

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

มัสตาร์ด (*Brassica juncea*) นอกจากจะเป็นแหล่งของน้ำมันที่สำคัญแล้วพบว่า กากที่เหลือจากกากสกัดน้ำมันออกไปแล้วยังมีปริมาณของโปรตีนอยู่สูง จากรายงานของ Gohl (2) , Ahmad et al. (13) และ Zhou et al. (12) พบว่า เมล็ดและกากมัสตาร์ดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 23.40-28.35 และ 37.84-47.80 % ตามลำดับ อีกทั้งยังมีชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอยู่ค่อนข้างสมบูรณ์ จึงน่าจะนำมาเป็นแหล่งที่สำคัญของโปรตีนสำหรับคนและสัตว์ได้ จิราพร (1) ได้สกัดและตกตะกอนโปรตีนจากกากมัสตาร์ด (*Brassica juncea*) ที่ได้ภายหลังการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดมัสตาร์ด โดยพบว่า กากมัสตาร์ดมีปริมาณโปรตีน 18.97% ของน้ำหนักกากมัสตาร์ด ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง จึงน่าจะศึกษาการสกัดและแยกโปรตีนจากกากมัสตาร์ดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด

ในการสกัดและแยกโปรตีนออกมาให้ได้ปริมาณมากที่สุดนั้น มีความจำเป็นที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะสกัดและแยกโปรตีนออกมาจากพืชให้ได้มากที่สุด ซึ่งในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดพืชน้ำมันโดยทั่วไป มักจะสกัดด้วยสารละลายต่าง เช่น สารละลาย NaOH แล้วแยกโปรตีนที่สกัดได้ออกมาจากสารสกัดโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายกรด เช่น สารละลาย HCl (4-6) และจากรายงานของจิราพร (1) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกโปรตีนจากกากมัสตาร์ด ได้แก่ การสกัดโดยใช้สารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 375 มล. ด้วย shaking water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลาย HCl โดยปรับ pH เป็น 3.8 ได้ปริมาณโปรตีนออกมามากที่สุดในปริมาณ 34.26 % ของโปรตีนในกากมัสตาร์ด อย่างไรก็ตามในการทดลองดังกล่าวไม่ได้หาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายที่ใช้สกัด ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงได้หาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ซึ่งจากการทดลองพบว่า การใช้สารละลาย 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 500 มล. ในการสกัดโปรตีนจากกากมัสตาร์ด 50 กรัม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย HCl โดยปรับ pH เป็น 3.8 กรองโปรตีนที่ตกตะกอน แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักของตะกอนโปรตีนที่แห้งดีแล้ว พบว่า ได้ตะกอนโปรตีนออกมามากที่สุดในปริมาณ 27.95 % ของโปรตีนในกากมัสตาร์ด โดยปริมาตรที่ใช้คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างกากมัสตาร์ดกับสารละลายที่ใช้สกัดได้เป็น 1 : 10 และเป็นปริมาตรที่พอดีท่วม

กากมันสตาร์ท ดังนั้นในการหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดต่อไปจะสกัดโปรตีนจากกากมันสตาร์ทด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 ในอัตราส่วน 1 : 10 ซึ่งจากผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน พบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้ตะกอนโปรตีนมากที่สุดในปริมาณ 25.51% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ท จึงยังคงเลือกใช้อุณหภูมินี้ในการสกัดโปรตีนครั้งต่อไป เมื่อทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน พบว่า การสกัดโปรตีนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้ตะกอนโปรตีนออกมามากที่สุดในปริมาณ 45.98% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ท ซึ่งไม่ตรงกับรายงานของจิราพร (1) ที่พบว่าการใช้เวลาในการสกัดเพียง 1 ชั่วโมง ได้โปรตีนออกมามากที่สุดในปริมาณ 34.26% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ท ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลมาจากอัตราเร็วในการเขย่า และปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน

จากรายงานของ Thompson (21) พบว่า การสกัดโปรตีนจากเรปซิดด้วยสารละลาย $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่มี pH 7 จะได้โปรตีนออกมาในปริมาณสูง ส่วนจิราพร (1) ได้รายงานว่า การสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่มี pH 5.4 ได้ตะกอนโปรตีนออกมา 15.33% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ทโดยสกัดโปรตีนได้น้อยกว่าสารละลาย 2% Na_2CO_3 ประมาณ 30 % นอกจากนี้ พบว่า pH ที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เช่นกัน เนื่องจากในพวกพืชน้ำมัน เช่น เรปซิด มีโปรตีนที่ค่อนข้างซับซ้อนและมีค่า isoelectric point ที่กว้าง ตั้งแต่ 4-11 (5, 11) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากกากมันสตาร์ทด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ด้วย โดยในขั้นแรกได้ทำการหา pH ที่เหมาะสมของสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่จะใช้ในการสกัดตั้งแต่ pH 1-12 พบว่า การสกัดด้วยสารละลายที่เป็นกรด แล้วตกตะกอนด้วยสารละลายต่าง pH 8.3 ได้ตะกอนโปรตีนที่มีลักษณะค่อนข้างแห้ง และมีสีค่อนข้างขาว โดยการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 ได้ตะกอนโปรตีนออกมามากที่สุดประมาณ 43.58% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ท จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนถึง pH 6 ส่วนการสกัดด้วยสารละลายต่าง แล้วตกตะกอนด้วยสารละลายกรด pH 3.8 ได้ตะกอนโปรตีนที่มีลักษณะค่อนข้างเหนียวและมีสีค่อนข้างดำ โดยการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 ได้ตะกอนโปรตีนปริมาณมากที่สุด ประมาณ 32.50% ของโปรตีนในกากมันสตาร์ท ซึ่งจากการเปรียบเทียบการสกัดโปรตีนจากกากมันสตาร์ทด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่ปรับ pH ให้เป็นกรดหรือต่างแล้ว พบว่า การสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่มี pH 1 ได้โปรตีนที่มีปริมาณสูงสุด อีกทั้งสีของโปรตีนก็เป็นที่ยอมรับมากกว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ ที่มี pH เป็นต่าง อย่างไรก็ตาม ในการวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ใช้วิธีการชั่งน้ำหนักของตะกอนแห้งที่ได้ โดยถือว่า ตะกอนที่ได้เป็นโปรตีนทั้งหมด ซึ่งไม่ถูกต้องเสียทั้งหมด

เนื่องจากสารที่ตกตะกอนออกมาอาจจะไม่ใช่โปรตีนทั้งหมด ค่าที่ได้จึงเป็นการบอกคร่าวๆถึงโปรตีนที่ได้ออกมาเท่านั้น ดังนั้นจึงได้ทดลองวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 , 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 และ pH 11 ซึ่งพบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 แบบ มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบจริงอยู่เพียง 23.32, 10.00 และ 23.74% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำกลับไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ได้จริงจากการสกัดทั้ง 3 แบบ คิดเป็น 10.72, 5.18 และ 7.72 % ของโปรตีนในกากมัสตาร์ดตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับรายงานของ Xu et al, Zhou et al และ Thompson et al (11, 12, 21) ซึ่งสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ 50-60% ของโปรตีนทั้งหมด โดยพบว่า โปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 2% Na_2CO_3 นอกจากจะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบแล้ว ยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เถ้า ความชื้น ในปริมาณ 17.78, 12.26 และ 10.96 % ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 1 มีปริมาณ เถ้า และความชื้น ถึง 49.26 และ 12.55 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าปริมาณโปรตีนที่ต้องการสกัด ในขณะที่การสกัดด้วยสารละลาย 2% $(\text{NaPO}_3)_6$ pH 11 จะให้ปริมาณเถ้า และความชื้น 18.69 และ 11.80 % ตามลำดับ การที่ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายทั้ง 3 แบบ มีปริมาณโปรตีนอยู่น้อย ในขณะที่มีสารอื่นอยู่อีกมาก น่าจะเป็นผลมาจากการตกตะกอนของสารอื่น เช่น phytic acid ร่วมกับโปรตีน (5) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดและตกตะกอนโปรตีนทั้ง 3 แบบข้างต้น ยังไม่เหมาะสมเท่าที่ควรในการนำมาใช้สกัดและแยกโปรตีนจากกากมัสตาร์ด เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในตะกอนโปรตีนทั้งสาม พบว่า โปรตีนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 แบบ มี arginine เป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุด รองลงมาคือ glutamic acid ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นพบอยู่ในปริมาณเล็กน้อย แต่จะไม่พบ cysteine ในโปรตีนทั้งสามแบบเลย

