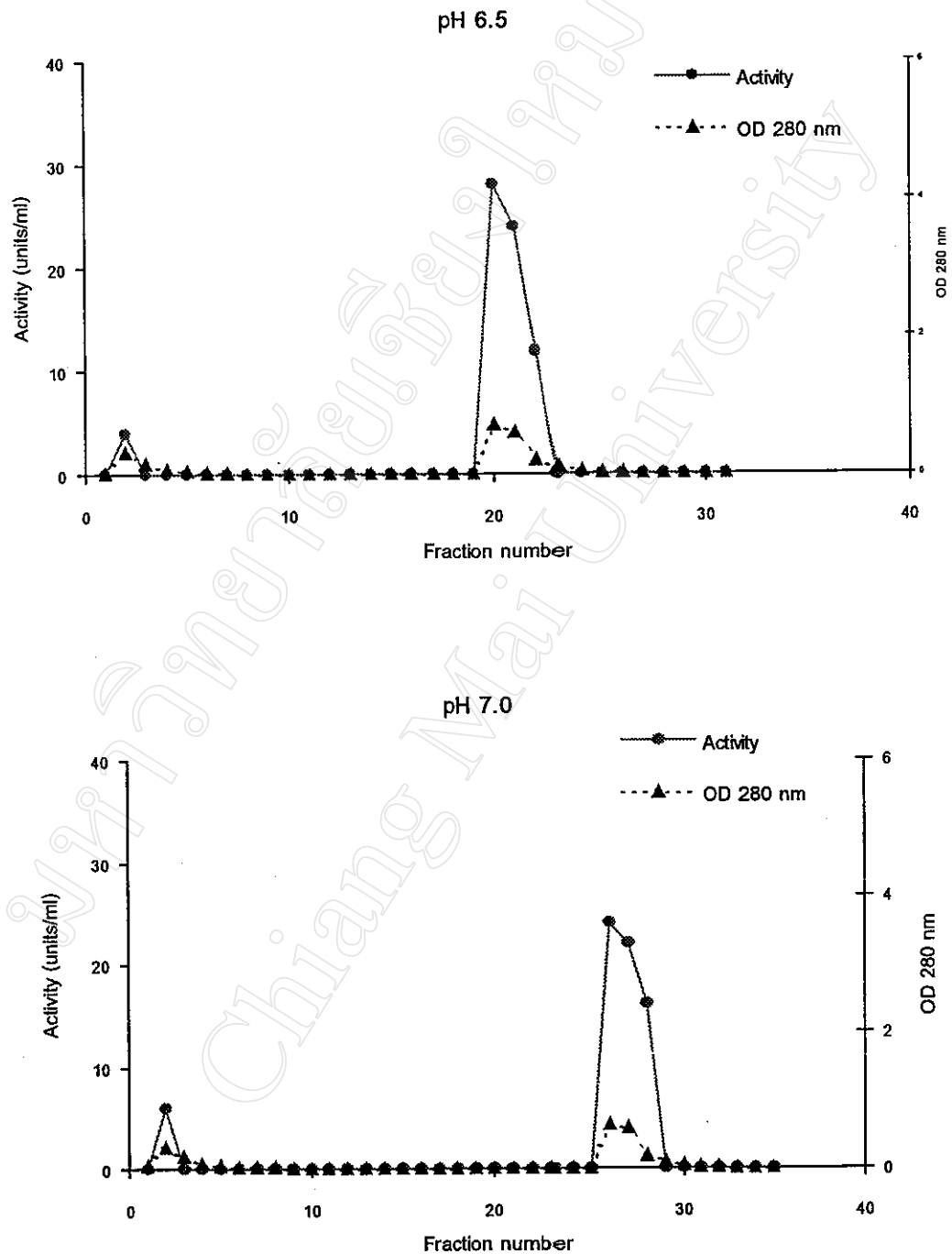
จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.22 จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสส่วนมากจะจับกับคอลัมน์ CM Sephadex ซึ่งเมื่อถูกชะออกจากคอลัมน์จะมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์ทั้งหมด 116.5 units/ml ในขณะที่เดียวกันก็พบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสบางส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ CM Sephadex ซึ่งจะมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ 51.5 units/ml การที่มีเอนไซม์ทั้งจับและไม่จับกับคอลัมน์อาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์มีอยู่หลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามจากการทดลองแสดงว่าคอลัมน์ CM Sephadex สามารถที่จะนำมาใช้จับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นได้ แต่ควรจะมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้ CM Sephadex จับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้ได้มากที่สุดต่อไป อย่างไรก็ตามจะพบว่าเอนไซม์ที่ได้หลังจากคอลัมน์ทั้งในส่วนที่จับและไม่จับกับคอลัมน์ จะมีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ผ่านคอลัมน์ถึงประมาณหนึ่งเท่าตัว แสดงว่า ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น่าจะถูกแยกออกไปในระหว่างที่นำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์

ผลการทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับ CM Sephadex ที่ pH ต่างๆ

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ซึ่งมีแอกติวิตี 100 units/ml มา 0.5 ml ผ่านลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุ CM Sephadex แล้วล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นชะเอาโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1 M NaCl ได้ผลการหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ดังแสดงในรูปที่ 3.23



รูปที่ 3.23 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex ที่ equilibrate ด้วยสารละลาย pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0



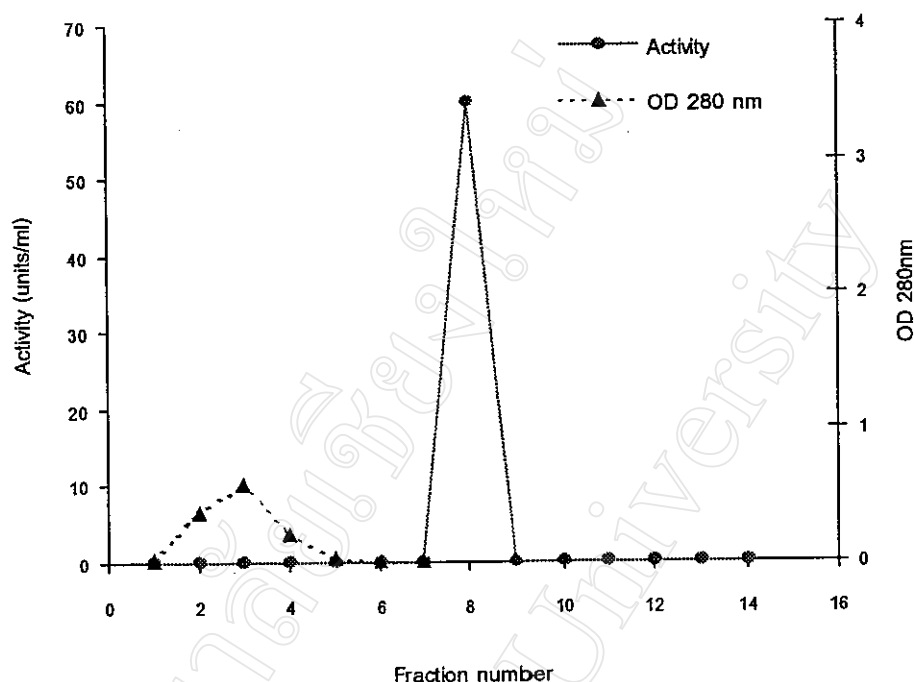
รูปที่ 3.23(ต่อ) แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex ที่ equilibrate ด้วยสารละลาย pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0

จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.23 จะไม่พบความแตกต่างในการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับคอลัมน์ CM Sephadex ที่ equilibrate ด้วยสารละลาย pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 มากนัก โดยจะได้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่จับกับคอลัมน์เท่ากับ 4.0 units/ml เมื่อ equilibrate ด้วยสารละลาย pH 5.5, 6.0, และ 6.5 และ 7.0 units/ml และจะได้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์เมื่อ equilibrate ด้วยสารละลาย pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เท่ากับ 56, 60, 64 และ 62 units/ml ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ครั้งต่อไปจะเลือกใช้การ equilibrate คอลัมน์ CM Sephadex ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 เนื่องจากให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด

3.4.3.5 ผลการแยกเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ Con A Sepharose

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วนำไปผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ CM Sephadex มา 0.5 มล. (ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการทำงาน 80 units/ml) ผ่านลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุ Con A Sepharose หลังจากล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 20 mM tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 และ 1 mM CaCl_2 pH 7.4 แล้วชะเอาโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมาด้วยสารละลาย 1 M glucose, 20 mM tris-HCl และ 0.5 M NaCl pH 7.4 เก็บไว้ในหลอดทดลอง ได้ผลการหาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ดังแสดงในรูปที่ 3.24

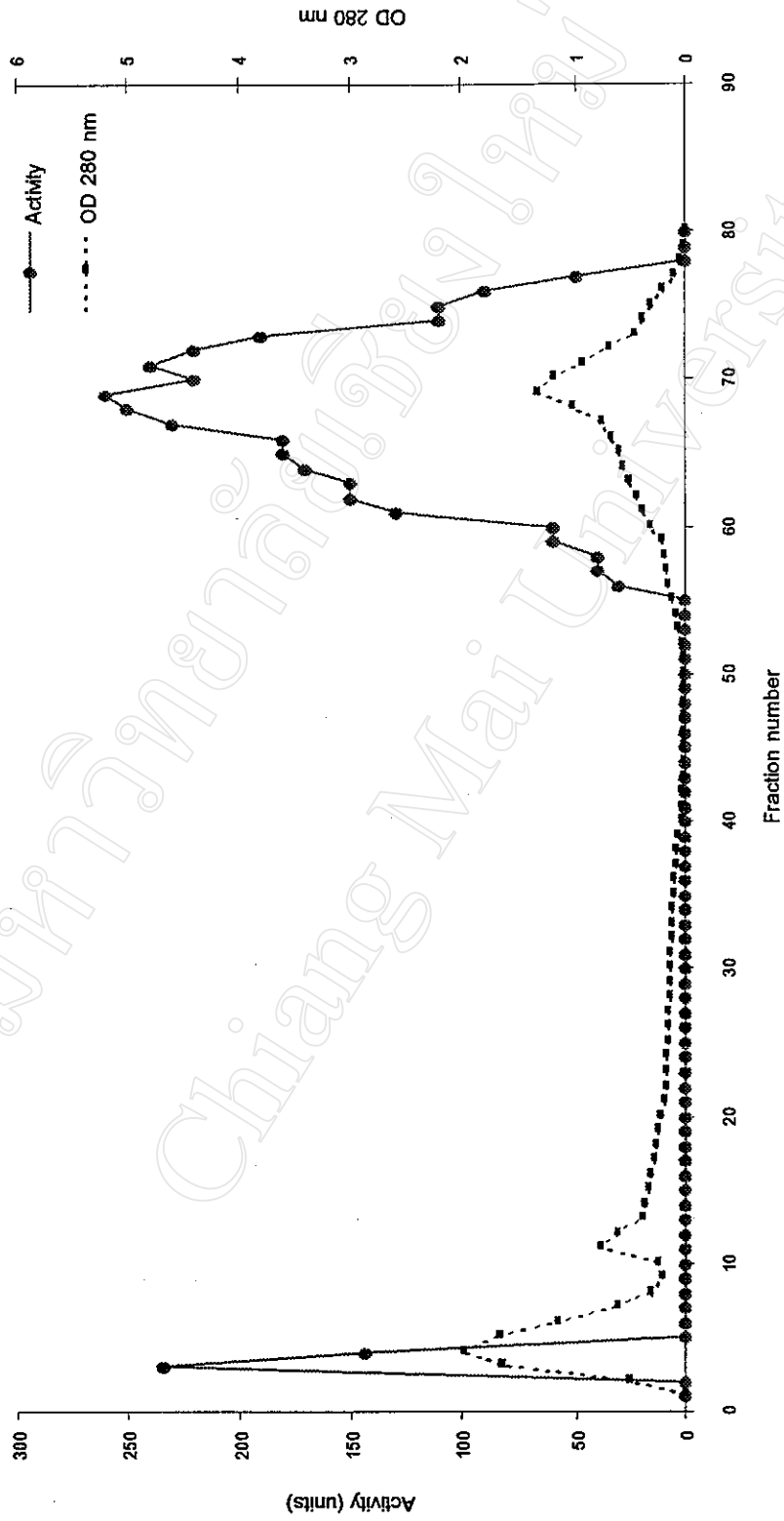
จากผลการทดลองดังรูปที่ 3.24 จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถจะจับกับคอลัมน์ Con A Sepharose ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่พบค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในส่วนของโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์เลย เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ก็พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะไม่จับกับคอลัมน์ เหลือเพียงส่วนน้อยที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ไม่ได้ที่จับกับคอลัมน์ นอกจากนี้ถ้าเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้นก่อนผ่านคอลัมน์ กับเอนไซม์ที่ได้หลังจากชะออกมาจากคอลัมน์แล้วพบว่า ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ยังเพิ่มขึ้นจากเดิมที่มีอยู่ 40 units เป็น 60 units ด้วย ดังนั้นจะเลือกใช้ Con A Sepharose ในการทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีความบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป



