การแยกโปรตีนจากผงมะขามโดยใช้โปรติเอส

นางสาวนิภาวดี แสงยนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545
ISBN 974-17-1048-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEPARATION OF PROTEINS FROM TAMARIND KERNEL POWDER USING PROTEASE

Miss Nipawadee Sangyont

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University

Academic Year 2002
ISBN 974-17-1048-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกโปรตีนจากผงมะขามโดยใช้โปรติเอส
โดย	นางสาวนิภาวดี แสงยนต์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายปรีชา แสงธีระปิติกุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ ตัณฑะพานิชกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นายปรีชา แสงธีระปิติกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์)

..... กรรมการ
(ดร.ชฎา พิศาลพงศ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิภาวดี แสงยนต์: การแยกโปรตีนจากผงมะขามโดยใช้โปรติเอส (SEPARATION OF PROTEINS FROM TAMARIND KERNEL POWDER USING PROTEASE) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นายปรีชา แสงธีระปิติกุล, 143 หน้า. ISBN : 974-17-1048-8

การศึกษาการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้โปรติเอส (นิวเทรส) ร่วมกับเอทานอล แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการศึกษาคุณสมบัติของผงเนื้อในเมล็ดมะขามและสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ส่วนที่สองเป็นการเปรียบเทียบผลของการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ ส่วนที่สามเป็นการศึกษาการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเอทานอล โดยจากการศึกษาคุณสมบัติของผงเนื้อในเมล็ดมะขามพบว่า ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ 68.06 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 17.33 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7.05 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ 7.56 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะประกอบด้วยส่วนที่มีขนาด 1 – 15 ไมโครเมตร 23.61 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน และไขมัน และส่วนที่เหลือมีขนาด 15 – 100 ไมโครเมตร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น อุณหภูมิ และเวลาในการกวนเพิ่มขึ้น ส่วนความเร็วรอบที่ 200 400 และ 600 รอบต่อนาทีไม่มีผลต่อความหนืด นอกจากนี้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะมีขนาดเล็กลงและมีการกระจายตัวดีขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิคงที่คือ 45 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิในช่วงที่เอนไซม์ทำงานได้ดี และผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความหนืดไม่เกิน 50 เซ็นติพอยส์ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 และไม่สูญเสียกิจกรรมเมื่อกวนที่ความเร็วรอบเป็น 200 400 และ 600 รอบต่อนาที แต่จะสูญเสียกิจกรรมทันทีในสารละลายเอทานอล โดยสูญเสียกิจกรรมมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์เมื่อเอทานอลมีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรขึ้นไป

ในส่วนที่สองได้มีการศึกษาการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ที่ 6.58 8 และ 10 ในภาวะที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์พบว่าในภาวะที่ใช้เอนไซม์ และสารแขวนลอยอยู่ที่พีเอช 8 จะให้ผลการแยกโปรตีนมากที่สุด มากกว่าไม่ใช้เอนไซม์อยู่ 6.37 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าที่ไม่ปรับพีเอชอยู่ 15.89 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วรอบ ในการกวนที่ 600 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ในภาวะที่ใช้เอนไซม์ ที่พีเอช 8 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแยกสูงสุดคือ 97.051 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับต้ม) หรือ 100.369 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับไม่ต้ม) และจากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม คือใช้เอนไซม์เข้มข้น (43.4 unit/ml) 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ต่อผงเนื้อในเมล็ดมะขามเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ในเวลา 20 นาที

ส่วนที่สามเป็นการศึกษาการแยกโปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเอทานอล ซึ่งทำการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมข้างต้น โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่ากรณีที่ไม่เติมเอทานอลจะสามารถแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้ 93.97 เปอร์เซ็นต์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เพียง 0.42 - 0.48 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และการเพิ่มเอทานอลไม่ทำให้แยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้มากขึ้น และยังมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์จะทำให้เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์น้อยกว่างานวิจัยอื่นๆ คืออยู่ในช่วง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากอนุภาคโพลีแซคคาไรด์ส่วนมากมีขนาดเท่าเดิม

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4270390521: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING
KEYWORD: TAMARIND KERNEL POWDER / TAMARIND SEED POLYSACHARIDE/PROTEIN/ SEPARATION/ PROTEASE/ ETHANOL

NIPAWADEE SANGYONT: SEPARATION OF PROTEINS FROM TAMARIND KERNEL POWDER USING PROTEASE THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr. Ing. THESIS CO-ADVISOR: PRECHA SANGTERAPITIKUL 143 pp. ISBN: 974-17-1048-8

The study of protein separation from tamarind kernel powder using protease (neutrase) and ethanol could be categorized into three sections. The first section was related to study of the properties of tamarind kernel powder and the suitable condition for enzyme activity. While the comparison between the separation with and without the enzyme was accomplished in the second section. And the last was to find the suitable condition for protein separation from tamarind kernel powder with the use of enzyme and ethanol.

Regarding the first section, the tamarind kernel powder was composed of polysaccharide, protein, lipid, and others in the compositions of 68.06, 17.33, 7.05, and 7.56 %, respectively. From the corresponding particle size distribution, a fraction of 23.61% v/v, which is mainly protein and lipid, could be sized as 1-15 micrometers and the rest, which is mainly polysaccharide, could be sized as 15-100 micrometers. The viscosity of the powder increased in response to the increasing concentration, temperature, and agitation time but was not affected by the agitation speed (200, 400, and 600 rpm). In addition, the size of kernel powder was smaller and had better distribution at higher pH value. At the suitable condition for enzyme activity, which was at the working temperature of 45 ^{0}C, TKP concentration of 40 g/l and the viscosity of the kernel powder not exceeding than 50 cP, the enzyme was most active at the pH value of 8 and its activity was not affected by the agitation speed (200, 400, and 600 rpm). On the contrary, its activity was substantially denatured more than 10% when it was exposed to 5% v/v up of ethanol solution.

Concerning the second section, The experiments were carried out at pH value of 6.58 8 and 10 in cooperation with and without enzyme condition. It was found that at pH value of 8 and the presence of enzyme could give the highest percentage protein removal, which was 6.37% and 15.89% higher than the case of no enzyme and no pH regulation respectively. In addition, It was also found that at agitation speed of 600 rpm, reaction time of 20 minutes, pH of 8 and in the presence of enzyme should the highest protein separation of 97.051 % (cooking basis) or 100.369.% (non-cooking basis). The suitable enzyme (43.4 unit/ml) dosage was at 0.01 %v/v for 40 g/l if TKP and in 20 minutes incubation time.

For the last section, protein separation using enzyme and ethanol at stated suitable condition was investigated by varying the ethanol concentration from 1 3 to 5 %v/v. The experimental results show that without the use of ethanol the lipid could be remove by 93%, remaining only the trace amount of lipid (0.42–0.48 % wt/wt) in the product. Even with the presence of ethanol the lipid remove (1, 3, and 5 % v/v), it was confirmed that the lipid removal could not be enhanced. Protein separation, comparing with the other research, the use of enzyme could also reduce the polysaccharide loss in the rang of 40-60 % due to unchanging in size of the most polysaccharide particle.

Department….Chemical Engineering……Student's signature……
Field of study..Chemical Engineering…….Advisor's signature……
Academic year……2002……..Co-advisor's signature……..……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความช่วยเหลือที่ดียิ่งจากหลายๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ คุณปรีชา แสงธีระปิติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำวิธีการทำงานวิจัยตลอดจนตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ ตัณฑะพานิชกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ และ ดร. ชฎา พิศาลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้เสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ และ แก้ไข เพิ่มเติมส่วนที่บกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ บริษัท จี เอ็ม อิชิฮารา จำกัด ที่สนับสนุนวัตถุดิบในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีส เอเชียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน) ที่สนับสนุนเอนไซม์ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.ชฎา พิศาลพงศ์ สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทบวงมหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมเคมีสิ่งแวดล้อม และความปลอดภัย ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และขอกราบขอบพระคุณบิดา และมารดา และขอบคุณทุกๆคน ในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทางการศึกษาตลอดมาจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ(ภาษาไทย)..... ง

บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ) ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฏ

สัญลักษณ์..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 4

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย..... 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

2.1 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับเมล็ดมะขาม..... 5

2.1.1 ผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (tamarind kemel powder : TKP)..... 5

2.1.2 โพลีแซคคาไรด์ของเมล็ดมะขาม (jellose)..... 8

2.1.3 โปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 10

2.1.4 ไขมันในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 12

2.2 การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 13

2.3 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์..... 18

3. ทฤษฎี..... 22

3.1 โพลีแซคคาไรด์..... 22

3.1.1 ประเภทของโพลีแซคคาไรด์..... 22

3.1.2 คุณสมบัติทางเคมีของโพลีแซคคาไรด์..... 22

3.1.2.1 ปฏิกิริยากับกรด..... 23

3.1.2.2 ปฏิกิริยากับเบส..... 23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความหนืดของโพลีแซคคาไรด์ จากเมล็ดมะขามเมื่อกระจายตัวในน้ำ..... 23
3.2 โปรตีน..... 24
3.2.1 โครงสร้างของโปรตีน..... 25
3.2.2 ประเภทของโปรตีน..... 26
3.2.3 สมบัติและปฏิกิริยาบางประการของโปรตีน..... 32
3.2.3.1 ความเป็นกรดและเบสของโปรตีน..... 32
3.2.3.2 สมบัติการละลายของโปรตีน..... 34
3.2.3.3 สมบัติการเป็นคอลลอยด์..... 38
3.2.3.4 การเสื่อมสภาพธรรมชาติของโปรตีน..... 38
3.3 เอนไซม์..... 40
3.3.1 ประเภทของเอนไซม์จากจุลชีพ 43
3.3.2 สมบัติทางกายภาพและเคมี..... 45
3.3.3 สมบัติทางด้านเอนไซม์ (enzymic properties)..... 47
3.3.4 การทำงานของเอนไซม์..... 48
3.3.4.1 การจับตัวของสับสเตรท (binding of substrates)..... 48
3.3.4.2 การเปลี่ยนแปลง conformation ของเอนไซม์ และโครงรูปของสับสเตรท..... 50
3.3.4.3 วิธีคะตาลิซิสของเอนไซม์..... 51
3.4 ไขมัน..... 55
3.4.1 สมบัติทั่วไปของไขมัน..... 56
3.4.1.1 สมบัติทางฟิสิกส์..... 56
3.4.1.2 สมบัติทางเคมี..... 57
4. เคมีภัณฑ์ อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 60
4.1 เคมีภัณฑ์..... 60
4.2 เอนไซม์..... 61
4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง..... 61
4.4 วิธีการทดลอง..... 62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การวิเคราะห์..... 68
5. ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล..... 73
5.1 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 73
5.1.1 การศึกษาส่วนประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 73
5.1.2 การศึกษาขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 73
5.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และ เวลาที่มีผลความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 76
5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นิวเทรส..... 78
5.2.1 การศึกษาผลของพีเอช (pH)ที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด..... 78
5.2.2 การศึกษาผลของการปั่นกวนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์..... 79
5.2.3 การศึกษาผลของการมีสารละลายเอทานอลร่วมในปฏิกิริยา ที่กระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์..... 80
5.3 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 81
5.3.1 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออก จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช..... 84
5.3.1.1 กรณีไม่ใช้เอนไซม์..... 86
5.3.1.2 กรณีที่ใช้เอนไซม์..... 91
5.3.2 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลี-แซคคาไรด์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลา..... 94
5.4 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์..... 99
5.5 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์..... 101
5.6 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์..... 104

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.7 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม..... 106
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 107
6.1 สรุปผลการทดลอง..... 107
6.2 ข้อเสนอแนะ..... 109
รายการอ้างอิง..... 111
ภาคผนวก..... 115
ภาคผนวก ก. เส้นกราฟมาตรฐาน..... 116
ภาคผนวก ข. ข้อมูลการทดลองของบทที่ 5..... 119
ภาคผนวก ค. วิธีการคำนวณ..... 139
ประวัติผู้แต่ง..... 143

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบต่างๆ ของเมล็ดมะขาม เนื้อในเมล็ดมะขาม และ เปลือกมะขาม.....	7
2.2	กรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม.....	11
2.3	คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี ของไขมันในเนื้อเมล็ดมะขาม.....	13
2.4	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารเคมีต่างๆ (เกลือซัลเฟต, เอทานอล)ที่ใช้ในการสกัดเจลโลส กับปริมาณเจลโลสที่สกัดได้.....	14
2.5	การวิจัยเกี่ยวกับการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยวิธีการต่างๆ	16
3.1	มวลโมเลกุลของโปรตีนบางชนิด.....	25
3.2	จุดไอโซอีเลคตริคของโปรตีนต่างๆ.....	33
3.3	ค่าคงตัวไออิเลคของของเหลวต่างๆ ที่ 20 องศาเซลเซียส	37
3.4	ความจำเพาะต่อสับสเตรทของ proteolytic enzymes ชนิดต่าง ๆ.....	42
5.1	การศึกษาขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม.....	73
5.2	ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อใช้เอนไซม์ และไม่ใช้เอนไซม์.....	84
5.3	ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อใช้เอนไซม์ และไม่ใช้เอนไซม์.....	84
5.4	ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ ต่อการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม.....	106

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Rao P.S., 1956;Kumararaj R. 1980; Savur G.R., 1955; White EV. และ Rao P.S.,1966	8
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Kooiman P. (1957) ……	9
2.3	โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Savur G.R., 1955, Srivastava HC และ Singh PP., 1967……	9
2.4	กระบวนการสกัดเจลโลสจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์และอัลกอฮอล์……..	19
3.1	สายโพลีเปปไทด์……..	25
3.2	ผลของ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือต่อการละลายของเบต้าแลคโตกลอบบูลิน 25 องศาเซียลเซียส ……..…….……..	35
3.3	การคลายตัวและม้วนตัวของโปรตีนเมื่อแปรสภาพธรรมชาติไปกลับ……	40
3.4	การไฮโดรไลซ์เปปไทด์ด้วยโปรติเอส……	41
3.5	ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ thermolysin …….. …	46
3.6	ลักษณะการสวมกันเข้าได้พอดีของสับสเตรทและบริเวณเร่งของเอนไซม์ (complement) เสมือนลูกกุญแจกับแม่กุญแจ ……	49
3.7	ความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะต่อสับสเตรทต่อลักษณะของบริเวณเร่งของเอนไซม์..	49
3.8	ขั้นตอน acylation และ deacylation บน chymotrypsin แสดง covalent catalysis…..	51
3.9	คะตาลิซิสบนเปปไทด์โดย carboxypeptidase A……..…….	52
3.10	การจับตัวของ Zn^{2+} เข้ากับเอนไซม์ carboxypeptidase A……..	52
3.11	การจับตัวของ glycyltyrosine กับบริเวณเร่งของ carboxypeptidase A... ……	53
3.12	กลไกคะตาลิซิสของ carboxypeptidase A……	54
4.1	เครื่องปฏิกรณ์……..	65
4.2	ชุดการทดลอง……..	66
4.3	ชุดอุปกรณ์ในการกรอง……...	66
5.1	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม……	74
5.2	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เริ่มต้น ผ่านผ้ากรอง และติดบนผ้ากรอง……..……..……	74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
5.3	ภาพถ่ายโพลีแซคคาไรด์ และโปรตีน ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า	75
5.4	ความหนืดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการกวน 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที.....	77
5.5	ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ.....	78
5.6	ผลของการปั่นกวนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อปั่นกวนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที.....	79
5.7	ผลของการมีสารละลายเอทานอลร่วมในปฏิกิริยาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ก)กิจกรรมของเอนไซม์กับความเข้มข้นของเอทานอล (ข) เปอร์เซ็นต์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์กับความเข้มข้นของเอทานอล	80
5.8	ลักษณะภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (ก) อนุภาคที่ผ่านผ้ากรอง กำลังขยาย 100 เท่า (ข) อนุภาคที่ผ่านผ้ากรอง กำลังขยาย 400 เท่า (ค) อนุภาคที่ติดบนผ้ากรอง กำลังขยาย 100 เท่า (ง) อนุภาคที่ติดบนผ้ากรอง กำลังขยาย 400 เท่า.....	83
5.9	ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์.....	85
5.10	ผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช.....	85
5.11	ลักษณะผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อแขวนลอยในสารละลายพีเอช 6.58 8 10 และ 12.....	88
5.12	ลักษณะผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อแขวนลอยในสารละลายพีเอช 6.58 8 10 และ 12 หลังจากทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง.....	88
5.13	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่พีเอชต่างๆ หลังจากกวน 20 นาที โดยไม่เติมเอนไซม์.....	89
5.14	ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่แขวนลอยในสารละลาย โดยไม่เติมเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ	90
5.15	การย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์นิวเทรส ทำให้เกิดการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม.....	91

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
5.16	การกระจายตัวของอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เปรียบเทียบกรณีที่เติมเอนไซม์และไม่เติมเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ	93
5.17	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เวลาต่างๆเมื่อไม่ปรับพีเอช....	95
5.18	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เวลาต่างๆ เมื่อพีเอชเป็น 8....	95
5.19	ลักษณะอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เป็นอุปสรรคต่อการแยกโปรตีน โดยใช้เอนไซม์.....	96
5.20	ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ เปรียบเทียบกับกรณีไม่ใช้เอนไซม์ โดยถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	97
5.21	ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ เปรียบเทียบกับกรณีไม่ใช้เอนไซม์ โดยถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	98
5.22	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อปั่นกวนที่เวลาต่างๆ	99
5.23	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 200 400 และ 600 รอบต่อนาที.....	100
5.24	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เมื่อปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที	100
5.25	ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์.....	102
5.26	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามหลังทำปฏิกิริยา 20 นาที โดยใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ.....	103
5.27	ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์.....	104
5.28	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเอทานอล ที่ความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆกัน เทียบกับผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น.....	105

สัญลักษณ์

μ	ความหนืดของสารละลาย	cP
A	ค่าคงที่ของอาร์เรเนียส	
E	พลังงานกระตุ้น	J
R	ค่าคงที่ของก๊าซ	J/mol-K
T	อุณหภูมิสัมบูรณ์	K
μ	กำลังอิออน (ionic strength)	
C	ความเข้มข้น	(mol/l)
Z	เป็นประจุของอิออน	
F	แรงดึงดูดระหว่างอิออน 2 อันซึ่งมีประจุต่างกัน e_1 และ e_2 เป็นประจุของแต่ละอิออน	
r	ระยะทางระหว่างประจุทั้งสอง	(m)
D	ค่าคงตัวไดอีเลคตริค	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากประเทศไทยมีปริมาณการผลิตมะขามปีละประมาณแสนตัน (สถิติการเพาะปลูกผลไม้ยืนต้น ปีการเพาะปลูก, 2533/2534) ทำให้มีเมล็ดมะขามซึ่งเป็นผลพลอยได้ประมาณสามหมื่นตันต่อปี การใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นการบริโภคในส่วนเนื้อ ส่วนเมล็ดมะขามยังไม่ค่อยมีการใช้ประโยชน์มากนัก ส่วนใหญ่จะใช้คั่วผสมกับกาแฟหรือรับประทานเป็นของขบเคี้ยว และส่วนที่เหลือจากนั้นจะถูกนำไปทิ้ง ซึ่งก่อให้เกิดขยะและต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการกำจัด ทั้งๆที่ในเมล็ดมะขามมีโพลีแซคคาไรด์ ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่เป็นประโยชน์อย่างมาก กล่าวคือ ในเมล็ดมะขามมีโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเรียกว่า Tamarind Seed Polysaccharide (TSP) โดยมีคุณสมบัติเป็นเจลเมื่อละลายอยู่ในน้ำ และไม่มีกรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid) หรือ หมู่ฟังก์ชันของเมทิลยูโรเนท (methyl uronate) ทั้งยังสามารถคงรูปเจลอยู่ได้ในช่วงพีเอชที่กว้างซึ่งต่างจากโพลีแซคคาไรด์ จากพืชชนิดอื่น ดังนั้นจึงเรียกสารตัวนี้ว่า เจลโลส (jellose) (Rao.Ps,1956) เจลโลสเป็นสารประเภทกัม ที่มีประโยชน์มากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเส้นใย เครื่องสำอาง เภสัชกรรม กระดาษ อาหารและอื่น ๆ โดยใช้เป็นสารให้ความหนืด (thickening) สารรักษาความคงตัว (stabilizer) สารเสริมน้ำและน้ำมันให้เข้าเป็น เนื้อเดียวกัน (emulsifier) สารช่วยในการรวมตัวกับน้ำ (water binder) และสารช่วยการแขวนลอย (suspending agent) (Rao.Ps,1993) เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีบริษัทที่ผลิตผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (Tamarind Kernel Powder : TKP) ขึ้นในประเทศไทย คือบริษัท จีเอ็ม อิชิฮารา จำกัด (G.M. Ichihara Co.ltd) โดยบริษัทได้รับซื้อเมล็ดมะขามจากที่ต่างๆ ในประเทศไทย จากนั้นจึงนำมา ผ่านกระบวนการแยกเปลือกของเมล็ดออกแล้วบดเนื้อในเมล็ดมะขามจนได้ขนาดที่ต้องการ ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า MAKAM 200 แล้วจึงส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นเพื่อทำการกำจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามจนกระทั่งได้ TSP (ชื่อทางการค้าว่า SOABIGUM หรือ TG 200) ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดที่จะทำการผลิต TSP อย่างครบวงจรเพื่อใช้ในประเทศไทย

จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ได้ มีส่วนประกอบของสารที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ร้อยละ 65 -72.2 และ ส่วนที่ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ ในส่วนที่ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ส่วนใหญ่เป็น โปรตีนร้อยละ 15 - 21 ซึ่งได้แก่ อัลบูมิน (albumin) กลอบบูลิน (gobulin) โพรลามีน (prolamine) และกลูเทอ

ลีน (glutelins) ไขมันร้อยละ 4 - 8 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวได้แก่ กรดลิโนเลอิก (linolelic acid) กรดปาล์มมิติก (palmitic acid) และกรดโอลิอิก (oleic acid) และเส้นใยร้อยละ 2.5 - 8.2 (The Wealth of india, 1996) สารเจือปนเหล่านี้ทำให้เจลโลสมีคุณสมบัติไม่ดี โดยไขมันจะทำให้เจลโลสเหนียว มีความหนืดสูง มีกลิ่นเหม็นหืน และไม่สามารถไหลได้ ทำให้ยากต่อการเคลื่อนที่และกระจายตัว ส่วนโปรตีน จะทำให้เกิดฟองขึ้นในระหว่างการกระจายตัวในระบบที่เป็นของเหลว และเมื่อโปรตีนเสื่อมสภาพจะมีผลให้โปรตีนตกตะกอนได้ ส่วนไฟเบอร์นั้นไม่ละลายในน้ำ ทำให้ไปติดขัดกับอุปกรณ์ในกระบวนการ ทำให้ต้องหยุดกระบวนการได้ (Jones และคณะ, 1978) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องแยกสารที่ไม่ใช่เจลโลสเหล่านี้ออก

จากการศึกษาโครงสร้างของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศ์ จะพบว่าอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ มีลักษณะเป็นก้อนกลม และมีอนุภาคของโปรตีนเกาะอยู่รอบๆ โดยโปรตีนจะเชื่อมอยู่ระหว่างอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโปรตีน และ โพลีแซคคาไรด์ ส่วนใหญ่เป็นแรงยึดเหนี่ยวเนื่องจากไฟฟ้าสถิตย์ (Imeson และคณะ, 1977) โดยถึงแม้ว่าสารชีวโมเลกุลทั้งสองจะมีประจุไฟฟ้าสุทธิ เป็นลบเหมือนกัน แต่ยังสามารถมีดึงดูดกันระหว่างประจุบวกภายในโครงสร้างของโปรตีน และประจุลบของโพลีแซคคาไรด์ (Tolstoguzov, 1986 และ Ledword, 1994) ส่วนแรงยึดเหนี่ยวชนิดอื่น เช่น พันธะไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) หรือ พันธะโคเวเลนต์ซึ่งเป็นแรงยึดเหนี่ยวที่แข็งแรงกว่ามีผลต่อตวามคงตัว ทำให้แยกโมเลกุลทั้งสองออกได้ยากขึ้น (Imeson และคณะ, 1977)

ในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จำเป็นต้องทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอนุภาคของโปรตีน และอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ ออกจากกันก่อน แล้วจึงแยกส่วนที่เป็นโปรตีน และ โพลีแซคคาไรด์ ออกจากกัน โดยจากงานวิจัยของ วารี 2543 ได้นำผงเนื้อในเมล็ดมะขามมาผ่านคลื่นเหนือเสียงในการแยกโมเลกุลโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ ออกจากกัน แต่การทำในลักษณะนี้ จะทำให้คลื่นเหนือเสียงจะไปทำลายโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ ทำให้มีโมเลกุลเล็กลง และมีความหนืดลดลง และมีงานวิจัยมากมายที่พยายามแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารละลายเกลือต่างๆ กัน Deguchi (1963) ใช้หลักการ Salting out เพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยลารละลายแอมโมเนียนซัลเฟต อลูมิเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต Gordon (1968) ใช้ไอโซโพรพานอล Rao (1959) ใช้กรดซิตริก และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ Standford (1984) ใช้สารละลายเบสเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 13 ร่วมกับไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ Jones (1978) ใช้เอทิลีนไดคลอไรด์ เฮปเทน และโทลูอีน Teraoka และ คณะ (1990) ใช้เมทานอล เอทานอล โพรพานอล ไอโซโพรพานอล และอะซิโตน ซึ่ง

การใช้ตัวทำละลายเหล่านี้จะทำให้มีสารตกค้างอยู่ในโพลีแซคคาไรด์ และพบว่าไม่มีตัวทำละลายใดที่จะสามารถละลายสิ่งเจือปนออกจากโพลีแซคคาไรด์ ได้ทั้งหมด เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม มีขนาดใหญ่และประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ดังนั้นการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยการใช้ความสามารถในการละลายที่แตกต่างกัน จึงทำได้ยาก และเนื่องจากโพลีแซคคาไรด์ มีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือเหนียวหนืด ทำให้ต้องทำการแยกภายใต้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำทำให้สิ้นเปลืองสารละลายมาก และต้องใช้ภาชนะขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยบางส่วนใช้แรงเฉือนเนื่องจากการกรองแบบหมุน และการหมุนเหวี่ยงในการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ (กิตติพงษ์,2544)

ในส่วนของการแยกโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ และโมเลกุลของโปรตีนออกจากกัน หลังจากทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ แล้ว ส่วนใหญ่ใช้การกรอง การกรองแบบหมุน (กิตติพงษ์ 2544) แต่ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ใช้การแยกด้วย air classification หรือไฮโดรไซโคลน (Jones และคณะ, 1978) ซึ่งวิธีนี้ได้มีการจดลิขสิทธิ์ไว้ แต่ก็ยังมีข้อเสียคือ ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองสารเคมีมากอีกทั้งยังต้องใช้ไฮโดรไซโคลนถึง 36 ตัวทำให้ต้องใช้พื้นที่ และสิ้นเปลืองพลังงานมาก

ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกโปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ไดแอสเทสย่อยแป้งให้มีขนาดเล็กลง ทำให้เจลโลสที่ติดกับโมเลกุลของแป้งหลุดออกมาได้ง่ายขึ้นและใช้ปาเปนในการย่อยสลายโปรตีน และในการแยกโปรตีนออกจากหางนม (whey) และ ผงข้าว ซึ่งมีการใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก ย่อยสลายโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนซึ่งมีขนาดเล็ก ละลายน้ำและแยกออกได้ง่าย อีกทั้งเอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้เร็ว และมีความเฉพาะเจาะจงต่อสับเสรททำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่การทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ โดยจะใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนตรงส่วนที่ยึดเกาะอยู่โดยรอบๆ อนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ ให้เป็นกรดอะมิโนซึ่งมีโมเลกุลเล็ก ละลายน้ำได้ดี ผลจากการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอนุภาคทั้งสอง ทำให้อนุภาคของโปรตีนหลุดออกจากโพลีแซคคาไรด์ แล้วจึงค่อยแยกโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ออกจากกันด้วยกระบวนการกรอง การแยกโดยวิธีนี้จะง่าย, ประหยัดพลังงาน ใช้เวลาน้อย และใช้พื้นที่ในการติดตั้งน้อย เพื่อให้ได้ TSP ที่ต้องการ โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของพีเอช ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลา และหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนและโพลีแซคคา-

ไรด์ ออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม รวมทั้งได้ศึกษาผลของการใช้เอทานอลในการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม หลังจากแยกโปรตีนออกด้วย

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนจากผงมะขามโดยใช้โปรติเอสร่วมกับเอทานอล

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1.2.1 วิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ , โปรตีน ไขมัน ขนาดอนุภาค และศึกษาคุณสมบัติด้านความหนืด ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสโดยศึกษาผลของ ความเร็วรอบในการกวน พีเอช และปริมาณเอทานอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

1.2.3 เปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

1.2.4 ศึกษาผลของการแยกโปรตีนด้วยเอนไซม์นิวเทรส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง พีเอช, เวลา, ปริมาณเอนไซม์ และความเข้มข้นของเอทานอล จากนั้นนำไปกรองและชะด้วยน้ำ เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ และวัดขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากโพลีแซคคาไรด์

1.2.5 ศึกษาผลของการแยกไขมันเมื่อใช้โปรติเอส ร่วมกับเอทานอล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทำให้ทราบภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้โปรติเอสร่วมกับเอทานอล

1.3.2 เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ทางการเกษตรที่มีค่าน้อยให้มีมูลค่าสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับเมล็ดมะขาม

2.1.1 ผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (tamarind kernel powder :TKP)

เมล็ดมะขามประกอบด้วย เปลือกเมล็ดร้อยละ 30 และส่วนเนื้อในเมล็ดร้อยละ 70 (N.B. Shankaracharya, 1998) เมื่อนำเมล็ดมะขาม มาแยกเอาเปลือกออกแล้วนำเนื้อไปบดให้เป็นผงละเอียด จะได้ผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (tamarind kernel power :TKP) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นหืนเมื่อเก็บไว้นาน แต่ในทางตรงกันข้ามหากมีการสกัดแยกน้ำมันออกประมาณร้อยละ 0.5 จะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีสีเหลืองนวลและไม่มีกลิ่นเหม็นหืน และเมื่อแยกโปรตีนซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดฟองและตกตะกอนเมื่อเสื่อมสภาพออก จะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีคุณภาพสูงขึ้น ในการสกัดผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพื่อแยกไขมันและโปรตีนออกนั้น พบว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามประกอบด้วยกรดไขมันที่เป็นโซ่ยาว (C_{22} ถึง C_{24}) (Sivarama Reddy และคณะ , 1979) มีโปรตีนที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้หลายชนิด และมีโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 60

กระบวนการในการผลิตผงเนื้อในเมล็ดมะขามจากเมล็ดมะขามดิบมีหลักพื้นฐานง่ายๆ คือ ต้องทำการแยกเปลือกเมล็ดที่มีสีน้ำตาลออก จากนั้นนำเอาเฉพาะเนื้อไปบดให้เป็นผงละเอียดตามขนาดที่ต้องการ ในประเทศอินเดียมีการจดสิทธิบัตรกระบวนการผลิตผงมะขามไว้มากมาย ซึ่งกระบวนการต่างๆเหล่านี้สามารถแบ่งออกได้อย่างกว้างๆ เป็น 2 วิธีคือ

1. การนำเมล็ดดิบมาผ่านกระบวนการให้ความร้อน โดยการอบหรือคั่วที่อุณหภูมิ 125 – 200 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการให้ความร้อนขึ้นอยู่กับการทดลอง เพื่อให้เปลือกเมล็ดกรอบร่อน สามารถแยกออกจากเนื้อเมล็ดได้ด้วยวิธีการง่ายๆ เช่น การขัดสี
2. นำเมล็ดดิบมาทำการแยกเปลือกเมล็ดออก โดยไม่ผ่านการอบ การแยกเปลือกทำได้โดยเครื่องจักรที่ทำให้เมล็ดแตกออกหยาบๆ แล้วทำการแยกเปลือกเมล็ดออกไป จากนั้นจึงนำเอาเนื้อเมล็ดมาบดให้เป็นผงละเอียดอีกครั้งหนึ่ง

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการทั้ง 2 วิธีแล้ว กระบวนการที่ไม่ใช้ความร้อนจะเสียค่าใช้จ่ายน้อยและให้ผลผลิตสูง แต่ต้องมีการลงทุนค่าเครื่องจักร ส่วนในกระบวนการที่ใช้ความร้อนนั้นสามารถทำได้ง่ายกว่าไม่ต้องมีการลงทุนเบื้องต้นมากนัก แต่ต้องระวังเรื่องคุณภาพของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เพราะการให้ความร้อนที่ไม่เหมาะสมนั้นอาจทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ได้มีคุณภาพลดลง

ส่วนประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขามสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ตามความสามารถในการละลายและการเป็นเจล (พวงเพ็ชร, 2521) คือ

ส่วนที่ 1 มีปริมาณ ร้อยละ 2 – 4 สามารถละลายในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสได้ภายใน 2-3 นาที ส่วนนี้ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ที่แท้จริงแต่เป็น polyuronide ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการเป็นเจลและมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน

ส่วนที่ 2 เป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อผสมน้ำ 10 เท่า และกวนเป็นเวลา 45 นาที มีอยู่ร้อยละ 20-30 มีความสามารถในการเป็นเจลและเป็นตัวประสาน

ส่วนที่ 3 เป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่ไม่ละลายในน้ำเย็น แต่จะละลายในน้ำเดือดใน 20 นาทีมีอยู่ร้อยละ 30 –35 มีความสามารถในการเป็นเจลและเป็นตัวประสานที่ดีมากเช่นกัน

ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีน้ำหนักโมเลกุล (หาโดย osmometry และ copper-reducing value) ประมาณ 55,000 (Chakraverti,I.B. , Nag, S and Macmillan, 1963) ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ (jellose) ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์, โปรตีน เส้นใย (fiber), ไขมัน, เกลือ อนินทรีย์, น้ำตาลอิสระ (free sugars) และ แทนนิน (tannins) องค์ประกอบต่างๆ จะมีปริมาณต่างกัน ในแต่ละการทดลอง เนื่องจากขึ้นอยู่กับฤดูกาล ดินฟ้าอากาศ และสถานที่ปลูก โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเป็นชนิดไม่มีประจุประกอบด้วย D-glucose , D- xylose , D-galactose และ L-arabinose เมื่อละลายน้ำให้สารละลายที่เหนียวหนืด (mucilaginous) และเป็นเจลภายใต้พีเอช ที่เป็นกรดและเป็นกลางได้ดี ซึ่งสามารถใช้แทนแป้งและเปคติน (pectin) ได้ (The Wealth of India 1976) ทั้งยังมีโครงสร้างต่างจากโพลีแซคคาไรด์ ในพืชชนิดอื่นๆ ทำให้โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามมีชื่อเฉพาะเรียกว่าเจลโลส (jellose) ซึ่งจะกล่าวละเอียดในหัวข้อ

ถัดไป ส่วนประกอบต่างๆ ของเมล็ดมะขาม เนื้อในเมล็ดมะขาม และ เปลือกเมล็ดมะขาม แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเมล็ดมะขาม เนื้อในเมล็ดมะขาม และ เปลือกเมล็ดมะขาม

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์		
	เมล็ดมะขาม	เนื้อในเมล็ดมะขาม	เปลือกเมล็ดมะขาม
ความชื้น	9.4-11.3	11.4-22.7	11.0
โปรตีน	13.3-26.9	15.0-20.9	-
ไขมัน/น้ำมัน	4.5-16.2	3.9-8.0	-
เส้นใย	7.4-8.8	2.5-8.2	21.6
คาร์โบไฮเดรต	50.0-57.0	65.1-72.2	-
เถ้า	1.6-4.2	2.4-4.2	7.4
ไนโตรเจนอิสระ	59.0	-	-
extract			
yield of TKP	50.0-60.0	-	-
calories / 100 กรัม	340.3	-	-
น้ำตาลทั้งหมด (total sugars)	11.3-25.3	-	-
น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars)	7.43	-	-
แป้ง (strach)	33.1	-	-
แทนนิน	-	-	20.2

ที่มา :Wealth of India (1996),; Ishola และคณะ (1990),; Bhattacharya และคณะ (1993),; Morad และคณะ (1978)

ลักษณะของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ตั้งขึ้นโดย Indian Standard Institution เป็นดังนี้ (Rao P.S.,1959)

1. มีสีขาวครีม วัดโดยเครื่อง lovibond tintometer ให้ได้สีขาวมาตรฐาน สีแดงและสีเหลืองไม่เข้มเกินกว่า 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ
2. ต้องไม่มีกลิ่นที่ไม่เป็นที่ต้องการ
3. สารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะต้องมีความหนืดสัมพัทธ์เท่ากับ 4.5-5.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
4. มีเถ้าไม่เกินร้อยละ 3.0
5. ต้องมีโพลีแซคคาไรด์อยู่มากกว่าร้อยละ 50 โดยเป็นปริมาณ xylose ร้อยละ 19-20

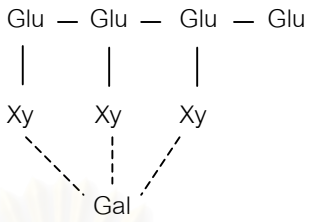
2.1.2 **โพลีแซคคาไรด์ของเมล็ดมะขาม (jellose)**

เจลโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม มีคุณสมบัติเป็นกลาง ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (Savur G.R.,1955) มีสีขาว ลักษณะเป็นเส้นใย และเป็นสารกัมประเภทหนึ่ง ให้สารละลายที่อยู่ในรูปเจลได้ในช่วงกว้าง กล่าวคือความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงไปแม้ว่าความเป็นกรด-ด่างจะเปลี่ยนไป แต่อย่างไรก็ตามในสภาพความเป็นด่างสูงๆ พบว่าสารละลายของกัมประเภทนี้จะมีความหนืดลดลงได้ซึ่งจะขึ้นกับการเกิดสารประกอบระหว่างคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในเจลโลส (Sila Bhattacharya และ S.Bal, R.K. Mukhherjee, 1994)

โครงสร้างของเจลโลสพบว่าประกอบด้วย D-glucose , D-xylose และ D-galactose ในอัตราส่วนโดยโมลเป็น 3 : 2 : 1 และมีสูตรโครงสร้างดังนี้ (Rao P.S., 1956;Kumararaj R. 1980; Savur G.R., 1955; White EV. และ Rao P.S., 1966)