เนื่องจากมีรายงานว่า ในเมล็ดพืชน้ำมันส่วนใหญ่มีสารที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็น antinutritional factors ได้แก่ กลูโคซิโนเลต (glucosinolate) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และกรดไฟติก (phytic acid) อยู่ด้วย (5, 9) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเมล็ดพืชน้ำมันเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ จึงได้ศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในกากมัสตาร์ดด้วย

ในการทดลองครั้งนี้นอกจากจะได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ดแล้วยังได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากกากและเมล็ดมัสตาร์ดที่แยกโปรตีนออกมาแล้วด้วย เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถจับกับโปรตีนได้ (14-18) ดังนั้นโปรตีนที่แยกได้นั้นอาจมีสารประกอบฟีนอลิครวมอยู่ด้วย โดยการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ดได้ทำ

2 แบบ แบบแรกตามวิธีของ Raymond et al. (28) และแบบที่สองตามวิธีของ Krygier et al. (27) ซึ่งแยกสารประกอบฟีนอลิกออกมาในรูปต่างๆ คือ รูปอิสระ (free) รูปเอสเทอร์ (ester) และรูปที่จับกับกาก (bound) โดย Raymond et al. (28) ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดทานตะวัน โดยสกัดโปรตีนออกมาจากเมล็ดทานตะวันก่อน แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เพื่อแยกเอาโปรตีนออกไป แล้วจึงสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสารละลายดังกล่าวด้วย ethyl acetate ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ก็ได้ใช้วิธีการในทำนองเดียวกันนี้ คือ สกัดโปรตีนออกมาจากกากมัสตาร์ดก่อนด้วยสารละลาย Na_2CO_3 แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย HCl pH 3.8 จากนั้นสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วย ethyl acetate ส่วนการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ใช้โครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทาง ในทิศทางแรกใช้ acetic acid เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากนั้นใช้ n-butanol-acetic acid-water เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ในทิศทางที่สอง

Krygier et al. (27) ได้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดด้วยสารละลายผสมของ methanol-acetone-water แล้วแยกส่วนกากมาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย NaOH จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปจับกับกาก ส่วนสารละลายใสที่ได้เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethylether-ethyl acetate ได้สารละลายชั้นบนซึ่งเป็นสารอินทรีย์ คือสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ ส่วนสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำ คือสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย NaOH จะได้เป็นสารประกอบฟีนอลิกรูปอิสระ การตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกทำได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ benzene-methanol-acetic acid เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีการสกัดและตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกจากกากมัสตาร์ดตามวิธีของ Krygier ด้วย โดยเพิ่มขั้นตอนการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย Na_2CO_3 ออกมาก่อน แล้วจึงแยกสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์จากสารละลายที่แยกโปรตีนออกไปแล้ว ส่วนสารประกอบฟีนอลิกที่จับกับโปรตีนก็ทำการศึกษาได้เช่นเดียวกับกาก

ในการตรวจสอบหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากทั้งวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษแบบสองทิศทางและแบบผิวบาง ใช้การเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน ได้แก่ การเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ค่า R_f และการให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitroaniline และ Hoepfner เหมือนกัน โดยพบ sinapic acid เป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบฟีนอลิกทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก นอกจากนี้ยังพบสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นที่ไม่สามารถตรวจ

สอบได้เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่พบว่า sinapic acid เป็นสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในพริกชี้และมัสตาร์ด (13-18, 25-27)

เมื่อตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ในรูปต่างๆ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-600 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน sinapic acid พบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปจับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงที่ตรงกับสารละลายมาตรฐาน sinapic acid คือที่ประมาณ 220 และ 320 nm อย่างไรก็ตาม พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ยังมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 280 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน แสดงว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้นั้นบางส่วนจับรวมตัวอยู่กับโปรตีนด้วย

จากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของกากและเมล็ดมัสตาร์ด พบสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระมากที่สุด โดยพบว่า ในกากมัสตาร์ดมีสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ และรูปที่จับกับกากในปริมาณ 60.78, 28.97 และ 22.60 mg/100 g ของกากมัสตาร์ด ตามลำดับ ส่วนในกากมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีน มีสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากในปริมาณ 37.9, 15.1, 7.7 และ 36.7 mg/100 g ของกากมัสตาร์ด ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่านการสกัดโปรตีน มีสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากในปริมาณ 117.8, 57.6, 25.2 และ 59.3 mg/100 g ของเมล็ดมัสตาร์ด ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า โปรตีนที่ได้จากกากและเมล็ดมัสตาร์ดมีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ด้วยในปริมาณ 158.5 และ 239.7 mg/100 g ของโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำโปรตีนนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป อย่างไรก็ตามผลการทดลองหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่พบว่า sinapine ซึ่งเป็น choline ester ของ sinapic acid กับ choline เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีปริมาณมากที่สุด (13-18, 25-27) ในขณะที่จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระ ซึ่งส่วนใหญ่คือ sinapic acid มีอยู่ในปริมาณมากที่สุด แสดงว่า อาจมีการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกในรูปเอสเทอร์กลายเป็นรูปอิสระ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มีปริมาณน้อยกว่าที่เคยมีรายงาน 1.38-1.67% (13) ค่อนข้างมาก จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีการสูญเสีย หรือการเปลี่ยนรูปของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างขั้นตอนการเตรียม รวมทั้งแหล่งของวัตถุดิบที่ใช้ก็แตกต่างกันด้วย

จากการที่พบว่า เมื่อเก็บกากมัสตาร์ดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษานี้ไว้ระยะเวลาหนึ่ง กากมัสตาร์ดที่เก็บไว้จะมีสีที่เข้มขึ้นกว่าเดิม ซึ่งเป็นเรื่องที่พบได้ทั่วไปในพริกผัก ผลไม้ที่มี

การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยข้อสันนิษฐานประการหนึ่ง น่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีอยู่ในผักและผลไม้ที่ออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบควิโนน จากนั้นสารประกอบควิโนนที่เกิดขึ้นก็ทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรชันต่อไปได้เป็นสารประกอบที่มีสีคล้ำ เช่น น้ำตาล ดำ หรือแดง (31-34) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงได้ให้ความสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมัสตาร์ดด้วย โดยวิธีการที่ใช้ในการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสนั้นโดยทั่วไป จะใช้อยู่ 2 วิธี (34) คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปอันเนื่องมาจากสารประกอบควิโนนที่เกิดขึ้น หรือวัดปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยเอนไซม์เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสนี้ จำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาด้วย ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ตามวิธีการแรกซึ่งค่อนข้างจะสะดวกกว่า อีกทั้งอุปกรณ์ก็ไม่ยุ่งยาก

จุดสำคัญในการตรวจสอบว่าเมล็ดมัสตาร์ดมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสอยู่หรือไม่ ในปริมาณมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สับสเตรทของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์โดยทั่วไป จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้น ในขั้นตอนแรกต้องหาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเสียก่อน โดยได้เลือกสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสับสเตรททั้งพวก mono, di และ polyphenol แล้ววัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดจากเมล็ดมัสตาร์ด สามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกพวก polyphenol ได้แก่ pyrogallol และ gallic acid ได้ดีที่สุดตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถออกซิไดส์พวก diphenol เช่น hydroquinone, DOPA ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้นี้ไม่สามารถใช้พวก monophenol เช่น p-cresol เป็นสับสเตรทได้ แสดงว่าเอนไซม์นี้ขาด monophenolase activity ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองจะพบว่า pyrogallol เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดของเอนไซม์ที่สกัดได้นี้ แต่เนื่องจากในการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ค่าที่สูงมากเกินไป ทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อนได้สูง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท

เมื่อพบว่าเมล็ดมัสตาร์ดมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสแล้ว ขั้นตอนต่อไปก็ต้องศึกษาถึง การสกัดเอนไซม์ออกจากเมล็ด โดยต้องทำให้เมล็ดแตกเสียก่อน ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการปั่นเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเครื่อง blender แล้วจึงหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ออกมาจากเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี pH ต่างๆ กัน ตั้งแต่ 3-10 ซึ่งพบว่า สารละลาย