รูปที่ 3.24 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ Con A Sepharose

3.4.3.6 ผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วนำมาผ่านการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation แล้วแบ่งส่วนสารละลายไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.28 จากนั้นนำโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation และ dialyse แล้วมา 18.5 ml ผ่านคอลัมน์ CM Sephadex เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลังจาก equilibrate ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 และชะด้วยสารละลาย gradient 0-1 M NaCl แล้วไว้ในหลอดทดลอง ได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 3.25



รูปที่ 3.25 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์เฟลิกซ์ในหลอดกลั่นแสงที่ 280 nm หลังการตกตะกอนด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ CM Sephadex

จากนั้นรวมเอนไซม์ที่ได้จากการชะด้วย gradient 0-1 M NaCl ในหลอดทดลองที่ 56-77 เข้าไว้ด้วยกัน นำไป dialyse แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration แบ่งส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ได้นี้ไว้วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.28 จากนั้นนำเอนไซม์ที่เหลือนี้ไปผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose หลายๆ ครั้งจนเอนไซม์หมด แล้วเก็บรวบรวมหลอดทดลองภายหลังจากชะออกจากคอลัมน์ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไว้ด้วยกัน นำไป dialyse แล้วทำให้เข้มข้นโดยผ่าน ultrafiltration แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.28

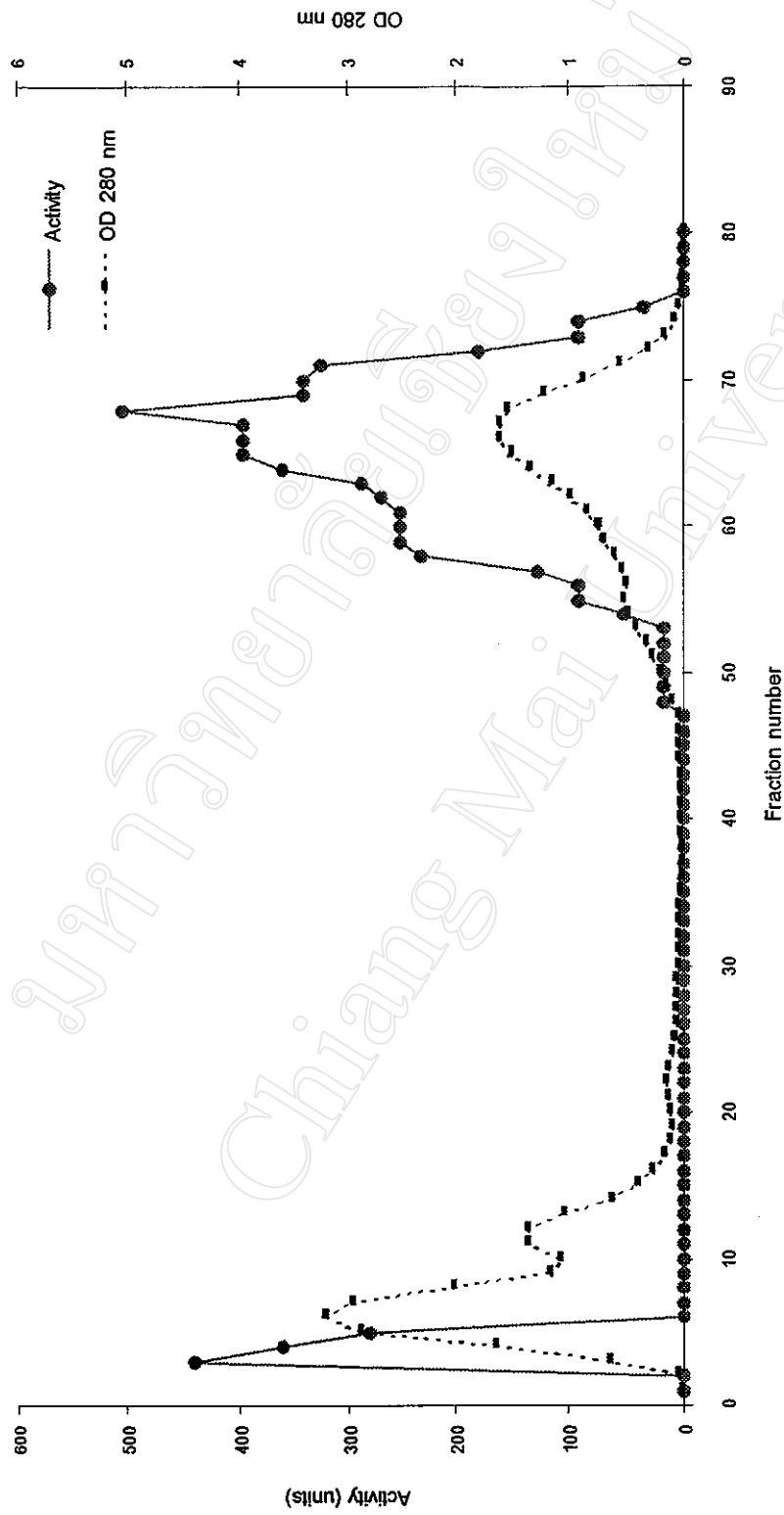
ตารางที่ 3.28 แสดงผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose

ขั้นตอน	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mgprotein)	% Activity yield	Purification fold
Crude extract	9,790	1,473	6.65	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,713	351	7.73	27.71	1.16
CM Sephadex	2,065	107	19.30	21.09	2.90
Con A Sepharose	188	0.27	696.30	1.92	104.71

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.28 จะพบว่าเอนไซม์หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย คือ Con A Sepharose แล้ว ได้ % yield ต่ำมากเพียง 1.92 เท่านั้น ซึ่งเอนไซม์ที่หายไปนี้ส่วนใหญ่ก็จะเสียไปในขั้นตอนการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ถึงประมาณ 70 % ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงจะไม่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แต่จะทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน ultrafiltration แทน จากผลการทดลองที่ได้นี้ ถือว่า เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์กว่าเดิมมากโดยมีค่า specific activity เพิ่มขึ้นจากตอนแรกถึง 105 เท่าตัวหลังจากผ่าน Con A Sepharose แต่ในขั้นตอนอื่นๆ คือการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผ่านคอลัมน์ CM Sephadex ไม่ช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์กว่าเดิมมากนัก