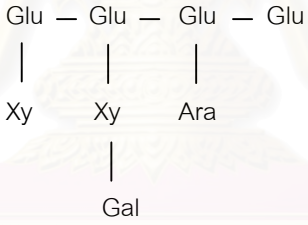
รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Rao P.S., 1956;Kumararaj R. 1980; Savur G.R., 1955; White EV. และ Rao P.S., 1966

Kooiman P. (1957) พบว่าเจลโลสประกอบด้วย D-glucose, D-xylose และ D-galactose ในอัตราส่วนโดยโมลเป็น 4 : 2.99 : 1.33 และมีสูตรโครงสร้างดังนี้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Kooiman P. (1957)

ได้มีผู้หาสูตรโครงสร้างด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก พบว่าเจลโลสประกอบด้วย glucose , xylose , galactose และ arabinose ในอัตราส่วนโดยโมลเป็น 8 : 4 : 2 : 1 (Savur G.R., 1955; Srivastava HC และ Singh PP., 1967)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากการศึกษาของ Savur G.R., 1955, Srivastava HC และ Singh PP., 1967

<u>คุณสมบัติและการใช้ประโยชน์ของเจลโลส</u> (พวงเพ็ชร นิชยานนท์, 2521; Rao P.S., 1956)

จากโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามซึ่งมีเจลโลสเป็นองค์ประกอบไม่มีกรดยูโรนิก และกลุ่มของกรดเมทิลยูโรนิก ในขณะที่สารให้ความหนืดจากพืชชนิดอื่นๆ เป็นสารจำพวกโพลียูโรไนด์ (polyuronide) ซึ่งคุณสมบัติความเป็นกรดของสารจำพวกนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณกรดยูโรไนด์ที่เป็นส่วนประกอบ และไม่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแตกต่างจากโพลี-แซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ทำให้โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีชื่อเรียกเฉพาะว่า เจลโลส ซึ่งมีคุณสมบัติเกิดเจลที่โปร่งใส และคงตัวได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง และเป็น

กรด และเมื่อกระจายตัวในน้ำจะได้ของเหลวที่มีความหนืดสูง มีสมบัติการเกิดเจลเหมือนกับเพคตินจากผลไม้ ไม่ตกตะกอนด้วยเกลือแคลเซียม แต่ตกตะกอนด้วย เอทิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เข้มข้นร้อยละ 70 และตกตะกอนโดยสารละลายอิเล็คโทรไลต์ (electrolyte) เช่น ในสารละลายผสมความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของกรดแทนนิค (tannic acid), สารละลายฟีชลิง fehling's solution , กรดฟอสฟอทังสติก (phosphotungstic acid) และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) ละลายได้ง่ายแม้ในน้ำเย็น ทั้งในสภาพที่เป็นกรดหรือไม่เป็นกรดจะเกิดลักษณะเป็นสารละลายข้นเหนียวหนืดรวมทั้งเกิดเป็นคอลลอยด์ที่มีการกระจายตัวที่ดี (colloidal dispersion) ความหนืดของสารละลายจะเพิ่มมากขึ้นจนเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 1

จากการศึกษาพบว่าการปรับปรุงคุณภาพโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยกรดซิตริก จะทำให้ลดความหนืดของเจลลงได้ โดยเจลโลสจะมีความหนืดสูงสุดที่ความเข้มข้นเพียง 0.7 - 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในทางตรงกันข้ามสารให้ความหนืดจากพืชชนิดอื่น จะต้องใช้ความเข้มข้นเป็นสองเท่าจึงจะได้ความหนืดเท่ากัน ดังนั้นจึงมีการใช้เจลโลสมากในอุตสาหกรรม เกี่ยวกับลูกกวาด และขนมหวาน (The Wealth of India 1976)

จากคุณสมบัติเฉพาะตัวของ โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามดังกล่าว ทำให้เจลโลสถูกนำมาใช้แทนสารให้ความหนืดจากเพคตินได้เป็นอย่างดี ในอุตสาหกรรม แยม เยลลี่ และวุ้น นอกจากอุตสาหกรรมอาหารแล้ว เจลโลสยังถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความหนืดในอุตสาหกรรมเส้นใย เครื่องสำอาง เภสัชกรรม กระดาษ และอื่นๆ ทั้งนี้เพราะเจลโลสมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งสารรักษาความคงตัว สารช่วยให้น้ำและน้ำมันรวมเป็นเนื้อเดียวกัน สารช่วยการรวมตัวกับน้ำ และสารช่วยการแขวนลอย

2.1.3 โปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

เมื่อแยกเปลือกเมล็ดมะขามออกแล้ว จะได้เนื้อในเมล็ดมะขาม ซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีน ร้อยละ 15.0 – 20.9 โพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะอยู่ในอัลบูเมน (albumen) ซึ่งอยู่ในเซลล์ และมีการเกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดประมาณ 40 – 80 ไมโครเมตร ภายในเซลล์จะมีโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 1 – 2 ไมโครเมตรร้อยละ 15 – 24 โดยน้ำหนักของเซลล์ทั้งหมด และเมื่อบดเซลล์ให้มีขนาดเล็กลง ผลของการบดจะทำให้ผนังเซลล์แตก และสามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กออกได้ และจากการศึกษาพบว่าขนาดอนุภาคที่เหมาะสมในการนำไปแยกโปรตีนออก ควรมีขนาดเล็กกว่า 80 ไมโครเมตร (Takashi, 1992)

โปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามความสามารถในการละลายคือ อัลบูมิน (albumin) สามารถละลายได้ในน้ำกลั่น ที่พีเอช 7 กลอบบูลิน (globulin) สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 โพลามีน (prolamine) สามารถละลายได้ในสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 และ กลูทิลีน (glutelins) สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 10 (Eart 1968) และ กรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ได้แก่ ไลซีน (lysine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสพาติก (aspartic acid) ไกลซีน (glycine) และ ลิวซีน (luecine) แต่มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมาก (Shankaracharya, 1998) ซึ่งได้แสดงปริมาณกรด อะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในผงเนื้อในเมล็ดมะขามไว้ดัง ตารางที่ 2.2 และคุณสมบัติของโปรตีนแต่ละชนิดจะกล่าวอย่างละเอียดในบทที่ 3

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

กรดอะมิโน	g./ 16 gN
aspartic acid	11.59-11.82
glutamic acid	16.91 – 18.53
serine	4.78-7.741
glucine	4.62-9.12
Ilistidine	2.01-2.68
arginine	4.20-9.18
proline	6.19-8.70
alanine	4.99-6.96
cystine+Methionine	0.63-1.04
threconine	3.78-3.90
tyrosine+Phenylalanine	6.32-8.32
valine	4.60-6.03
Isoleucine	4.12-4.19
leucine	7.93-8.12
lysine	5.96 – 6.49

ที่มา : Lumen และคณะ (1986); Marangoni และคณะ (1988); Sone และ Sato (1994)

2.1.4 ไขมันในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

กรดไขมันในผงเนื้อในเมล็ดมะขามเป็นกรดไขมันอิ่มตัว 65- 75 เปอร์เซ็นต์ ของไขมันทั้งหมด มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในระดับที่แนะนำ ยกเว้น ทรีโอนิน (threonine) และทริบโตเฟน (tryptophan) และมีกรดไขมันหลักๆ คือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดปาล์มมิติก (palmitic acid) และ กรดโอลิอิก (oleic acid) นอกจากนี้ยังมีสารต้านสารอาหาร (antinutrition factors) เช่น แทนนิน (tannins),กรดฟิติก (phytic acid) ,ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) และสารยับยั้ง ทริบซิน (trypsin inhibitor activity) จำนวนปานกลางเท่านั้น จึงทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้อย (Siddaraja และคณะ, 1995)

Andrimantenaq และคณะ (1983) ได้ศึกษา การสกัดน้ำมันจากเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เฮกเซน และสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม และ เมทานอล พบว่าสามารถสกัดน้ำมันได้ 6 – 6.4 เปอร์เซ็นต์ และ 7.4 – 9.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและเมื่อนำไปวิเคราะห์โดย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลว (gas liquid chromatography) พบว่าประกอบด้วยกรดไขมัน 15 ชนิด ส่วนใหญ่คือ กรดปาล์มมิติก 14 - 20 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 6 – 7 เปอร์เซ็นต์ โอลิอิก 15 - 27 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลนิก 36 – 49 เปอร์เซ็นต์ อราชิดิก (arachidic) 2 – 4 เปอร์เซ็นต์ บีฮีนิก (behenic) 3 – 5 เปอร์เซ็นต์ และ ลิกโนซิลิก (lignoceric) 3 – 8 เปอร์เซ็นต์ และยังประกอบด้วยสเตียรอล 7 ชนิด เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย GLC พบว่าเป็น เบต้า ซิโตสเตียรอล (β-sitosterol) 66 – 72 เปอร์เซ็นต์ แคมพิสเตียรอย (campesterol) 16 – 19 เปอร์เซ็นต์ และ สติกมาสเตียรอล (stigmasterol) 11 – 14 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาของ Sivarama Reddy และคณะ (1979) พบว่าการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามให้เหลือน้อยประมาณ 5 – 7 เปอร์เซ็นต์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย จะมีผลดีต่อผงเนื้อในเมล็ดมะขามในการเก็บ ทำให้โพลีแซคคาไรด์มีคุณภาพเพิ่มขึ้น และยังคงความขาว และจะทำให้ค่าความเป็นกรด (acid value) และค่าสปอนนิฟิเคชัน (saponification value) ต่ำลง หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ และการฟอกสี นักวิจัยหลายท่าน ได้วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ของไขมันในเนื้อเมล็ดมะขามไว้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี ของไขมันในเนื้อเมล็ดมะขาม

คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี	ค่า
saponification value	183.4 – 192.0
iodine Value	99.1 – 140.0
tire	45.8 ^{0}C
bellier's turbidity temp.	52 ^{0}C
specific gravity	0.9194 – 0.9324
refractive Index	1.4510 – 1.4770
acid value	0.10 – 12.70
unsaponifiable matter,เปอร์เซ็นต์	1.60 – 3.70
ester value	164

ที่มา : Wealth of India (1976) ; Sivaramareddy และคณะ (1979) ; Adriamantena และคณะ (1983)

2.2 การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

การสกัดเพื่อให้ได้โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จำเป็นต้องแยกโปรตีน ไขมัน และเส้นใยซึ่งเป็นสิ่งเจือปนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่มีผลทำให้โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีคุณภาพต่ำ โดยในการสกัดเพื่อแยกสิ่งเจือปนต่างๆ เหล่านี้ จำเป็นต้องทำลายแรงยึดเหนี่ยว ระหว่างโมเลกุลดังกล่าวและโพลีแซคคาไรด์ออกจากกันก่อน แล้วจึงแยกโมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ออกจากกันโดยการกรอง

การทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและไขมัน ออกจากโพลีแซคคาไรด์ทำได้หลายวิธีโดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า วารี 2543 ได้ใช้คลื่นเหนือเสียงในการแยกโมเลกุลโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ออกจากกัน และมีการใช้เอทานอลร่วมด้วยเพื่อละลายไขมันและช่วยในการคงตัวของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เวลาในการผ่านคลื่นเหนือเสียง และความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามคือ ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เวลาในการผ่านคลื่นเหนือเสียงเท่ากับ 60 วินาที

และความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะให้ร้อยละของการแยกโปรตีนเท่ากับ 92.203 และร้อยละของการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 68.512

นอกจากนี้การทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลอาจทำได้โดย ใช้คุณสมบัติในการละลาย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการละลายของโปรตีน ได้แก่ พีเอช โดยโปรตีนจะสามารถละลายได้น้อยที่สุดที่ค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับประจุสุทธิของโปรตีน ในสารละลายเกลือที่เป็นกลางโดยเฉพาะเกลือที่มีไดวาเลนท์ไอออน โดยการเกิดปรากฏการณ์ salting in โปรตีนจะสามารถละลายได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ และในทางกลับกันปรากฏการณ์ salting out โปรตีนจะตกตะกอนดังงานวิจัยของ Deguchi (1963) ที่จะกล่าวต่อไป และการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลโดยคุณสมบัติในการละลายอาจทำได้โดย การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ดังงานวิจัยของ Gordon (1968) Jones (1978) และ Teraoka (1990) การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอนไอออนขนาดใหญ่ และการตกตะกอนโปรตีนด้วยแคทไอออนของโลหะหนัก งานวิจัยที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นการใช้คุณสมบัติด้านการละลายในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

งานวิจัยของ Deguchi (1963) อาศัยหลักการ salting out โดยการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้สารละลายเกลือชนิดต่างๆ ใช้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามปริมาณ 4.3 กิโลกรัม ละลายในสารละลายซัลฟูรัส 20 ลิตร เพื่อทำการฟอกสี ใช้น้ำปริมาตร 100 ลิตร ทำการสกัดคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ต้องการออก เมื่อทำการกรองเอาสารที่ไม่ต้องการออกแล้วจะได้สารละลาย 100 กิโลกรัม จากนั้นใช้เกลือต่างๆ ตกตะกอนเจลโลส หลังจากตกตะกอนแล้วทำการล้างเจลโลสที่ได้ด้วยเอทานอลเพื่อละลายเกลือซัลเฟตออก ในการศึกษาการสกัดเจลโลสจะใช้สารละลายเกลือในปริมาณที่ต่างกันทำให้ได้ปริมาณเจลโลสต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4 จะได้เจลโลสประมาณร้อยละ 40

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารเคมีต่างๆ (เกลือซัลเฟต, เอทานอล) ที่ใช้ในการสกัดเจลโลส กับปริมาณเจลโลสที่สกัดได้

ปริมาณเกลือที่ใช้ตกตะกอน	ปริมาตรเอทานอล (ลิตร)	ปริมาณเจลโลสที่สกัดได้ (กิโลกรัม)
$(NH_4)_2SO_4$ 50 กิโลกรัม	10	1.7
$Al_2(SO_4)_3 18H_2O$ 50 กิโลกรัม	20	1.6
Na_2SO_4 25 กิโลกรัม	28	1.7
$MgSO_4 7H_2O$ 60 กิโลกรัม	20	1.7

Gordon (1968) ทำการสกัดเจลโลสจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีขั้นตอนการสกัด 2 ขั้นตอน คือ สกัดด้วยไอโซโพรพานอล และสกัดด้วยน้ำ โดยนำผงเนื้อในเมล็ดมะขามปริมาณ 500 ปอนด์ ผสมกับไอโซโพรพานอล 600 แกลลอน เพื่อแยกเอาโปรตีนและไขมันออก ได้เจลโลสปริมาณ 130 ปอนด์ คิดเป็นร้อยละ 26 ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

Stanford (1984) ศึกษาการทำผงเนื้อในเมล็ดมะขามให้บริสุทธิ์ โดยผสมผงเนื้อในเมล็ดมะขามกับสารละลายเบสแก่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 13 กวนเพื่อให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามกระจายตัวอย่างสมบูรณ์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลายด้วยน้ำปริมาตรเท่ากับ 5 เท่าของปริมาตรของสารละลาย และกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำสารละลายให้เป็นกลางโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ทำการตกตะกอนเจลโลสด้วยไอโซโพรพิลอัลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเท่ากับ 3 เท่าของสารละลาย นำตะกอนเจลโลสที่ได้มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบดละเอียด ได้โพลีแซคคาไรด์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่สามารถละลายน้ำได้ดี มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 2-10 และสารละลายมี ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 มีความโปร่งแสงประมาณร้อยละ 70-80 ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

Rao (1959) และ Shankaracharya (1998) สกัดเจลโลสโดยใช้น้ำ และกรดซิตริกเช่นเดียวกันโดย Rao ใช้น้ำเย็นในอัตรา 1 ส่วน ต่อ 10 ส่วน และเติมน้ำเดือดปริมาตร 300 เท่าและใส่กรดซิตริก เพื่อระงับการเกิดปฏิกิริยาของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ที่เติมในกระบวนการเพื่อทำการฟอกสี โดยกระบวนการนี้จะสามารถสกัดเจลโลสได้ร้อยละ 50 ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ส่วน Shankaracharya ใช้น้ำปริมาตร 30-40 เท่าโดยน้ำหนักของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เติมกรดซิตริกหรือกรดตาตาริกเข้มข้น 0.2 แล้วให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วทิ้งให้ตกตะกอน 1 คืน

Jones และคณะ (1978) สกัดไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลีนไดคลอไรด์ (ethylene dichloride), เฮปเทน (heptane), และโทลูอีน (toluene) เพื่อให้ได้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ปราศจากไขมัน แล้วนำไปผ่านกระบวนการแยกต่อไป

Teraoka และคณะ (1990) นำผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ได้จากการบดมากระจายตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถเข้ากันได้ดีกับน้ำเช่น เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล, ไอโซโพรพา

นอล, และอะซิโตนในปริมาณร้อยละ 5 – 60 โดยน้ำหนัก พบว่าถ้าใช้สารละลายตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก อนุภาคโพลีแซคคาไรด์จะบวมทำให้ไขมันไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ และถ้าใช้สารละลายตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากกว่าร้อยละ 60 จะทำให้องค์ประกอบที่สามารถละลายน้ำได้ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ และจะทำให้โมเลกุลของโปรตีนเหนียวติดกันหรือติดกับอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์

ในส่วนของการแยกโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ และโมเลกุลของสิ่งเจือปน (โปรตีนและไขมัน) ออกจากกันหลังจากโมเลกุลดังกล่าวไม่มีแรงยึดเหนี่ยวต่อกันแล้วทำได้หลายวิธีโดยส่วนใหญ่ใช้ความแตกต่างของขนาดอนุภาคในการแยกโมเลกุลทั้งสองออกจากกัน เช่น การกรองดังงานวิจัยของวารี (2543) การกรองแบบหมุน ดังงานวิจัยของกิตติพงษ์ (2544) การปั่นเหวี่ยง ดังงานวิจัยของ Rao (1959) และการใช้ไฮโดรไซโคลน และแอร์คลาสิฟิเคชัน (air classification) ดังงานวิจัยของ Jones และคณะ (1978) และ Teraoka และคณะ(1990) ซึ่งได้สรุปวิธีการทำลายแรงยึดเหนี่ยว และการแยกโมเลกุลสิ่งเจือปนและโพลีแซคคาไรด์ออกจากกัน ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การวิจัยเกี่ยวกับการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยวิธีการต่างๆ

ผู้วิจัย	ปี	วิธีทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล	การแยก
พวงเพ็ชร	2521	เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก	กรอง
กิตติพงษ์	2544	น้ำเป็นตัวทำละลาย	กรองแบบหมุน
วารี	2543	คลื่นเหนือเสียง	กรอง
Rao	1959	น้ำเดือด กรดซิตริก ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	เครื่องปั่นเหวี่ยง
Deguchi	1963	salting out	เครื่องปั่นเหวี่ยง
Gordon	1968	ไอโซโพรพานอลและน้ำ	เครื่องปั่นเหวี่ยง
Jones และคณะ	1978	เอทิลีนไดคลอไรด์ เฮปเทน โทลูอีน	แอร์คลาสสิฟิเคชัน
Stanford	1984	เบสแก่	
Teraoka และคณะ	1990	เมทานอล เอทานอล โพพานอล ไอโซโพรพานอล อะซิโตน	ไฮโดรไซโคลน
Shankarachara	1998	น้ำเป็นตัวทำละลาย	กรองแบบกดอัด

วารี (2543) ศึกษาการกรองชนิดไหลผ่านตัวกรอง (dead-end- filtration) ในถังกวนโดยกวาดผิวหน้าตัวกรองด้วยใบกวาด และมีการชะเค้กด้วยสารละลายเอทานอล จากการทดลองพบว่าจะได้ร้อยละการกำจัดโปรตีน 81.216 และร้อยละการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ 70.995 ส่วนโพลี-แซคคาไรด์ของเมล็ดมะขามที่ได้จากการทดลองจะมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ปริมาณโปรตีน และไขมันร้อยละ 93.616 4.844 และ 1.540 โดยน้ำหนักตามลำดับ

กิตติพงษ์ (2544) พบว่าการกรองด้วยเครื่องกรองชนิดหมุนได้ สามารถคัดขนาดของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก โดยดูจากการกระจายตัวของอนุภาคของสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น ในสายป้อน และในสายฟิลเตรต โดยภาวะการกรองที่เหมาะสม การกระจายตัวของอนุภาคในสายป้อนจะแยกออกจากการกระจายตัวของอนุภาคเริ่มต้น โดยมีขนาดของอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 22-23 ไมโครเมตร ส่วนการกระจายตัวของอนุภาคในสายฟิลเตรตจะมีลักษณะเป็นโค้งแคบ มีขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 7-9 ไมโครเมตร และภาวะการกรองสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยเครื่องกรองชนิดหมุนได้ที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นสารแขวนลอย 20 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบในการหมุนตัวกรอง 1700 รอบต่อนาที ความดันคร่อมตัวกรอง 0.16 บาร์ และระยะห่างระหว่างผิวหน้าของตัวกรองกับผนังด้านในของทรงกระบอกชั้นนอกเท่ากับ 0.008 เมตร (ค่าเทย์เลอร์นัมเบอร์เท่ากับ 7596 ค่าอัตราการเฉือนเท่ากับ 10704 และค่าเรย์โนลด์นัมเบอร์ในแนวแกนเท่ากับ 50) ได้ค่าฟิลเตรตฟลักซ์เท่ากับ 9354 ลิตรต่อตารางเมตรชั่วโมง ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนและค่าร้อยละการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 74.36 และ 40.31 ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณโปรตีน ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ และปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 9.70 66.41 และ 5.10 โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับร้อยละ 29.03 โดยน้ำหนัก

จากงานวิจัยของ Jones และคณะ (1978) เมื่อบดผงเนื้อเมล็ดมะขามปราศจากไขมันด้วยเครื่องแฮมเมอร์มิลล์ หรือพินมิลล์ ให้มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 100 ไมโครเมตร จะได้การกระจายขนาดของอนุภาคหลังบดคือ ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 ไมโครเมตรจะมีปริมาณ 15- 30 เปอร์เซ็นต์ ขนาดอนุภาคระหว่าง 10-20 ไมโครเมตร 10- 20 เปอร์เซ็นต์, ขนาดอนุภาคระหว่าง 60-80 ไมโครเมตรจะมีปริมาณ 15- 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปแยกด้วยเครื่องแอร์คลาสิฟิเคชัน จะมีการเติมผงซิลิกาจำพวก hisil หรือ cab-o-sil ซึ่งสารจำพวกนี้จะช่วยปรับปรุงสมบัติการไหลของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ทำให้การแยกองค์ประกอบด้วยแอร์คลาสิฟิเคชัน มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการแยกด้วยเครื่องแอร์คลาสิฟิเคชัน สามารถแยกองค์ประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขามออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 คือ ส่วนที่มีขนาดเล็กละเอียด ซึ่งมีปริมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคส่วนนี้จะมี

องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน, ส่วนที่ 2 คือ ส่วนที่มีขนาดหยาบ ซึ่งจะถูกแยกออกมาโดยใช้ความเร็วของอากาศต่ำๆ ซึ่งส่วนนี้จะมีปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมด ถ้ามีปริมาณมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำการป้อนกลับเพื่อแยกอีกครั้ง โดยอนุภาคที่แยกได้ในส่วนนี้จะมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนและสิ่งเจือปนอื่นๆ ต่ำ ส่วนที่ 3 คือส่วนที่อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยสิ่งเจือปนทางกลเป็นส่วนใหญ่ โพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะถูกแยกออกมาในส่วนที่ 2 ซึ่งมีโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ของอนุภาคที่สามารถแยกได้จากแอร์คลาสิฟิเคชัน

Teraoka และคณะ (1990) แยกโพลีแซคคาไรด์ออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้ไฮโดรไซโคลน โดย Teraoka และคณะพบว่าอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์จะถูกแยกออกมาในส่วนล่างของไฮโดร-ไซโคลน ในขณะที่อนุภาคของสิ่งเจือปนอื่นๆจะถูกแยกออกไปทางส่วนบนของไฮโดรไซโคลน วิธีการแยกโพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามโดยใช้ไฮโดรไซโคลนจะได้โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามประมาณร้อยละ 94 โดยน้ำหนัก มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าร้อยละ 3 และไขมันน้อยกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

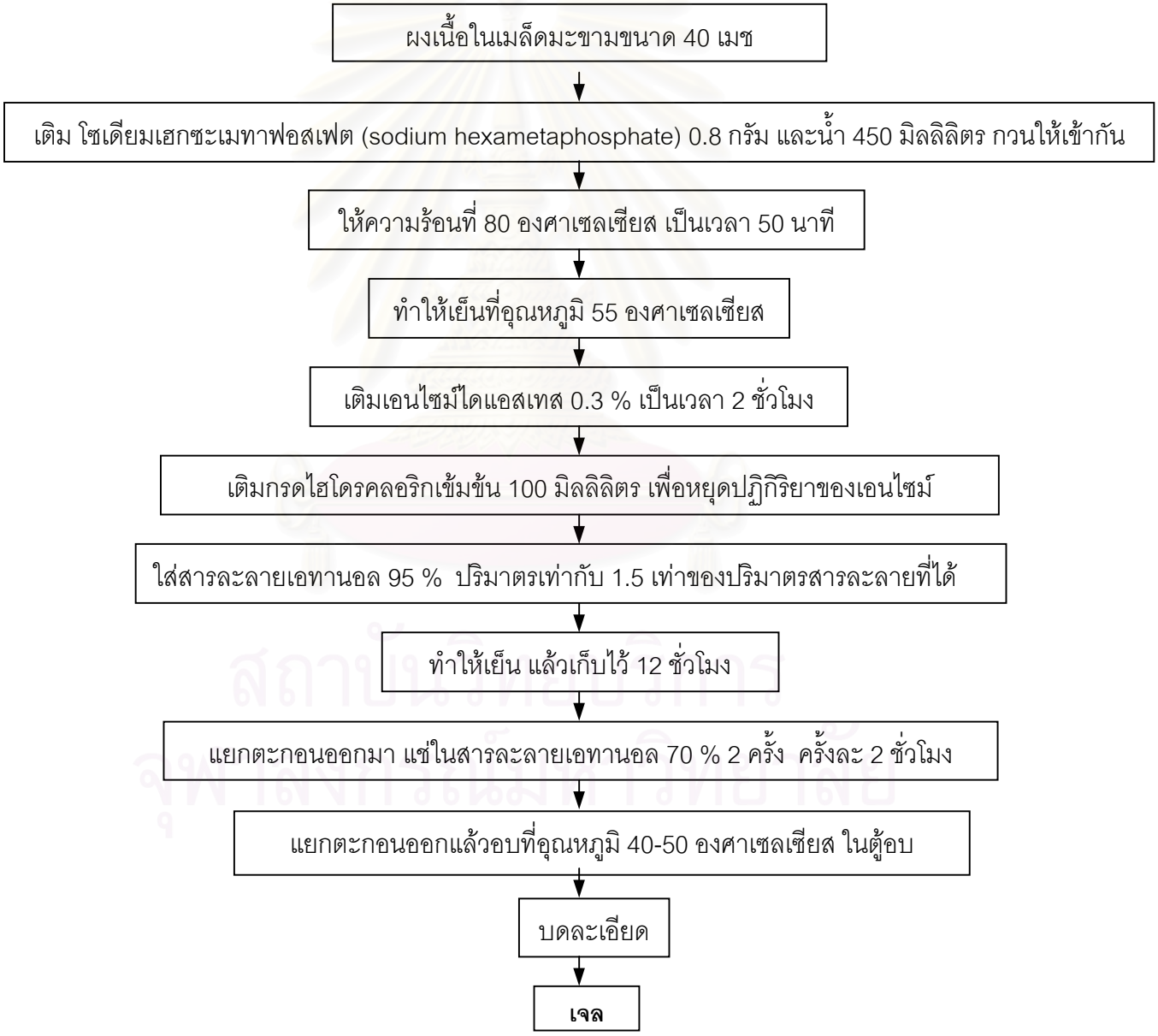
2.3 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

2.3.1 การแยกโปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก (proteolytic enzyme)

พวงเพ็ชร, 2521 ศึกษาการสกัดเจลโลสโดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) แยกโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ประยุกต์มาจากกระบวนการสกัดของ Deguchi และ Gordon ที่ใช้อัลกอฮอล์ในการตกตะกอนเจลโลส และการสกัดเจลโลสของ Lawrence ที่ใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัดเจลโลส โดยมีกระบวนการสกัดดังรูปที่ 2.4

ทำการสกัดเจลโลสโดยใช้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามขนาด 40 เมช ใช้เอนไซม์ไดแอสเทส (diastase) ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเอนไซม์ไดแอสเทสสามารถย่อยแป้งให้มีขนาดเล็กลง ทำให้เจลโลสซึ่งติดอยู่กับโมเลกุลแป้งหลุดออกมาได้ง่ายขึ้น แต่เจลโลสไม่สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ ไดแอสเทส ทำให้สามารถสกัดเจลโลสได้มากขึ้น และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ มีการทดลองใช้เอนไซม์ปาเปน เพื่อ

ย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง พบว่าทำให้ได้ปริมาณเจลโลสที่สกัดได้สูง แต่มีความบริสุทธิ์ต่ำ เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่มากในผงเนื้อในเมล็ดมะขามไม่ถูกย่อยสลายเลย ทำให้สารละลายไม่สามารถเข้าไปตกตะกอนเจลโลสออกมาได้ ส่วนสารละลายอัลกอฮอล์ที่ใช้จะไปละลายคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เจลโลส และตกตะกอนเจลโลส ในการตกตะกอนเจลโลสจะใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในการตกตะกอนครั้งแรก ปริมาณที่เหมาะสมคือ 1.5 เท่าของสารละลายที่สกัดได้ ถ้าใช้ปริมาณ 1 เท่าจะสกัดได้น้อยกว่าเกือบครึ่งหนึ่ง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า ไม่สามารถสกัดเจลโลสได้เพิ่มขึ้นจากการใช้อัลกอฮอล์ 1.5 เท่า รวมทั้งมีการใช้อัลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ในการสกัดอีก 2 ครั้ง ทำให้ได้เจลโลสที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น วิธีนี้สามารถสกัดเจลโลสได้ประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม



รูปที่ 2.4 แสดงกระบวนการสกัดเจลโลสจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์และอัลกอฮอล์

2.3.2 การแยกโปรตีนจากหางนม (whey) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก (proteolytic enzyme)

Z.Y. Ju และคณะ ปี1995 ได้ ศึกษาการแยกโปรตีนจากหางนม (whey) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) คือ porcine ทริพซิน โปรติเอสจาก *Bacillus Subtilis* (นิวเทรส) และโปรติเอสจาก *Bacillus Licheniformis* และศึกษาการเกิดเจล ของหางนมหลังจากถูกย่อยสลายโปรตีนออกแล้ว โดยศึกษาที่สภาวะต่างๆ ดังนี้คือ พีเอชในช่วง 3 – 7 ความเข้มข้นของโปรตีนจากหางนม และอันดับของการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยวัดจากเครื่อง osmometry เปรียบเทียบการเกิดเจลกับตัวควบคุมซึ่งคือหางนมที่ไม่ถูกย่อยสลาย เมื่อให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที ที่พีเอช 3 และ 7 เท่านั้น

ขั้นตอนในการย่อยสลายหางนมเป็นดังนี้คือ เตรียมหางนม 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แล้วกวน 30 นาที แล้วทิ้งไว้ 1 คืนที่ 5 องศาเซลเซียส ก่อนเติมเอนไซม์จะนำมาให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีก่อน แล้วเติมเอนไซม์ทริพซิน นิวเทรส และโปรติเอสจาก *Bacillus Licheniformis* ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1 ต่อ 100 , 1 ต่อ 10 และ 1 ต่อ 100 ตามลำดับ จากนั้นบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7 ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ซึ่งในระหว่างการดำเนินไปของปฏิกิริยา จะพบว่าพีเอชลดลง เป็น 6.5 และ 6.7 ในเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารหลังการย่อยสลายไปวัดการเกิดเจล

จากการศึกษาอัตราการย่อยสลาย (hydrolysis rate) จะพบว่านิวเทรสมีอัตราการย่อยสลายสูงที่สุด และ โปรติเอสจาก *Bacillus Licheniformis* ต่ำสุด และจากการศึกษาความคงตัวของเจล (gel strength) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับอันดับของการย่อยสลาย จะพบการใช้นิวเทรสย่อยสลายจะให้เจลที่มีความคงตัวที่พีเอช 3 และลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มเป็น 5.2 และ 7

2.3.3 การแยกโปรตีนจากผงข้าว โดยใช้อัลคาไลด์ โปรติเอส (alkaline protease) เพื่อให้ได้แป้งข้าวที่บริสุทธิ์

N. lumdubwong และ P. A. Seib ได้ศึกษาการแยกโปรตีนออกจากผงข้าว โดยใช้อัลคาไลด์ โปรติเอส โดยในการศึกษาได้ใช้เทคนิคการออกแบบการทดลอง แบบ 3 x 3 แฟคทอเรียล ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย ศึกษาผลของพีเอชในช่วง 8.5 – 10 ปริมาณเอนไซม์โปรติเอส 0.5 – 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการย่อยสลาย 5 – 30 ชั่วโมง โดยการย่อยสลายจะให้อุณหภูมิคงที่ ที่ 55 องศาเซลเซียส กวนเบาๆ ในสารละลายที่มีผงข้าว 34 – 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำ

หนักต่อปริมาตร ค่าความพีเอชมีความคลาดเคลื่อน +-0.2 หน่วย จากการย่อยสลายพบว่าการใช้โปรติเอส 1.1 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 10 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจะสามารถย่อยสลายผงข้าว จนแหลือโปรตีนอยู่ในผงข้าวเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเท่านั้น ซึ่งการย่อยสลายส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่วง 3 – 4 ชั่วโมงแรก ในการทดลองได้เปรียบเทียบการแยกโปรตีนจากผงข้าวโดยใช้เอนไซม์กับการแยกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการแยกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ จะสามารถแยกโปรตีนออกได้มากกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่การแยกโดยใช้เอนไซม์จะทำให้ได้แป้งจากข้าวมากกว่า 1.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ขั้นตอนการแยกโปรตีนออกจากผงข้าวโดยใช้อัลคาไลต์โปรติเอส ทำดังนี้คือ นำผงข้าวมา 17.5 กรัม ซึ่งจะมีส่วนประกอบของโปรตีน 1.4 กรัม และแป้ง 13.3 กรัม เติม 0.001 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร และเติมโปรติเอส 0.22 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้ได้ 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปปั่นกวน 18 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 75 ไมโครเมตร แล้วนำส่วนที่เป็นแป้งไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที 20 นาที ส่วนที่ตกตะกอนจะนำมาล้างด้วยน้ำ แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที อีก 15 นาที หลังจากนั้นปรับพีเอช ให้เป็น 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาทีอีก 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำและหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาทีอีก 15 นาที เพื่อให้ได้เค้กแป้ง นำไปอบที่ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จะได้ผงแป้ง 12.7 กรัมที่มีโปรตีนเหลืออยู่เพียง 0.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ทฤษฎี

3.1 โพลีแซคคาไรด์

โพลีแซคคาไรด์ จัดเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต หรือ แซคคาไรด์ (saccharide) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ ประเภทอัลดีไฮด์ หรือคีโตน ที่มีหมู่ไฮดรอกซี หลายหมู่ โพลีแซคคาไรด์จะประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์มากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป (ดาวัล, 2538) โพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันตรงชนิดและจำนวนของโมโนแซคคาไรด์ ทำให้โมเลกุลและลักษณะของสูตรโครงสร้างแตกต่างกันออกไปมากน้อย ถี่ห่างแตกต่างกัน แต่โพลีแซคคาไรด์ทุกชนิดมีสิ่งที่เหมือนกันคือ โมโนแซคาไรด์ที่ประกอบขึ้นเป็นโพลีแซคคาไรด์นั้นล้วนจับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bonds) ซึ่งอาจจะเป็นชนิดแอลฟา หรือเบตาก็ได้ และอาจพบที่ตำแหน่ง 1 → 2 1 → 3 1 → 4 หรือ 1 → 6 เป็นโซ่ยาวๆ แล้วอาจมีการแยกกิ่งที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง โพลีแซคคาไรด์โมเลกุลเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำนั้นจะประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 30 – 90 หน่วย แต่โพลีแซคคาไรด์ส่วยใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงคือประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์หลายร้อย หลายพันหน่วย (ประเสริฐ, 2525)

3.1.1 ประเภทของโพลีแซคคาไรด์

โพลีแซคคาไรด์ที่ย่อยสลายได้ผลผลิตเป็นโมโนแซคคาไรด์ชนิดเดียวกันเรียก โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (homopolysacharide) เช่น แป้ง และ เซลลูโลส ถ้าให้โมโนแซคคาไรด์มากกว่าหนึ่งชนิดเรียกเฮทเทอโรแซคคาไรด์ (heteropolysacharide) เช่น กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และ เฮพาริน (heparin) (ดาวัล, 2538)

3.1.2 คุณสมบัติทางเคมีของโพลีแซคคาไรด์

โพลีแซคคาไรด์มีคุณสมบัติไม่เหมือนกับโมโนแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์หลายอย่าง เช่น ไม่ละลายน้ำ ไม่มีรสหวาน และไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงสมบัติบางประการของโมโนแซคคาไรด์ (ประเสริฐ, 2525)

3.1.2.1 ปฏิกิริยากับกรด

เมื่อให้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับกรดแก่ที่อุณหภูมิสูงๆ จะได้สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน ทั้งนี้เพราะน้ำตาลเกิดปฏิกิริยาไซไคลเซชัน (cyclization) จากการสูญเสียโมเลกุลของน้ำกลายเป็นสารประกอบเฟอร์ฟิวราล (furfural) หรืออนุพันธ์ของเฟอร์ฟิวราล (furfural derivative) สารประกอบที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกฟีนอล หลายชนิดเกิดเป็นสารประกอบที่มีสี ดังนั้นปฏิกิริยานี้จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาน้ำตาลได้