เอนไซม์ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ให้ค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุด ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับการสกัดเอนไซม์โดยทั่วไปที่ใช้สารละลายที่มีความแรงไอออน และ pH ใกล้เคียงกับสภาพภายในเซลล์ให้มากที่สุด (61-62) ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยสารละลายในสภาพต่าง ให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ค่อนข้างสูง แต่ไม่เหมาะในการศึกษา เนื่องจากในสภาวะต่างจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกได้ดี ส่วนการสกัดในสภาวะกรดก็ไม่เหมาะสม เนื่องจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มักถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารละลายกรด (46) ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้สารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ในการสกัดเอนไซม์จากเมล็ดมันฝรั่ง

เมื่อได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์แล้ว ก็จะมาหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งต่อไป โดยเวลาที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีที่ใช้ในการสกัด ในการทดลองนี้ได้สกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง โดยการคนด้วย magnetic stirrer ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดเอนไซม์ให้มากขึ้น จะได้ค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่โปรตีนก็จะละลายออกมาได้มากขึ้นด้วยเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity ที่ได้ การสกัดเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ค่าที่สูงสุด อีกทั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ได้ก็ไม่แตกต่างจากการเพิ่มเวลาในการสกัดให้มากขึ้นสักเท่าใด ดังนั้นในการทดลองต่อไป ได้เลือกใช้เวลาในการสกัดเอนไซม์ 1 ชั่วโมง

เมื่อได้สกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดมันฝรั่งให้ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์แล้ว พบว่า เอนไซม์ที่ได้ค่อนข้างจะเจือจาง ดังนั้นขั้นตอนต่อไปคือทำเอนไซม์ที่สกัดได้นี้ให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน โดยเริ่มแรกต้องหา % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัวที่สามารถตกตะกอนเอนไซม์ที่เราต้องการออกมาให้ได้ก่อน ซึ่งทำได้โดยการค่อยๆเติมเกลือ ตั้งแต่ 10-80% ภายหลังจากละลายตะกอนเอนไซม์ที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาณน้อยสุดแล้ว ก็หาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เพื่อดูว่า % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัวที่เท่าไรที่ทำให้เอนไซม์ที่เราต้องการตกตะกอนออกมา โดยวิธีการนี้นอกจากจะทำให้เอนไซม์ที่เราต้องการเข้มข้นขึ้นแล้ว ยังช่วยแยกโปรตีนอื่นออกไปได้อีกด้วย ซึ่งถือเป็นการช่วยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นต้น (61-62) จากผลการทดลองที่ได้ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือ 2 แบบ คือแบบต่อเนื่อง และไม่ต่อเนื่อง พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถตกตะกอนได้ในทุกช่วง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัว 10-80% ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่า specific activity ของแต่ละช่วงเกลือ พบว่า ค่า specific activity ที่ได้แทบจะไม่แตกต่างจากของเอนไซม์ก่อนตก

ตะกอนด้วยเกลือเลย ดังนั้น วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือนี้จึงเพียงแต่ช่วยทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากการสกัดในตอนแรกเข้มข้นขึ้นเท่านั้น แต่แยกโปรตีนอื่นออกไปได้ไม่มากนัก และเนื่องจากการที่เอนไซม์สามารถตกตะกอนได้ในเกือบทุกช่วงของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ดังนั้นจึงเลือกใช้เกลือ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในการตกตะกอนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจาก crude extract

ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดขั้นหนึ่งในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ คือ การทำให้เอนไซม์ที่ได้จากการสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการแยกโปรตีนอื่นออกไปให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นนั้น ได้แก่ ion exchange, gel filtration, hydrophobic และ affinity chromatography จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสนั้นส่วนใหญ่จะทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ ion exchange คือ DEAE (34, 41, 52) แต่จากรายงานของ Fujuta et al. (54) พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้จากกะหล่ำปลีไม่จับกับ DEAE แต่จับกับ CM แทน ซึ่งปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการตัดสินใจว่าเอนไซม์สามารถจับกับคอลัมน์ชนิดใดได้นั้น คือ pH ของสารละลายที่ใช้ equilibrate คอลัมน์ โดยถ้า pH ของสารละลายมีค่ามากกว่า pI ของเอนไซม์ เอนไซม์จะมีประจุลบและจับกับ DEAE แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้า pH ของสารละลายมีค่าน้อยกว่า pI ของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์มีประจุบวกและจับกับ CM (61-62) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสกับทั้ง DEAE และ CM โดยการ equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 7 ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ค่อนข้างมีความคงตัวดี ซึ่งผลการทดลองพบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสามารถจับกับคอลัมน์ทั้งสองชนิดได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากการชะเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1 M NaCl แล้ว พบว่า เอนไซม์สามารถจับกับ CM ได้ดีกว่า DEAE โดยเมื่อใช้ DEAE เอนไซม์ส่วนใหญ่หลุดออกมาจากคอลัมน์ มีเอนไซม์เพียงบางส่วนที่จับกับคอลัมน์เท่านั้น ในขณะที่เมื่อใช้ CM เอนไซม์ส่วนใหญ่จับกับคอลัมน์ มีเพียงบางส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งจากคุณสมบัตินี้มีความเป็นไปได้ว่า เอนไซม์อาจมีอยู่หลายรูปแบบ (form) โดยที่แต่ละรูปแบบอาจมีคุณสมบัติแตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่า เอนไซม์บางส่วนอาจรวมตัวกับสารประกอบอื่น เช่น สารประกอบฟีนอลิก หรือ กรดไฟติกที่มีอยู่ในเมล็ดมันฝรั่งแล้วเกิดเป็นสารประกอบที่มีประจุลบทำให้สามารถจับกับ DEAE ซึ่งมีประจุบวกได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไป ได้เลือกใช้ CM ในการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ทั้ง CM และ DEAE มีค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ก่อนผ่านคอลัมน์ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ถูกแยกออกไปในระหว่างการผ่านคอลัมน์

จากการที่เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไม่สามารถจับกับคอลัมน์ CM ได้ทั้งหมด ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์จับกับคอลัมน์ไม่ดีพอทำให้มีโปรตีนอื่นแย่งกับคอลัมน์ได้ด้วย ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงได้ equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 ที่มี pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยคาดหมายว่า ที่ pH ต่ำลงเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสน่าจะมีความแรงของประจุมากขึ้น และจับกับคอลัมน์ได้เกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม จากการทดลอง พบว่า การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 6.5 จะให้เอนไซม์ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุด แต่ไม่ต่างจาก pH 7 เท่าใดนัก ยังคงมีเอนไซม์บางส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ส่วนการ equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย pH 5.5 และ 6.0 แล้วกลับได้เอนไซม์ที่มีค่าประสิทธิภาพการทำงานต่ำลงนั้น อาจเนื่องมาจากความไม่คงตัวของเอนไซม์ในสารละลายที่มี pH ดังกล่าว ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 ในการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ CM ต่อไป

เนื่องจากการใช้ CM ไม่สามารถทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีความบริสุทธิ์ได้มากเท่าใดนัก จึงต้องลองหาวิธีการอื่นในการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป จากรายงานของ Raymond et al. (52) พบว่า สามารถทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดทานตะวันให้บริสุทธิ์ขึ้นได้มากด้วย affinity chromatography โดยการใช้ Con A Sepharose ซึ่งจะมีความจำเพาะในการจับกับเอนไซม์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังนั้น จึงได้ทดสอบการจับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากมันฝรั่งกับคอลัมน์ Con A Sepharose พบว่า เอนไซม์สามารถจับกับคอลัมน์ Con A Sepharose ได้หมด ดังนั้น จึงเลือกใช้คอลัมน์ Con A Sepharose ในการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ต่อไป

ภายหลังจากที่เลือกวิธีการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์ขึ้นได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการใช้วิธีการต่าง ๆ ดังกล่าวร่วมกันเพื่อเตรียมเอนไซม์ในปริมาณมากขึ้นให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อจะนำไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ต่อไป โดยวิธีการที่เลือกใช้ คือ การตกตะกอนเอนไซม์ด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation เพื่อทำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ CM ที่ equilibrate ด้วยสารละลาย 0.01 M Citric acid- Na_2HPO_4 pH 6.5 แล้วนำเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์ซึ่งถูกชะออกมาด้วยสารละลาย 1 M NaCl มาผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose พบว่า จะได้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น (purification fold) เท่ากับ 104.71 โดยมี % yield 1.92 ซึ่งพบว่าเอนไซม์จะสูญเสียไปมากในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อีกทั้งวิธีการนี้ไม่ได้ช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น