3.4.3.7 ผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยผ่านการทำให้ เข้มข้นด้วย Ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose

เมื่อสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 แล้วนำมาทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน ultrafiltration จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์นี้ไป dialyse แล้วแบ่งส่วนสารละลายไว้หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.29 จากนั้นนำโปรตีนที่ผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration และ dialyse แล้วมา 34.5 ml ผ่านคอลัมน์ CM Sephadex ทำการเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลังจาก equilibrate ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 และชะด้วยสารละลาย gradient 0-1 M NaCl แล้วไว้ในหลอดทดลอง ได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 3.26



รูปที่ 3.26 แสดงผลการทำงานของเอนไซม์โพลีฟอสฟอไรเลสที่ 280 nm หลังผ่านการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration แล้วนำ มาผ่านคอลัมน์ CM Sephadex

จากนั้นรวมเอนไซม์ที่ได้จากการชะด้วย gradient 0-1 M NaCl ในหลอดทดลองที่ 55-72 เข้าไว้ด้วยกัน นำไป dialyse แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration แบ่งส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ได้นี้ไว้วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.29 จากนั้นนำเอนไซม์ที่เหลือนี้ไปผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose หลายๆ ครั้งจนเอนไซม์หมด แล้วเก็บรวบรวมหลอดทดลองภายหลังจากชะออกจากคอลัมน์ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไว้ด้วยกัน นำไป dialyse แล้วทำให้เข้มข้นโดยผ่าน ultrafiltration วัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.29

ตารางที่ 3.29 แสดงผลการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยผ่านการทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose

ขั้นตอน	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mgprotein)	% Activity yield	Purification fold
Crude extract	7,215	1,142	6.32	100	1
Ultrafiltrate	3,638	482	7.55	50.42	1.19
CM Sephadex	2,000	236	8.47	27.72	1.34
Con A Sepharose	928	4.43	209.48	12.86	33.14

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.29 จะได้เอนไซม์หลังจากผ่าน Con A Sepharose ในขั้นตอนสุดท้ายที่มี % yield =12.86 ซึ่งก็ถือว่าค่อนข้างต่ำ โดยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะสูญเสียไปประมาณครึ่งหนึ่งของแต่ละขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้นี้ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์สูง โดยมีค่า specific activity เพิ่มขึ้นจากเดิม 33 เท่า เมื่อผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose ส่วนในขั้นตอนการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และผ่านคอลัมน์ CM Sephadex นั้น ไม่ช่วยทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเท่าใดนัก

จากการเปรียบเทียบขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration แล้ว จะพบว่า ทั้งสองวิธีให้ค่า specific activity ที่ไม่ต่างกัน แต่การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะทำให้เสีย yield มากกว่า ถึง 70% เมื่อเทียบกับ ผ่าน ultrafiltration ซึ่งเสีย yield 50%

3.4.3.8 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่าน ultrafiltration, CM Sephadex และ Con A Sepharose chromatography มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE และหามวลโมเลกุลโดยเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ได้แก่ ribonuclease b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000) และ trypsin inhibitor (20,100) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.27



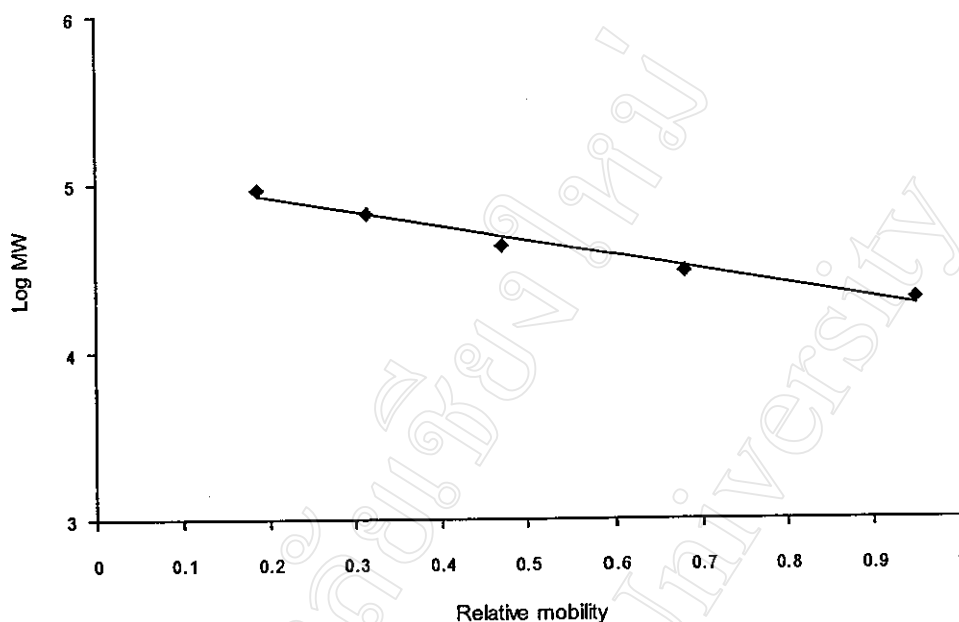
รูปที่ 3.27 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสด้วย SDS-PAGE (A) สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (B) เอนไซม์หลังจากผ่าน Con A Sepharose (C) เอนไซม์หลังจากผ่าน CM Sephadex

จากรูปที่ 3.27 จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ CM Sephadex ยังมีโปรตีนอื่นปนอยู่อีกมาก ทำให้ไม่สามารถเห็นแถบของเอนไซม์ได้ชัดเจน แต่เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose แล้วจะพบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น จนสามารถเห็นแถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียว อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าเอนไซม์ที่ได้ี้มีความบริสุทธิ์จนกระทั่งปราศจากโปรตีนอื่นปนอยู่เลย เพราะยังมีแถบโปรตีนอื่นๆ ที่เจือจางมากจนไม่สามารถเห็นได้ชัดเจน

สำหรับค่า relative mobility ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานแสดงได้ดังตารางที่ 3.30 ซึ่งสามารถนำมาเขียนกราฟระหว่างค่า Log MW กับ relative mobility ได้ดังรูปที่ 3.28

ตารางที่ 3.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility กับ Log MW ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

MW (Da)	Log MW	Relative mobility
94,000	4.9731	0.146
67,00	4.8261	0.244
43,000	4.6335	0.378
30,000	4.4771	0.549
20,100	4.3032	0.780



รูปที่ 3.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Relative mobility กับ Log MW ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