3.1.2.2 ปฏิกิริยากับเบส

เมื่อให้น้ำตาลอยู่ในสารละลายเบสอ่อนๆ เช่น $Ca(OH)_2$ หรือ $Ba(OH)_2$ น้ำตาลกลูโคสจะเปลี่ยนเป็นฟรุคโตส และแมนโนสได้ หรือกลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนส จะเปลี่ยนโครงสร้างไปมาระหว่างกันได้ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นตรงคาร์บอนอะตอมที่ 1 และ 2 เท่านั้น เนื่องจากน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมีโครงสร้างตั้งแต่ $C_3 - C_6$ เหมือนกัน เมื่อมีการการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดผ่านทาง enol form ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediate) ของปฏิกิริยานี้ก่อน เราเรียกลักษณะนี้ว่า lobry de bruyn transformation

เมื่อให้น้ำตาลอยู่ในสารละลายเบสแก่ เช่น NaOH หรือ KOH จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลายอย่าง ทำให้น้ำตาลมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา มากกว่าในสารละลายกรด ดังนั้นการทดสอบการรีดิวซ์ของน้ำตาลจึงนิยมทำในสารละลายที่มีด่างแก่อยู่ด้วย

3.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความหนืดของโพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามเมื่อกระจายตัวในน้ำ (Suttananta, 1986)

3.1.3.1. ความเข้มข้น

โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามจะมีสมบัติเป็นของไหลชนิดนันนิวโตเนียน (non-newtonian fluid) ที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1.75 เมื่อทำการเปรียบเทียบความหนืดสัมพัทธ์ของโพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามกับกัมชนิดอื่นๆ พบว่า โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามจะมีความหนืดสูงกว่าโซเดียมอัลจิเนท เพ็กติน (เกรด 150) และกัมอะคาเซีย (acacia) ที่ความเข้มข้นเท่ากัน แต่จะมีความหนืดต่ำกว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcelluose)

3.1.3.2. อุณหภูมิ

ความหนืดของโพลีแซคคาไรด์จะมีค่าลดลงเป็นฟังก์ชันเอ็กโปเนนเชียลกับอุณหภูมิ ซึ่งเป็นไปตามสมการของอาร์เรเนียส (arrhenius equation) คือ

$$\mu = Ae^{E/RT} \qquad (3.1)$$

เมื่อ μ คือความหนืดของสารละลาย A คือค่าคงที่ของอาร์เรเนียส E คือค่าพลังงานกระตุ้น R คือค่าคงที่ของก๊าซ และ T คืออุณหภูมิสัมบูรณ์

3.1.3.3. ความเป็นกรด-ด่าง

ความหนืดของโพลีแซคคาไรด์จะสูงสุดที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-3.2 และไม่คงตัวในภาวะเป็นเบส โดยเฉพาะที่ค่าพีเอชมากกว่า 8

3.1.3.4. ผลของสารอื่น

จากการศึกษาความสามารถในการผสมผสานระหว่างโพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามกับตัวทำละลายที่ใช้ในงานเภสัชกรรม พบว่า โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขามสามารถผสมผสานกับ ซอร์บิทอล (sorbitol) ไซรัป ยูเอสพี (syrup USP) ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่สามารถผสมผสานกับอัลกอฮอล์ และ กลีเซอรอล

3.2 โปรตีน

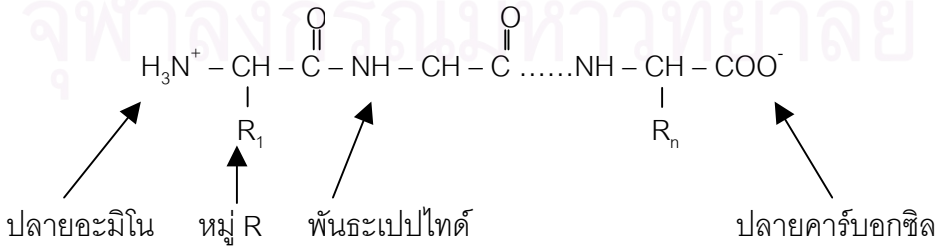
โปรตีน เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต ถ้าไม่รวมน้ำอยู่ด้วย ในสิ่งมีชีวิตมีโปรตีนมากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักโปรตีนเป็นสารประกอบประเภทพอลิเมอร์ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดใหญ่หรือมีมวลโมเลกุลมากคือประมาณ 5,000 จนถึงมากกว่า 400,000 ในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า กรดอะมิโน ซึ่งมีหลายชนิดและหลาย ๆ โมเลกุลมารวมตัวกัน

ตารางที่ 3.1 มวลโมเลกุลของโปรตีนบางชนิด

โปรตีน	มวลโมเลกุล
insurin	5,734
Ribonuclease	13,000
Trypsin	13,500
Lactalbumin	17,400
Zein	40,000
β-lactoglobulin	42,000
Ovallbumin	44,000
Hemoglobin	67,000
serum albumin	69,000
serum γ globulin	96,000
Edestin	310,000
Urease	370,000

3.2.1 โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนทุกชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนมารวมตัวกันโดยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันชนิดคอนเดนเซชันพอลิเมอไรเซชัน คือ กรดอะมิโนซึ่งเป็นมอนอเมอร์รวมตัวกันเป็นโปรตีน (พอลิเมอร์) และมีน้ำเกิดขึ้น กรดอะมิโนในโปรตีนแต่ละชนิดรวมตัวกันโดยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างคาร์บอนอะตอมในหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนโมเลกุลหนึ่งกับไนโตรเจนอะตอมในหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอีกในโมเลกุลหนึ่งดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สายโพลิเปปไทด์

3.2.2 ประเภทของโปรตีน

โปรตีนอาจแบ่งออกได้ตามส่วนประกอบเป็น 3 ประเภท (บุญยืน, 2529) คือ

3.2.2.1 **โปรตีนธรรมดา** (simple protein) คือโปรตีนที่ประกอบขึ้นด้วยกรดอัลฟาอะมิโน ไม่มีสารอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เมื่อไฮโดรไลซ์ได้กรดอัลฟ่าอะมิโนล้วนๆ เช่น อินซูลิน โปรตีนธรรมดา แบ่งเป็น โปรตีนเส้นใย และโปรตีนก้อนกลม

3.2.2.1.1 **โปรตีนเส้นใย** (fibrous protein) เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นยาวหรือขดเป็นเกลียว ตัวอย่างโปรตีนเส้นใย เช่น เคราดินในเส้นผม ขนสัตว์ เขาสัตว์และเล็บไฟโบรอินในไหม ไมโอซินในกล้ามเนื้อ คอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน พบมากในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิดตามแหล่งกำเนิดของโปรตีน คือ

3.2.2.1.1.1 **คอลลาเจน** (collagen) เป็นโปรตีนส่วนใญ่ของเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ โปรตีนพวกนี้แม้ว่าไม่ละลายน้ำ และไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน แต่เมื่อนำมาต้มในน้ำหรือกรดเจือจาง หรือด่างเจือจาง จะเปลี่ยนเป็นเจลลาติน (gelatin) ซึ่งละลายน้ำได้ และถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ ร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบขึ้นด้วยโปรตีนชนิดคอลลาเจน 30 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด

3.2.2.1.1.2 **อีลาสตีน** (elastin) มีอยู่ในเทนดอน (tendon) เส้นโลหิตแดง (artery) และเนื้อเยื่ออิลาสติค (elastic) ต่างๆ โปรตีนชนิดนี้มีสมบัติคล้ายๆ คอลลาเจน แต่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นเจลาตินได้

3.2.2.1.1.3 **เคราตีน** (keratin) มีอยู่ในเส้นผม ขนแกะ กีบ และเล็บ โปรตีนนี้มีซีสตีน (cystine) อยู่มาก จึงมีกำมะถันอยู่เป็นจำนวนมาก ผมของคนมีซีสตีน อยู่ประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.1.2 **โปรตีนก้อนกลม** (globular protein) เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ สารละลายเกลือ กรด เบส หรือ เอทานอล มีสายพอลิเพปไทด์พันไปพันมาและอัดแน่น ทำให้โมเลกุลมีรูปร่างเป็นก้อนกลม ตัวอย่างกลอบบูลาร์โปรตีน เช่น เอนไซม์, แอนติบอดี ฮอร์โมน ฮีโมโกลบิน เป็นต้น สามารถแบ่งตามความสามารถการละลายได้เป็น (H.D.Jakubke และ H. Jeschkeit , 1977)

3.2.2.1.2.1 **อัลบูมิน** (albumins) เป็นโปรตีนที่ตกผลึกอย่างรวดเร็ว มีมวลโมเลกุลน้อยและสามารถละลายในน้ำ และสารละลายเกลือเจือจางได้ที่ พีเอช 4 – 8.5 สามารถตกตะกอนโปรตีนชนิดนี้ได้ ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 – 100 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว คุณสมบัติเป็นกรดเล็กน้อยเนื่องจากมีส่วนประกอบของกรดกลูตามิก (glutamic acid) และ กรดแอสฟาติก (aspartic acid) สูงประมาณ 20 – 25 เปอร์เซ็นต์

อัลบูมินที่พบส่วนใหญ่คือ เซรัมอัลบูมิน (serum ablumin) ,แอลฟาอัลบูมิน (α-lactalbumin), อัลบูมินในไข่ขาว (ovalbumin) และ อัลบูมินจากพืช เช่น ผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

เซรัมอัลบูมิน มีมวลโมเลกุล 67000 เป็นส่วนประกอบพลาสมาโปรตีนซึ่งมีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมความดันออสโมติกในเลือด โดยจะจับกับแคลเซียมไอออน โซเดียมไอออน และ โพแทสเซียมไอออน สำหรับฮอร์โมน กรดไขมัน และยา

แอลฟาอัลบูมิน พบในนม และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทนความร้อนสูง มีส่วนประกอบของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเชื่อมติดกับ พันธะเปปไทด์ผ่านไปถึงกลุ่มเบต้าคาร์บอก-ซิล ของกรดแอสพาติกที่เหลือ

อัลบูมินในไข่ขาว มีมวลโมเลกุล 44,000 มี คาร์โบไฮเดรต และ กรดฟอสฟอริก เป็นองค์ประกอบประมาณ 3.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเกิดพันธะกับเซรินได้

อัลบูมินในพืชมักพบในส่วนเมล็ด ซึ่งมีจำนวนน้อย เช่น เมล็ดละหุ่ง เมล็ดข้าวหลายชนิด และ เมล็ดพืชตระกูลถั่ว ไรซิน (ricin) และ แอบริน (abrin) ในเมล็ดของ abrus precitorius เป็นโปรตีนที่มีพิษ

3.2.2.1.2.2 **กลอบบูลิน** (globulins) มีมวลโมเลกุล มากกว่าอัลบูมิน และพบในเซลล์สัตว์ และเซลล์พืชทั่วๆ ไป ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบ เป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ พลาสมาโปรตีน แอนติบอดี โปรตีนจากนม ไกลโคโปรตีน และโปรตีนสะสมในพืช ฯลฯ กลอบบูลินจะมีคาร์โบไฮเดรตจับอยู่อย่างหนาแน่น

กลอบบูลินไม่ละลายน้ำหรือละลายได้เล็กน้อย การละลายมีค่าต่ำสุดที่จุดไอโซอิเลคทริค (isoelectric point) แต่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ และสามารถตกตะกอนได้ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต พบในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

โปรตีนประเภทกลอบบูลินที่พบในพืช ได้แก่ อิเพสติน (edestin) อราซิน (arachin) เซียน (zein or maize) และ ทูเบอริน (tuberin) อิเพสติน เป็นโปรตีนที่พบในเมล็ดป่านหรือปอ มีมวลโมเลกุล 300,000 ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย แต่ละส่วนมีพันธะโพลิเปปไทด์ ที่ไม่ระบุ เชื่อมต่อซึ่งกันและกันผ่านพันธะไดซัลไฟด์ อราซิน เป็นโปรตีนที่พบในถั่วลิสง มีโครงสร้างเป็นแบบ เฮกซะเมทริก และแต่ละหน่วยย่อยจะมีพันธะเปปไทด์ 2 พันธะเชื่อมต่อกันและกัน ด้วยพันธะโคเวเลนต์

3.2.2.1.2.3 **โพรลามีน** (prolamines) มีลักษณะสำคัญคือ โพรลามีนมีส่วนประกอบของกรดกลูตามิกสูงประมาณ 30 – 45 เปอร์เซ็นต์ และโพรลีน (proline) ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรตีนกลุ่มนี้มีชื่อต่างจากโปรตีนชนิดอื่นๆ เนื่องจากโปรตีนนี้มี โพรลีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุด โพรลีนไม่ละลายในน้ำ และลารละลายเกลือแต่จะละลายได้ในลารละลายเอทานอล 50 – 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่โปรตีนชนิดนี้จะพบมากในเมล็ดข้าว เช่น ไกลอาดีน (gliadin) เป็นโปรตีนจากเมล็ดข้าวไรย์ เมล็ดข้าวสาลี และฮอร์เดนีน (hordenin) เป็นโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ และยังพบโพรลามีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โปรตีนนี้จะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่ำ ส่วนเมล็ดข้าว และข้าวโอ๊ต จะไม่มีโพรลามีน

3.2.2.1.2.4 **กลูทิลีน** (glutelines) โปรตีนกลุ่มนี้เรียกตามปริมาณกรดกลูตามิกที่มีอยู่มากกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ กลูทิลีนไม่ละลายในน้ำ สารละลายเกลือ และเอทานอลเจือจาง แต่สามารถละลายได้ดีในสารที่มีพีเอช สูงและต่ำ กลูทิลีนส่วนใหญ่พบในเมล็ดข้าวสาลีเรียกว่า กลูทินีน (glutenine) ในข้าวเรียก ออร์ไซนีน (orynine) ในข้าวบาร์เลย์เรียกว่า ฮอร์ดินีน (hordenine) กลูทินิน และ ไกลอาดีน (gliadin) และยังพบในผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วย ประกอบด้วยโปรตีนที่ยึดติดแน่นและเหนียวที่เรียกว่า กลูทีน (gluten)

3.2.2.1.2.5 **ฮีสโตน** (histone) เป็นโปรตีนที่มีจุดไอโซอิเลคทริก เป็นอัลคาไลน์ (alkaline isoelectric point) มีสมบัติละลายน้ำ แต่ไม่ละลายในสารละลายเจือจางของแอมโมเนีย ไม่จับกันเป็นก้อนเมื่อโดนความร้อน เมื่อไฮโดรไลซ์จะให้กรดเบสิคอะมิโน (basic amino acid) จำนวนมากเช่น อาร์จินีน (arginine) สามารถทำให้โปรตีนตัวอื่นตกตะกอนออกมา

จากสารละลายได้ เนื่องจากฮีสโตนเป็นเบสิคโปรตีนจึงสามารถรวมตัวกันกรด เกิดเป็นเกลืออยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ

3.2.2.1.2.6 **โพรทามีน** (protamine) เป็นเบสิคโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบสอย่างแรง มีค่าพีเอช ที่จุดไอโซอิเลคทริค ประมาณ 12 มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยประมาณ 3,000 แต่บางทีมีค่าถึง 10,000 ละลายในน้ำ และสารละลายแอมโมเนีย สามารถทำปฏิกริยากับกรดแร่ (mineral acid) เกิดเกลือ เกลือตกผลึกได้ ไม่รวมตัวเป็นก้อนโดยความร้อน สามารถไฮโดรไลซ์ได้กรดอะมิโน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกกรดเบสิคอะมิโน เช่น อาร์จินีน (arginine) โปรทามีนมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนอื่นๆ ซึ่งละลายน้ำตกตะกอนออกมาได้

3.2.2.2 **คอนจูเกตเตดโปรตีน** (conjugated protein) คือโปรตีนที่ประกอบขึ้นด้วยกรดอัลฟาอะมิโน และมีสารอื่นจับติดอยู่ด้วยเป็นหมู่โพรสเธติค (prosthetic group) เมื่อไฮโดรไลซ์ได้กรดอัลฟาอะมิโน และสารอื่นออกมาด้วย เช่น เฮโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนคือ กลอบบิน (globin) และส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคือ อีม (heme) ซึ่งประกอบด้วยเหล็ก กับโพรโตเพอรไฟลิน (protoporphyrin) คอนจูเกตเตดโปรตีน แบ่งเป็น

3.2.2.2.1 **นิวคลีโอโปรตีน** (nucleoprotein) เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกรวมตัวกับเบสิคโปรตีน เช่น ฮีสโตน และ โพรทามีน พบในนิวเคลียส ไมโครโซม และไมโตคอนเดรีย

3.2.2.2.2 **มิวโคโปรตีน** (mucoprotein) ประกอบด้วยโปรตีนรวมตัวกับคาร์โบไฮเดรตจำนวนมาก โดยคิดจากปริมาณของเฮกโซซามีน (hexosamine) ถ้าเฮกโซซามีนมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวกมิวโคโปรจีน คาร์โบไฮเดรตที่รวมตัวกับโปรตีนเป็นพวกคอมเพลกซ์โพลีแซคคาไรด์ (complex polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วย เอ็น-อะเซตติลเฮคโซซามีน (n-acetylhexosamine) รวมกับกรดยูโรริก (uronic acid) หรือน้ำตาลอื่นๆ มิวโคโปรตีนส่วนมากมีกรดไซอาลิก (sialic acid) รวมอยู่ด้วย มิวโคโปรตีนบางตัวมีคาร์โบไฮเดรตจับกับซีรีน (serine) ด้วยเอสเทอร์บอนด์ (ester bond) ตัวอย่างของมิวโคโปรตีนที่ละลายน้ำได้ เช่น โอโวมิวคอยด์อัล-ฟา (ovomucoid alpha) จากไข่ขาว มิวโคโปรตีนจากซีรัม และจากน้ำปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ มิวโคโปรตีนเมื่อละลายน้ำแล้วจะไม่ถูกแปรสภาพ โดยความร้อนไม่สามารถทำให้ตกตะกอนโดยกรดไตรคลอโรอะซิติค (trichloroacetic acid) หรือ โดยกรดพิคริค (picric acid)

3.2.2.2.3 **ไกลโคโปรตีน** (glycoprotein) เป็นโปรตีน ที่มีคาร์โบไฮเดรชรวมอยู่ด้วยน้อย มีเฮกโซซามีน (hexosamine) รวมอยู่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างไกลโคโปรตีน เช่น อัลบูมินในไข่ขาว ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) และซีรัมกลอบบูลิน (serum globulin) ในไกลโคโปรตีนบางตัว เช่น โอวาลบูมิน (ovalbumin) แกมมากลอบบูลิน (gramma globulin) คาร์โบไฮเดรตจับกับโปรตีนด้วยอะมีดบอนด์ (amide bond) ระหว่างแอสพาราจีนซีคิว กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของเอนอะเซติลกลูโคซามีน (n-acetyglucosamine)

3.2.2.2.4 **ไลโปโปรตีน** (lipoprotein) เป็นโปรตีนซึ่งมีลิปิดรวมอยู่ด้วย มีสมบัติละลายน้ำได้ ลิปิด ฟอสฟอลิปิด (phospholipid) คอเรสเตอรอล (cholesterol) สามารถรวมกับโปรตีนได้ ในซีรัมมีไลโพโปรตีนอยู่หลายชนิด ไลโพโปรตีนพบในสมอง เนื้อเยื่อประสาท และเป็นโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์

3.2.2.2.5 **โครโมโปรตีน** (chromoprotein) เป็นโปรตีนที่มีสี เช่น เฮโมโปรตีน (hemoprotein) เป็นโปรตีนที่รวมตัวกับฮีม

3.2.2.2.6 **ฟลาโวโปรตีน** (flavoprotein) เป็นโปรตีนที่มีฟลาวีนแอดดินินไดนิวคลีโอ-ไทด์ (flavine adenine dinucleotide, fad) หรือ ฟลาวีนโมโนนิวคลีโอไทด์ (flavine mononucleotide, fmn) เป็นหมู่โพรสเธติค (posthetic group) ได้แก่พวกเอ็นไซม์บางตัว เช่น ซัค-ซินิคดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase)

3.2.2.2.7 **เมตัลโลโปรตีน** (metalloprotein) เป็นโปรตีนที่รวมตัวอยู่กับโลหะต่างๆ เช่น Mg Fe Co Zn และ Cu เป็นต้น ตัวอย่างของโปรตีนพวกนี้ได้แก่เอ็นไซม์ไทโรซินออกซิเดส (thyrosine oxidase) ซึ่งเป็นคอปเปอร์โปรตีนที่มีทองแดงจับอยู่กับโปรตีน

3.2.2.2.8 **ฟอสโฟโปรตีน** (phosphoprotein) เป็นโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสรวมอยู่ด้วย ทั้งนี้ไม่รวมพวกนิวคลีโอโปรตีน ตัวอย่างเช่น เคซีน ซึ่งมีเซียรินเรสซิดิวจับกับหมู่ฟอสฟอรัสแบบเอสเทอร์

3.2.2.3 **อนุพันธ์โปรตีน** (derived protein)

3.2.2.3.1 **อนุพันธ์ปฐมภูมิ** (primary derived protein) เป็นอนุพันที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเพียงเล็กน้อยโดยไม่มีการไฮโดรไลซ์ให้เป็นพันธะเปปไทด์แตกออก โปรตีนที่แปรสภาพไปจากธรรมชาติ (denatured protein) จัดเป็นโปรตีนประเภทนี้ อนุพันธ์ปฐมภูมิของโปรตีนได้แก่

3.2.2.3.1.1 **โปรติแอน** (protean) เป็นอนุพันธ์ที่ไม่ละลายน้ำ เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของกรดเจือจาง หรือโดยเอนไซม์ ทำกับโปรตีนในระยะเวลาสั้น ตัวอย่างเช่น ไมโซแซน (myosan) เกิดจากไมโอซิน (myosin)

3.2.2.3.1.2 **เมตตาโปรตีน** (metaprotein) เป็นอนุพันธ์ของโปรตีนที่ละลายได้ในกรดอย่างเจือจาง และในเบสเจือจาง และไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลาง เกิดจากโปรตีนทำปฏิกิริยากับกรดหรือด่างในระยะเวลานานกว่าทำให้เกิดโปรตีนแอน ตัวอย่างเช่น แอซิดอัลบูมิเนต (acid albuminate) และอัลคาไรด์อัลบูเนต (alkali albuminate)

3.2.2.3.1.3 **โคแอคกูเลตโปรตีน** (coagulated protein) เป็นอนุพันธ์ของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เกิดเมื่อให้ความร้อนแก่โปรตีนหรือ เติมอัลกอฮอล์ ลงไปนอกจากนี้เกิดจากแสงรังสีเหนือม่วง (ultraviolet light) หรือ รังสีเอกซ์ (x-ray) ฉายผ่านโปรตีน ตัวอย่างของอนุพันธ์ประเภทนี้ เช่น ไข่ขาวสุก

3.2.2.3.2 **อนุพันธ์ทุติยภูมิ** (secondary derived protein) เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์เปปไทด์บอนด์ของโปรตีน อนุพันธ์พวกนี้ละลายน้ำได้ และไม่จับกันเป็นกลุ่มก้อน เมื่อถูกความร้อน

3.2.2.3.2.1 **โปรติโอส** (proteose) สามารถทำให้ตกตะกอนได้ในสารละลายที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

3.2.2.3.2.2 **เปปโทน** (peptone) ไม่สามารถทำให้ตกตะกอนได้ในสารละลายที่อิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต แต่จะตกตะกอนโดยสารจำพวกอัลคาลอยดัลรีเอเจนต์ (alkaloidal reagent)

3.2.2.3.2.3 **เปปไทด์** (peptide) เมื่อโปรตีนถูกไฮโดรไลซ์ในภาวะที่แรงจนพันธะเปปไทด์บางอันตัดออก ผลที่ได้อาจเป็นไดเปปไทด์ ไตรเปปไทด์ และเปปไทด์อื่นๆ ที่มีกรดอะมิโนมากกว่าสองและสาม

3.2.3 **สมบัติและปฏิกิริยาบางประการของโปรตีน**

3.2.3.1 **ความเป็นกรดและเบสของโปรตีน (บุญยืน**, 2529)

ในสารละลายของกลอบบูลาร์โปรตีนในน้ำสมบัติแห่งความเป็นกรดและเบสของโปรตีนขึ้นอยู่กับหมู่ R ที่อิออนไนซ์ได้ของเรซิดิวของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ส่วนหมู่อัลฟาอะมิโนและหมู่อัลฟาคาร์บอคซิลที่ปลายทั้งสองของห่วงโซ่โพลี่เปปไทด์ มีผลต่อสภาพความเป็นกรดและเบสของโปรตีนน้อยมาก การที่หมู่ R จะอิออนไนซ์ ได้ดีเพียงใดขึ้นอยู่กับลักษณะของหมู่ R ที่อยู่ใกล้เคียงกันด้วย

พวกกลอบบูลาร์โปรตีนอื่นๆ เช่น เบต้าแลคโตกลอบบูลิน อัลบูมินในไข่ หมู่ R ที่ อิออน-ไนซ์ได้สามารถไตเตรตได้เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าหมู่ R ที่อิออนไนซ์ได้อยู่ที่ผิวนอกจึงไตเตรตได้ ส่วนหมู่ที่เป็นนอนโพลาร์อยู่ข้างใน กลอบบูลาร์โปรตีนบางตัวเช่น ไมโอโกลบินมีหมู่อิมิดาซอลของฮิสทีดีนอยู่ 11 หมู่ แต่สามารถไตเตรตได้เพียง 5 หมู่ ส่วนอีก 6 หมู่ไม่สามารถไตเตรตได้เนื่องจากมันขดซ่อนอยู่ข้างในโครงสร้างตติยภูมิของมัน ถ้าต้องการไตเตรตหมู่อิมิดาซอลที่เหลืออีก 6 หมู่นี้ให้ได้ต้องแปรสภาพธรรมชาติของไมโอโกลบินเสียก่อน

ที่จุดไอโซอีเลกตริคโมเลกุลของโปรตีนจะไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า เนื่องจากประจุรวมเป็นศูนย์ ค่าไอโซอีเลกตริคพีเอช หาจากจำนวน และ pK' ของหมู่ R ที่อิออนไนซ์ได้ ถ้าโปรตีนมีกรดอะมิโนชนิดเบสิคเป็นองค์ประกอบ (เช่นไลซีน อาจินีน) อยู่มาก ค่าพีไอ (pI) สูงกว่า 7.0 ไรโบนิวคลีเอสมี กรดอะมิโนชนิดเบสิคเป็นองค์ประกอบอยู่มากจึงมีค่าพีไอ สูงถึง 9.6 ถ้าโปรตีนมีกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด เป็นองค์ประกอบอยู่มาก (เช่น กรดแอสพาติค กรดกลูตามิค) ค่าพีไอ (pI) จะต่ำกว่า 7 เช่น เปปซิน กลอบบูลาร์ โปรตีนส่วนมากมีค่าพีไอ ระหว่าง 4.5 ถึง 6.5 ดูตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จุดไอโซอีเลคตริคของโปรตีนต่างๆ

โปรตีน	จุดไอโซอีเลคตริค
เปปซิน	ประมาณ 1
อัลบูมินจากไข่	4.6
อัลบูมินจากซีรัม	4.9
ยูรีเอส (urease)	5.0
เบต้าแลคโตกลอบบูลิน	5.2
แกมม่ากลอบบูลิน	6.6
เฮโมโกลบิน	6.8
ไมโอโกลบิน	7.0
ไรโบนิวคลีเอส	9.6
ไคโมทริพซิโนเจน	9.5
ไซโตโครมซี	10.6
ไลโซซายม	11.0

เมื่อโปรตีนมี พีเอช สูงกว่าจุดไอโซอีเลคตริค โปรตีนมีประจุรวมเป็นลบ และเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วบวก ถ้า พีเอช ยิ่งสูงขึ้นโปรตีนยิ่งมีประจุลบเพิ่มขึ้นดูจากไตเตรชันเคอรฟ ตรงกันข้ามถ้าโปรตีนมีพีเอช ต่ำกว่าจุดไอโซอีเลคตริค โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นบวกและเคลื่อนที่ไปสู่แคโทดในสนามไฟฟ้า

ถ้ามีเกลือชนิดที่เป็นกลาง (neutral salt) ละลายปนอยู่กับโปรตีน ไตเตรชั่นเคอรฟและจุดไอโซอีเลคตริคของโปรตีนจะเปลี่ยนไป เนื่องจากหมู่ R มีค่าองศาแห่งการแตกตัวเป็นอิออน (degree of ionization) เปลี่ยนไป โปรตีนอาจรวมกับแคทอิออนเช่น Ca^{2+} หรืออาจจับกับแอนอิออนเช่น Cl^- ดังนั้นค่าไอโซอีเลคตริค พีเอช ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับลักษณะของมีเดียมที่ละลายโปรตีนอยู่

เมื่อนำสารละลายของโปรตีนมาไดอะไลซ์ (dialyze) กับน้ำกลั่นเพื่อไล่แคทอิออนและแอนอิออนต่างๆ ออกให้หมดคงมีแต่ H^+ กับ OH^- สารละลายของโปรตีนที่ได้ตอนนี้มี พีเอช ซึ่งเรียกว่าไอโซอิออนนิค พีเอช (isoionic pH) โปรตีนแต่ละชนิดย่อมมีค่าไอโซอิออนนิค พีเอช คงที่

จากสมบัติแห่งความเป็นกรดและเบสของโปรตีนนี้เรานำมาใช้ประโยชน์เพื่อแยกและวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีอีเลคโตรฟอรีซีส และโครมาโตกราฟฟี่ชนิดแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography)

3.2.3.2 **สมบัติการสารละลายของโปรตีน**

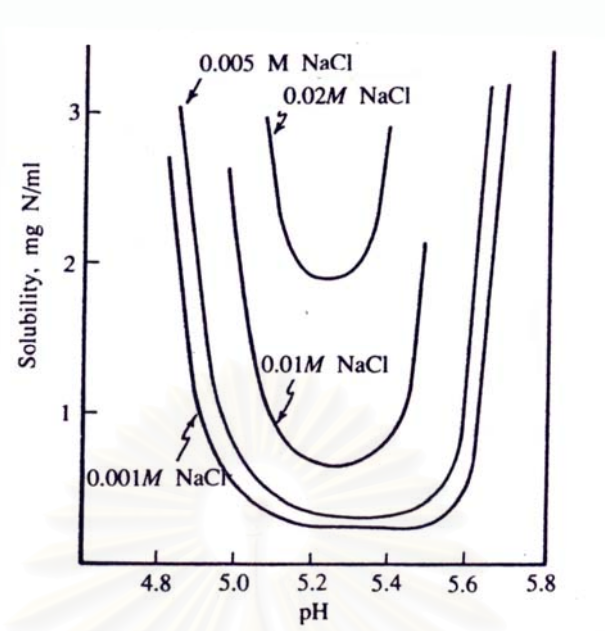
ใน พ. ศ. 2459 อีมิลฟิสเซอร์ (Email Fischer) เชื่อว่าโปรตีนเมื่ออยู่ในสารละลายจะจับกันเป็นกลุ่ม (micellelike complex) เมื่อเติมกรดหรือเบส หรือเกลือที่เป็นกลางลงไป สมบัติแห่งการละลายของโปรตีนจะเปลี่ยนไป ปัจจุบันนี้เราพบว่าโปรตีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน เมื่อละลายแล้ว สารละลายมีลักษณะเป็นสารละลายที่แท้จริง (true molecular solution) และมีสมบัติเป็นสารละลายอิเลคโตรไลท์ (electrolyte)

การละลายของโปรตีนขึ้นอยู่กับ พีเอช กำลังของอิออน (ionic strength) สมบัติไดอีเลคตริคของตัวทำละลาย และ อุณหภูมิ

3.2.3.2.1 **ผลของพีเอชต่อการละลายของโปรตีน**

โปรตีนละลายได้น้อยที่สุด เมื่อ พีเอช อยู่ที่จุดไอโซอีเลคตริคเพราะโมเลกุลของโปรตีนที่ไอโซอีเลคตริค พีเอช มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นศูนย์จึงไม่มีแรงที่จะผลักกันให้กระจายอยู่ในสารละลาย ที่ พีเอช อื่นๆ ซึ่งไม่ใช่ไอโซอีเลคตริค พีเอช โปรตีนมีประจุไฟฟ้าเป็นบวกหรือลบเหมือนกัน จึงมีแรงไฟฟ้าสถิตย์ผลักกันให้กระจายอยู่ในสารละลาย

จุดไอโซอีเลคตริค (isoelectric point) ของโปรตีนคือ พีเอช ซึ่งโปรตีนไม่เคลื่อนย้ายไปทางขั้วบวกหรือขั้วลบในสนามไฟฟ้า ที่ พีเอช นี้ โปรตีนอยู่ในสภาพเป็นซวิทเทอร์อิออน (zwitterion) ซึ่งประจุบวกทั้งหมดมีค่าเท่ากับประจุลบทั้งหมด และประจุรวมมีค่าเท่ากับศูนย์



รูปที่ 3.2 ผลของ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือต่อการละลายของเบต้าแลคโตกลอบบูลิน 25 องศาเซียลเซียส จำนวน M เป็นความเข้มข้นของเกลือแกง (NaCl)

จากรูปที่ 3.2 จะเห็นว่าการละลายของเบต้าแลคโตกลอบบูลิน มีค่าต่ำสุดที่ พีเอช 5.2 ถึง 5.3 ที่ พีเอช 4.9 และ 5.7 โปรตีนตัวนี้ละลายได้ถึง 10 เท่า ของการละลายที่ พีเอช 5.2 โดยเฉพาะเมื่อเติมเกลือแกงลงไปเพียงเล็กน้อย ที่ พีเอช 5.2 ซึ่งเป็นจุดไอโซอีเลคตริคของเบต้าแลคโตกลอบบูลินการละลายของโปรตีนนี้เป็นไปได้น้อยมาก เมื่อ พีเอช เปลี่ยนไปเพียง 0.3 ถึง 0.5 การละลายเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า โปรตีนบางตัวไม่ละลายน้ำเลยที่จุดไอโซอีเลคตริคของมัน (ดูตารางที่ 3.2) ดังนั้นจึงสามารถแยกโปรตีนแต่ละตัวออกจากของผสมได้ โดยทำให้ของผสมนั้นมี พีเอช อยู่ที่จุดไอโซอีเลคตริคของโปรตีนเหล่านั้น การแยกโปรตีนออกจากกันโดยวิธีนี้เรียกว่า การตกตะกอนที่จุดไอโซอีเลคตริค

3.2.3.2.2 ผลของกำลังของอิออน ต่อการละลายของโปรตีน

กำลังของอิออน (ionic strength) ของเกลือที่อยู่ในสารละลายของโปรตีนมีผลต่อการละลายของโปรตีน กำลังของอิออน คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี วท. จุฬา, 2536)

$$\mu = \frac{1}{2} \sum cZ^2 \qquad (3.2)$$

เมื่อ μ = กำลังอิออน (ionic strength)

c เป็นโมลาริตี

Z เป็นประจุของอิออน

ดังนั้นจะเห็นว่า เกลือพวกที่มีอิออนซึ่งมีเวเลนซ์เท่ากับ 1 จะมีกำลังอิออนเท่ากับโมลาริตีของสารละลาย

เมื่อเติมเกลือทีมีสมบัติเป็นกลาง (neutral salt) จำนวนเล็กน้อยลงในสารละลายของโปรตีนจะทำให้กลอบบูลาร์โปรตีน (globular protein) ละลายได้ดีขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้เรียกว่า ซอลติงอิน (salting-in) เกลือที่ประกอบด้วยอิออน ซึ่งมีเวเลนซี 2 (divalent ion) เช่น $MgCl_2$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้เกิด ซอลติง-อิน ได้มากกว่าเกลือที่ประกอบด้วยอิออน ซึ่งมีเวเลนซี 1 (monovalent ion) เช่น NaCl, KCl และ NH_4Cl ทั้งนี้เนื่องจาก กำลังของอิออน (ionic strength)

กลอบบูลิน เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้ยากมาก ในการสกัดกลอบบูลินออกจากเนื้อเยื่อ จึงใช้น้ำเกลือที่เจือจาง ซึ่งนับว่าเป็นวิธี ซอลติง-อิน กล่าวคือ เมื่อมีเกลือจำนวนเล็กน้อยอยู่ด้วย ช่วยทำให้กลอบบูลินละลายน้ำได้ดีขึ้น เมื่อต้องการทำให้กลอบบูลิน ซึ่งละลายอยู่ในน้ำเกลือตกตะกอน ให้เติมน้ำลงไปมากๆ กลอบบูลินไม่ละลายน้ำ จึงตกตะกอนออกมา หรืออาจใช้วิธีไดอะไลซีส (dialysis) ด้วยน้ำ ใส่กลอบบูลินที่สกัดออกมาได้ ซึ่งละลายอยู่ในน้ำเกลือลงในถุงเซลโลเฟน (cellophane) แล้วแช่ถุงนี้ลงมนน้ำ อิออนเล็กๆ ของเกลือจะลอดรูของถุงซึ่งเป็นเซมิเพอรมิเอเบิล (semi permeable) ออกมาได้ ส่วนโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดโตไม่สามารถลอดรูของถุงออกมาได้ เมื่อเปลี่ยนน้ำที่แช่ถุงหลายครั้ง ในที่สุดอิออนของเกลือจะออกไปหมดและกลอบบูลินจะตกตะกอนอยู่ภายในถุง

การเติมเกลือจำนวนเล็กน้อยลงไปแล้ว ทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น อธิบายโดยเหตุผลได้ว่า การที่สารชนิดหนึ่งละลายในตัวทำละลายได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายด้วยกัน และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลาย ถ้าแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายด้วยกันลดน้อยลง การละลายย่อมดีขึ้น ดังนั้นการเติมเกลือลงไปช่วยลดแรงดึงดูดระหว่างตัวถูกละลายด้วยกัน ย่อมทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น

อิออนเล็กๆ ของเกลือจะไปจับหมู่อิออนในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลงซึ่งมีผลทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น