จากเดิมมากนัก ดังนั้น จึงได้เลือกใช้การทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration แทนการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

เมื่อนำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านการทำให้เอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration จากนั้นนำเอนไซม์ที่เข้มข้นขึ้นแล้วนี้มาผ่านคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose ตามลำดับแล้ว ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 33.14 เท่า โดยมี % yield 12.86 โดยถ้าเปรียบเทียบระหว่างการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับการทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration พบว่า การทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration ให้ yield มากกว่า คือ 50.42 % ในขณะที่การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ได้ผลผลิตคิดเป็น 27.71% โดยค่า purification fold ที่ลดลงนี้ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่คอลัมน์ Con A Sepharose ถูกปนเปื้อนภายหลังจากการใช้งานหลายๆครั้งแล้ว แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE จะเห็นโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียว ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 40,691 ดาลตัน

เมื่อได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นแล้ว ขั้นตอนต่อไป เป็นการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนนี้ ในขั้นแรกจะศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ซึ่งพบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคืออยู่ในช่วง 30-50 μl

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง ต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มักพบทั่วไปที่อุณหภูมิห้อง (34) แต่ก็ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเมลิตทานตะวันตกที่ 45 องศาเซลเซียส (52) และ 55-60 องศาเซลเซียส (42) เอนไซม์ที่ได้ไม่ค่อยคงทนต่อความร้อนมากนัก โดยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงไปกว่า 50% เมื่อ incubate ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสขึ้นไปเป็นเวลา 30 นาที

pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ 8.0 เมื่อใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท ซึ่งใกล้เคียงกับของกะหล่ำปลีที่ 7.6 เมื่อใช้ phloroglucinol เป็นสับสเตรท (54) และ เมลิตทานตะวันตก ที่ 7.9 เมื่อใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท (52) แต่โดยทั่วไป pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะอยู่ในช่วง 4.5-7.0 ขึ้นกับแหล่งของเอนไซม์ (31-34) เมื่อพิจารณาความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ พบว่า เอนไซม์มีความคงตัวต่อสารละลายต่างมากกว่าสารละลายกรด โดยเอนไซม์ยังมีค่าประสิทธิภาพการทำงานอยู่ 70-90% เมื่ออยู่ในช่วง pH 9-7.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.01 mM และ 0.02 $\mu\text{mole/min}$ ตามลำดับ โดย K_m ที่ได้นี้มีค่าน้อยเมื่อเทียบกับของกะหล่ำปลี ซึ่งมีค่า 6.4 mM (54) และ แอปเปิ้ล ซึ่งมีค่า 10.96 mM (53) แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะในการจับกับสับสเตรทได้ดีพอสมควร

เอนไซม์สามารถออกซิไดส์สับสเตรทประเภท polyphenolic compound เช่น gallic acid และ pyrogallol ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับสับสเตรทที่เหมาะสมของ ลำไย และถูกผสมของเมล็ดทานตะวัน (40, 42) โดยในการทดลองนี้จะเลือกใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ส่วนพวก diphenol เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้บ้าง แต่ไม่สามารถออกซิไดส์สับสเตรทประเภท monophenol เช่น p-cresol ได้เลย แสดงว่า เอนไซม์ที่ได้มีขาด monophenolase activity

เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารประกอบหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ เช่น 2-mercaptoethanol , cysteine ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ potassium metabisulfite สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ประมาณ 50% ส่วน citric acid และ sinapic acid ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน โดย citric acid มีผลในการทำให้ pH ของสารละลายลดต่ำลงมากจนไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (46) ส่วน sinapic acid ซึ่งมีโครงสร้างเป็น benzene ring จะก่อให้เกิด steric hindrance ที่มีผลต่อการจับของเอนไซม์กับสับสเตรท (34, 47, 48) เกลือโซเดียมคลอไรด์สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้บางส่วนเช่นกัน ในขณะที่ CaCl_2 จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณหนึ่งเท่าตัว

เอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวค่อนข้างดี โดยพบว่า ภายหลังจากเวลาผ่านไป 7 วัน เอนไซม์ที่แช่แข็งไว้ยังคงมีค่าประสิทธิภาพการทำงานเหลืออยู่กว่า 60%