จากรูปที่ 3.28 เมื่อเปรียบเทียบค่า relative mobility ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.451 กับ log MW ของโปรตีนมาตรฐานแล้ว จะพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 40,691 daltons

3.4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่บริสุทธิ์

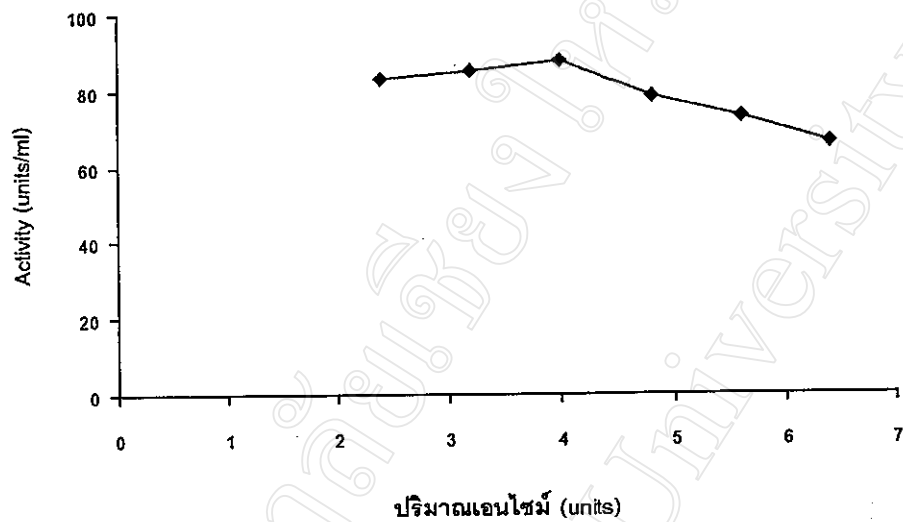
3.4.4.1 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ตั้งแต่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μ l ซึ่งคิดเป็น 2.4, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6 และ 6.4 units แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.31

ตารางที่ 3.31 แสดงผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ปริมาณเอนไซม์ (units)	Activity (units/ml)
2.4	83.33
3.2	85.00
4.0	88.00
4.8	78.33
5.6	72.86
6.4	66.25

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.31 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.29 ซึ่งจะพบว่า ปริมาณเอนไซม์ในช่วง 2.4-4.0 units จะให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงสุด ถ้าใช้เอนไซม์ในปริมาณมากกว่านี้แล้วค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ก็จะลดลงตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจะเลือกใช้เอนไซม์ในปริมาณ 2.8 units ซึ่งคิดเป็นปริมาตร 35 μ l ในการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เมื่อใช้สับสเตรทความเข้มข้น 10 mM



รูปที่ 3.29 แสดงผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อการทำงานของเอนไซม์
โพลีฟีนอลออกซิเดส

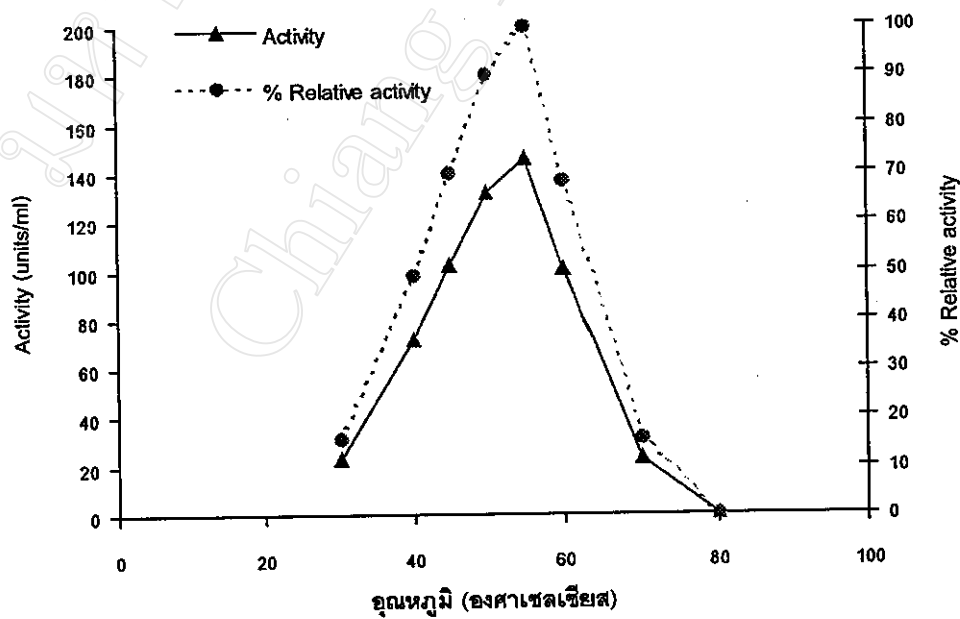
3.4.4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.32

ตารางที่ 3.32 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

อุณหภูมิ (°C)	Activity (units/ml)	% Relative activity
30	22.86	15.66
40	71.43	48.92
45	102.28	70.05
50	131.43	90.02
55	146.00	100.00
60	100.00	68.49
70	22.86	15.66
80	0	0

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.32 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.30



รูปที่ 3.30 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.32 จะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จะอยู่ในช่วง 45-60 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 55 องศาเซลเซียส โดยถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 45 หรือ สูงกว่า 60 องศาเซลเซียสแล้ว ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเป็นอย่างมาก