3.2.3.2.3 ผลของสมบัติไดอีเลคตริคของตัวทำละลายต่อการละลายของโปรตีน

เมื่อเติมตัวทำละลายเช่นอัลกอฮอล์หรืออะซิโตนลงไปในสารละลายของโปรตีนในน้ำ ปรากฏว่าโปรตีนละลายน้ำได้น้อยลง และถ้าเติมลงไปมากๆ โปรตีนอาจตกตะกอนออกมาได้ ทั้งนี้เนื่องจากค่าคงตัวไดอีเลคตริคของอัลกอฮอล์และอะซิโตนมีค่าน้อยกว่าของน้ำ ดังในตารางที่ 3.3 เมื่อค่าคงตัวไดอีเลคตริคน้อยลง แรงดึงดูดระหว่างประจุบวกกับประจุลบย่อมมีค่าเพิ่มขึ้น ตามสูตร

$$F = e_1 e_2/Dr^2 \qquad (3.3)$$

เมื่อ F เป็นแรงดึงดูดระหว่างอิออน 2 อันซึ่งมีประจุต่างกัน

e_1 และ e_2 เป็นประจุของแต่ละอิออน

r เป็นระยะทางระหว่างประจุทั้งสอง

D เป็นค่าคงตัวไดอีเลคตริค

เมื่ออัลกอฮอล์หรืออะซีโตนทำให้แรงดึงดูดระหว่างอิออนเพิ่มขึ้น จึงทำให้โปรตีนแตกตัวเป็นอิออนได้น้อยลงและจับกันเป็นก้อน (coalescence) อัลกอฮอล์และอะซิโตนทำให้การละลายของโปรตีนลดลง

ตารางที่ 3.3 ค่าคงตัวไดอิเลคตริคของของเหลวต่าง ๆ ที่ 20 องศาเซลเซียส

	D
น้ำ	80
เมธานอล	33
เอธานอล	24
อะซิโตน	21.4
เบนซิน	2.3
เฮกเซน	1.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวทำละลายที่มีค่าคงตัวไดอีเล็คตริคสูงกว่าของน้ำเช่น ไดเมธิลซัลฟอคไซด์ (dimethyl sulfoxide) และฟอร์มามีน (formamide) เมื่อเติมลงไปจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น

3.2.3.2.4 **ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีน**

ในช่วงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส โปรตีนละลายได้มากขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส โปรตีนเริ่มแปรสภาพจากธรรมชาติ และการละลายลดน้อยลง ที่ พีเอช เป็นกลาง

3.2.3.3 **สมบัติการเป็นคอลลอยด์** (Colloidal Properties)

โปรตีนถูกจัดอยู่ในสารจำพวกแมคโครโมเลกุล จึงพบว่าโปรตีนที่อยู่ในสภาพสารละลาย มีสมบัติเป็นคอลลอยด์ สามารถจำแนกออกตามลักษณะได้ 2 ชนิดคือ อิมัลซอยด์ (emulsoid) และซัสเพนซอยด์ (suspensoid) โปรตีนที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นอิมัลซอยด์ คือเป็นคอลลอยด์ชนิดไฮโดรฟิลิก (hydrophilic colloids) ส่วนซัสเพนซอยด์เป็นคอลลอยด์ ชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic colloids) สารละลายชนิดคอลลอยด์ทั้งอิมัลซอยด์ และซัสเพนซอยด์ แสดงประจุไฟฟ้าที่ผิวของโมเลกุลเนื่องจาก การที่แขนงข้างของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนสามารถแสดงประจุได้ การที่โปรตีนสามารถแสดงประจุไฟฟ้าได้มีประโยชน์ในการแยกโปรตีนออกจากสารอื่นได้ เนื่องจากโปรตีนเป็นคอลลอยด์ที่มีขนาดใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อเซลล์ (semipermeable membrane) รวมทั้งสามารถดึงน้ำและสารอื่นไว้ได้ ทำให้โปรตีนมีบทบาทสำคัญในการกำหนดปริมาณน้ำ (ดาวัล, 2538)

3.2.3.4 **การเสื่อมสภาพธรรมชาติของโปรตีน** (denaturation)

โปรตีนเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ ย่อมสามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ฮอร์โมนสามารถกระตุ้นที่เนื้อเยื่อเป้าหมายได้ อัลบูมินในพลาสมาสามารถจับสารต่างๆ เพื่อพาไปส่งยังเนื้อเยื่อและรักษาดุลออสโมซิสได้ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะโปรตีนเหล่านั้นมีโครงร่างจำเพาะเหมาะแก่การทำงานต่างๆ ดังกล่าว การเสื่อมสภาพธรรมชาติโดยวิธีต่างๆ ทำให้โครงสร้างขั้นที่สี่ สาม และสองเปลี่ยนแปลงไป แต่ไม่ได้ทำลายโครงสร้างขั้นแรก นั่นก็คือพันธะเปปไทด์ยังยึดกรดอะมิโนต่างๆ ไว้ได้อยู่เป็นโพลีเปปไทด์ เพราะฉะนั้นการทดสอบทางเคมีของโปรตีนที่ถูกเสื่อมสภาพธรรมชาติแล้วจึงยังได้ผลบวกอยู่ แต่การทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพจะไม่ได้

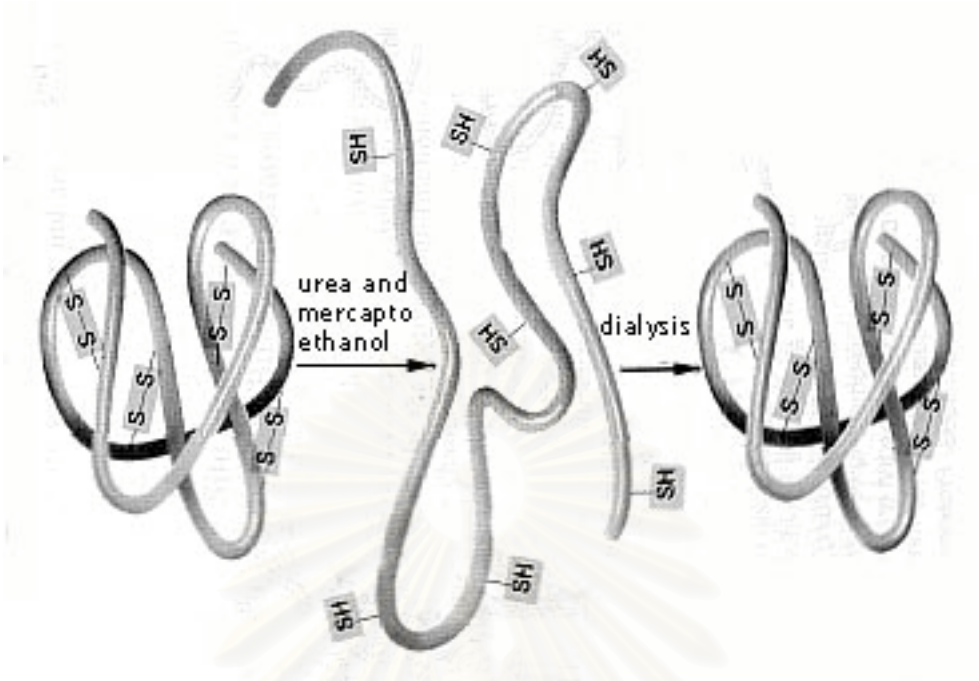
ผล เพราะโปรตีนหนึ่งๆ จะทำหน้าที่ได้ในอุณหภูมิและพีเอชเฉพาะช่วงหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในช่วงอุณหภูมิและพีเอชนี้ โปรตีนจะมีโครงสร้างเฉพาะตัวของมัน ซึ่งเหมาะแก่การทำหน้าที่ทางชีวภาพนั้นๆ นอกจากนี้การเสื่อมสภาพธรรมชาติยังทำให้สมบัติทางฟิสิกส์ของโปรตีนเปลี่ยนไปด้วย เช่น การดูดกลืนแสง การละลาย เป็นต้น

สิ่งที่เสื่อมสภาพธรรมชาติของโปรตีน ได้แก่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟิสิกส์ เช่น การทำให้ร้อน การเปลี่ยนพีเอช การเติมตัวทำลายต่างๆ เช่น อัลกอฮอล์ หรืออะซีโตน การเติมยูเรียจำนวนมาก การเติมสารดีเทอร์เจนต์ การฉายรังสีเอกซ์ การฉายแสงและการเขย่า เป็นต้น

การเสื่อมสภาพธรรมชาติเช่นนี้ ถ้าไม่รุนแรงเกินไปอาจทำให้โปรตีนนั้นกลับมีสภาพธรรมชาติเดิมได้ (renaturation หรือ refolding) โดยการจัดให้สู่สภาพเดิม เช่น ทำให้เย็น ปรับ พีเอชเสียใหม่ เอาตัวทำละลายหรือสารต่างๆ ที่เติมลงไปออกเสีย โปรตีนจะกลับคืนสู่โครงร่างเดิมได้เองโดยไม่ต้องใช้พลังงานใดๆ เช่น ฮีโมโกลบินเมื่ออยู่ในกรดถูกทำลายสภาพธรรมชาติ แต่เมื่อเติมด่างจนมีพีเอชเท่าเดิม จะคืนสู่สภาพเดิมได้

ตัวอย่างของการเสื่อมสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่เห็นได้ชัด คือ การต้มสารละลายไข่ขาวและโปรตีนจากเนื้อสัตว์ต่างๆ โปรตีนจะตกตะกอน เมื่อบีบน้ำมะนาวซึ่งเป็นกรดลงในต้มยำกุ้งจะมีตะกอนสีขาวขุ่นของโปรตีน เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิหรือพีเอชของสารละลายเอนไซม์ให้ผิดไปจากธรรมชาติของมัน เอนไซม์จะไม่เร่งปฏิกิริยาต่างๆอีกต่อไป

สิ่งที่เปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของโปรตีนเมื่อถูกเสื่อมสภาพธรรมชาติ คือ เกิดการคลายตัว (unfolding) ของรูปร่างเฉพาะของโปรตีน ซึ่งเท่ากับเป็นการทำลายแรงยึดโครงร่างขั้นที่สอง สาม และสี่ ทำให้โปรตีนมีลักษณะไม่เป็นรูปร่าง (randomly and irregularly conformation) เช่น โปรตีนรูปร่างมนกลมอาจยืดตัวออก ลักษณะแอลฟาฮีลิกซ์อาจคลายตัวออก หน่วยย่อยที่รวมกันอยู่อาจแยกตัวออกจากกัน ตัวอย่างเช่น สายแอลฟาและเบตาโพลีเพพไทด์ทั้งสี่ของฮีโมโกลบินเมื่อแยกออกเป็น 4 หน่วยย่อยแล้ว ไม่สามารถทำหน้าที่พาก๊าซ CO_2 และ O_2 ได้ รูปที่ 3.3 แสดงการเปลี่ยนสภาพและการกลับสู่สภาพเดิมของโปรตีนมนกลมชนิดหนึ่ง



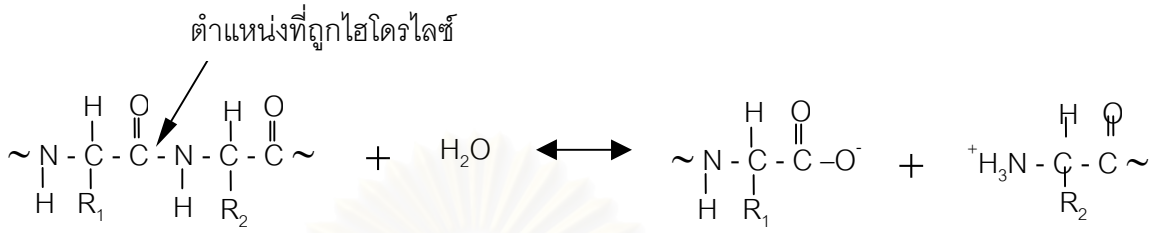
รูปที่ 3.3 การคลายตัวและการม้วนตัวของโปรตีนเมื่อแปรสภาพธรรมชาติไปกลับ

เมื่อโปรตีนถูกเสื่อมสภาพธรรมชาติ นอกจากจะทำให้เสียผลทางชีวภาพแล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง เช่น ค่าพีเอช สูงขึ้น ทั้งนี้เพราะหมู่ธาตุ เช่น –SH หรือ –OH ที่ถูกปิดไว้ด้วยการขดตัวของสายโพลีเปปไทด์ได้ถูกเปิดออก นอกจากนั้นการละลายของโปรตีนจะลดน้อยลง ทำให้โปรตีนตกตะกอน อาหารโปรตีน เช่น ไข่ต้ม เนื้อต้ม จะย่อยง่ายขึ้นเมื่อถูกเสื่อมสภาพธรรมชาติ การปรุงอาหารก็เป็นการเสื่อมสภาพธรรมชาติวิธีหนึ่ง

3.3 เอนไซม์

เอนไซม์เกือบทั้งหมดที่รู้จักในปัจจุบันเป็นโปรตีน ความสามารถที่ทำให้เอนไซม์แตกต่างจากโปรตีนอื่น คือ การเร่ง (catalyze) การเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เช่น ไฮโดรลิซิส ปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่ของสารหรืออิเลคตรอน ปฏิกิริยาการตัดและเชื่อมต่อพันธะต่างๆ ตลอดจนปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน เป็นต้น ยิ่งกว่านั้นสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้มันเหนือกว่าตัวเร่งที่เป็นสารเคมี (chemical catalyst) คือความจำเพาะต่อชนิดของปฏิกิริยาและสับสเตรทของมัน เอนไซม์มักจะเร่งเฉพาะปฏิกิริยาเดียวหรือเฉพาะประเภทเดียวเท่านั้น และใช้สับสเตรทชนิดเดียว (substrate specificity) ในงานวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์ประเภทที่เร่งการไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ หรือโปรติโอไล-

ติก เอนไซม์ (proteolytic enzyme) มีชื่อสามัญว่าเปปติเดส (peptidase), โปรติเอส (protease) , โปรตีนเนส (proteinase) และเปปไทด์ ไฮโดรไลเซส (peptide hydrolysaes) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ดังรูปที่ 3.4 (สุกัญญา, 2531)



รูปที่ 3.4 การไฮโดรไลซ์เปปไทด์ด้วยโปรติเอส

โปรติโอไลติกเอนไซม์ถึงแม้จะเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกัน แต่ก็มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.4 เช่น ทริพซิน (trypsin) มีความจำเพาะนี้ค่อนข้างสูง จะไฮโดร-ไลซ์พันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนชนิดเบสิค เช่น ไลซีน (lysine) และ อาจินิน (arginine) เป็นต้น ธรอมบิน (thrombin) จะไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ระหว่างอาจินิน และไกลซีน (glycine) ส่วนเทอร์โมไลซีน (thermolysin) มีความจำเพาะกับเปปไทด์ โดยจดจำกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่มีขนาดใหญ่ เช่นลิวซีน (leucine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) และ ฟีนิลอลานีน (phenylalanine) เป็นต้น และยิ่งถ้ากรดอะมิโนทั้งสองข้างของเปปไทด์ ที่จะถูกไฮโดรไลซ์เป็นชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) แล้ว อัตราเร่งของปฏิกิริยาก็จะสูงยิ่งขึ้น

จากเห็นได้ว่าความสามารถพิเศษนี้ของเอนไซม์จะสามารถทำให้สามารถใช้เอนไซม์ต่างชนิดกันทำงานต่างกันในเวลาเดียวกันได้ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติตามต้องการ ยิ่งกว่านั้นคือไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by-product) ที่ไม่ต้องการอีกด้วย สมบัติอีกประการที่เอนไซม์มีเหนือตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (chemical catalyst) คือประสิทธิภาพของเอนไซม์สูงมาก อันนี้ขึ้นกับความสามารถของเอนไซม์ที่จะจับตัวกับสับสเตรทประการหนึ่ง และความสามารถที่เอนไซม์จะเปลี่ยนแปลง conformation อีกประการหนึ่ง

ตารางที่ 3.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของ proteolytic enzymes ชนิดต่าง ๆ

Proteofytic Enzyme	ชนิดของกระอะมิโนบนโพลีเปปไทด์บนบริเวณ xy ↓ z		
	ปลายทางด้านอะนิโน		ปลายทางด้านคาร์บอกซิล
	x	y	z
Trypsin	-	Basic [lys, arg]	-
Chymotrypsin	-	aromatic [trp , tyr , phe] หรือ hydrophobic [leu, met]	-
Elastase	-	hydrophobic ขนาดเล็ก (ala)	-
Papain	phe	lys>ala	leu, trp.
Thermolysin (จาก bacillus thermoproteolyticus)	-	-	Hydrophobic ขนาดใหญ่ [val, leu, ile, phe]
pepsin	-	phe	phe, trp, tyr.
carboxypeptidase a (ตัดปลายด้านคาร์บอคซิล)	-	-	aromatic หรือ hydrophobic ขนาดใหญ่]

มีการค้นพบเอนไซม์นี้มากกว่า 200 ปี (Mihalyi, 1972 ; Adler – Nissen.1986) โดยเริ่มจากการสังเกตระบบการย่อยในกระเพาะอาหารสัตว์ จนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอสไว้มากมาย และได้มีการจัดแบ่งชนิดของโปรติเอสไว้หลายวิธี เช่น แบ่งตามจุดกำเนิดได้ 3 ชนิดคือ จากสัตว์ , จากพืช และจากจุลชีพ หรือ แบ่งตามลักษณะบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ได้เป็น 4 ชนิดคือ serine , thiol , metal และ acid protease หรือถ้าแบ่งตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเปปไทด์แบ่งได้สองชนิดคือตัดที่ปลายสาย (exoprotease) และ ตัดที่ระหว่างสายโพลีเปปไทด์ (endoprotease)

3.3.1. ประเภทของเอนไซม์จากจุลชีพ

จากการที่โปรติเอสต่างชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้หลายประเภท โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะได้มาจากจุลชีพ เนื่องจากเป็นแหล่ง ที่เหมาะสมในการผลิตปริมาณมาก และการสกัดเอนไซม์ทำได้ง่ายเนื่องจากจุลชีพผลิตแล้วส่งออกสู่นอกเซลล์ (extracellular emzyme) เอนไซม์โปรติเอสจากจุลชีพแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ (Keay , 1971) คือ

3.3.1.1 acid protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง พีเอช ประมาณ 2 – 5 ส่วนใหญ่ได้จากจุลชีพจำพวกเชื้อราและยีสต์ ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย มีกรดอะมิโนแอสปาเทตอยู่ที่บริเวณเร่ง (Fruton , 1970) ไม่ถูกยับยั้งโดยสารพวก diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA) แต่ถูกยับยั้งโดยสารพวก diazoketone compounds (Mizube และคณะ ,1973)

3.3.1.2 alkaline protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง พีเอช ประมาณ 7 – 11 พบทั้งในแบคทีเรีย รา และยีส มีสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริบซินและไคโมทริบซินในสัตว์ น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 15,000 – 30,000 มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทใช้มากในอุตสาหกรรมผงซักฟอก อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีผู้สนใจศึกษาและนำมาใช้มากในอุตสาหกรรมคือ อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรียตระกูลบาซิลัส และเป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซรินที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เรียกเอนไซม์นี้ว่าสับทิลิซิน subtilisin

3.3.1.3 neutral protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง พีเอช เป็นกลาง พบทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา มีผู้ศึกษาไว้ในแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัสหลายชนิด เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 35,000-45,000 มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มีพันธะไดซัลไฟด์และเป็นเมทเทลโล-เอนโดโปรติเอส metallo-endoprotease คือมีไอออนโลหะเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล และมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนส่วนใหญ่ที่พบคือ Zn^{2+} ซึ่งไม่มีความสำคัญต่อความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมี สังกะสีเป็นส่วนประกอบประมาณ 1 - 2 อะตอมต่อโมเลกุลเอนไซม์ และนิวทรัลโปรติเอสบางชนิดอาจมีส่วนประกอบของแคลเซียมด้วย นิวทรัลโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับโปรติเอสชนิดอื่นๆ เป็นเมทเทลโลเอนไซม์ (metalloenzyme) จึงถูกยับยั้งโดยสารพวกคีเลตติ้ง เช่น EDTA. o – phenanthrolie , dithizone แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DEP. sulfhydryl reagent . soybean trypsin

inhibitor หรือ potato protease inhibitor ในแง่ความจำเพาะของปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์พบว่านิวทรัลโปรติเอสมีความจำเพาะต่อปลาย n ของสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก หรือ bulky amino acid เช่นกรดอะมิโนลิวซิน หรือ กรดอะมิโนฟีนิล-อลานีน ปัจจุบันมีการนำโปรติเอสชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมหลายประเภท ใช้ย่อยโปรตีนในอุตสาหกรรมเบียร์ ฟอกหนัง ซีอิ้ว น้ำปลา การผลิต yeast extrac และใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็งและขนมปังต่างๆ พบว่านิวทรัลโปรติเอสจาก *B.subtilis* ช่วยปรับคุณภาพของแป้งทำขนมปังประเภท cracker และ biscuit ทำให้สามารถแผ่เป็นแผ่นบางได้โดยไม่ขาดและลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ และเมื่อใช้นิวทรัลโปรติเอสร่วมกับเอนไซม์ไลเปส ในการทำเนยแข็งพบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม

เอนไซม์ที่ใช้ในงานที่มีชื่อทางการค้าที่ว่า นิวเทรส (neutrase) เป็นโปรติเอสที่ได้จากการหมักในของเหลว (submerged fermentation) ของจุลชีพสายพันธุ์ *Bacillus amylolique* เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระระหว่างสายโพลิเปปไทด์ (endopeptidases) นิวเทรสมีส่วนประกอบของโปรติเอสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง จาก *B. amylolique faciens* เท่านั้น ซึ่งต่างจากเอนไซม์ทางการค้าชนิดอื่นที่มีส่วนประกอบของ alkaline proteinase ด้วย นิวเทรสเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบ คือ Zn ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ เรียกว่า metallo proteinase และมีความคงตัวเมื่อมีแคลเซียมไอออนถูกยับยั้งได้ด้วยสาร EDTA นิวเทรส ประกอบด้วย a non - standardized amounl of beta-glucanase และไม่มีส่วนประกอบของ alpha - amylose นิวเทรสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 - 55 องศาเซลเซียส หรือ 113 - 131 องศาฟาเรนไฮด์ และมีพีเอช 5.5 - 7.5

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้นิวเทรสซึ่งเป็นนิวทรัล โปรติเอส (neutral protease) ดังนั้น จะกล่าวถึงเฉพาะทฤษฎีของนิวทรัลโปรติเอสอย่างละเอียด

neutral protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง พบทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา มีผู้ศึกษาไว้ในแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสหลายชนิด เช่น จาก *Bacillus subtilis B. cereus, B. megaterium, B.stearothermophilus* (keay, 1972) *B .thuringiensis* (Li & Yousten, 1975), *B.pumilus* (Tran Chau & Uranek, 1974) *B.thermoproteolytieus* (thermolysin) Keay & Wildi, 1970 และ *B.polymyxa* (Fogarty & Griffin, 1973) ในแบคทีเรีย *B.polymyxa*, *B.megaterium, B.cereus*, และ *B.thermoproteolyticus* มีการผลิตเฉพาะเอนไซม์นิวทรัลโปรติ-เอสเท่านั้น แต่ใน *B.subtilis* พบว่าผลิตทั้งเอนไซม์นิวทรัลและอัลคาไลน์โปรดีเอส นอกจากใน

แบคทีเรียกลุ่มนี้แล้วยังมีการศึกษาในเชื้อราและแบคทีเรียอีกหลายชนิด เช่น *streptomyces* naraensis (Hiramatsu, 1967), *S.ariseus* (Nomoto & Narashashi, 1959) *P.aeruginosa* (Morihara & Tsuzuki, 1967) และ *aspergillus oryzae* (Nakadai และคณะ, 1973)

เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส มีลักษณะและสมบัติทางด้านต่าง ๆ สรุปได้ดังต่อไปนี้

3.3.2 **สมบัติทางกายภาพและเคมี**

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 35,000-45,000 จากการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค ultracentrifugation ใน *B.subtilis* NRRLB 3411, *B.subtilis* - *var.amylosachariticus* และ thermolysin จาก *B .thermoproteolyticus* พบว่าเอนไซม์มีขนาด 44,700, 33,800 และ 37,500 ตามลำดับ (Tsuru และคณะ, 1966; Ohta และคณะ, 1966) Dtsuru และคณะ (1965) รายงานว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเกิดการ autolysis ได้ง่าย โดยพบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก *B.subtilis* ซึ่งหาด้วยวิธี sedimentation equilibrium ขึ้นกับระยะเวลาหลังจาก full speed ของ sedimen tation run ถ้าเขียนกราฟระหว่างเวลากับค่าน้ำหนักโมเลกุลจะได้ค่าความชันเป็นลบ และจะยิ่งเป็นลบมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดจากการ autolysis ของเอนไซม์ ดังนั้นการหาน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงของ native intact enzyme ควรใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำที่สุด

นิวทรัลโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มี พันธะไดซัลไฟด์ เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก *B.subtilis* NRRLB 3411 ประกอบด้วย กรดอะมิโน 325 ตัว (Keay & Wildi, 1970) มีไกลซีนและลิวซีนอยู่ที่ปลายสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย n และปลาย c ตามลำดับ เอนไซม์จากสายพันธุ์อื่นมีกรดอะมิโนที่ปลาย n ต่างออกไป เช่น เอนไซม์จาก *B.subtilis var.amylosacchariticus* เป็นอะลานีน (D.tsuru และคณะ, 1966) และเอนไซม์จาก *B.theromoproteolyticus* เป็นไอโซลิวซีน-ทรีโอนีน-ไกลซีน-ทวีโอนีน และพบว่าส่วนประกอบของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์จาก *B .subtilis* NRRLB 3411 คล้ายกับของ *B.subtilis var.amylosa* chariticus แต่ต่างจากของ *B.thermoproteolyticus* (Keay & Wildi, 1970)

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเป็น metallo-endoprotease คือ มีไอออนโลหะเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล และมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนส่วนใหญ่ที่พบ คือ Zn^{2+} มีการศึกษาลักษณะของ Zn^{2+} ในโมเลกุลของ thermolysin ซึ่งเป็นโมเลกุลพับ (folded) ทำให้เกิด

เป็น 2 lobes แยกจากกันโดยร่องลึก (deep cleft) (Matthew, 1977) ซึ่งเป็นส่วนที่มีอะตอมของสังกะสีอยู่ (รูปที่ 3.5) โครงสร้างของเอนไซม์ thermolysin ที่บริเวณจับกับสับสเตรท (binding site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัว ใกล้กับอะตอมของสังกะสี (Morihara & Oka, 1968) และพบว่าเมื่อเอา Zn^{2+} ออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้มีการเปลี่ยนโครงรูป (conformation) ของโมเลกุลเพียงเล็กน้อย ดังนั้น Zn^{2+} จึงไม่น่ามีความสำคัญต่อความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ (Weaver และคณะ, 1978) การศึกษาถึงความสำคัญของ Zn^{2+} ในนิวทรัลโปรตีเอสต่อปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์ โดยใช้สารดีเลตติ้ง เช่น EDTA ดึง Zn^{2+} ออกจากโมเลกุลเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี(inactivated)และเมื่อเติม Zn^{2+} เข้าไปใหม่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืน (reactivated) ประมาณ 40-80เปอร์เซ็นต์ แม้จะเติม Zn^{2+} จนถึงปริมาณที่มากเกินพอ (D.tsuru และคณะ, 1964) ปริมาณ Zn^{2+} ในโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส จาก *R.subtilis* NRRLB 3411, *B.thermoproteolyticus, B.subtilis var. amylosacchariticus* มี 1.4, 1.5 และ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ คือมี 1 หรือ 2 อะตอมสังกะสีต่อโมเลกุลเอนไซม์ (Keay & Wildi, 1970) นอกจากนี้ในโมเลกุลของนิวทรัลโปรตีเอสยังมีไอออนของแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ เช่น ในโมเลกุลของนิวทรัลโปรตีเอสจาก *B. amyloliquefaciens* และ *B . thermoproteolyticus* ประกอบด้วยแคลเซียม 2 และ 4 อะตอมต่อโมเลกุลเอนไซม์ ตามลำดับ (Ward, 1983)

รูปที่ 3.5 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ thermolysin (Natthew, 1977)
วงกลมสีเทา แสดงอะตอมของสังกะสี 1 อะตอมที่บริเวณเร่งของเอนไซม์
วงกลมสีดำ แสดงอะตอมของแคลเซียม 4 อะตอมในโมเลกุลของเอนไซม์

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีเอสชนิดอื่น ๆ ถ้าอินคิวเบตนิวทรัลโปรตีเอสจาก *B.subtilis* ที่ พีเอช 7 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะยังคงมีแอคติวิตีเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่จะสูญเสียแอคติวิตีไปถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออินคิว-

เบตที่ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่มีความเสถียร ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด คือ thermolysin จาก *B.thermoproteolyticus* โดยพบว่าเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Endo, 1965; ohta, 1966) ซึ่งการที่เอนไซม์สามารถทนร้อนได้ดีกว่านิวทรัลโปรตีเอสชนิดอื่นอาจเนื่องจาก thermolysin มีเปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนชนิดที่เป็นไฮโดรโฟบิดมากกว่าและมีแคลเซียมต่อโมเลกุลเอนไซม์มากกว่า (Anustrup, 1980) มีรายงานยืนยันว่า ca^{2+} ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ นอกจากทำให้เอนไซม์ทนร้อนได้ดีขึ้น ที่ความเข้มข้นของ ca^{2+} มากกว่า $2x10^{-3}$ โมลาร์ จะช่วยลดการเกิด autolysis ของเอนไซม์ได้ (Mcconn. 1964) นอกจากนี้ ca^{2+} ยังสามารถทำให้เอนไซม์ที่ถูก inactivated ด้วย EDTA มีแอคติวิตีกลับคืนได้มากขึ้น เมื่อ reactivate ด้วย Zn^{2+} (Tsuru และคณะ, 1966)

3.3.3 **สมบัติทางด้านเอนไซม์** (enzymic properties)

นิวทรัลโปรตีเอสเป็น metalloenzyme จึงถูกยับยั้งโดยสารพวกคีเลตติ้ง เช่น EDTA. o-phenanthroline, dithizone แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP.sulfhydryl reagent. soyhean trypsin inhibitor หรือ potato protease inhibitor Yasunoba และคณะ (1964) พบว่าเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยสารคีเลตติ้ง จะมีแอคติวิตีกลับคืน ประมาณ 38-82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม Zn^{2+}, Co^{2+} และ Mn^{2+} ในช่วงความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ โดยที่แอคติวิตีจะกลับคืนมากหรือน้อยขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของสารคีเลตติ้ง ช่วงเวลาของการ treat ด้วยสารยับยั้งแอคติวิตี และชนิดของไดวาเลนท์ เมทัลไอออน ที่ใช้ในการ reactivate เป็นต้น (Tsuru และคณะ, 1966)

ในแง่ความจำเพาะของปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ โดยเอนไซม์พบว่านิวทรัลโปรตีนเอสมีความจำเพาะต่อปลายด้าน n ของสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิค หรือ bulky amino acid เช่น กรดอะมิโนลิวซีน หรือกรดอะมิโนฟีนิลอลามีน แต่จากการศึกษาของ Matsubara และคณะ (1969) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ thermolysin ไม่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ที่ด้าน คาร์บอนิล ของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิค ที่ติดกับด้าน n ของกรดอะมิโนโปรลีน ผลการทดลองนี้มีการยืนยันในนิวทรัลโปรตีเอส จาก B.subtilis ในอีกรายงานหนึ่ง (Benson & yasunobu, 1968) ซึ่งแสดงว่าความจำเพาะของเอนไซม์ต่อกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคขึ้นกับกรดอะมิโนตัวถัดไปด้วย จากรายงานการศึกษาการตัดพันธะเปปไทด์ในสายอินซูลิน (insulin chain) โดยนิวทรัลโปรตีเอสจาก *B.sutilis* (Feder & Lewis, 1967; Morihara และคณะ, 1968; Tsuru และคณะ. 1967), *B.thermoproteolyticus* (Matsubara และคณะ, 1966; Morihara &

Tsuzuki, 1966), *B.megaterium*, (Millet & Acher, 1969) และ *A.oryzae* (Morihara และคณะ, 1968) พบว่ามีจุดที่ถูกตัดในสายอินซูลินเหมือนกัน คือ ที่ตำแหน่งระหว่าง his 5-leu 6, his 10-leu 11, ala 14-leu 15, try 16-leu 17, gly 23-phe 24 และ phe 24-phe 25 ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่าตำแหน่งที่ถูกตัดบนสายอินซูลิน คือ ปลายด้าน n ของกรดอะมิโนลิวซีน และฟีนิลอลานีนนั่นเอง และจากการศึกษาความจำเพาะกับสับสเตรทชนิดที่มีพันธะเอสเทอร์ พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ (Boyer, 1971)

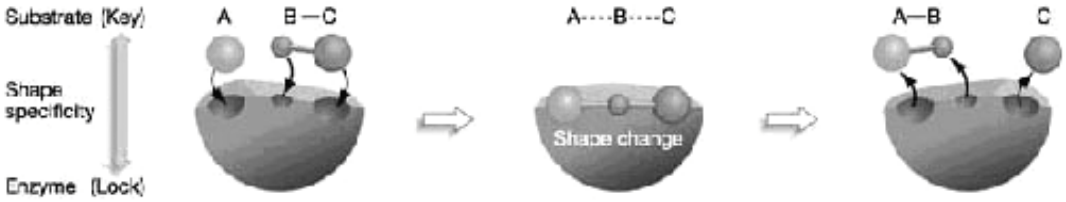
3.3.4 การทำงานของเอนไซม์

ในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ทุกอันจะเริ่มจากการจับตัวของสับสเตรทลงบนโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ ปฏิกิริยาที่ตามมาและได้รับการศึกษามากคือ acid base catalysis และการเกิดสารตัวกลางประเภทพันธะโควาเลนท์ (covalent intermediate) ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาในที่สุด เราอาจพิจารณาขั้นตอนดังกล่าวได้ดังนี้

3.3.4.1. การจับตัวของสับสเตรท (binding of substrates)

เอนไซม์จะทำงานได้ดีเพียงใดขึ้นกับความสามารถที่มันจะจับตัวกับสับสเตรทให้เป็นสารเชิงซ้อน เอนไซม์-สับสเตรท (enzyme-substrate complex) ได้ดีเพียงใด สับสเตรทจะเข้าไปในบริเวณของเอนไซม์ตรงส่วนที่เรียกว่าบริเวณเร่ง หรือ active site บริเวณนี้เมื่อเทียบกับปริมาตรของโมเลกุลเอนไซม์ทั้งหมดแล้วจะมีขนาดเล็กมาก มักมีลักษณะเป็นร่อง (clefts หรือ crevices) ซึ่งเกิดขึ้นจากการม้วนตัวของสายเปปไทด์ของเอนไซม์ บ่อยครั้งที่เราพบว่าในบริเวณนี้จะมีสมบัติเป็น แบบไม่มีขั้ว (nonpolar) ซึ่งทำให้สับสเตรทจับตัวกับมันได้ดี ปฏิกิริยาที่เอนไซม์คะตาไลซ์จะเกิดในบริเวณนี้ต่อไป โมเลกุลของน้ำมักไม่อยู่ในบริเวณนี้ นอกจากที่จะเข้าไปร่วมในปฏิกิริยาเท่านั้น ในบางเอนไซม์เราพบกรดอะมิโนที่มีสมบัติเป็นแบบมีขั้ว (polar) ในบริเวณนี้ สมบัติอันนี้ของมันทำให้มันมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาเสมอ ๆ

ในปี 1890 Emil Fisher ได้สร้างสมมติฐาน lock and key อธิบายลักษณะการสวมกันเข้าได้พอดีของสับสเตรทและบริเวณเร่งของเอนไซม์ (complement) เสมือนลูกกุญแจกับแม่กุญแจ ดังรูปที่ 3.6 และ 3.7



รูปที่ 3.6 ลักษณะการสวมกันเข้าได้พอดีของสับสเตรทและบริเวณเร่งของเอนไซม์ (complement) เสมือนลูกกุญแจกับแม่กุญแจ

Chymotrypsin
จำเพาะต่อกรดอะมิโน
ที่เป็น non polar
ขนาดใหญ่

Trypsin
จำเพาะต่อ
Lys และ Arg

Elastase
จำเพาะต่อกรดอะมิโน
ขนาดเล็ก
ที่ไม่มีประจุ

รูปที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะต่อสับสเตรทต่อลักษณะของบริเวณเร่งของเอนไซม์

chymotrypsin, trypsin และ elastase เป็น proteolytic enzymes ที่มีกลไกการคะตาไลซ์ปฏิกิริยาเหมือนกัน แต่แตกต่างกันในความจำเพาะของสับสเตรท รูปที่ 3.7 จะสามารถอธิบายได้ว่า ทั้งนี้เพราะบริเวณเร่งของ chymotrypsin เป็นร่องขนาดใหญ่ที่มีสมบัติภายในเป็น nonpolar trypsin มีบริเวณเร่งลักษณะเช่นเดียวกัน แต่มีกรดอะมิโนประเภท acidic คือ asp สำหรับจับกับประจุบวกของ lys และ arg ของสับสเตรท ส่วน elastase บริเวณนี้จะถูกกั้นขวางไว้ด้วย val และ

thr กรดอะมิโนขนาดใหญ่จึงไม่สามารถเข้าไปได้ และไม่มี asp สำหรับจดจำกรดอะมิโนประเภท basic ของสับสเตรท proteolytic enzymes ทั้งสามจึงมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน

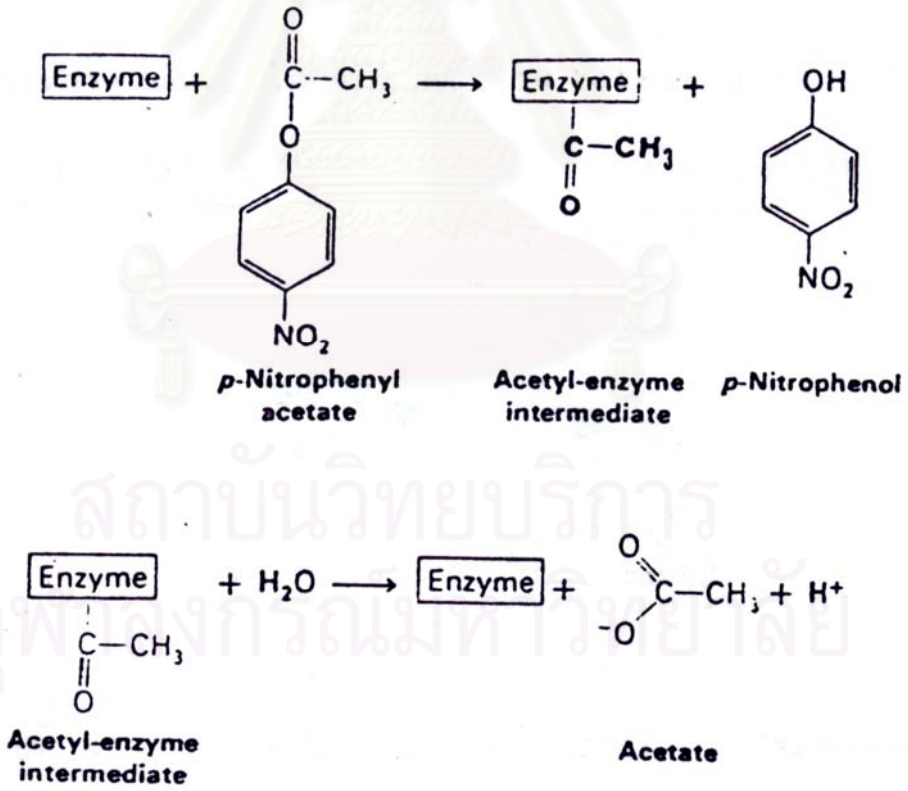
เมื่อสับสเตรทเข้าจับตัวกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งนี้ มันมักจะใช้พันธะที่มีแรงอ่อน ๆ ซึ่งมักมีพลังงานอิสระประมาณ -3 ถึง -12 กิโลแคลอรีต่อโมล เท่านั้น อันได้แก่ พันธะประเภท electrostatic, พันธะไฮโดรเจน, แรงวานเดอร์วาล (van der waal) และ hydrophobic เป็นต้น

3.3.4.2. การเปลี่ยนแปลง conformation ของเอนไซม์ และโครงรูปของสับสเตรท

ในการศึกษาสมบัติทางฟิลิกส์ของเอนไซม์ เช่น absorption spectra, fluorescence spectra, NMR spectra, และ x-ray crystallography รวมทั้งการศึกษาทางจลน์ศาสตร์ สนับสนุนว่าเมื่อเอนไซม์และสับสเตรทเข้าจับตัวกันนั้น เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation ของเอนไซม์ได้ในบางกรณี จุดประสงค์แรกของการเปลี่ยนแปลงนี้คือ หมู่ของกรดอะมิโนที่จะเข้าร่วมในการคะตะไลซ์ปฏิกิริยาจะถูกดึงให้เข้ามาอยู่ในทิศทางและตำแหน่งที่เหมาะสม โดยใช้พลังงานจำนวนหนึ่ง (binding energy) โมเดลนี้อาจเรียกได้อีกอย่างว่า induced fit เหตุผลที่สองคือการเปลี่ยน conformation อาจช่วยให้บริเวณเร่งนี้มีสภาพเป็นไฮโดรโฟบิคมากขึ้น (hydrophobic pocket) เพื่อทำให้พันธะหรือแรงระหว่างเอนไซม์-สับสเตรทมากยิ่งขึ้น เหตุผลอีกประการคือเพื่อให้ทุกส่วนของโมเลกุลของเอนไซม์ได้มีส่วนเข้าร่วมในคะตาลิซิส ทั้งนี้มีการทดลองมากมายที่สนับสนุนความคิดว่าทุกส่วนของโมเลกุลของเอนไซม์ต้องมีส่วนในการทำงานนี้ ปฏิกิริยาจึงจะดำเนินไปได้ดีที่สุด เช่น ถ้าทดลองตัดส่วนของเอนไซม์ตรงบริเวณที่ไม่ใช่บริเวณเร่งออก หรือเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณเหล่านั้น จะพบว่าแอคติวิตีหรือการทำงานของเอนไซม์ลดลง เปปไทด์สังเคราะห์ที่เหมือนบริเวณเร่งทุกประการก็ไม่สามารถคะตาไลซ์ปฏิกิริยาได้ดีเท่ากับโมเลกุลของเอนไซม์ ทั้งนี้พบว่าการสร้างหรือทำลายพันธะอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลง conformation จะสามารถลดพลังงานอิสระของการกระตุ้น (free energy of activation) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ ถึงแม้พันธะเหล่านี้จะมีแรงขนาดต่ำก็ตาม แต่เมื่อมีจำนวนของพันธะหลายอันเข้า ขนาดของแรงจึงมากพอที่จะทำงานต่อไปได้ และสับสเตรทเองก็อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ในขณะเข้าไปจับตัวกับบริเวณเร่งของเอนไซม์เช่นกัน

3.3.4.3. **วิธีคะตาลิซิสของเอนไซม์**

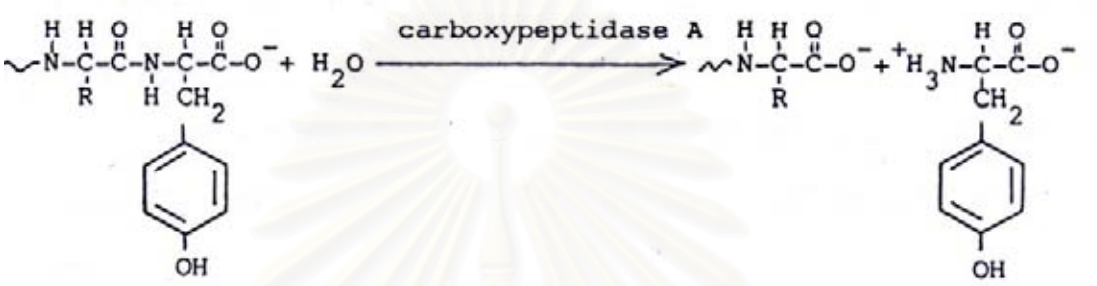
หลังจากสับสเตรทเข้าจับตัวกับเอนไซม์แล้ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างเอนไซม์-สับสเตรท ซึ่งส่วนมากมักเป็นประเภทที่มีการเคลื่อนย้าย-รับ-ส่ง โปรตอน (acid-base catalysis) ทั้งนี้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งที่เข้ามีส่วนร่วมในปฏิกิริยา มักจะเป็นพวก polar สามารถรับ-ส่งโปรตอนในขณะเกิดปฏิกิริยาได้ หรืออีกประเภทที่พบจากเอนไซม์คือ covalent catalysis หรือการที่ส่วนของสับสเตรทเข้าจับกับเอนไซม์โดยพันธะประเภทโควาเลนท์ เช่น chymotrypsin เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของเปปไทด์หรือเอสเทอร์ในสองขั้นตอนดังนี้ เมื่อศึกษาโดยใช้ p-nitrophenyl acetate เป็นสับสเตรทขั้นตอนแรก คือการสร้างสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรท จากรูปที่ 3.8 จะเห็นได้ว่าสารนี้ไม่ได้ใช้พันธะประเภทที่มีแรงอย่างอ่อน แต่ใช้พันธะโควาเลนท์จับหมู่อะเซทิลของสับสเตรทเข้ากับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ตัวที่หนึ่งคือ p-nitro phenol หลุดจากเอนไซม์ ขั้นที่ 2 เกิดปฏิกิริยา deacetylation บนเอนไซม์ เพื่อได้ผลิตภัณฑ์ตัวที่สองและเอนไซม์อิสระเข้าทำงานได้อีกครั้งหนึ่ง



รูปที่ 3.8 ขั้นตอน acylation และ deacylation บน chymotrypsin แสดง covalent catalysis

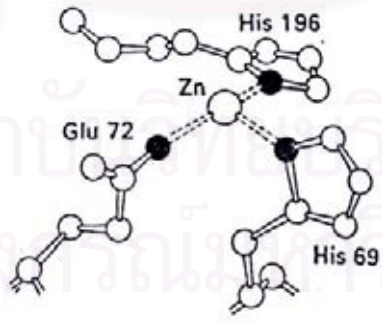
ขั้นตอนที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในเอนไซม์ต่างชนิดกัน ถึงแม้ปฏิกิริยาอาจแตกต่างกันบ้าง แต่ทุกชนิดจะมีขั้นตอนพื้นฐานใกล้เคียงกัน เพื่อจะทำให้เห็นภาพรวมของกลไกการทำงานของเอนไซม์ จะขอยกตัวอย่างของ carboxypeptidase A ไว้ ดังนี้

carboxypeptidase A เป็น proteolytic enzyme ที่ตัดเปปไทด์ทางปลายด้าน carboxyl โดยเฉพาะเมื่อปลายนี้มีกรดอะมิโนชนิด aromatic หรือ aliphatic ขนาดใหญ่ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 คะตาลิซิสบนเปปไทด์โดย carboxypeptidase A

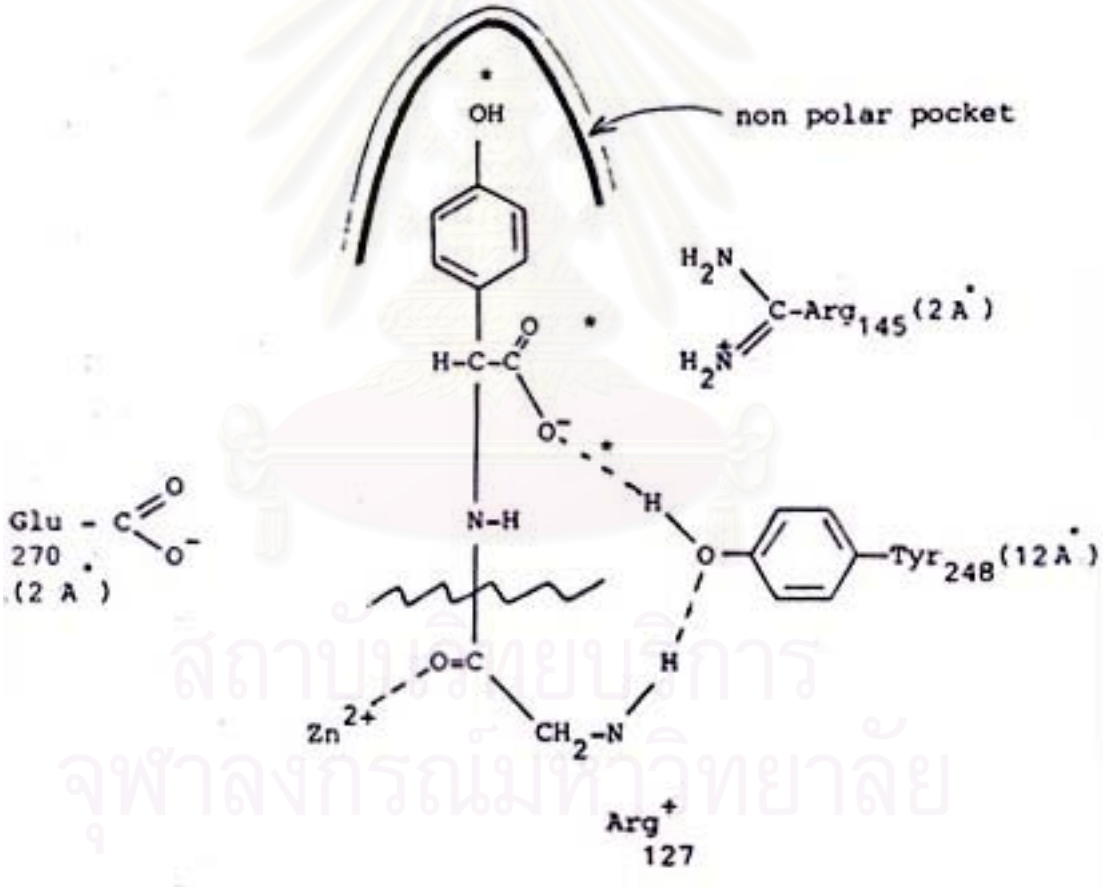
เอนไซม์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 307 ตัว มี Zn เป็น cofactor ที่สำคัญของปฏิกิริยา Zn ฝังตัวอยู่ในบริเวณแร่ง โดยจับตัวอยู่ในรูป tetrahedral กับกรดอะมิโน glu 72, his 69 และ his 196 ของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 การจับตัวของ Zn เข้ากับเอนไซม์ carboxypeptidase A

เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดได้เร็วมาก เพื่อจะสามารถติดตามได้ทัน เขานิยมศึกษาโดยใช้ glycyl-tyrosine เป็นสับสเตรท เพราะมันถูกไฮโดรไลซ์ได้ช้า induced fit เป็นปรากฏการณ์สำคัญของเอนไซม์ ในขณะที่สับสเตรทเข้าจับตัวกับเอนไซม์นั้น พบว่า arg 145, glu 270 เคลื่อนออกจาก

ตำแหน่งเดิมถึง 2 A และ tyr 248 เคลื่อนจากผิวหน้าของโมเลกุลลงไปภายใน เป็นระยะทางถึง 12 A ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับขนาดของโมเลกุล 50 x 42 x 38 x A การเคลื่อนที่นี้ทำให้ Zn สามารถแย่งที่น้ำ เข้าจับกับออกซิเจนบนหมู่คาร์บอนิลของสับสเตรทได้ และหมู่ tyrosine ของสับสเตรทก็สามารถไล่ที่น้ำออกจาก hydrophobic pocket และปิดบริเวณเร่งจากสภาพแวดล้อมภายนอกด้วย และที่สำคัญคือมันสามารถที่จะเรียกเอากรดอะมิโนหลักถึง 4 ตัว ซึ่งเดิมอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ กับบนเอนไซม์ เข้ามาอยู่ในบริเวณเดียวกัน แล้วสร้างพันธะที่กำหนดความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 3.11 อันได้แก่แรง hydrophobic ใน nonpolar pocket ที่จะเลือกกรดอะมิโนประเภท aromatic แรง electrostatic ระหว่าง arg 145 กับปลาย carboxyl ของสับสเตรท และพันธะไฮโดรเจน ระหว่าง tyr 248 กับปลาย carboxyl ของสับสเตรท เป็นตัวกำหนดความจำเพาะที่จะไฮโดรไลซ์เปปไทด์ทางปลายด้านนี้

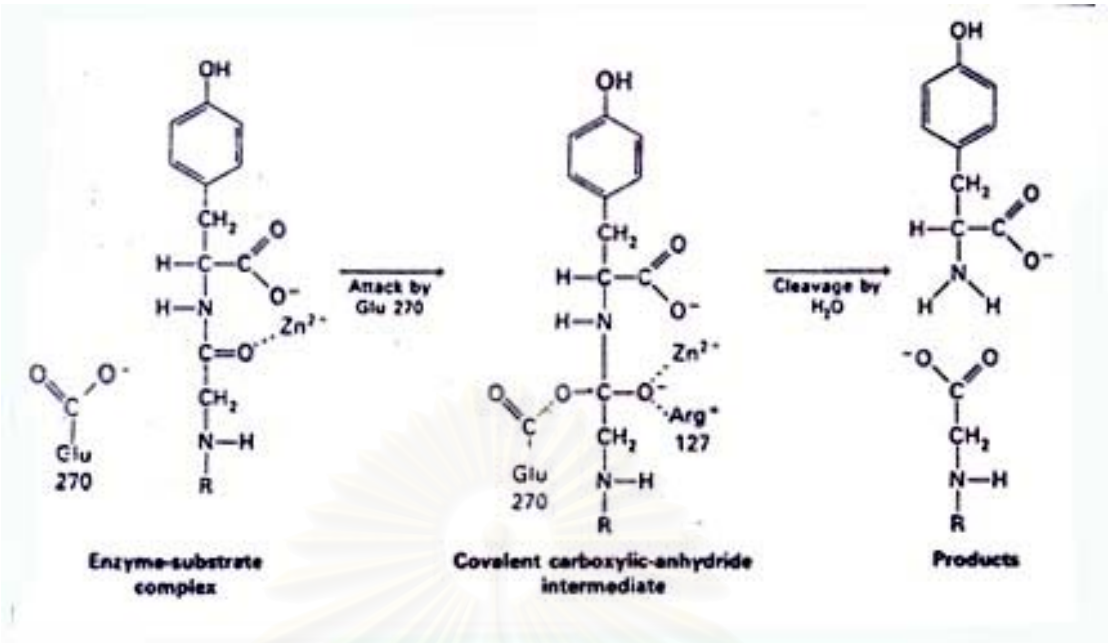


รูปที่ 3.11 การจับตัวของ glycyltyrosine กับบริเวณเร่งของ carboxypeptidase A.

* แสดงแรงที่เป็นตัวกำหนดความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท

เมื่อเอนไซม์-สับสเตรทเข้าจับตัวกันแล้วนั้น จะเกิดคะตาไลซิสต่อไป โดยใช้ Zn และ glu 270 และ arg 127 ซึ่งถูกเคลื่อนย้ายมาโดยการเปลี่ยน conformation ของเอนไซม์เช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.12 กลไกคะตาลิซิสของ carboxypeptidase A

จากรูปที่ 3.12 จะเห็นได้ว่ากลไกคะตาลิซิสเริ่มจาก Zn ในสภาพแวดล้อมที่เป็น non polar สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด dipole ขึ้นบนหมู่คาร์บอนิล ทำให้เกิดพันธะขึ้นระหว่างคาร์บอนในหมู่นี้กับหมู่คาร์บอคซิลของ glu 270 arg 127 เข้าช่วยตรึงออกซิเจนไว้ด้วยพันธะ electrostatic ขณะนี้จะได้สารตัวกลางสำคัญของปฏิกิริยาคือ carboxylic anhydride ซึ่งมีพันธะระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทเป็น covalent จะเห็นได้ว่าในขณะนี้เอนไซม์ และ Zn ได้ช่วยกันดึงอิเลคตรอนสับสเตรท ทำให้คาร์บอนและไนโตรเจนบนพันธะที่จะถูกไฮโดรไลซ์ถูกกระทำด้วยโมเลกุลของน้ำ (ที่จับกับ Zn) ได้ง่ายขึ้น จนเกิดไฮโดรลิซิสขึ้นในที่สุด ลักษณะเช่นนี้เราสามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้โดยทำให้เกิด electronic strain ขึ้นบนโมเลกุลของสับสเตรท ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยน conformation ของเอนไซม์ และการทำให้เกิด electronic strain (โดย covalent intermediate) เป็นกุลแจสำคัญของการทำงานของ carboxypeptidase A.

theromolysin เป็น proteolytic emzyme อีกตัวหนึ่งที่กลไกคะตาลิซิสของมันได้รับความสนใจ W.R.Kester และ B.W. Matthews ได้อธิบายการทำงานของมันจากการทดลองทาง crystallography โดยใช้ *-phenylpropionly-l-phenylalanine (BPPP) แทนสับสเตรทไว้ว่า กลไกการทำงานของเอนไซม์นี้คล้ายกับ carboxypeptidase A มาก รวมทั้งการใช้ Zn เป็น cofactor ความคล้ายคลึงกันของสิ่งสำคัญในคะตาลิซิส

3.4 ไขมัน

ไขมันเป็นลิปิดที่มีมากในธรรมชาติ เช่น ในผลไม้เปลือกแข็ง (nuts) ต่าง ๆ ในเมล็ด (seeds) และแหล่งเก็บสะสมไขมันของสัตว์ ไขมันอาจมีสถานะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่อุณหภูมิธรรมดาก็ได้ ขึ้นอยู่กับจุดลอมเหลวของไขมันนั้น ๆ ไขมันที่มีสภาวะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติเรียกว่า น้ำมัน เช่น น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cottonseed oil) เป็นต้น ดังนั้นคำว่า น้ำมัน จึงเป็นคำที่ใช้บอกสถานะของไขมันเท่านั้น ไม่ได้บอกให้ทราบถึงโครงสร้างของสารแต่อย่างใด

ไขมันเป็นเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมันเกิดขึ้นโดยหมู่ไฮดรอกวิลของกลีเซอรอลอาจเกิดเอสเทอร์กับกรดไขัน หนึ่ง สอง หรือสามหมู่ก็ได้ ถ้าหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลเกิดเอสเทอร์กับกรดไขัน 1 หมู่ เรียกว่า โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เกิด 2 หมู่เรียกว่า ไดกลีเซอไรด์ (diglyceide) และ 3 หมู่เรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ถ้าไดกลีเซอไรด์หรือไตรกลีเวอไรด์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกัน เรียกว่า กลีเซอไรด์ผสม (mixed glyceride) ซึ่งเป็นโครงสร้างของไขมันในธรรมชาติทั่วไป

การอ่านชื่อกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดเดียวกัน (simple glyceride) ให้อ่านโดยเปลี่ยนชื่อท้ายเสียงของกรดไขมันจาก -ic เป็น -in เช่น กลีเซอไรด์ประกอบด้วยกรดสเตียริค ก็อ่านว่า สเตียรินหรือไตรสเตียริน เป็นต้น

สำหรับการอ่านชื่อกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด หรือเป็นกลีเซอไรด์ผสมนั้น จะต้องอ่านกรดไขมันทีละชนิดและบอกด้วยว่ากรดไขมันนั้นเกิดจากเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลที่ตำแหน่งใดบ้าง กรดไขมันที่ผ่านก่อนจะต้องเปลี่ยนท้ายเสียงของกรดไขมันจาก -ic เป็น -o ส่วนกรดไขมันที่อ่านทีหลังสุดให้เปลี่ยนท้ายเสียงของกรดไขมันจาก -ic เป็น -o ส่วนกรดไขมันที่อ่านทีหลังสุดให้เปลี่ยนท้ายเสียงของกรดไขมันจาก ic เป็น -in เช่นเดียวกับตอนแรก เช่น กลีเซอไรด์ผสมประกอบด้วยกรดไขมัน 3 ชนิด คือ โอเลอิค สเตียริค และปาล์มิติค เกิดเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลที่ตำแหน่ง α, βและ α' หรือตำแหน่ง 1, 2, 3 ตามลำดับ อ่านชื่อได้ดังนี้ α-oleo α' - β palmitostearin หรือ β - stearo - α- α' oleopalmitin หรือ 2 - stearo - 1 : 3 eleopalmitin

3.4.1 สมบัติทั่วไปของไขมัน

เนื่องจากไขมันหรือกลีเซอไรด์ประกอบด้วยกลีเซอรอลกับกรดไขมัน บางทีจึงเรียกไขมันอีกอย่างหนึ่งว่า ไขมันเป็นกลาง (neutral fats) ก็ได้ โดยทั่วไปแล้วไขมันมีสมบัติดังนี้

3.4.1.1 สมบัติทางฟิสิกส์ สมบัติทางฟิสิกส์ของไขมันขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล และชนิดของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบ สมบัติทางฟิสิกส์ของไขมันแบ่งออกได้ดังนี้

3.4.1.1.1 สี กลิ่น รส ไขมันที่บริสุทธิ์ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรส และมีสมบัติเป็นกลาง เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้ถูกกับอากาศนาน ๆ จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากถูกออกซิไดซ์ ด้วยก๊าซออกซิเจน ทำให้ไขมันมีกลิ่นเหม็นหืน (rancid)

3.4.1.1.2 จุดหลอมเหลว จุดหลอมเหลวของไขมันขึ้นอยู่กับกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบ โดยทั่วไปแล้วไขมันจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าจุดหลอมเหลวของกรดไขมัน ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวจะมีจุดลอมเหลวสูงกว่าไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เมื่อมีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน เช่น ไตรปาล์มิติน (tripalmitin) มีจุดหลอมเหลวสูงกว่าไตรปาล์มิโตเลอิน (tripalmitolein) เป็นต้น

3.4.1.1.3 การละลาย ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น กรดบิวไทริค สามารถละลายได้ในน้ำ ถ้าไขมันประกอบด้วยกรดไขมันที่มีโมเลกุลใหญ่จะละลายน้ำไม่ได้ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายไขมัน ได้แก่ อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน ปิโตเลียม อีเธอร์ และละลายได้บ้างเล็กน้อยในเมธิลอัลกอฮอล์ เอธิลอัลกอฮอล์ และอะซิโตนที่เย็น แต่การละลายจะดีขึ้นเมื่อทำให้ร้อน ดังนั้นการสกัดไขมันหรือลิปิดจากเนื้อเยื่อจึงใช้วิธีต้มกับเอธิลอัลกอกฮอล์ ซึ่งถือว่าเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด

3.4.1.1.4 ความถ่วงจำเพาะ ไขมันมีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ ไขมันแข็งมีความถ่วงจำเพาะประมาณ 0.86 ส่วนไขมันเหลวจะมีความถ่วงจำเพาะประมาณ 0.92-0.94 เมื่อนำไขมันเหลวใส่ลงในน้ำจะลอยอยู่เหนือผิวน้ำและกระจายอย่างเท่าเทียมกัน

3.4.1.2 สมบัติทางเคมี สมบัติทางเคมีของไขมันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของไขมันนั้น เช่น ถ้าไขมันประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ไขมันก็จะแสดงสมบัติคล้ายกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว

เป็นต้น และเนื่องจากไขมันหรือกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเอสเทอร์ทั้งหลาย สมบัติทางเคมีของไขมันมีดังนี้

3.4.1.2.1 hydrolysis ไขมันจะถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยน้ำที่อุณหภูมิ และความดันสูง ๆ แต่ถ้าเติมตัวคะตะไลต์ เช่น กรดลงไป ไขมันจะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายขึ้น กล่าวคือนำไปต้มที่ความดันปกติก็สามารถไฮโดรไลซ์ได้ ผลจากการไฮโดรไลซ์ไขมันจะได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล การไฮโดรไลซ์กรดไขมันอาจทำได้โดยการใช้เอ็นไซม์ไลเปส (lipase) ซึ่งจะให้กรดไขมันกับกลีเซอรอลเช่นเดียวกัน

3.4.1.2.2 saponification เมื่อต้มไขมันกับด่างแก่ เช่น โซเดียมหรือโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์จะแตกสลายได้กลีเซอรอลกับเกลือของกรดไขมันหรือสบู่ (soaps) ดังสมการข้างล่างนี้ สบู่และกลีเซอรอลละลายได้ในน้ำ แยกสบู่ออกจากน้ำได้โดยการเติมเกลือจะทำให้สบู่ตกตะกอน การที่ไขมันทำปฏิกิริยากับด่างแล้วทำให้เกิดสบู่นี้ จากปริมาณของด่างที่ใช้สามารถคำนวณหาค่า saponification number ได้ ซึ่งหมายถึงจำนวนมิลลิกรัมของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับไขมัน 1 กรัม ค่านี้สามารถนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไขมันหรือไขมันได้ กล่าวคือไขมัน 1 โมล จะต้องใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3 โมล เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของโปตัส-เซียมไฮดรอกไซด์เป็น 56 ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของไขมันหาได้ดังนี้

$$\text{น้ำหนักโมเลกุลของไขมัน} = \frac{3 \times 56 \times 1000}{\text{Saponification number}} \qquad (3.4)$$

จะแสดงว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไขมันหรือกรดไขมันจะตรงข้ามกับค่า saponification number เสมอ แสดงว่าถ้าค่า saponification number ของไขมันใดมีค่าต่ำ ไขมันนั้นจะประกอบด้วยกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ถ้าค่า saponification number ของไขมันมีค่ามาก กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

3.4.1.2.3 acylation กลีเซอไรด์หรือไขมันที่กรดไขมันมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุล (hydroxylated fatty acids)

เมื่อให้กรดไดอะซีติคที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ จำนวนมิลลิกรัมของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดอะซีติคที่ได้จากการใช้ไขมัน 1 กรัม เรียกว่า acetyl number ซึ่งค่านี้จะบอกให้ทราบถึงปริมาณของกรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของกลีเซอไรด์ได้

3.4.1.2.4 hydrogenation ไขมันในธรรมชาติจะมีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอยู่บ้าง ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถเกิดปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนโดยมีนิคเกิลเป็นคะตะไลต์ได้กลีเวอไรด์อิ่มตัว ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้จะบอกให้ทราบว่าได้ว่า กลีเซอไรด์หรือกรดไขมันนั้นมีความไม่อิ่มตัวมากหรือน้อย

3.4.1.2.5 halogenation คลอรีน โบรมีน ไอโอดีน และไอโอดีนโบรไมด์ (IBr) สามารถเกิดปฏิกิริยาตรงพันธะคู่ของไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้เช่นเดียวกับไฮโดรเจน ซึ่งพันธะคู่ 1 พันธะจะใช้ฮาโลเจน 2 อะตอมเสมอ ทำให้ไขมันนั้นกลายเป็นไขมันอิ่มตัวได้ ไขมันโอเลอิน (olein) ลิโนเลอิน (linolin) และลิโนเลนิน (linolenin) จะใช้ฮาโลเจน 6, 12 และ 18 อะตอม แสดงว่าโมเลกุลของกรดโอเลอิคมีพันธะคู่ 1 พันธะ กรดลิโนเลอิค 2 พันธะ และกรดลิโนเลนิค 3 พันธะ และไขมันลิโนเลนินเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวมากที่สุด

เมื่อให้ไขมันทำปฏิกิริยากับไอโอดีน จำนวนกรัมของไอโอดีนที่เติมเข้าไปในไขมัน 100 กรัม เรียกว่า iodine number ซึ่งค่าใช้ประโยชน์ในการเปรียบเทียบความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ได้

3.4.1.2.6 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน กลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก ๆ สามารถเกิดปฏิกิริยายากับออกซิเจนหรือโอโซนได้ ปฏิกิริยาจะเกิดตรงพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้สารพวก เปอร์ออกไซด์ (peroxide) และโอโซไนด์ (ozonide) ตามลำดับ ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นอีกหลายชนิด เป็นผลให้ไขมันมีความเหนียว จึงใช้ประโยชน์ในการทำพวกทีทาและน้ำมันชักเงา (varnishes) เป็นต้น

3.4.1.2.7 ปฏิกิริยาของกลีเซอรอล กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบของไขมันและลิปิคอื่น ๆ อีกบางชนิด กลีเซอรอลมีรสหวาน ละลายได้ในน้ำและอัลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในอีเธอร์ คลอโรฟอร์มและเบนซีน เมื่อออกซิไดซ์ กลีเซอรอลด้วยไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ในสารละลายที่เป็นด่างและมีเกลือของเหล็กอยู่ด้วย จะได้กลีเซอริคอัลดีไฮด์และไดไฮดรอกซีอะซีโตนเกิดขึ้น ซึ่งเกิด

จากหมู่ไพรมารีและเซคันดารีอัลกอฮอล์ของกลีเซอรอลถูกออกซิไดซ์เป็นอัลดีไฮด์และคีโตนตามลำดับ

กลีเซอริคอัลดีไฮด์และไดไฮดอรกซีอะซีโตน เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟห์ลิงก์ (fehling) และสารละลายเบเนดิกต์ (benedict) จึงใช้ปฏิริยานี้ทดสอบหากลีเซอรอลได้

ปฏิกิริยาที่สำคัญของกลีเซอรอลอีกอย่างหนึ่งก็คือ สามารถทำปฏิกิริยากับ dehydrating agent เช่น $KHSO_4$ และ P_2O_5 เมื่อทำให้ร้อนจะได้สารที่มีกลิ่นเฉพาะตัวเรียกว่า cacrolein ซึ่งเป็นอัลดีไฮด์ไม่อิ่มตัว

3.4.1.2.8 การเหม็นหืน (rancidity) การเหม็นหืนของไขมันเกิดจากไขมันถูกออกซิไดซ์โดยอากาศ เนื่องจากไขมันมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นส่วนประกอบ การออกซิไดซ์จะเกิดตรงพันธะคู่ของกรดไขมันได้สารพวกเปอรอกไซด์แล้วจะสลายตัวไปเป็นสารประกอบอัลดีได์ที่มีกลิ่นและรสไม่ดี เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันเหล่านี้ ในทางการค้าจึงนิยมเติมสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันลงไปเรียกสารนี้ว่า antioxygen หรือ antioxidant เช่น ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

เคมีภัณฑ์ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 เคมีภัณฑ์

4.1.1. ผงเนื้อในเมล็ดมะขาม(TKP) ขนาด 200 mesh(75 ไมโครเมตร) ของบริษัท GM Ichihara.

4.1.2. โพลีแซคคาไรด์ของเมล็ดมะขาม(TSP) ของบริษัท GM Ichihara.

4.1.3. กรดซัลฟูริก(sulfuric acid) ของบริษัท Merck, Germany.

4.1.4. ฟีนอล(phenol) ของบริษัท Merck, Germany.

4.1.5. คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate , $CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท Carloerba, Italy.

4.1.6. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต(sodium potassium tartrate) ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

4.1.7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

4.1.8. โซเดียมคาร์บอเนต(sodium carbonate) ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.

4.1.9. โฟลินรีเอเจนท์(Folin – Ciocalteau reagent) ของบริษัท Merck, Germany.

4.1.10. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin : BSA) ของบริษัท Fluka , Switzerland.

4.1.11. เอโซเคซีน (Azocasein) ของ บริษัท Sigma, Germany

4.1.12. ไตรคลอโรอซิติกเอซิด (Trichloroacetic acid) ของบริษัท SR Lab Co.ltd

4.1.13. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) ของบริษัท SR Lab Co.ltd

4.1.14. แอบโซลูท เอทานอล (Absolute ethanol) ของบริษัท Carlo ERBA,Italy

4.1.15. โทลูอีน (Toluene) ของบริษัท Merck, Germany

4.1.16. น้ำกรอง

4.2 เอนไซม์

4.2.1 นิวเทรส (neutrase) ของบริษัท อีส เอเซียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน)

4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง

4.3.1. เครื่องปฏิกรณ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 12 เซนติเมตร มี baffle 4 อัน และใบพัดกวนขนาด 4 เซนติเมตร

4.3.2. อุปกรณ์ชุดกรองชนิดไหลผ่านตัวกรอง (Dead-end filtration) ประกอบด้วยเครื่อง กรองอะคริลิก ผ้ากรองซึ่งเป็นตัวกรอง ขนาด 15 ไมโครเมตร ภาชนะบรรจุสารป้อน

4.3.3. เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer / hot plate) รุ่น RCT basic ของบริษัท Ika labortechnik , Germany.

4.3.4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KUBOTA 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan.

4.3.5. เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW20ZM.n. ของบริษัท Ika labortechnik , Germany.

4.3.6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Julabo ของบริษัท Labartechnik GMBH, Germany.

4.3.7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA.

4.3.8. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digits balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

4.3.9. เครื่องวัดขนาดอนุภาค (particle size analyzer) รุ่น Coulter LS 230.

4.3.10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy , SEM) ของบริษัท Shimadzu , Japan.

4.3.11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH - 2 ของบริษัท OLYMPUS , Japan.