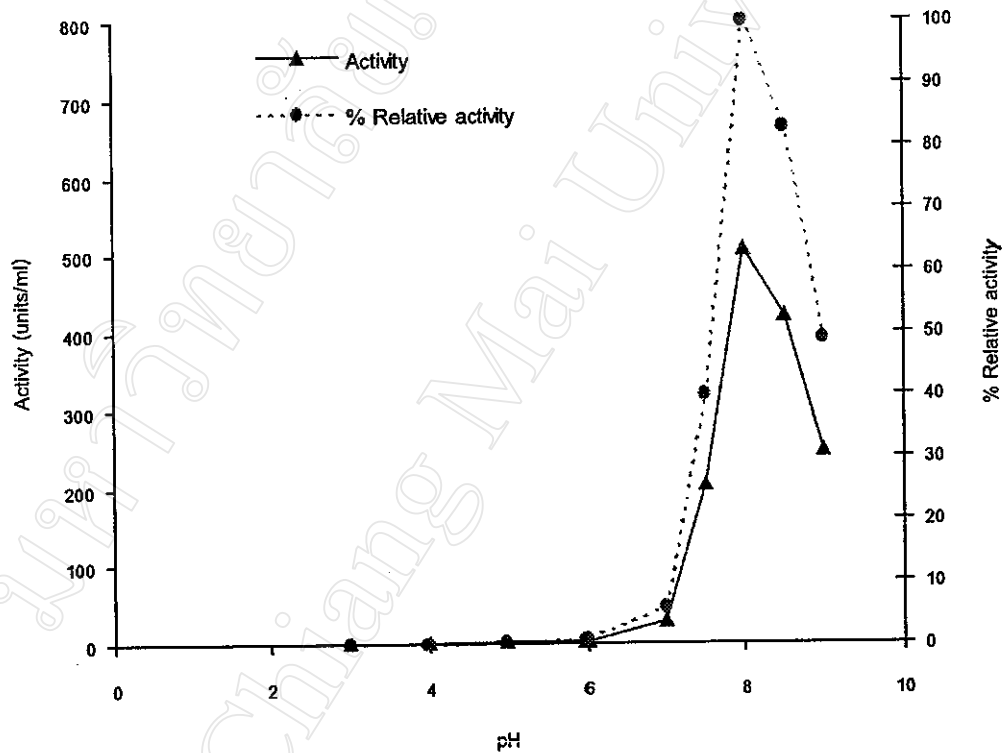
3.4.4.3 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ตั้งแต่ 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.33

ตารางที่ 3.33 แสดงผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

pH	Activity (units/ml)	% Relative activity
3	0	0
4	0	0
5	2.00	0.40
6	2.86	0.56
7	28.57	5.65
7.5	202.86	40.11
8	505.71	100.00
8.5	420.00	83.05
9	248.57	49.15

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.33 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.31 ซึ่งจะพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างไปทางเบส โดยจะให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดเมื่อ pH ในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 8 จากนั้นก็จะลดลงเหลือประมาณ 50% เมื่อ pH เป็น 9 นอกจากนี้ยังพบว่าช่วง pH ที่เป็นกรด จะไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเลย



รูปที่ 3.31 แสดงผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

3.4.4.4 ผลของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอล

ออกซิเดส

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาผลของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ คือ chlorogenic acid, gallic acid, hydroquinone, pyrogallol, pyrocatechol, DOPA, p-cresol และ sinapic acid แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.34

ตารางที่ 3.34 แสดงผลของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ชนิดของสับสเตรท	Activity (units/ml)	% Relative activity
Chlorogenic acid	0	0
Gallic acid	477.14	100
Hydroquinone	57.14	11.98
Pyrogallol	242.86	50.90
Pyrocatechol	51.43	10.78
DOPA	28.57	5.99
p-cresol	0	0
Sinapic acid	0	0

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.34 จะพบว่า สับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะเป็นสารประกอบพวก polyphenol ได้แก่ gallic acid และ pyrogallol อย่างไรก็ตามเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสก็ยังสามารถใช้สารประกอบพวก diphenol เช่น hydroquinone, pyrocatechol และ DOPA เป็นสับสเตรทได้บ้าง แต่เอนไซม์ไม่มีความสามารถในการใช้สับสเตรทประเภท monophenol เช่น p-cresol ได้เลย

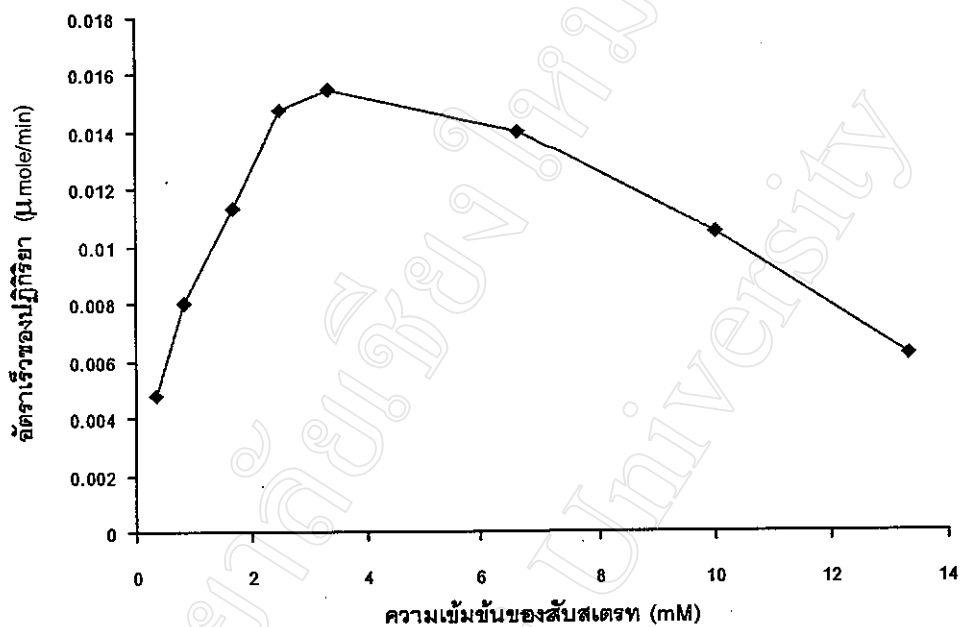
3.4.4.5 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาผลของความเข้มข้นของสับสเตรต ตั้งแต่ 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 และ 40 mM แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.35