4.3.12. อุปกรณ์วัดไขมัน (Soxhlet apparatus)

4.3.13. เครื่องวัดความหนืด แบบหลอดแก้วแคปปิลารี (ออสวาว์ล) Size E, F และ G

4.4 วิธีการทดลอง

4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบ ขนาดของอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ด ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

เตรียมสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามในน้ำโดยนำผงเนื้อในเมล็ดมะขามซึ่งเป็นวัตถุดิบในการทดลองโดยได้รับจากบริษัท จี เอ็ม อิชิฮารา จำกัด ปริมาณ 2 กรัมละลายในน้ำปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร) ทำการกวนเพื่อให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามกระจายตัวในน้ำอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณต่างๆดังนี้

4.4.1.1. วิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (phenol-sulfuric method) โดยใช้โพลีแซคคาไรด์จากเมล็ดมะขาม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท จี เอ็ม อิชิฮารา จำกัด และมีชื่อทางการค้าว่า SOABIGUM หรือ TG 200 เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยนำสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามมาทำการเจือจางด้วยน้ำ 400 เท่า แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1959)

4.4.1.2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยนำสารแขวนลอยมาเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี

4.4.1.3. วัดขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยเครื่องวัดอนุภาค (particle size analyzer) รุ่น Coulter LS 230 โดยใช้ small volume module

4.4.1.4. วิเคราะห์ปริมาณไขมันของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม วิเคราะห์ปริมาณไขมันตามวิธี AOAC.920.39 โดยใช้วิธี soxhlet extraction ใช้ปริมาณของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจำนวน 2 กรัม

4.4.1.5. ดูลักษณะอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยนำผงเนื้อในเมล็ดมะขามมาย้อมสีด้วยสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า

4.4.1.6. ดูลักษณะพื้นผิวอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) กำลังขยาย 3000 เท่า

4.4.2 การทดลองเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และเวลาที่มีผลต่อความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

เตรียมสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามในน้ำ ที่ความเข้มข้น 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จำนวน 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร กวนสารแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเทลงในหลอดแก้วออสวาว์ลให้ได้ตามปริมาตรตามต้องการ แล้วปล่อยให้สารแขวนลอยไหลลงมาตามหลอดแก้ว จับเวลาการไหลของสารแขวนลอยตั้งแต่สารแขวนลอยเริ่มไหลจนถึงตำแหน่งที่กำหนดในหน่วยวินาที นำค่าเวลาที่บันทึกได้มาคำนวนค่าความหนืดของสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากนั้นทำการทดลองซ้ำแบบเดิมโดยเปลี่ยนความเร็วรอบเป็น 400 และ 600 รอบต่อนาที เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนแปลงเวลาในการกวนเป็น 60 นาที โดยทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 X 3 X 3 รวม 27 การทดลอง

4.4.3 การหาผลของพีเอช เอทานอล ความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

4.4.3.1 การทดลองเพื่อศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์โดยนำเอนไซม์จากบริษัทอีส เอเชียติก จำกัด (มหาชน) มาผสมในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.02 โมลาร์ในอัตราส่วนโดยปริมาตร 9 : 1 แล้วเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

นำเอนไซม์ที่ได้จากการเตรียมด้านบนมาวัดกิจกรรม โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับเสรทตามวิธีของ Raja และ คณะ ปี 1993 (ภาคผนวก ค) และเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ

สารละลายบัฟเฟอร์เป็น 5 6 7 8 9 และ10 ตามลำดับ โดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

4.4.3.2 การทดลองเพื่อศึกษาผลของการปั่นกวนต่อการทำงานของเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จำนวน 400 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร แล้วแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ส่วนที่หนึ่งไม่ปั่นกวน และอีก 3 ส่วนนำไปปั่นกวนในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการปั่นกวนเป็น 200 400 และ 600 รอบต่อนาทีตามลำดับ หลังจากนั้นนำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมตามวิธีของ Raja และ คณะ 1993 (ภาคผนวก ค) เพื่อดูกิจกรรมที่เหลือหลังจากกวนที่ความเร็วรอบต่างๆเทียบกับกรณีที่ไม่กวนตอนเริ่มต้น

4.4.3.3 การทดลองเพื่อศึกษาผลของเอทานอลต่อการทำงานของเอนไซม์

เตรียมสารละลายบัพเฟอร์ของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้มีปริมาณเอทานอลเป็นส่วนผสมในสัดส่วน 0 - 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วนำสารละลายนี้ใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Rajaและคณะ 1993 (ภาคผนวก ค)

4.4.4 การทดลองเพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

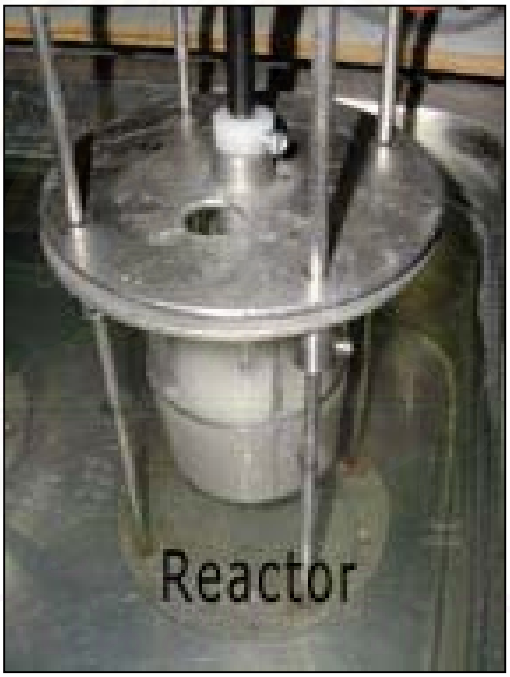
ในส่วนนี้จะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนคือ กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงพีเอช และกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงเวลา

4.4.3.1 กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงพีเอช

เตรียมสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามในน้ำความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จำนวน 1000 มิลลิลิตร แล้วแบ่งมาครั้งละ 100 มิลลิลิตร วัดพีเอชเริ่มต้น เทลงในเครื่องปฏิกรณ์ดังรูปที่ 4.1 ประกอบอุปกรณ์ดังรูปที่ 4.2 ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 45 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจำนวน 1 มิลลิลิตร กวนด้วยใบพัดกวนความเร็ว 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างก่อนกรอง แล้วนำมากรองด้วยชุดกรองดังรูปที่ 4.3 เก็บตัวอย่างส่วนที่

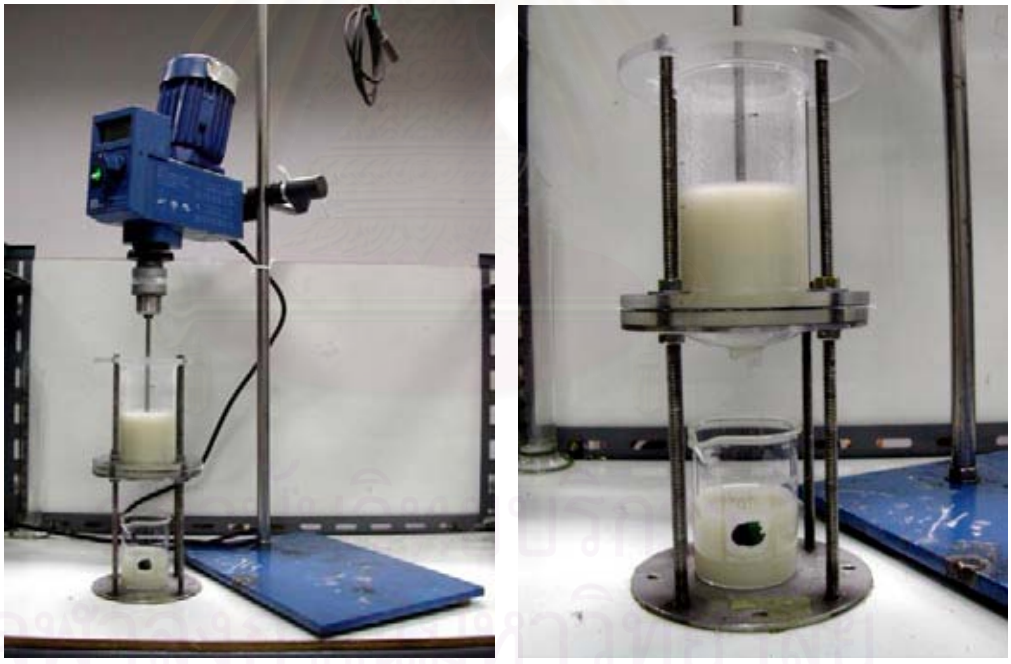
ผ่านผ้ากรองและวัดปริมาตร แล้วชะสารที่ติดบนตัวกรองด้วยน้ำจำนวน 100 มิลลิลิตร 2 ครั้งเก็บตัวอย่างและวัดปริมาตรทั้ง 2 ครั้ง และเก็บตัวอย่างสารที่ติดบนตัวกรอง นำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดขนาดอนุภาค วิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric method) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีลาวรี

หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำขั้นตอนเดิม แบ่งสารแขวนลอยผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้นที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตรมาปรับพีเอชเป็น 8 และ 10 ตามลำดับโดยเติมเอนไซม์ตามขั้นตอนข้างต้น แล้วทำการทดลองซ้ำโดยไม่เติมเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบกรณีใช้เอนไซม์ และไม่ใช้เอนไซม์



รูปที่ 4.1 เครื่องปฏิกรณ์

รูปที่ 4.2 ชุดการทดลอง



รูปที่ 4.3 ชุดอุปกรณ์ในการกรอง

4.4.3.1 กรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงเวลา

ทำการทดลองเช่นเดียวกับกรณีเปลี่ยนแปลงพีเอช แต่เปลี่ยนแปลงพีเอช 2 ค่า คือที่เริ่มต้นและที่พีเอชเป็น 8 แล้วเปลี่ยนแปลงเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1 3 5 10 และ15 นาที ทั้งกรณีที่ใช้เอนไซม์ และไม่ใช้เอนไซม์

4.4.5 การทดลองเพื่อศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ทำการทดลองเช่นเดิม โดยให้พีเอชเป็น 8 แล้วเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการกวนเป็น 200 400 และ 600 รอบต่อนาที

4.4.6 การทดลองเพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ทำการทดลองเช่นเดิม โดยให้พีเอชเป็น 8 แล้วเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.1 0.5 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเติมลงในถังปฏิกรณ์ 1 มิลลิลิตรเท่ากัน

4.4.7 การทดลองเพื่อศึกษาผลของเอทานอล ต่อการแยกโปรตีนและไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ทำการทดลองเช่นเดิม โดยให้พีเอชเป็น 8 แล้วเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของสารแขวนลอยทั้งหมด เพิ่มการวิเคราะห์ปริมาณไขมันเทียบกับกรณีที่ไม่มีการเติมเอทานอล และ ผงเนื้อในเมล็ดมะขามตั้งต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การวิเคราะห์

4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีลาวรี (Lawry's method)

สารเคมี

1. สารละลาย A คือร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate)
2. สารละลาย B คือร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมโปแตสเซียมทาร์-เทรต(sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C คือ 0.2 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(sodium hydroxide)
4. สารละลาย D คือร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)
5. Folin – Ciocalteau reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C จำนวน 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D จำนวน 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง
2. เจือจาง Folin – Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1 : 1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F
3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน(โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที
4. ใส่สารละลาย F จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดในข้อ 3
5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเอทานอลเป็น blank ทำตามขั้นตอน 3 – 6
7. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 0.05 – 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

   หมายเหตุ สารละลาย A , B , C และ D สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้

4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ตามวิธีฟีนอล – ซัลฟูริก (phenol – sulfuric method) (Dubois et.al., 1956)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. นำสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์(โดยมีปริมาณโพลีแซคคา-ไรด์อยู่ระหว่าง 10 – 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจำนวน 1 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
2. แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 483 นาโนเมตร(เป็นช่วงความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด) โดยใช้สารละลายเอทานอลเป็น blank
4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้โพลีแซคคาไรด์ของเมล็ดมะขามความเข้มข้นระหว่าง 10 – 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   <u>หมายเหตุ</u> สารที่เติมในข้อ 1 จะต้องเติมทันที

4.5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของโพรทีเอส (Raja และ คณะ 1993)

การหากิจกรรมของโปรติเอสเพื่อเป็นข้อมูล เบื้องต้น สำหรับพิจารณาปริมาณเอนไซม์ที่ต้องใช้ในการทดลอง โดยเริ่มต้นต้องหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมกับปริมาณสับเสรทมาตรฐาน ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ดังแสดงในภาคผนวก ค พบว่าควรใช้เอนไซม์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลาย KH_2PO_4 บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์

   ละลาย KH_2PO_4 บัฟเฟอร์ 6.05 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรด

ไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอลจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมเอโซเคซีน 1 กรัม เติม Absolute ethanol 2 มิลลิลิตร โทลูอีน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น คนจนเอโซเคซีนละลายจนหมด แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้น บรรจุในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. กรดไตรคลอโรอะซีติก 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมกรดไตรคลอโรอะซีติก 50 กรัม เติมน้ำกลั่น คนจนกรดละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร บรรจุขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. บ่มตัวอย่างเอนไซม์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจำนวน 0.1 มิลลิลิตรกับสารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์ต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย KH_2PO_4 บัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 0.9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นแช่ในอ่างน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส
3. หยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตร
4. นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
5. ดูดส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์

โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้งในหนึ่งชุดการทดลองและของกระบวนการทดลองตั้งแต่เตรียมระบบจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3 ชุดการทดลอง

ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้องทำหลอดควบคุมเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยใส่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตรลงไปก่อนแล้วจึงค่อยเติมตัวอย่าง, KH_2PO_4 บัฟเฟอร์ และสารละลายเอโซเคซีน 0.9 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำแช่ในอ่างน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน ดูดส่วนใสมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดตัวอย่าง คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากลบค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม (แสดงวิธีคำนวณ ดังภาคผนวก ค)

4.5.4 การวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค(particle size analyzer)

วิธีการใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (particle size analyzer)

1. เปิดโปรแกรม Coulter ที่เครื่องคอมพิวเตอร์ซึ่งต่อกับเครื่อง particle size analyzer
2. เปิดเครื่อง particle size analyzer อุ่นเครื่องไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง
3. นำเซล(cell) สำหรับวัดขนาดอนุภาคออกมาล้างด้วยน้ำ
4. เติมน้ำลงไปในเซลแล้วจึงนำเข้าเครื่องวัดขนาดอนุภาค
5. ที่เครื่องคอมพิวเตอร์ให้กดคำสั่ง run cycle(new sample) ที่ menu bar ของโปรแกรมรอจนกระทั่งหน้าจอแสดงข้อความว่า obscuration 0% Low , Add sample
6. เติมสารตัวอย่างลงในเซลจนกระทั่งเครื่องคอมพิวเตอร์อ่าน obscuration ได้ 8 – 12 % OK แล้วกด Done
7. ใส่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างที่ทำการวัดขนาดอนุภาค และเลือก fluid เป็นน้ำกด OK
8. สมการที่ใช้ในการวัดขนาดอนุภาค (model) ให้ใช้เป็น Fraunhaufer Model กด Done รอจนกระทั่งได้ผลของการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (particle distribution)

4.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet Extraction

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ จุดเดือด 40 – 60 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดสกัดที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator
2. แล้วจึงชั่งน้ำหนักขวดสกัด
3. ชั่งตัวอย่างแห้งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม แล้วห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
4. นำตัวอย่างที่ห่อแล้วไปใส่ใน thimble ซึ่งบรรจุอยู่ใน Soxhlet
5. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ซึ่งใช้เป็นตัวสกัด 80 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัดที่ทราบน้ำ-หนักแน่นอน และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 70 มิลลิลิตรลงใน Soxhlet
6. สกัดไขมันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยให้ความร้อนแก่ปิโตรเลียมอีเทอร์ด้วยเพลทให้ความร้อน
7. เมื่อครบ 3 ชั่วโมง นำสารที่ได้ในขวดสกัดมากลั่นปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากส่วน
8. ไขมันที่สกัดได้
9. อบขวดสกัดที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วนำขวดสกัดมาชั่ง
10. ปริมาณไขมันที่สกัดได้คือ ผลต่างของน้ำหนักของขวดสกัดก่อนและหลังการวัดปริมาณไขมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

5.1. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

5.1.1 การศึกษาส่วนประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขามซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท จีเอ็ม อิชิฮารา จำกัด พบว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น โพลีแซคคาไรด์ 68.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และส่วนที่ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน 17.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไขมัน 7.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารประกอบอื่นๆ 7.56 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 5.1

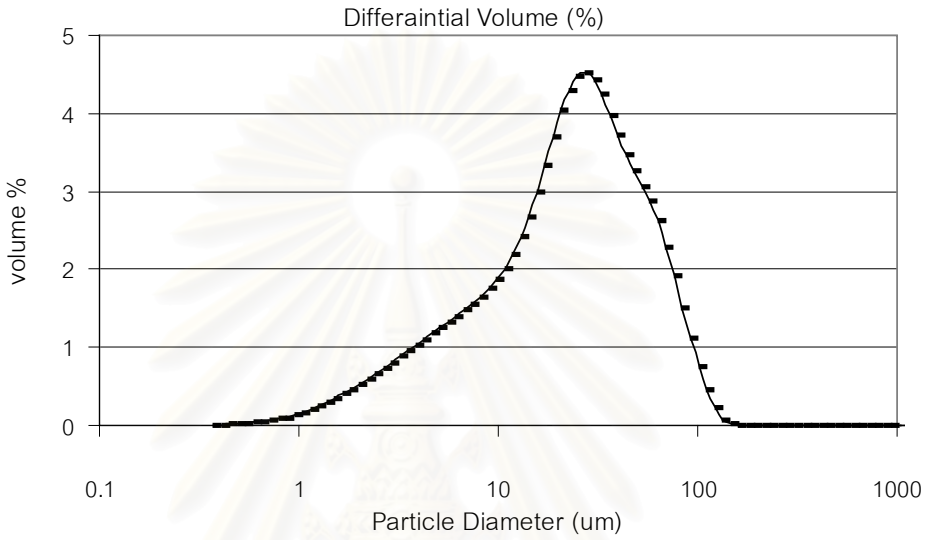
ตารางที่ 5.1 แสดงส่วนประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
โปรตีน	17.33
โพลีแซคคาไรด์	68.06
ไขมัน	7.05
อื่นๆ	7.56

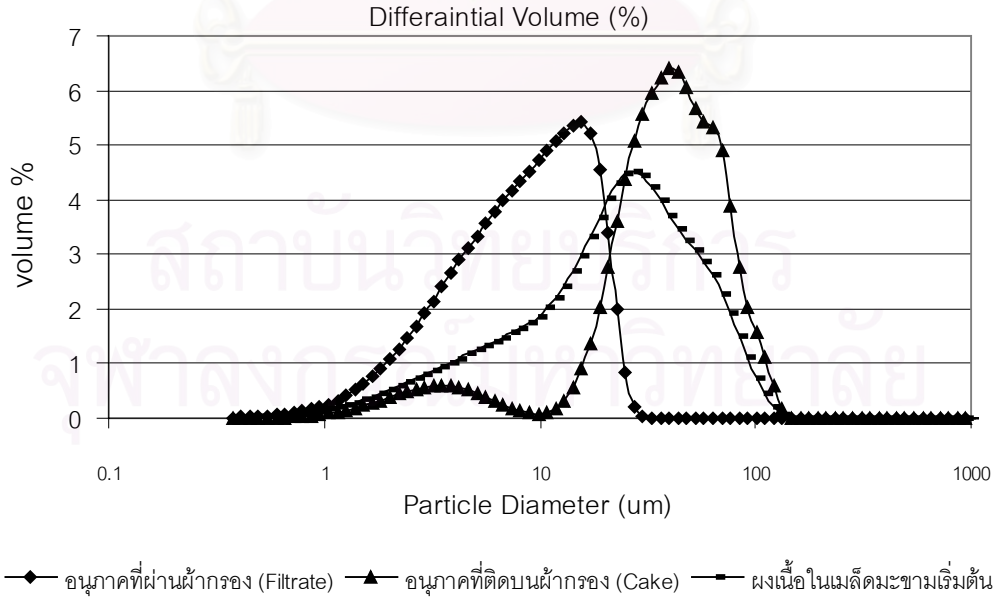
5.1.2 การศึกษาขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

จากการวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (particle size analyzer) พบว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 23.40 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 5.1 พบว่าสามารถแบ่งกราฟ ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่มีขนาดเล็กจะมีขนาดประมาณ 1 – 15 ไมโครเมตร มีสัดส่วนโดยปริมาตรรวม 23.61 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่สองมีขนาดประมาณ 15 – 100 ไมโครเมตรมีสัดส่วนโดยปริมาตรรวม 76.39 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนที่มีสัดส่วนโดยปริมาตรมากที่สุดมีขนาดประมาณ 34.58 ไมโครเมตร จากการทดลองแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยการกรองด้วยผ้ากรองขนาด 15 ไมโครเมตร แล้ววัดขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามก่อนกรอง อนุภาคที่

ผ่านผ้ากรอง อนุภาคที่ติดค้างบนผ้ากรองดังรูปที่ 5.2 และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและโพลี-แซคคาไรด์ จากส่วนที่ผ่านผ้ากรองจะพบว่าส่วนที่ผ่านผ้ากรองมีปริมาณโปรตีนเป็นส่วนมาก และมีโพลีแซคคาไรด์อนุภาคเล็กปนอยู่เล็กน้อย ทำให้สรุปได้ว่ากราฟแสดงขนาดอนุภาคส่วนที่มีขนาด 1 – 15 ไมโครเมตรส่วนใหญ่เป็นโปรตีน และส่วนที่มีอนุภาคใหญ่ประมาณ 15 – 100 ไมโครเมตร มีโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่

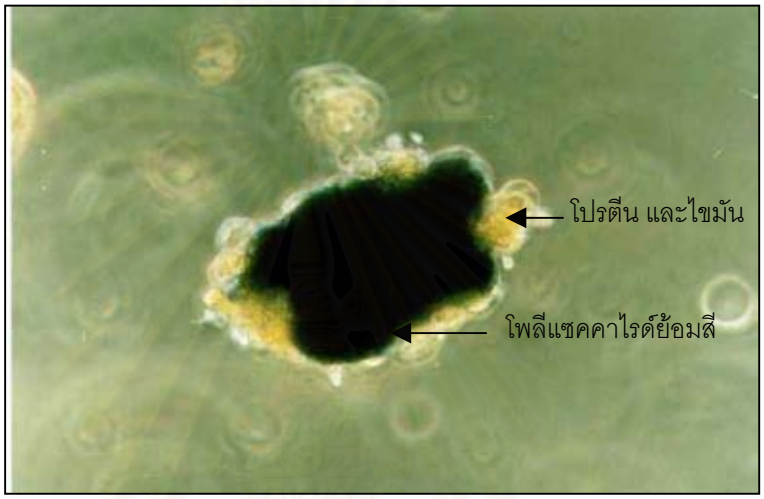


รูปที่ 5.1 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

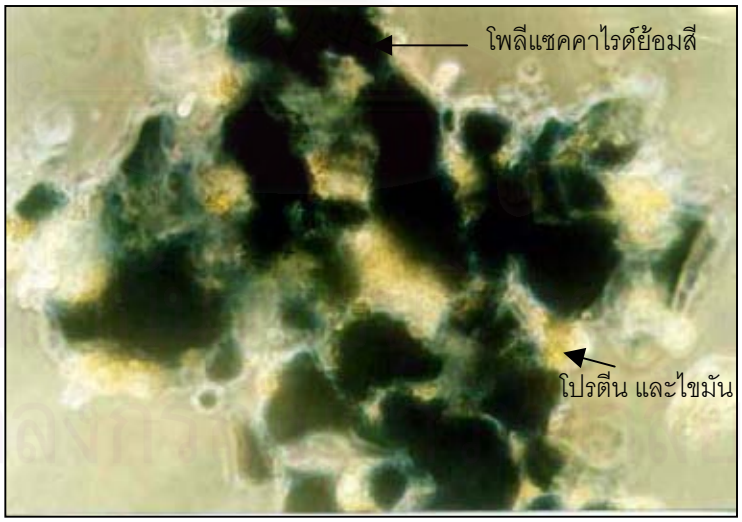


รูปที่ 5.2 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เริ่มต้น ผ่านผ้ากรอง และ ติดบนผ้ากรอง

จากการถ่ายภาพผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยกล้องจุลทรรศน์ และย้อมสีโพลีแซคคาไรด์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ทำให้เห็นลักษณะการรวมตัวกันระหว่างโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนดังรูปที่ 5.3 โดยโพลีแซคคาไรด์จะมีอนุภาคขนาดใหญ่กว่า และมีรูปร่างต่างๆ กันเช่น เป็นรูปทรงกลม และ แท่งสี่เหลี่ยม มีโปรตีนซึ่งมีอนุภาคเล็กและจะสังเกตเห็นเป็นอนุภาคสีเหลืองเกาะอยู่รอบๆ อนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ โดยโปรตีนจะเป็นตัวเชื่อมอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์แต่ละอนุภาคไว้ติดกัน จนรวมกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่



(ก)



(ข)

รูปที่ 5.3 ภาพถ่ายโพลีแซคคาไรด์ และโปรตีน ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ก) อนุภาคที่อยู่โดดเดี่ยว (ข) อนุภาคที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน

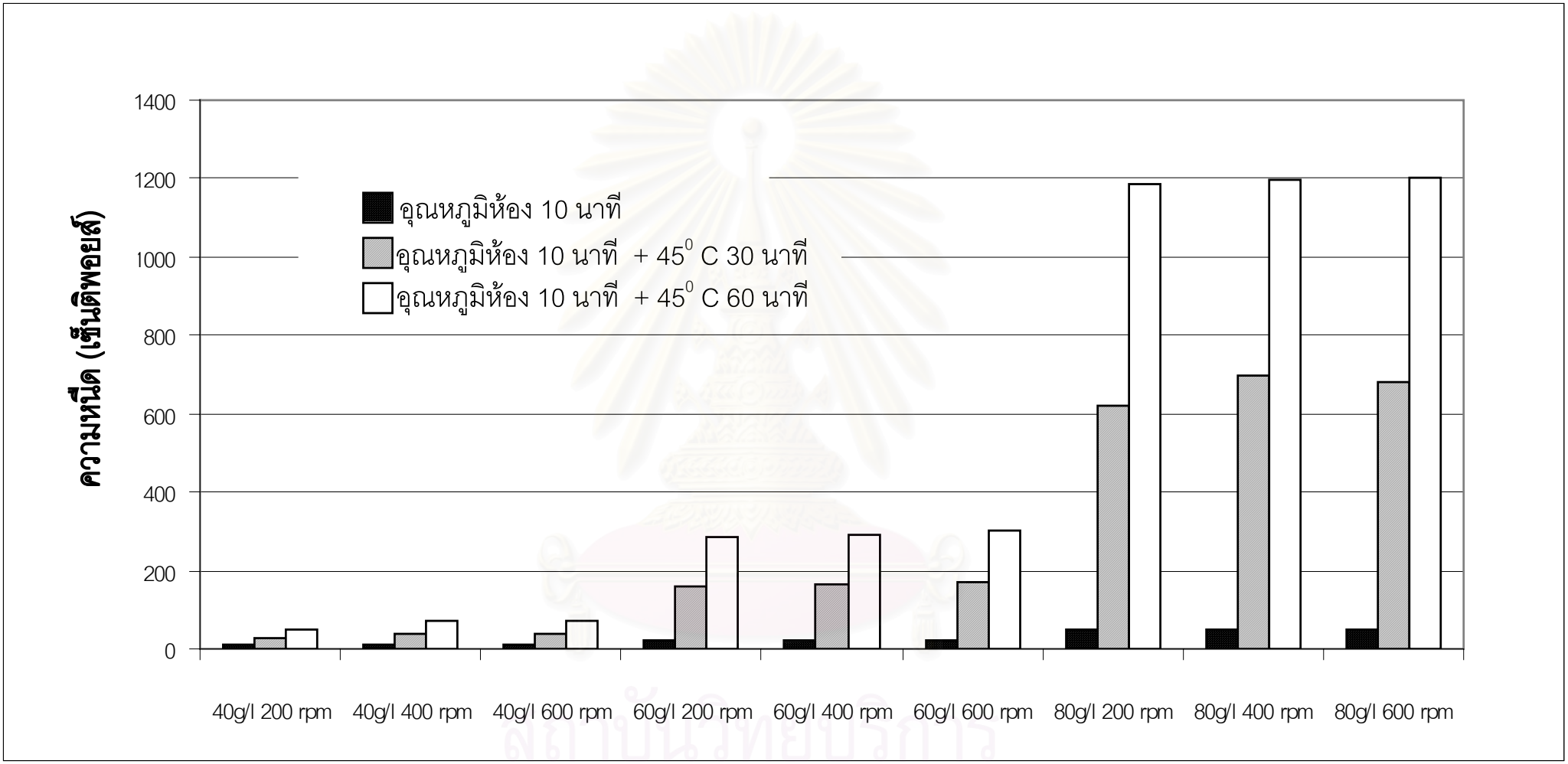
5.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และ เวลาที่มีผลต่อความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

เนื่องจากความหนืดมีผลต่ออัตราการกรองแยก และอัตราการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา ว่าตัวแปรใดมีผลต่อความหนืด

รูปที่ 5.4 ซึ่งแสดงผลของความเข้มข้น (40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร) ความเร็วรอบ (200 400 และ 600 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ (อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส) และ เวลาในการกวน (30 และ 60 นาที) ที่มีผลต่อความหนืดพบว่า ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม อุณหภูมิ และเวลา มีผลต่อความหนืดมากกว่าความเร็วรอบในการกวน กล่าวคือ ที่อุณหภูมิห้องความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส และกวน 30 นาที ความหนืดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และความหนืดจะเพิ่มขึ้นไปอีกเมื่อกวนนานขึ้น ในขณะที่ความเร็วรอบในการกวนของแต่ละสภาวะ ไม่มีผลต่อความหนืด ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า

ผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่มีความเข้มข้นมาก อนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น ทำให้มีพื้นที่ว่างในการเคลื่อนที่น้อย จึงมีอัตราการไหลช้า ส่งผลให้ความหนืดสูง การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดสูงขึ้นเช่นกันเนื่องจาก ที่อุณหภูมิสูงขึ้นอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะบวม มีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อคงที่อุณหภูมิสูง แล้วเพิ่มเวลาในการกวน ยิ่งทำให้อนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามบวมมากขึ้นอีก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

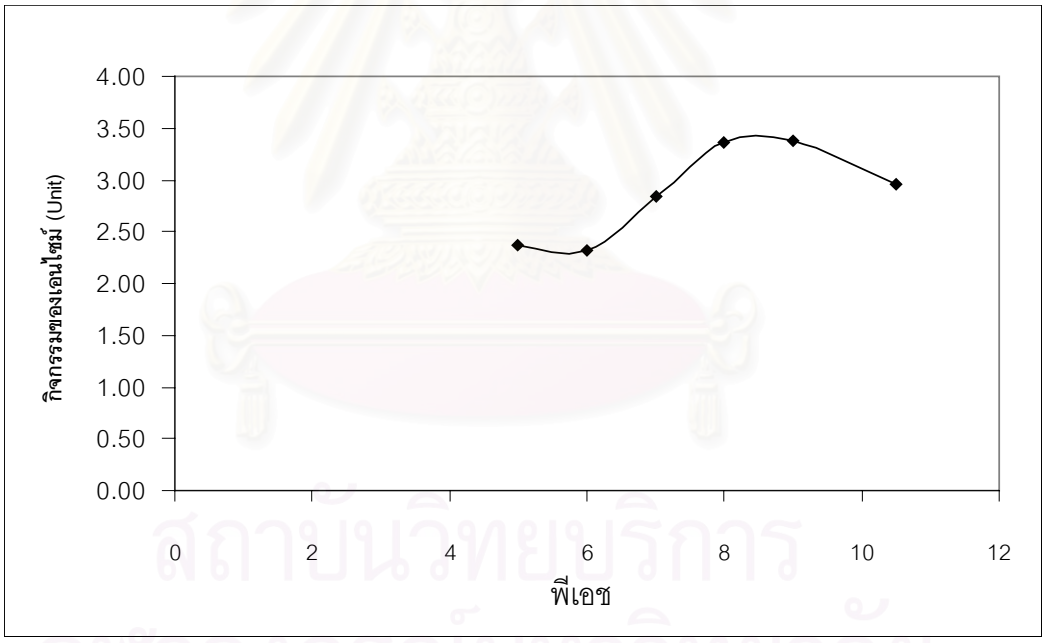


รูปที่ 5.4 ความหนืดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบในการกวน 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที

5.2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นิวเทรส

5.2.1 การศึกษาผลของพีเอช (pH) ที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด

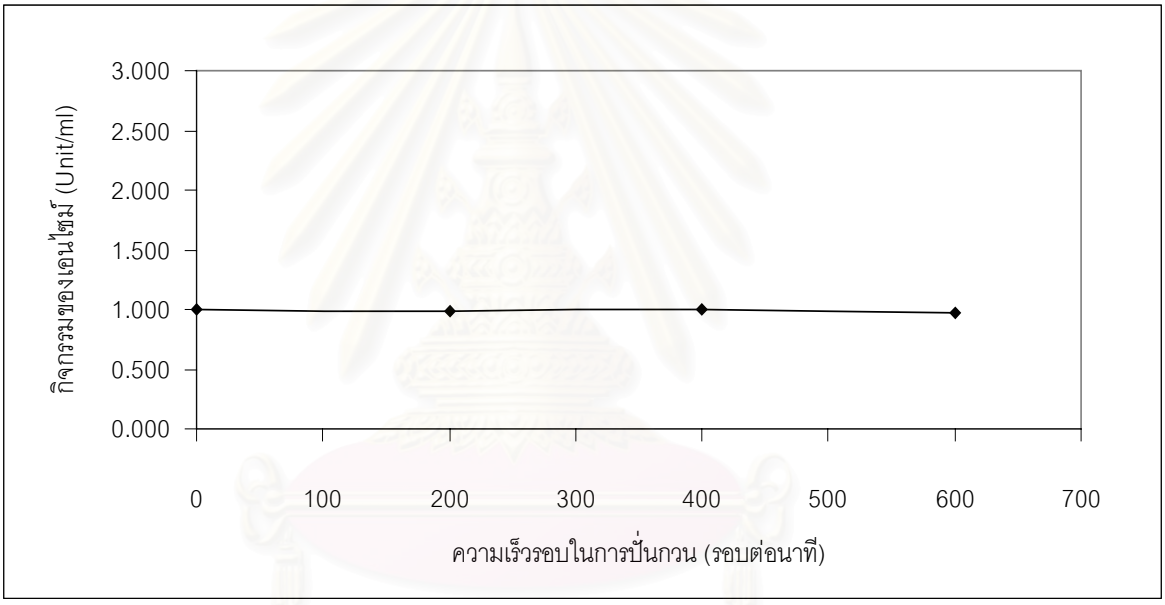
เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็นนิวทรัลโปรติเอส ที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง คือ 4 – 7.5 (ข้อมูลเบื้องต้นบริษัทอีส เอเซียติก ประเทศไทย จำกัด (มหาชน)) แต่เมื่อนำผงเนื้อในเมล็ดมะขามมาละลายน้ำจะให้พีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.5 – 6.9 และในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ต้องการทำให้โปรตีนละลายน้ำออกมาให้ได้มากที่สุด โปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามประกอบด้วยอัลบูมินซึ่งมี จุดไอโซอิเลคทริค ประมาณ 4 - 5 ดังนั้นจึงต้องการปรับพีเอชของสารละลายให้มีพีเอชสูงขึ้น เพื่อให้โปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามละลายออกมาได้มากขึ้น ดังนั้นในการวิจัยจึงทดลองเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายระหว่าง 5 – 11 เพื่อหาพีเอชที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมมากที่สุด จากรูปที่ 5.5 พบว่าที่พีเอช 8 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด



รูปที่ 5.5 กิจกรรมของเอนไซม์นิวเทรสที่พีเอชต่างๆ

5.2.2 การศึกษาผลของการปั่นกวนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เนื่องจากการปั่นกวนอาจมีผลทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ได้ เพราะการปั่นกวนแรงๆ เป็นเวลานานจะมีผลทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปไป ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของการปั่นกวนพบว่า การปั่นกวนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง เพราะเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีความแข็งแรง และเสถียรด้วยแคลเซียมไอออน ซึ่งมีรายงานยืนยันว่า Ca^{2+} ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ โดยช่วยให้ทนความร้อนได้ดีขึ้น ช่วยลดการเกิด autolysis และยังสามารถทำให้เอนไซม์ที่ inactivate มีแอคติวีตีกลับคืนได้มากขึ้น เมื่อ reactive ด้วย Zn^{2+} ดังที่กล่าวไว้ในทฤษฎีของเอนไซม์ (Tsuru และคณะ 1966)

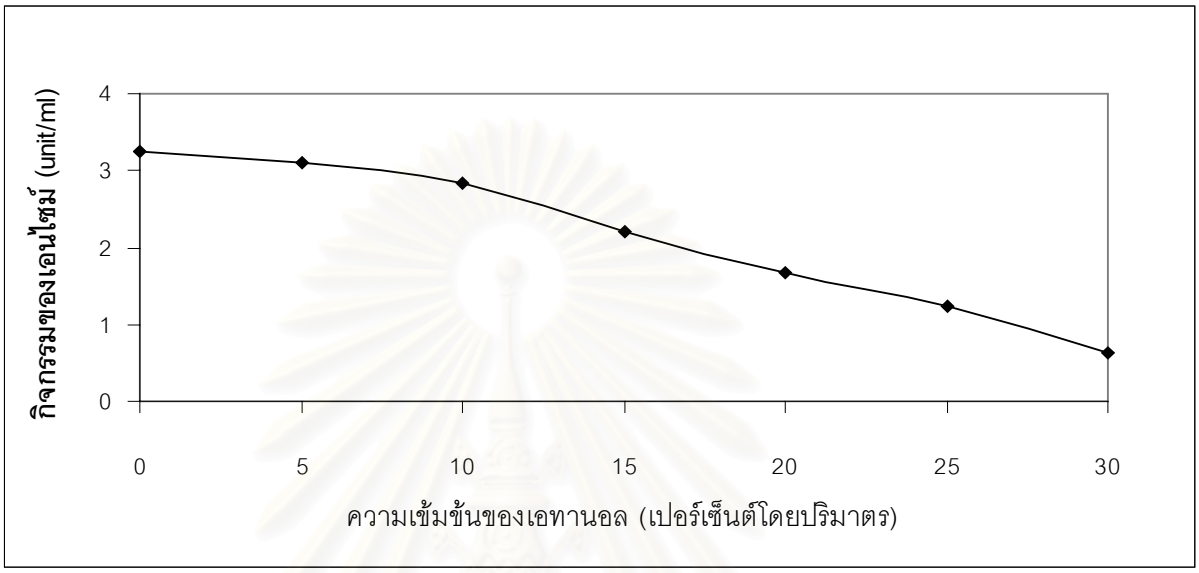


รูปที่ 5.6 ผลของการปั่นกวนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อปั่นกวนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาทีเมื่อใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท

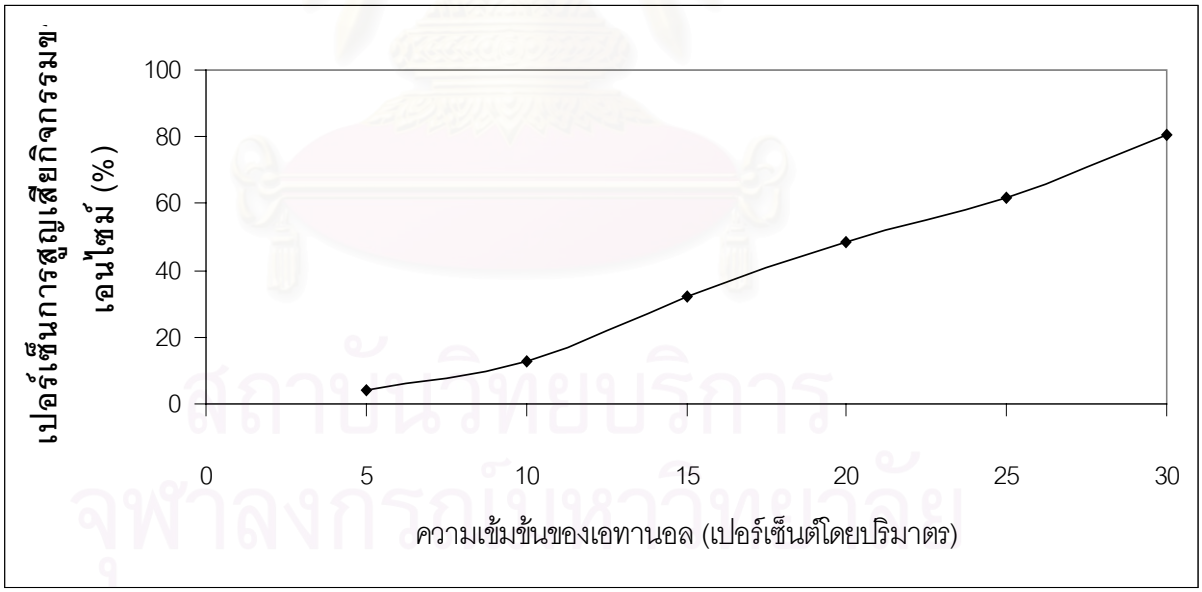
5.2.3 การศึกษาผลของการมีสารละลายเอทานอลร่วมในปฏิกิริยา ที่กระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากรูปที่ 5.7 จะพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลมีผลทำให้สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์มากขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้เพราะการเติมเอทานอลจะมีผลในการลดการละลายของโปรตีนและทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำตกตะกอน เพราะเอทานอลมีค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำจึงลดแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้าม พร้อมกับลดการแตกตัวของหมู่ R บนโปรตีนทำให้

ประจุสุทธิเข้าใกล้ศูนย์ (ประเสริฐ, 2525) หรือไปลดความเข้มข้นของน้ำ และไปแทนที่โมเลกุลที่รวมอยู่กับโปรตีน ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกาะกลุ่มกันและตกตะกอน มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้ดังเดิม



(ก)



(ข)

รูปที่5.7 ผลของเอทานอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง initial rate โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับเสตรท

(ก) กิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ต่างๆ

(ข) เปอร์เซ็นต์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

จากการศึกษาคุณสมบัติ ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ทำให้ทราบว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีส่วนประกอบของโปรตีนประมาณ 17.33 เปอร์เซ็นต์ และเกาะอยู่รอบๆ อนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโพลีแซคคาไรด์ โปรตีนเกาะกับโพลีแซคคาไรด์ด้วยแรงยึดเหนี่ยวเนื่องจากประจุไฟฟ้าสถิตแบบอ่อนๆและแรงวันเดอร์วาล (Imeson และคณะ, 1977)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์ในการทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์นิวเทรส จากข้อมูลจำเพาะของเอนไซม์ (ข้อมูลเบื้องต้นจากบริษัทอีสเอเชียติก จำกัด (มหาชน)) ระบุว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 – 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 – 7.5

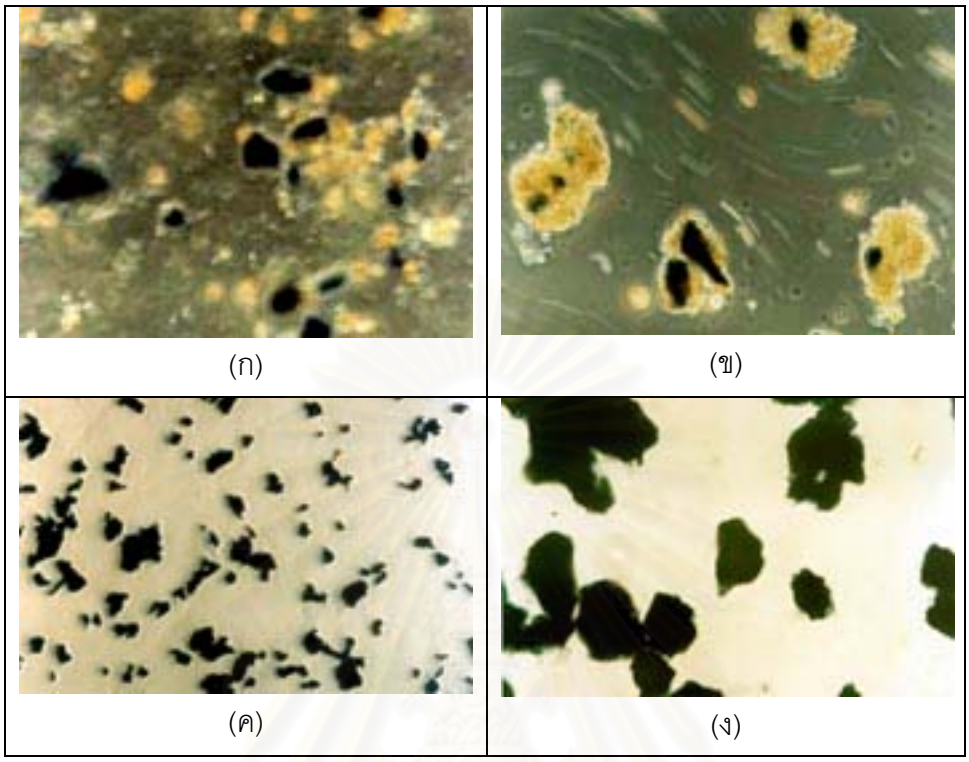
เนื่องจากเอนไซม์นิวเทรส ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 45 – 55 องศาเซลเซียส ดังนั้นจะเลือกใช้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เหตุที่เลือกอุณหภูมิต่ำสุดที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ ทั้งนี้เพราะการใช้อุณหภูมิสูง จะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีความหนืดเพิ่มขึ้นตามคุณสมบัติของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษ ของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ต่างจากสารอื่นๆ ที่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีความหนืดลดลง การที่ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีความหนืดเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการไหลของสาร ทำให้ไหลได้ช้าลงและทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ยากขึ้น เพราะอัตราการถ่ายเทมวลสารต่ำ และการเพิ่มอุณหภูมิยังมีผลทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามบวม หรือมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย นอกจากนี้อุณหภูมิสูงยังมีผลทำให้การละลายของโปรตีนลดลง ที่พีเอชเป็นกลาง (ดาวัลย์,2538)

การเลือกพีเอช ที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามนั้น นอกจากจะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ แล้วยังพบว่าที่พีเอชต่างๆ กันจะทำให้โปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามละลายออกมาได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามประกอบด้วยโปรตีน 4 ชนิดใหญ่ๆ คือ อัลบูมิน กลอบบูลิน กลูทิลิน และ โพลามีน ซึ่งมีจุดไอโซอีเลคทริค ต่างกันคืออัลบูมินและโกลบูลินมีจุดไอโซอีเลคทริคที่ 4.7 และ 5.1 ตามลำดับ (Chiyavat Chaiyasut and Takao Tsuda,2001) กลูทิลินสามารถละลายได้ในสารละลายทั้งที่มีพีเอชสูงจนถึงพีเอชต่ำ จุดไอโซอีเลคทริคอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ส่วนโพลามีนไม่สามารถ

ละลายน้ำได้ ดังนั้นพีเอชจึงเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีผลต่อการแยกโปรตีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ พีเอชเริ่มต้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามซึ่งมีค่าประมาณ 6.5 – 6.9 และที่พีเอชสูงขึ้น คือ 8 และ 10 เพื่อให้โปรตีนที่เกาะติดกับอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ ละลายออกมาได้มากขึ้น และสามารถกรองออกไปได้

ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่สำคัญ ในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยจากการศึกษาเรื่องความหนืดพบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จะทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อการไหล และมีอัตราการถ่ายเทมวลต่ำเกิดปฏิกิริยาได้ยาก ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และจากการศึกษาเกี่ยวกับการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ผ่านมา พบว่าการแยกโดยใช้ไฮโดรไซโคลน จะใช้ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามในช่วง 5 – 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Teraoka และคณะ 1990) การแยกโดยการกรองแบบหมุนและการกรองโดยใช้ใบกวาด ใช้ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ 20 กรัมต่อลิตร 40 กรัมต่อลิตร และ 60 กรัมต่อลิตร (กิตติพงษ์, 2544 และ วารี, 2543) และ การแยกโดยใช้เอนไซม์ diastase และปาเปนร่วมกันเพื่อย่อยโมเลกุลที่ไม่ต้องการออกให้หมด ใช้ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (พวงเพชร, 2522) ที่ความเข้มข้นต่ำ จะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีการกระจายตัวที่ดี ซึ่งในงานวิจัยนี้ต้องการให้เอนไซม์ไปย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง และแยกออกจากกันด้วยวิธีการกรอง ดังนั้นจะใช้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรหรือ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่การทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอนุภาคของโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ แต่เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่แยกออกมาได้ ทำให้ต้องแยกอนุภาคทั้งสองออกจากกันด้วยวิธีการกรอง จึงต้องศึกษาผลของการกรองต่อการแยก จากการศึกษาการกระจายตัวของผงเนื้อในเมล็ดมะขามข้างต้นดังแสดงในรูปที่ 5.1 พบว่า ที่ขนาดอนุภาคประมาณ 15 ไมโครเมตรจะมีสัดส่วนโดยปริมาตรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีสัดส่วนโดยปริมาตรรวมของอนุภาคขนาดเล็ก (1 – 15 ไมโครเมตร 23.61 เปอร์เซ็นต์) ใกล้เคียงกับสัดส่วนโดยน้ำหนักของโปรตีนและไขมันรวมกัน (ตารางที่ 5.1 24.38 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงเลือกผ้ากรองที่มีขนาด 15 ไมโครเมตร ในการทดลองขั้นต้นโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามแล้ว กรองแยกอนุภาคทั้งสองออกจากกันด้วยผ้ากรองขนาด 15 ไมโครเมตร จะได้ส่วนที่ผ่านผ้ากรองมีลักษณะดังรูปที่ 5.8 (ก) และ (ข) และส่วนที่ติดบนผ้ากรองมีลักษณะดังรูปที่ 5.8 (ค) และ (ง)



รูปที่ 5.8 ลักษณะภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

(ก)อนุภาคที่ผ่านผ้ากรอง กำลังขยาย 100 เท่า

(ข) อนุภาคที่ผ่านผ้ากรอง กำลังขยาย 400 เท่า

(ค) อนุภาคที่ติดบนผ้ากรอง กำลังขยาย 100 เท่า

(ง) อนุภาคที่ติดบนผ้ากรองกำลังขยาย 400 เท่า

จากรูป 5.8 พบว่าส่วนที่ผ่านผ้ากรองออกมาได้ ส่วนใหญ่เป็นอนุภาคของโปรตีน และมีโพลีแซคคาไรด์ขนาดเล็กปนออกมา ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าบางอนุภาคมีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับส่วนที่ติดอยู่บนผ้ากรอง เพราะ ขณะกรองจะมีการกวาดผิวหน้าผ้ากรองด้วยใบกวาด เพื่อกำจัดอนุภาคที่อุดตันบนผ้ากรอง ซึ่งจะทำให้อนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดรูพรุนของผ้ากรอง ถูกแรงดันให้หลุดลงไปรวมกับส่วนที่ผ่านผ้ากรองได้ และขณะที่อนุภาคนั้นถูกดันจนหลุดไปอยู่ใต้ผ้ากรองอาจรวมตัวกับอนุภาคที่อยู่ใกล้ๆ กันใต้ผ้ากรองนั้น จึงทำให้ขนาดอนุภาคในส่วนที่ผ่านผ้ากรองส่วนหนึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 15 ไมโครเมตรได้ สำหรับส่วนที่ติดอยู่บนผ้ากรองนั้นเมื่อใช้เอนไซม์จะมีเพียงอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์เท่านั้น

5.3.1 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช

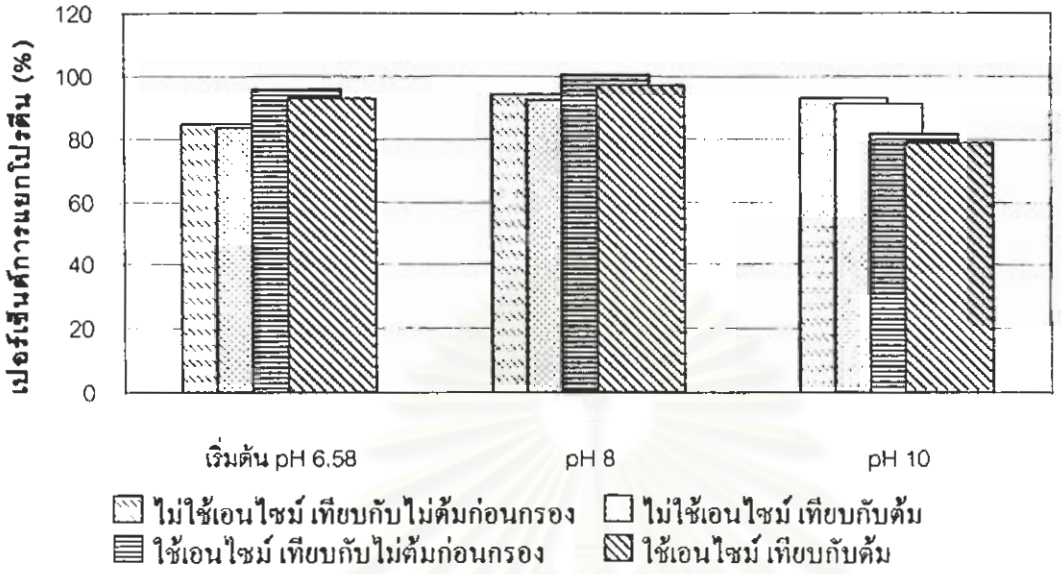
จากการทดลองเพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ ที่พีเอชต่างๆ โดยปรับพีเอชของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้นซึ่งมีพีเอช 6.58 เป็น 8 และ 10 ตามลำดับและทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส กวนที่ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนที่ผ่านผ้ากรอง ได้ผลดังตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.9 และผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ดังตารางที่ 5.3 และรูปที่ 5.10

ตารางที่ 5.2 ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์

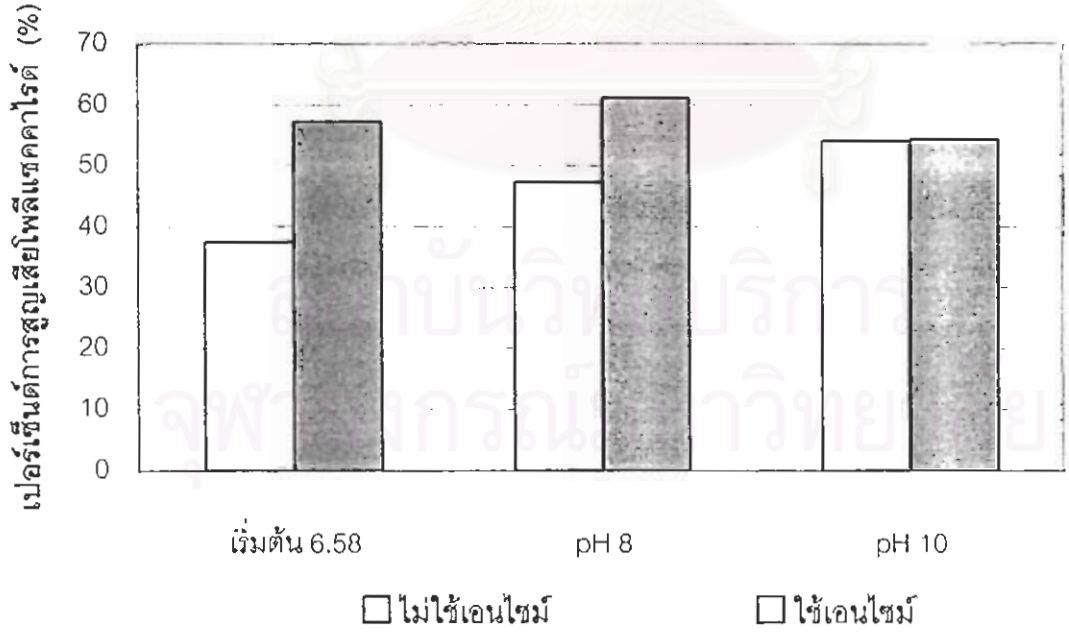
พีเอช	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน (เทียบกับไม่ต้มก่อนกรอง)		เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน (เทียบกับต้ม)	
	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์
เริ่มต้น 6.58	84.469	95.897	83.102	92.738
8	93.951	100.369	92.463	97.051
10	92.622	81.506	91.123	78.821

ตารางที่ 5.3 ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์สูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์

พีเอช	เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ (เทียบกับไม่ต้มก่อนกรอง)	
	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์
เริ่มต้น 6.58	37.51	58.706
8	47.26	58.267
10	54.02	56.899



รูปที่ 5.9 ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์



รูปที่ 5.10 ผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถอธิบายได้ดังนี้

5.3.1.1 กรณีไม่ใช้เอนไซม์

จากตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.9 เมื่อเปรียบเทียบกรณีที่ไม่ใช้เอนไซม์ ที่พีเอชต่างๆ พบว่า การปรับพีเอชเป็น 8 และ 10 จะแยกโปรตีนออกได้มากกว่ากรณีที่ไม่มีการปรับพีเอช (พีเอช 6.58) เพราะผงเนื้อในเมล็ดมะขามประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายที่พีเอชต่างๆ ไม่เท่ากันทำให้แยกโปรตีนออกได้ไม่เท่ากันซึ่งจากผลการทดลองที่พีเอช 8 โปรตีนจะจะละลายออกมาได้มากที่สุด

ผลของเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช กรณีที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้น ดังข้อมูลในตารางที่ 5.3 และรูปที่ 5.10 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการละลายของโปรตีนที่เกาะอยู่รอบๆ อนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ หรือเนื่องจากการกระจายตัวของผงเนื้อในเมล็ดมะขามซึ่งจะได้อธิบายต่อไป

นอกจากการละลายแล้ว การปรับพีเอชอาจมีผลต่อการกระจายตัวของอนุภาค จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยนำผงเนื้อในเมล็ดมะขามมาละลายน้ำความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอช ของสารแขวนลอยที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น (พีเอช 6.58) เป็น 8, 10 และ 12 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วถ่ายภาพลักษณะการแขวนลอยของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ดังแสดงในรูปที่ 5.11 พบว่าที่พีเอชสูงขึ้นจะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีสีเหลืองมากขึ้น มีกลิ่นของเบส และเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงดังแสดงในรูปที่ 5.12 พบว่าที่พีเอช 12 ผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะไม่ตกตะกอนลงมาหรือตกตะกอนช้ามาก ทั้งนี้เพราะเมื่อพีเอชสูงขึ้น สูงกว่าจุดไอโซอิเลคตริคของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีประจุรวมเป็นลบ และโพลีแซคคาไรด์ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยประจุลบในสารละลายเบสมีประจุเป็นลบเช่นกัน เมื่อมีประจุรวมเหมือนกันทำให้โมเลกุลทั้งสองผลักกันเกิดการกระจายตัวในผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพิ่มขึ้น (มนตรี,2542)

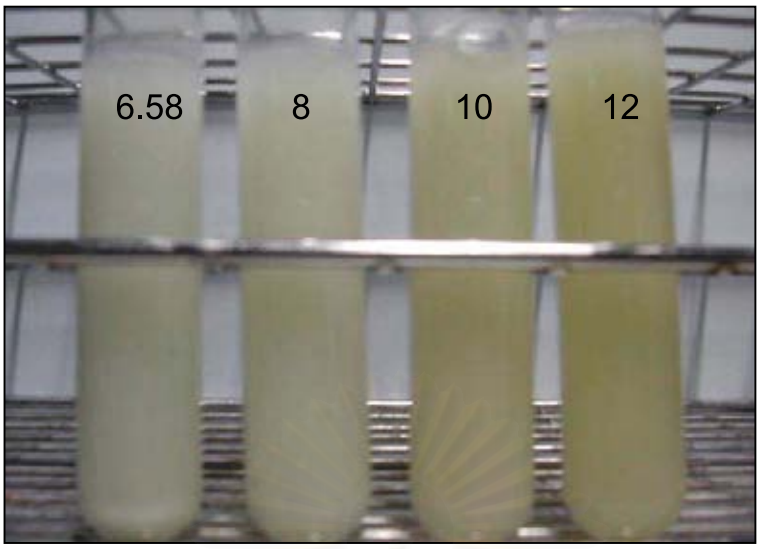
จากการศึกษาขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่พีเอชต่างๆ ตั้งแต่ที่เริ่มต้น จนถึงพีเอช 10 พบว่าที่พีเอชสูงขึ้นจะทำให้สัดส่วนอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ลดลงและสัดส่วนอนุภาคที่มีขนาดขนาดเล็กเพิ่มขึ้น และดังรูปที่ 5.13 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ดังตารางที่ 5.3 เมื่อไม่ใช้เอนไซม์ ซึ่งมากขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น อนุภาคมีขนาดเล็กลงเป็นผลเนื่องจากอนุภาคที่อยู่รวมกันเป็นอนุภาคใหญ่ กระจายตัวออกจาก

กันกลายเป็นอนุภาคอิสระ ซึ่งมีขนาดเล็กลง และผลจากการละลายที่ผิวสัมผัสของโปรตีน ที่พีเอช ต่างๆ

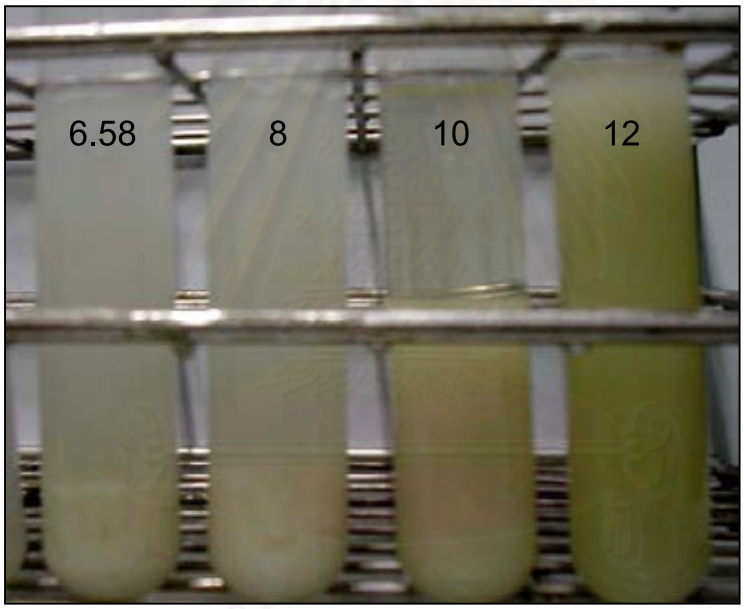
เมื่อพิจารณาลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามหลังจากแช่ในสารละลายเบส 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 5.14 พบว่าที่ผิวของอนุภาคโพลีแซคคาไรด์ยังคงมีอนุภาคของโปรตีนเกาะอยู่ แสดงว่าการปรับพีเอชอย่างเดียว ไม่ทำสามารถทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอนุภาคของโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ได้ แต่ช่วยให้อนุภาคกระจายตัวได้ดีขึ้น และเมื่อปรับพีเอชให้สูงขึ้นจะเห็นผิวของอนุภาคโพลีแซคคาไรด์จะเกลี้ยงเกลามากขึ้น

จากผลการปรับพีเอชที่พีเอชสูงๆ มีผลทำให้อนุภาคของโพลีแซคคาไรด์มีขนาดเล็กลง มีสีเหลืองและเป็นคอลลอยด์ไม่ตกตะกอน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามสูญเสียความคงตัวไป เนื่องจากเมื่อโพลีแซคคาไรด์อยู่ในสารละลายเบสอ่อน น้ำตาลกลูโคส ในโมเลกุลของโพลี-แซคคาไรด์ จะเปลี่ยนไปเป็นฟรุคโตส และแมนโนส ได้ หรือกลูโคส ฟรุคโตส และ แมนโนส จะเปลี่ยนโครงสร้างไปมาระหว่างกันได้ และในกรณีที่อยู่ในสารละลายที่เป็นเบสแก่ดังในกรณีนี้ซึ่งใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลายอย่าง ซึ่งจะทำลายความคงตัวของโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจากการศึกษาเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อความหนืดของโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม พบว่าที่พีเอชมากกว่า 8 จะทำให้ผลเนื้อในเมล็ดมะขามไม่คงตัว และในงานวิจัยของ Stanford ปี 1984 ได้ใช้สารละลายเบสแก่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในการทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีการกระจายตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีพีเอชประมาณ 13 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของพีเอชที่อธิบายไว้ข้างต้น นอกจากนี้ที่พีเอชสูงยังมีผลทำให้โพลีแซคคาไรด์มีความหนืดลดลงด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Sila Bhattacharcy และ S Bal , R.K. Mukhherjee ปี 1994 ซึ่งเนื่องจากอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์มีขนาดเล็กลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

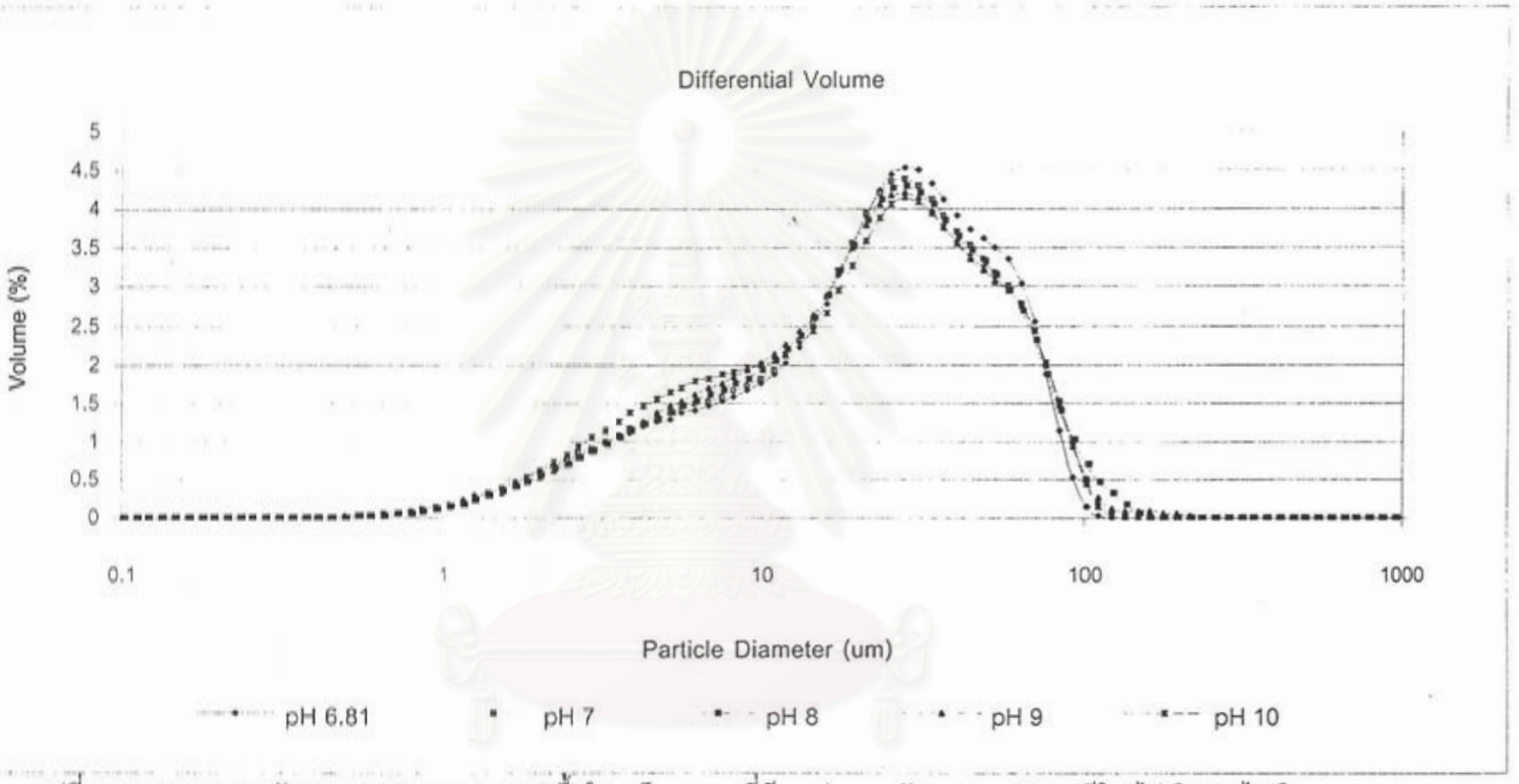


รูปที่ 5.11 ผงเนื้อในเมล็ดมะขามแขวนลอยในสารละลายพีเอช 6.58 8 10 และ 12



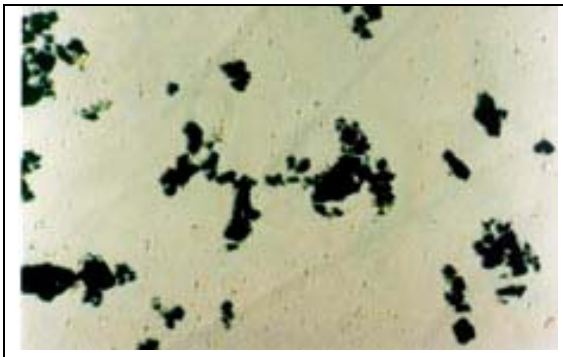
รูปที่ 5.12 ผงเนื้อในเมล็ดมะขามแขวนลอยในสารละลายพีเอช 6.58 8 10 และ 12 หลังจากตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

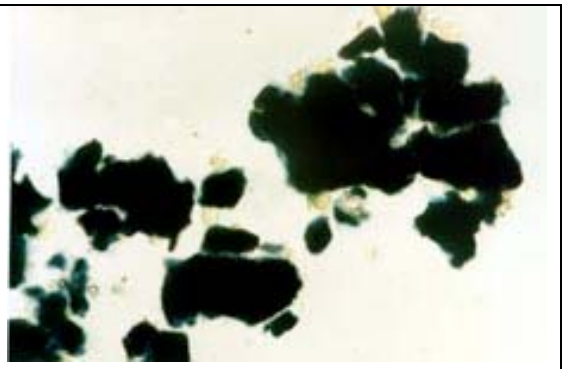


รูปที่ 5.13 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่พีเอชต่างๆ หลังจากกวน 20 นาทีโดยไม่เติมเอนไซม์

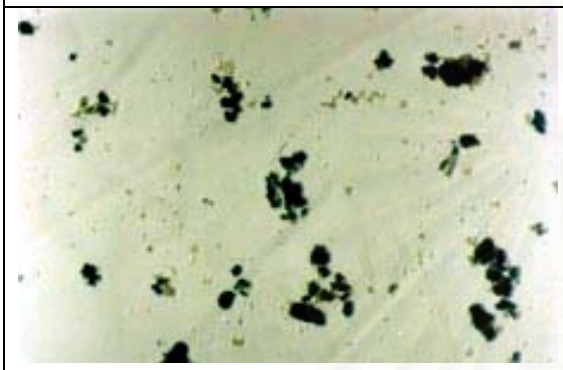
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



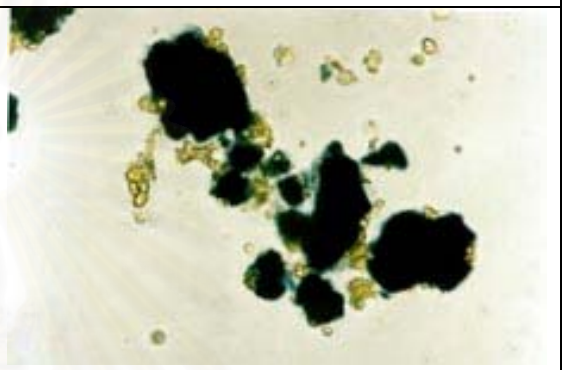
(ก) พีเอช 12 กำลังขยาย 100 เท่า



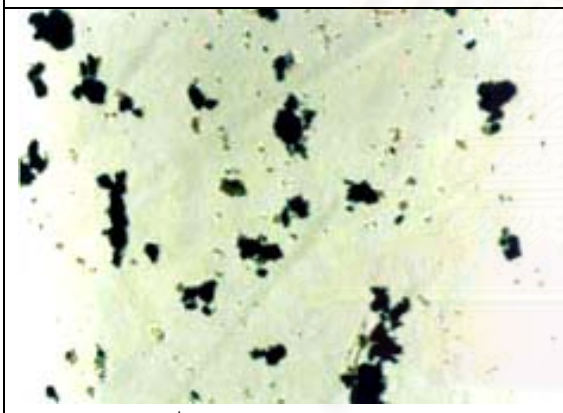
(ข) พีเอช 12 กำลังขยาย 400 เท่า



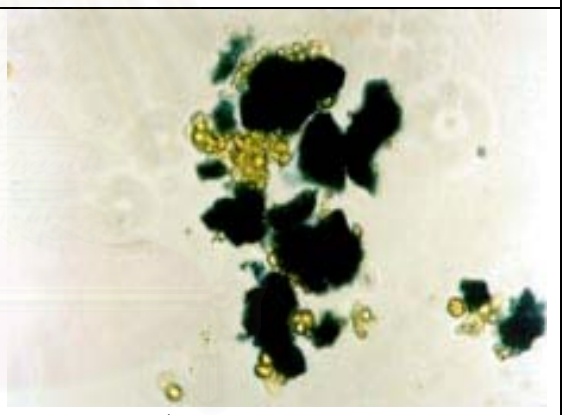
(ค) พีเอช 10 กำลังขยาย 100 เท่า



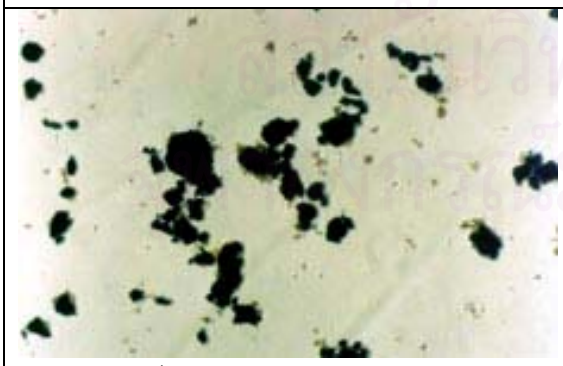
(ง) พีเอช 10 กำลังขยาย 400 เท่า



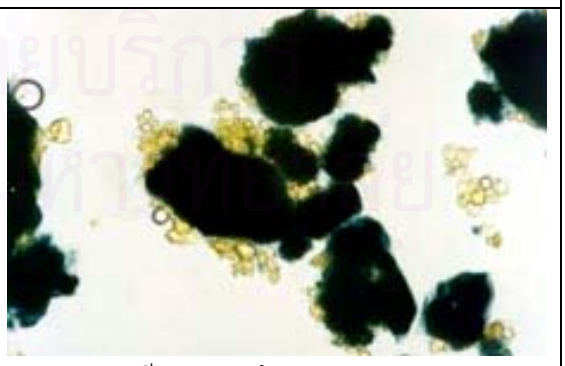
(จ) พีเอช 8 กำลังขยาย 100 เท่า



(ฉ) พีเอช 8 กำลังขยาย 400 เท่า



(ช) พีเอช 6.58 กำลังขยาย 100 เท่า



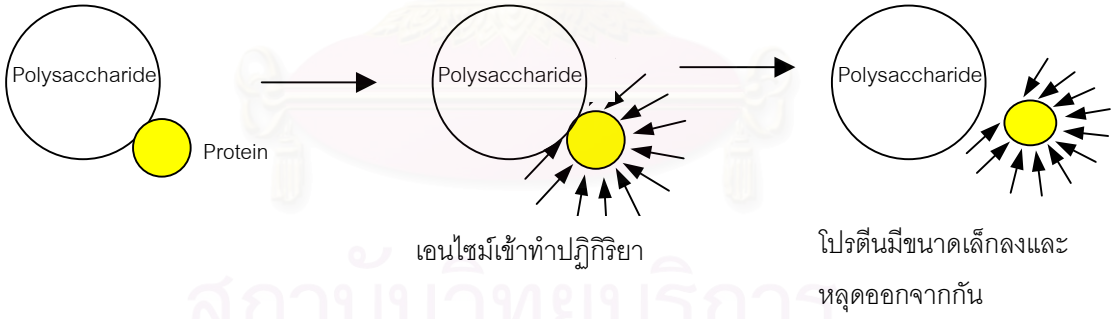
(ซ) พีเอช 6.58 กำลังขยาย 400 เท่า

รูปที่ 5.14 ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่แขวนลอยในสารละลายพีเอชต่างๆ โดยไม่เติมเอนไซม์

อ้างถึงตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.9 เมื่อเปรียบเทียบกรณีที่เติมเอนไซม์ และไม่เติมเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ พบว่าการเติมเอนไซม์จะทำให้แยกโปรตีนออกได้มากกว่ากรณีไม่เติมเอนไซม์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

5.3.1.2 กรณีที่ใช้เอนไซม์

จากตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.9 จะเห็นว่าการใช้เอนไซม์ โดยไม่ได้ปรับพีเอช และที่พีเอช 8 จะได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามมากกว่ากรณีที่ไม่ใช้เอนไซม์ทั้งนี้เนื่องจากในกรณีที่ใช้เอนไซม์ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนตรงบริเวณพื้นผิวของโปรตีนที่สัมผัสกับสารละลาย ได้กรดอะมิโนซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือโพลีเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็ก ในระหว่างการย่อยสลายจะทำให้อนุภาคของโปรตีนที่เกาะอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ มีขนาดเล็กลงและเมื่อบริเวณที่สัมผัสกับโพลีแซคคาไรด์ถูกย่อยสลาย จะทำให้โมเลกุลทั้งสองหลุดออกจากกันดังรูปที่ 5.15 ซึ่งมีลักษณะเดียวกับแบบจำลอง shrinking core ที่อธิบายโดย Octave Levenspiel (1999) โดยที่พีเอช 8 และใช้เอนไซม์จะได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนมากที่สุดคือ 97.051 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับต้ม และ 100.369 เปอร์เซ็นต์เทียบกับไม่ต้มก่อนกรอง เพราะที่พีเอชนี้เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ข้างต้น ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีที่สุด โดยที่สภาวะนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ 28.4 กรัมจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น 100 กรัม (แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ค)



รูปที่ 5.15 การย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์นิวเทรส ทำให้เกิดการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

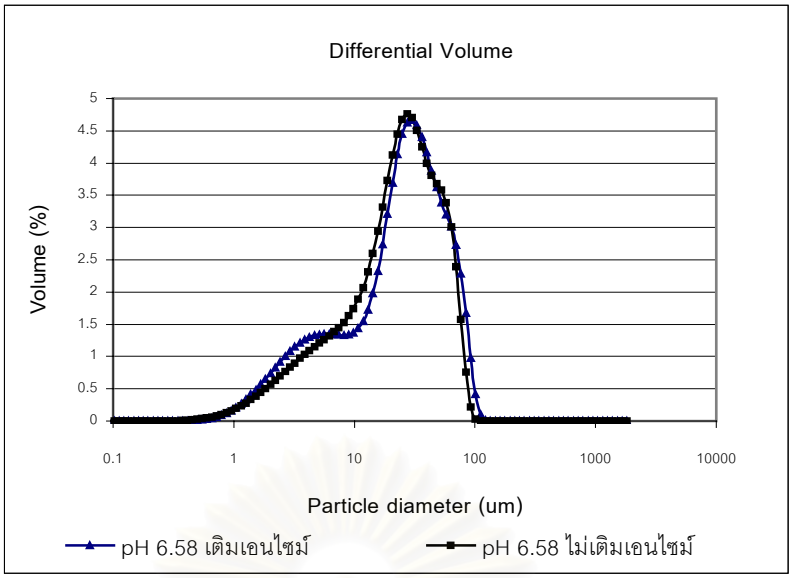
ที่พีเอช 10 จะพบว่าการใช้เอนไซม์จะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามลดลง เพราะที่พีเอชนี้เอนไซม์ได้สูญเสียกิจกรรมไปบางส่วนเนื่องจากที่พีเอชสูงๆ จะทำให้โครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์ถูกทำลายไป ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ และพบว่าการเติมเอนไซม์มีผลทำให้แยกโปรตีนออกได้ลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์รวมตัวกับโปรตีน ตก

ตะกอนลงมา ไม่สามารถกรองได้ หรือเนื่องจากการปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีพีเอชเป็น 10 ต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวนมาก จึงมีอะตอมของโซเดียมในสารแขวนลอยอยู่มาก อะตอมของโซเดียมที่มีประจุบวก จึงดึงดูดกับประจุลบของโปรตีนโมเลกุลเล็กๆ (จากเอนไซม์ และที่แขวนลอยอยู่ในลักษณะของคอลลอยด์) ซึ่งการมีเอนไซม์อยู่ด้วยอาจมีผลเร่งให้เกิดการรวมตัวกันเร็วขึ้น