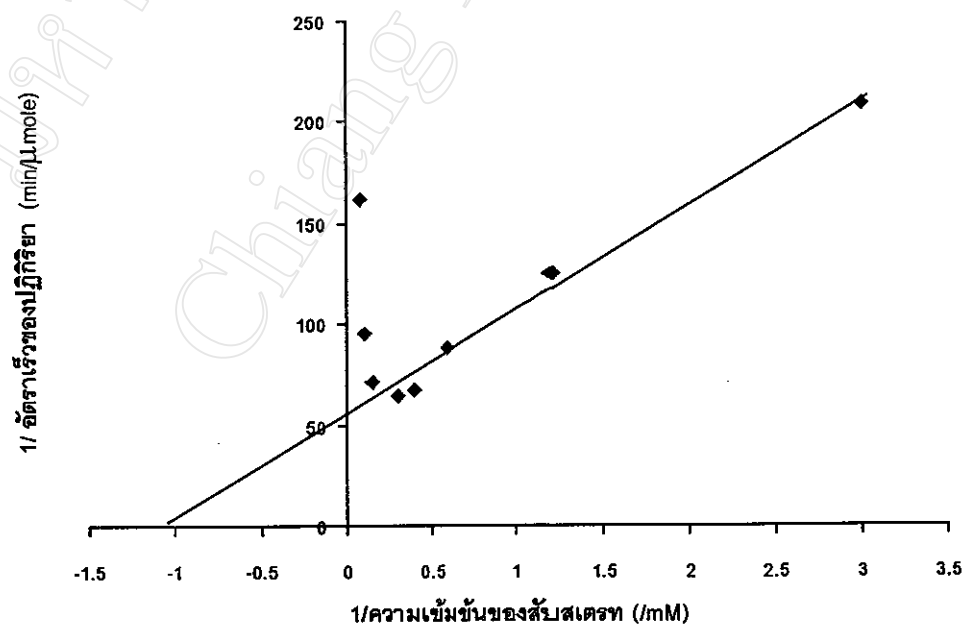
ตารางที่ 3.35 แสดงผลของสับสเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ความเข้มข้น ของสับสเตรต (mM)	1/ความเข้มข้น ของสับสเตรต (mM ⁻¹)	Activity (units/ml)	อัตราเร็วของ ปฏิกิริยา (μmole/min)	1/อัตราเร็วของ ปฏิกิริยา (min/μmole)
0.333	3.003	137.14	0.0048	208.33
0.833	1.200	228.57	0.0080	125.00
1.667	0.600	322.86	0.0113	88.50
2.500	0.400	422.86	0.0148	67.57
3.333	0.300	442.86	0.0155	64.52
6.667	0.150	400.00	0.0140	71.43
10.000	0.100	300.00	0.0105	95.24
13.333	0.075	177.14	0.0062	161.29

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.35 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรต (S) กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา (V) ได้ดังรูปที่ 3.32 และเมื่อนำมาเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/ความเข้มข้นของสับสเตรต (1/S) กับ 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยา (1/V) ได้ดังรูปที่ 3.33



รูปที่ 3.32 แสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.33 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ต่อ 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยา

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.35 และรูปที่ 3.32 จะพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของ สับสเตรทในการทำปฏิกิริยามากกว่า 10 mM แล้วอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเริ่มลดลง ส่วนผลการทดลองจากรูปที่ 3.33 สามารถจะนำมาหาค่า $V_{\max}$ และ K_m ได้จากจุดตัดบนแกน x และแกน y โดยจะหาค่า K_m ได้จากจุดตัดบนแกน x ซึ่งเท่ากับ $-1/K_m$ ส่วนจุดตัดบนแกน y จะให้ค่า $V_{\max}$ ซึ่งเท่ากับ $1/V_{\max}$ จากการคำนวณจะได้ว่า

$$-1/S = -1/K_m = -0.99$$

$$\text{ดังนั้น } K_m = 1.01 \text{ mM}$$

$$1/v = 1/V_{\max} = 52.485$$

$$\text{ดังนั้น } V_{\max} = 0.02 \text{ } \mu\text{mole/min}$$

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีค่า K_m ที่ค่อนข้างต่ำ แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อการจับ สับสเตรทได้ดี

3.4.4.6 ผลของสารกระตุ้นและยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอล ออกซิเดส

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาผลของสารประกอบ ชนิดต่างๆ คือ citric acid, NaCl, 2-mercaptoethanol, potassium metabisulphite, sinapic acid, CaCl_2 และ cysteine แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดัง ตารางที่ 3.36

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.36 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้สารประกอบชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 10 mM ใส่ลงไปในสารละลายเอนไซม์ citric acid, 2-mercaptoethanol, sinapic acid และ cysteine สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้สมบูรณ์ ส่วน potassium metabisulphite และ NaCl สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณ 50 และ 25% ตามลำดับ ในขณะที่ CaCl_2 จะมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณหนึ่งเท่าตัว

ตารางที่ 3.36 แสดงผลของสารกระตุ้นและยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ชนิดของสารประกอบ	Activity (units/ml)	% Relative activity
Control	442.86	100
Citric acid	0	0
2-Mercaptoethanol	0	0
Sinapic acid	0	0
Cysteine	0	0
Potassium metabisulphite	257.14	58.06
NaCl	337.14	76.13
CaCl ₂	808.57	182.58

3.4.4.7 ผลของความเสถียรของเอนไซม์

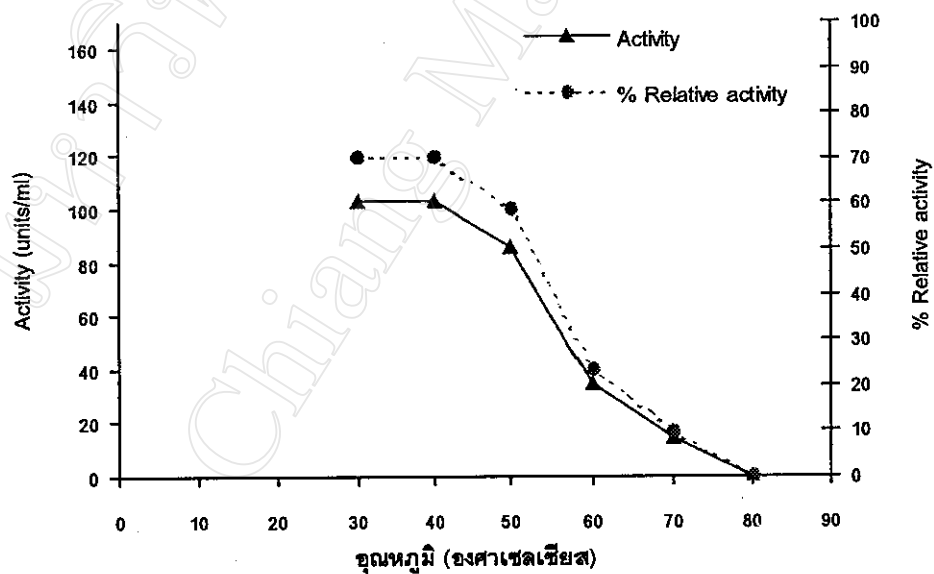
ก. ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาความคงตัวของอุณหภูมิ ตั้งแต่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.37

ตารางที่ 3.37 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่ออุณหภูมิ

อุณหภูมิ (°C)	Activity (units/ml)	% Relative activity
30	102.86	70.45
40	102.86	70.45
50	85.71	58.70
60	34.28	23.48
70	14.28	9.78
80	0	0

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.37 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.34



รูปที่ 3.34 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่ออุณหภูมิ

จากผลการทดลองดังตารางที่ 3.37 จะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไม่ค่อยคงตัวต่ออุณหภูมิสูงเท่าใดนัก โดยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงกว่า 50 % เมื่อ incubate เอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นไปเป็นเวลา 30 นาที

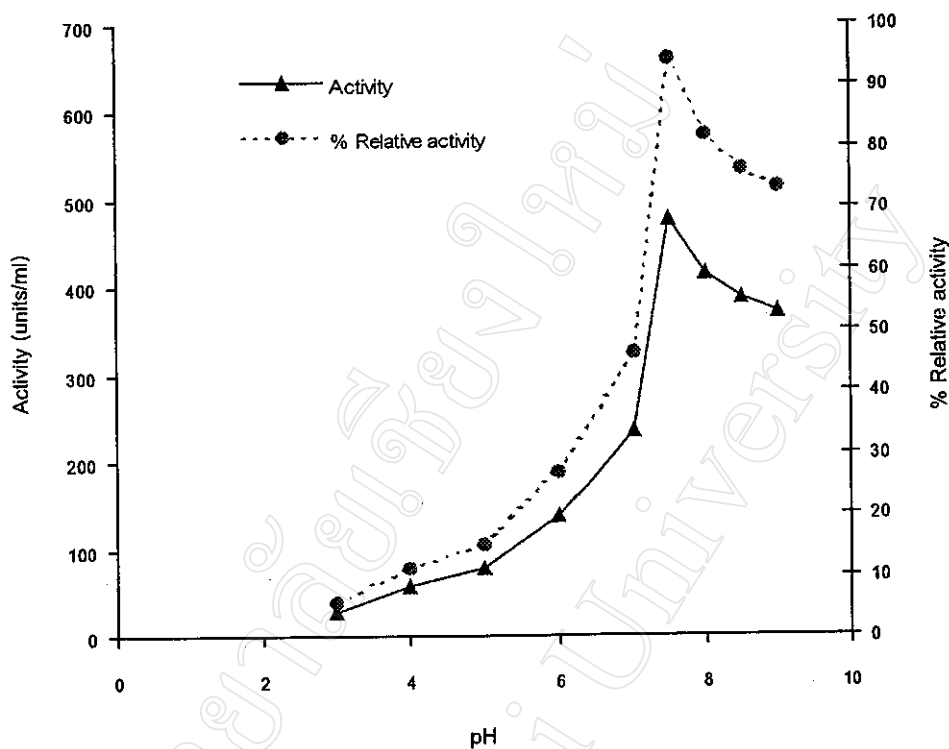
ข. ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ

เมื่อนำเอาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาความคงตัวต่อ pH ตั้งแต่ 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.38

ตารางที่ 3.38 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อ pH

pH	Activity (units/ml)	% Relative activity
3	28.57	5.65
4	57.14	11.30
5	77.14	15.25
6	137.14	27.12
7	234.28	46.33
7.5	477.14	94.35
8	414.28	81.92
8.5	385.71	76.27
9	371.43	73.45

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.38 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.35 ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสค่อนข้างมีความคงตัวต่อสารละลายที่มีสภาพเป็นเบส โดยยังมีค่าประสิทธิภาพการทำงานอยู่ 70-90 % ในช่วง pH 9-7.5 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จะไม่คงตัวต่อสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด โดยมีค่าประสิทธิภาพการทำงานเหลือประมาณ 50 % ในสารละลาย pH 7



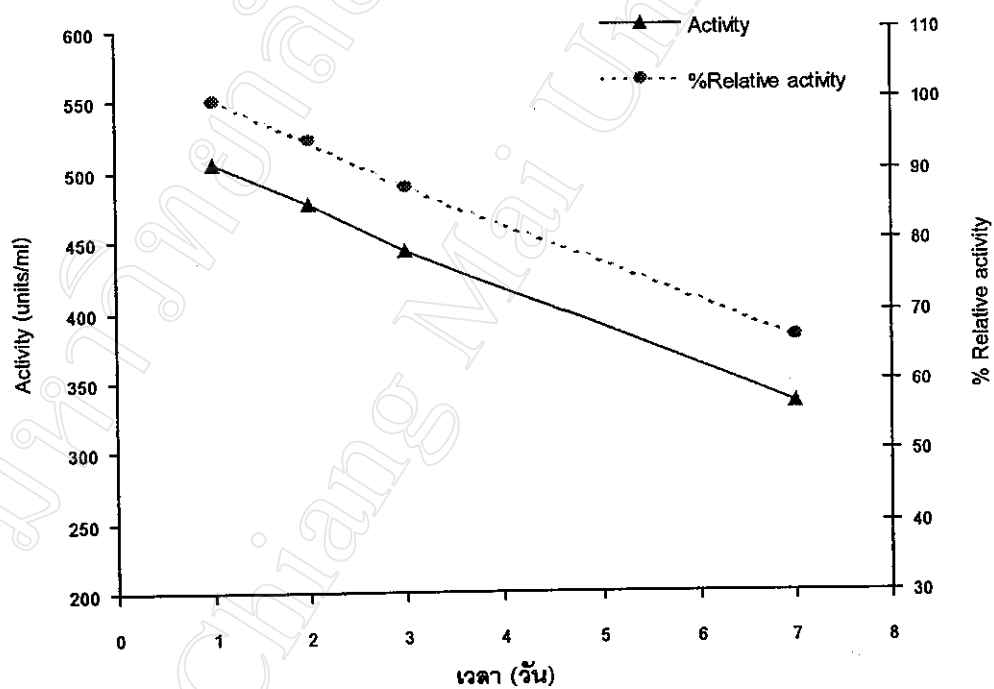
รูปที่ 3.35 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อ pH

ค. ผลของความเสถียรของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังจากการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration และแยกด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose มาศึกษาหาความเสถียรของเอนไซม์ที่แช่แข็งไว้ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 7 วัน แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.39

ตารางที่ 3.39 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อเวลา

เวลา (วัน)	Activity (units/ml)	% Relative activity
1	505.71	100
2	477.14	94.35
3	442.86	87.57
7	334.28	66.10



รูปที่ 3.36 แสดงผลความเสถียรของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสต่อเวลา

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.39 สามารถนำมาแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.36 ซึ่งพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีความคงตัวค่อนข้างสูง โดยจะสูญเสียค่าประสิทธิภาพการทำงานไปประมาณ 6 และ 13% อีกทั้งยังมีค่าประสิทธิภาพการทำงานเหลืออยู่กว่า 50% หลังเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ 2, 3 และ 7 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิแช่แข็ง