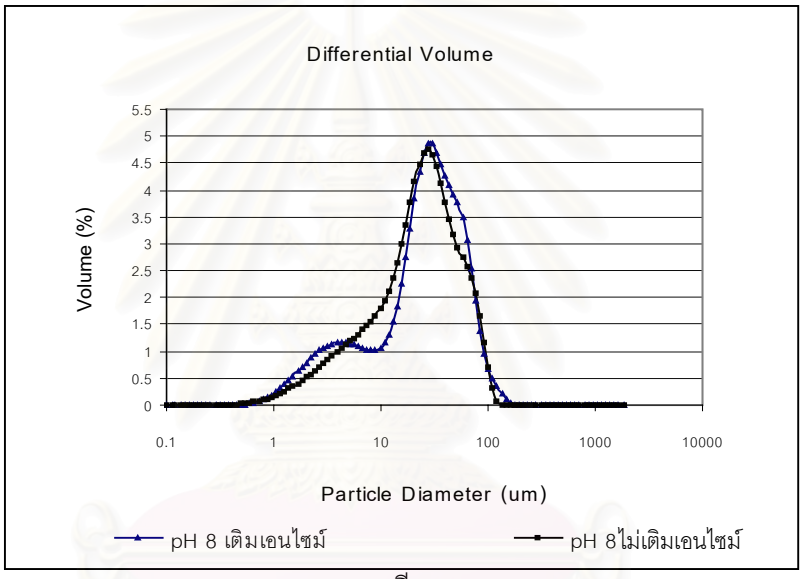
ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อเติมเอนไซม์ ที่พีเอชต่างๆ พบว่าการเพิ่มพีเอช ทำให้เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เปลี่ยนแปลงไม่มากนักคือ ในช่วง 57 – 59 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่ากรณีไม่เติมเอนไซม์ เพราะการเติมเอนไซม์จะมีผลในการแยกโปรตีนออกมาได้มาก ซึ่งโปรตีนจะเป็นตัวเชื่อมอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ไว้ด้วยกัน ดังนั้นโพลีแซคคาไรด์จึงมีขนาดอนุภาคเล็กลง อยู่กันอย่างอิสระมากขึ้น และถูกกรองแยกออกมากับอนุภาคของโปรตีนด้วย

จากการศึกษาขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม กรณีที่เติมเอนไซม์ และไม่เติมเอนไซม์หลังจากกวน 20 นาที ดังแสดงในรูปที่ 5.16 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ทำปฏิกิริยาโดยเติมเอนไซม์ กับผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ไม่เติมเอนไซม์ที่พีเอช 8 จะมีสัดส่วนขนาดอนุภาคขนาดเล็กเพิ่มขึ้นมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าเกิดการย่อยสลายโปรตีนทำให้อนุภาคโปรตีนมีขนาดเล็กลงและหลุดออกจากอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนได้มากที่สุดเช่นกันที่พีเอช 8 และที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอช 6.58) จะมีสัดส่วนขนาดอนุภาคขนาดเล็กเพิ่มขึ้นรองลงมา ซึ่งผลจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนก็ลดลงเช่นกัน และที่พีเอช 10 จะพบว่าสัดส่วนอนุภาคขนาดเล็กมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักซึ่งชี้ให้เห็นว่าที่พีเอชนี้จะสามารถแยกโปรตีนออกได้น้อยที่สุด จากปรากฏการณ์นี้สนับสนุนการอธิบายกลไกการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามตามรูปที่ 5.1

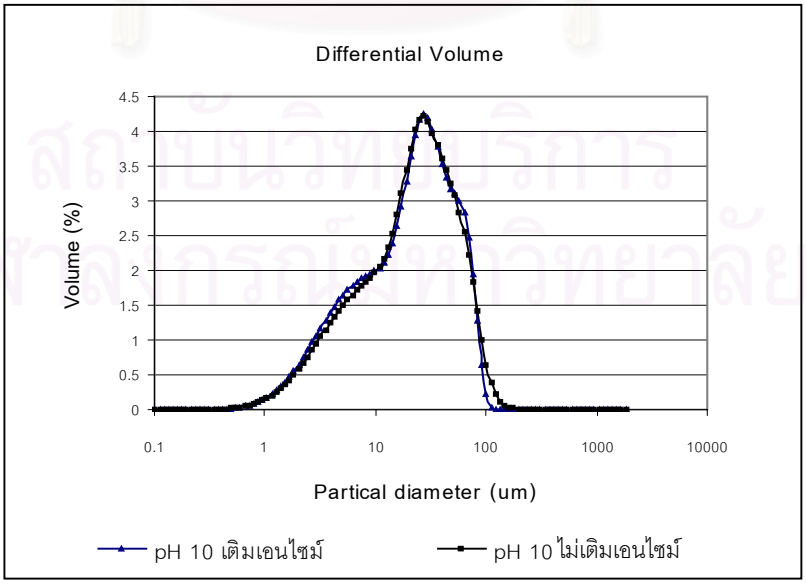
จากการทดลองจะพบว่าเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ พีเอช 8 ใช้เอนไซม์เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนไม่ต้มก่อนกรองจะเกิน 100 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีโปรตีนบางส่วนที่อยู่ภายในโมเลกุลของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ซึ่งไม่สามารถวัดได้ตอนเริ่มต้น และเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ และกวนที่ 600 รอบต่อนาที จะทำให้โปรตีนส่วนนี้หลุดออกมาได้ในตอนหลัง แต่เมื่อเทียบกับผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ผ่านการต้มในตอนเริ่มต้น เพื่อให้โมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ภายในหลุดออกมาก่อน จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนไม่เกินร้อยเปอร์เซ็นต์



(ก) พีเอช 6.58



(ข) พีเอช 8



(ค) พีเอช 10

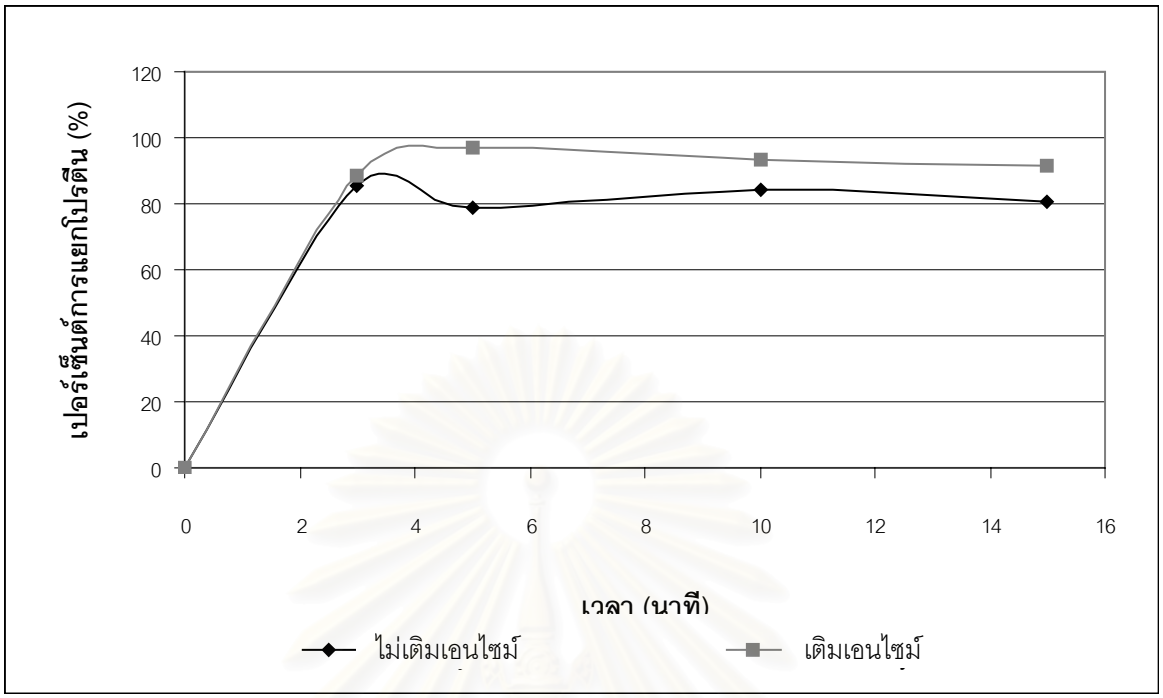
รูปที่ 5.16 การกระจายตัวของอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เปรียบเทียบกรณีเติมเอนไซม์และไม่เติมเอนไซม์ ที่พีเอชต่างๆ

5.3.2 การเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออก จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลา

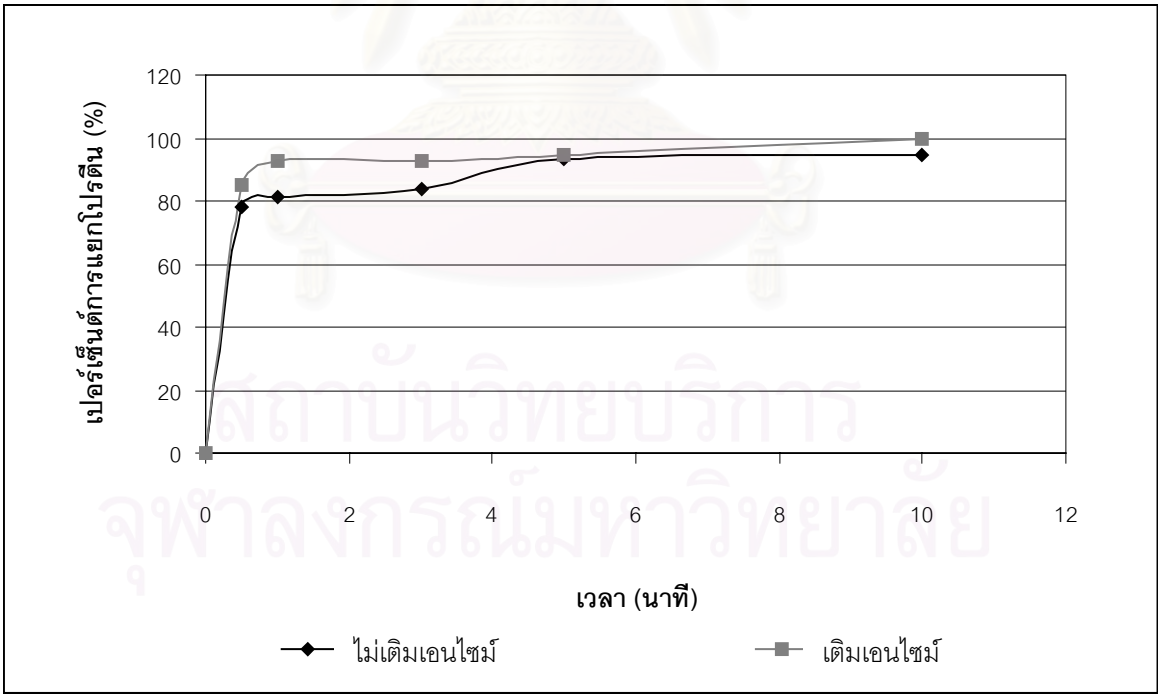
จากรูปที่ 5.17 และ 5.18 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 - 2 นาทีแรก และคงที่ในช่วง 3 –15 นาที เหตุที่เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงนาทีแรกเพราะ ในกรณีที่ไม่มีการเติมเอนไซม์และไม่ได้ปรับพีเอชเป็นการแยกโปรตีนอิสระรวมทั้งโปรตีนที่เกาะอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ขนาดเล็กออกได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการกรองคัดขนาด แต่เมื่อปรับพีเอชเป็น 8 แล้วปั่นกวนนานมากขึ้น จะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนเพิ่มขึ้นมากกว่ากรณีไม่ปรับพีเอช เพราะที่พีเอช 8 จะทำให้โปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามละลายออกมาได้มากกว่า ในกรณีที่ใช้เอนไซม์จะทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้เร็วขึ้น และได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนมากกว่า ทั้งกรณีที่ไม่ปรับพีเอชและที่พีเอชเป็น 8 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ช่วยให้แยกโปรตีนได้เร็วกว่าและมากกว่า และพบว่าการปั่นกวน 10 นาทีจะทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้อย่างสมบูรณ์

จะเห็นว่าใช้เวลาในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามน้อยมาก เพราะในที่นี้ไม่ได้ปล่อยให้เอนไซม์ย่อยให้โปรตีนเป็นกรดอะมิโนจนหมด แต่เอนไซม์จะเข้าไปย่อยโปรตีนเฉพาะบริเวณพื้นผิวของอนุภาคโปรตีนเท่านั้น ก็ทำให้อนุภาคของโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์หลุดออกจากกันได้ ดังอธิบายข้างต้น

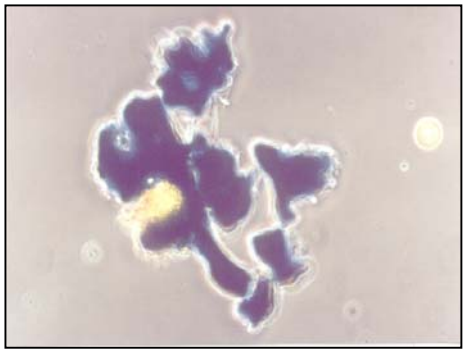
การให้เวลาในการปั่นกวนเพิ่มขึ้นจะทำให้แยกโปรตีนออกได้มากขึ้น เพราะในผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีโปรตีนเกาะติดอยู่ในลักษณะต่างๆ กันบ้างก็โดนอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ล้อมอยู่ดังรูปที่ 5.19 บ้างก็เกาะติดกับผิวของโพลีแซคคาไรด์ บ้างก็อยู่อย่างอิสระ ซึ่งส่วนที่อยู่อย่างอิสระจะสามารถกรองออกได้ตั้งแต่ต้นโดยที่ไม่ต้องใช้เอนไซม์ ส่วนโปรตีนที่เกาะติดกับผิวของโพลีแซคคาไรด์จะหลุดจากโพลีแซคคาไรด์ได้ด้วยแรงเฉือนจากการกวน และการย่อยสลายของเอนไซม์ซึ่งใช้เวลาไม่มากนัก ส่วนโปรตีนที่โดนโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ล้อมอยู่ต้องให้เวลาในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นานมากขึ้น ดังนั้นการเพิ่มเวลาจะทำให้โปรตีนในส่วนนี้ถูกแยกออกมาได้



รูปที่ 5.17 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เวลาต่างๆ เมื่อไม่ปรับพีเอช



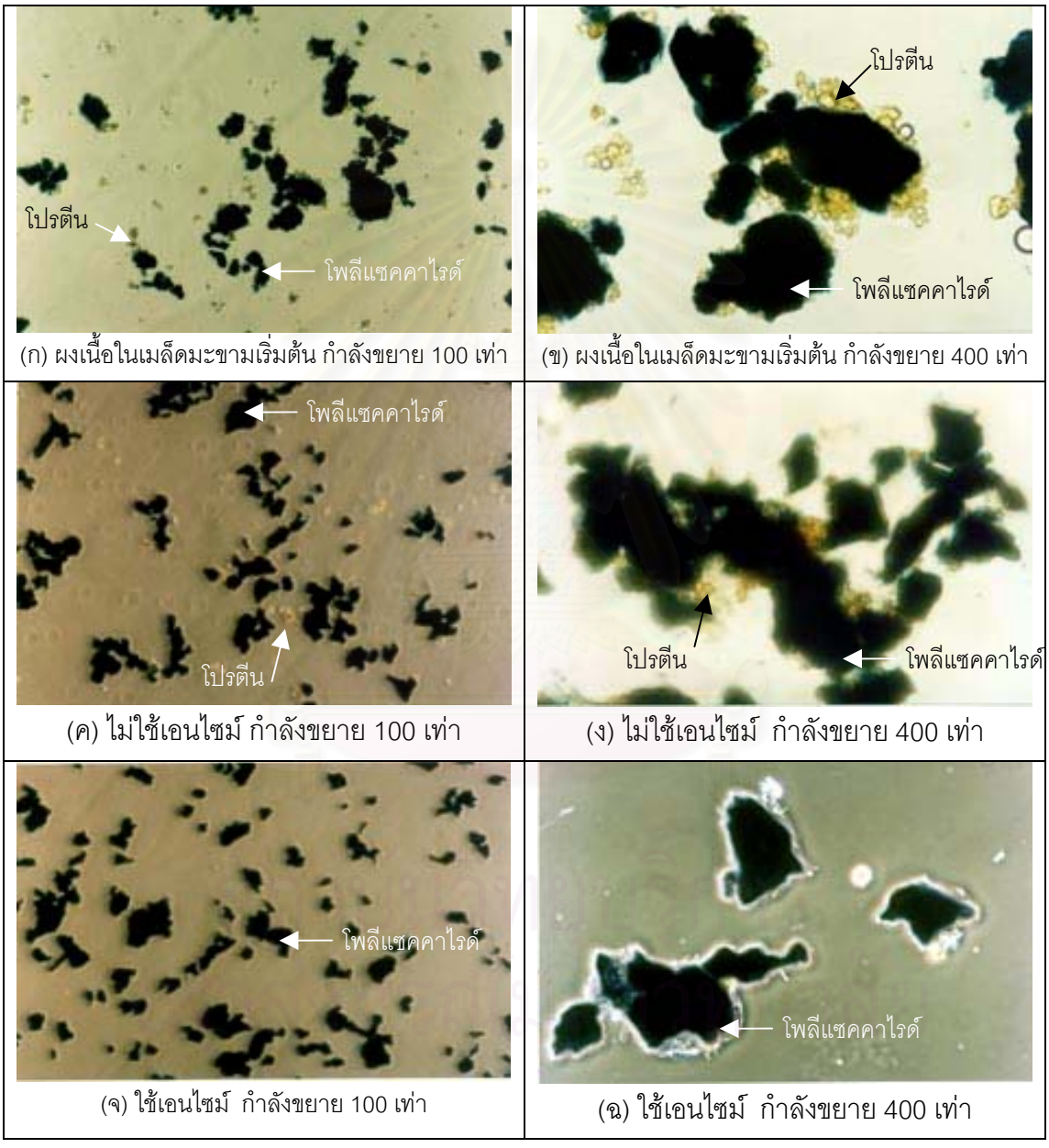
รูปที่ 5.18 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่เวลาต่างๆ เมื่อ พีเอชเป็น 8



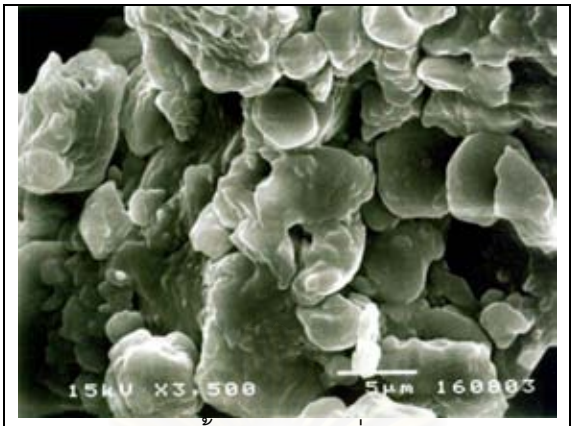
รูปที่ 5.19 ลักษณะอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ที่เป็นอุปสรรคต่อการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

จากการเปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออก จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช และ เวลาทำให้สรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์จะทำให้แยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้มากกว่ากรณีที่ไม่ใช้ โดยจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังรูปที่ 5.20 จะยืนยันให้เห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์จะทำให้อนุภาคของโปรตีน (สีเหลือง) ที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ (สีดำ) หลุดออกไปได้เกือบทั้งหมด โดยพิจารณารูป 5.20 (ก) และ (ข) ซึ่งเป็นรูปผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น ที่ไม่ได้แยกโปรตีนออก ไม่ผ่านการปั่นกวนและการกรอง จะพบว่ามีโปรตีนบางส่วนที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ และมีบางส่วนที่เป็นก้อนไม่เกาะติดกับโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งการปั่นกวนและการกรองจะทำให้โปรตีนส่วนนี้ถูกแยกออกไปได้ แต่ส่วนที่ติดอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ยังคงมีอยู่ไม่สามารถหลุดออกไปได้ทั้งหมด ดังรูปที่ 5.20 (ค) และ (ง) หรืออาจกล่าวได้ว่าการกรองและการกวน จะสามารถแยกโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโพลีแซคคาไรด์ และโปรตีนบางชนิดที่ละลายน้ำ ในที่นี้คืออัลบูมิน ออกไปได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์จะพบว่าได้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนประมาณ 80 – 85 เปอร์เซ็นต์ แต่การแยกโดยวิธีนี้ จะยังคงเหลือโปรตีนที่เกาะติดอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ ส่วนในรูปที่ 5.20 (จ) และ (ฉ) เป็นกรณีที่ใช้เอนไซม์ในการแยกโปรตีนออก จะพบว่ามีโปรตีนเหลืออยู่น้อยมาก และโปรตีนที่ติดอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ก็หลุดออกไปด้วย ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกได้เกือบถึง 100 เปอร์เซ็นต์

จากภาพถ่ายด้วยกล้องกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังรูปที่ 5.21 แสดงให้เห็นลักษณะพื้นผิวของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ซึ่งจะเห็นได้ว่าผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้นจะมีอนุภาคของโปรตีนเกาะอยู่อย่างขรุขระ และเมื่อนำไปละลายในน้ำจะทำให้โปรตีนบางส่วนละลายออกไปได้ เหลือเกาะอยู่กับโพลีแซคคาไรด์เล็กน้อย ส่วนกรณีที่ใช้เอนไซม์จะสังเกตเห็นพื้นผิวเรียบ ไม่มีโปรตีน

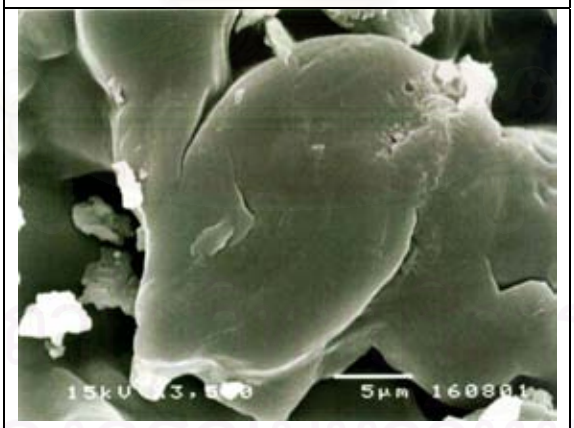


รูปที่ 5.20 ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์เปรียบเทียบกับกรณีไม่ใช้เอนไซม์ โดยถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์



ผงเนื้อในมะขามเริ่มต้น

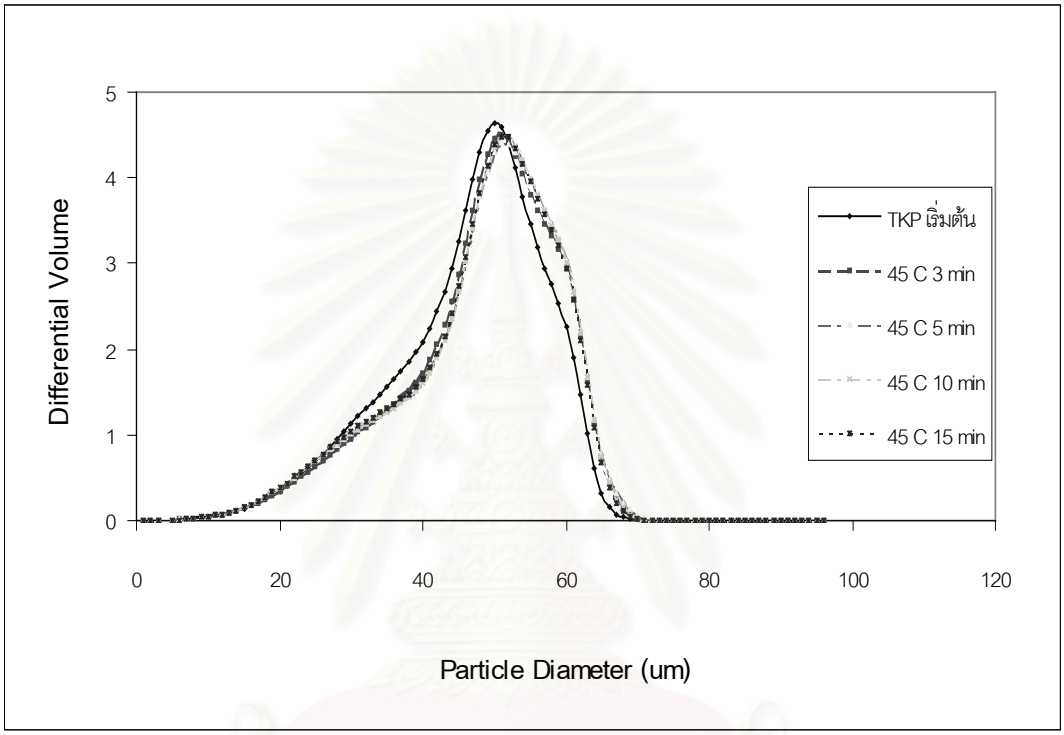
ผ่านการแยกโปรตีนโดยไม่ใช้เอนไซม์



ผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

รูปที่ 5.21 ลักษณะอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์เปรียบเทียบกับกรณีไม่ใช้เอนไซม์ โดยถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับงานวิจัยของวารี เนื่องจากในงานวิจัยนี้ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำให้โมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์บวม สังเกตได้จากรูปที่ 5.22 แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โพลีแซคคาไรด์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ทั้งนี้เพราะที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โมเลกุลของน้ำเข้าไปแทรกในผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้ง่าย ทำให้โปรตีนที่อยู่ภายใน และ ถูกย่อยโดยเอนไซม์ซึ่งละลายอยู่ในน้ำได้ง่ายขึ้น

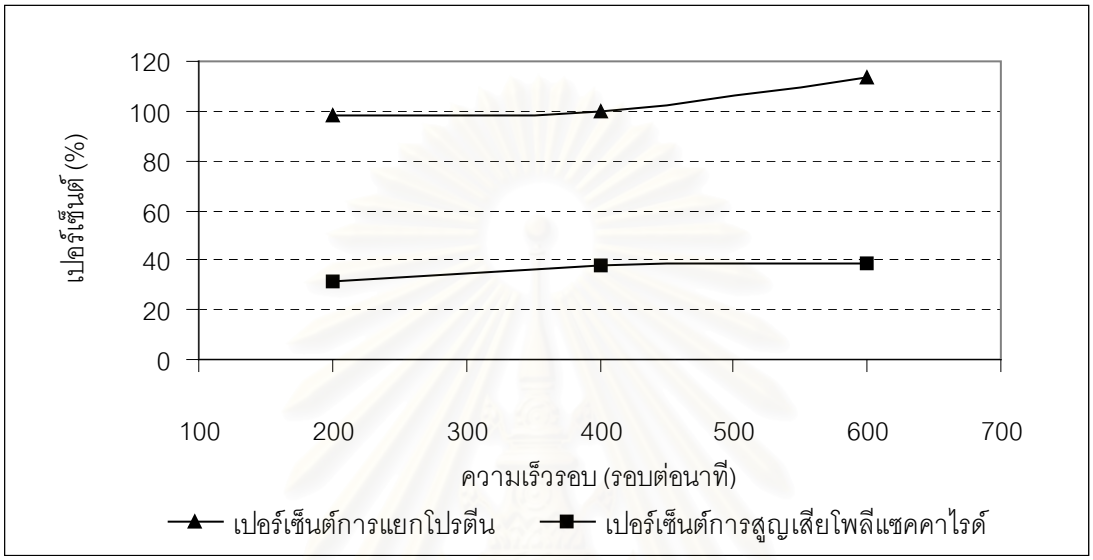


รูปที่ 5.22 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่อุณหภูมิห้อง และที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อไม่ใช้เอนไซม์ ปั่นกวนที่เวลาต่างๆ

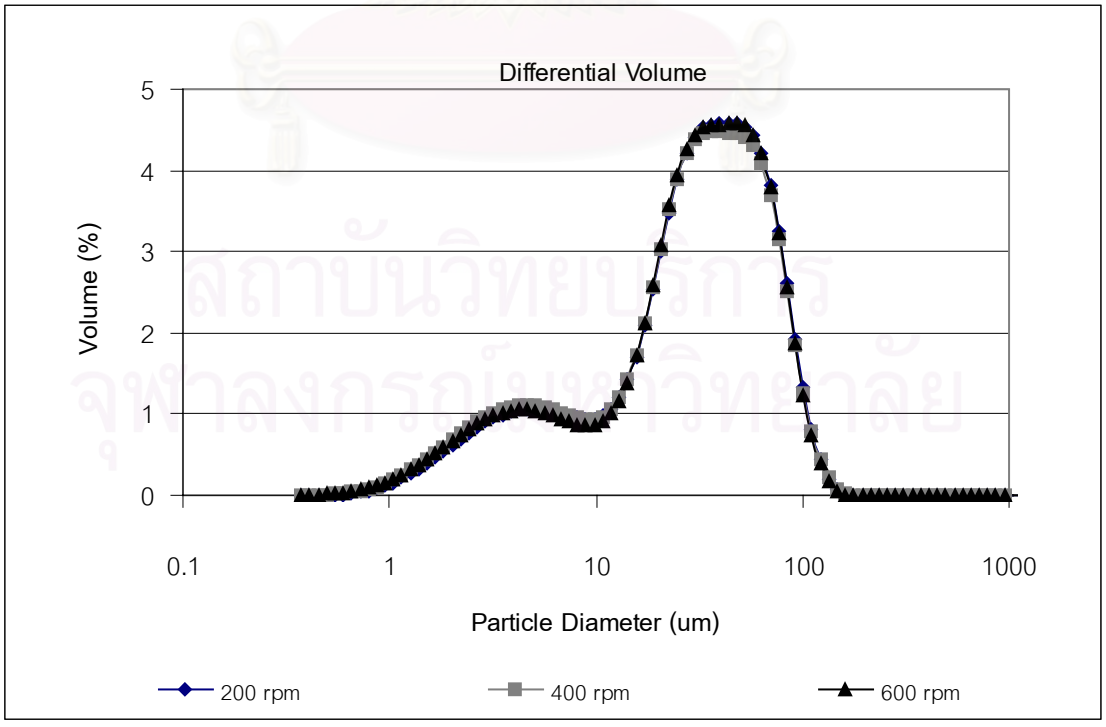
5.4 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

จากการศึกษาการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดย ใช้ความเร็วรอบในการปั่นกวนต่างๆกัน พบว่าการเพิ่มความเร็วรอบมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเร็วรอบในขณะที่มีผงเนื้อในเมล็ดมะขามอยู่ด้วย ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง หรือไม่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวไว้ในตอนต้น และจะเห็นได้จากรูปที่ 5.23 ว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อความเร็วรอบการกวนเพิ่มขึ้นแต่ไม่เกินร้อยละ 40-60 และเมื่อเปรียบเทียบ

กับวิธีของวารี (ร้อยละ 70) และวิธีใช้ไฮโดรไซโคลน (ร้อยละ 75) จะเห็นว่าวิธีนี้สูญเสียโพลีแซคคาไรด์น้อยกว่า เนื่องจากอนุภาคยังคงมีขนาดใหญ่อยู่ และจากการวัดขนาดอนุภาคได้ผลดังรูปที่ 5.24 พบว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และกวนเป็นเวลา 30 นาที ไม่ทำให้โมเลกุลของผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ดังแสดงในรูปที่ 5.3 (ข) แตกออกเป็นโมเลกุลที่เล็กลง



รูปที่ 5.23 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 200 400 และ 600 รอบต่อนาที



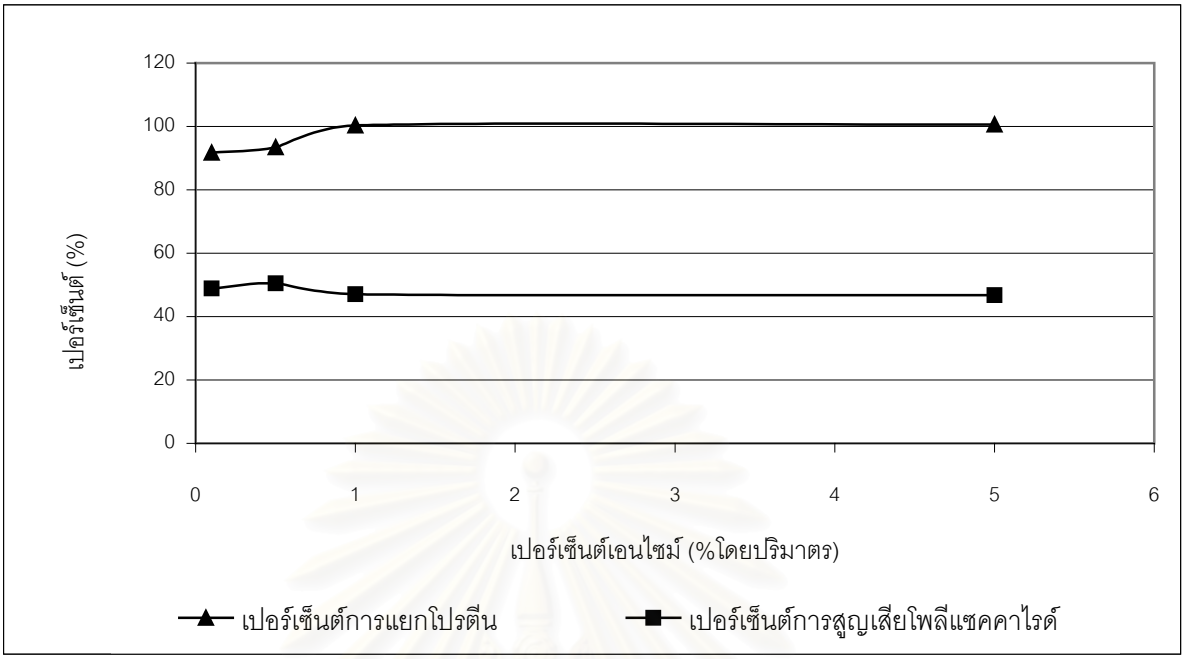
รูปที่ 5.24 ขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ใช้เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ดังนั้นความเร็วรอบในการปั่นกวนที่เหมาะสม 600 รอบต่อนาที ที่เลือกใช้ความเร็วรอบนี้เพราะ การกวนเร็วๆ จะช่วยให้เกิดการผสมผสานที่ดี เพิ่มความถี่ในการชนกันของอนุภาค ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น และแรงเฉือนที่เกิดขึ้นจากการกวนจะเป็นแรงสนับสนุนที่ให้โปรตีนหลุดจากโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ได้ง่ายขึ้น

5.5 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

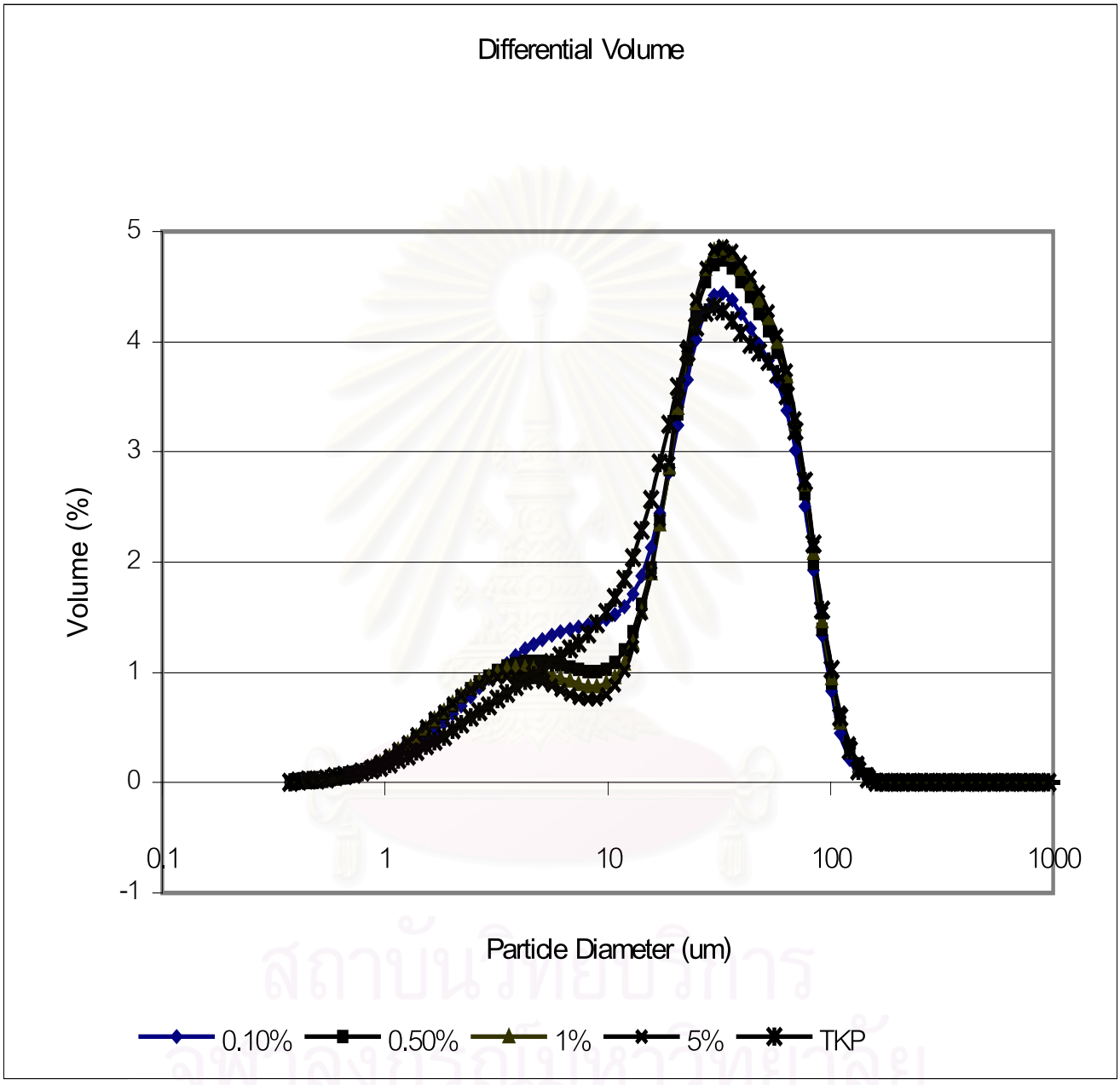
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และเติมเอนไซม์ลงในถังปฏิกรณ์จำนวนเท่าๆ กันคือ 1 มิลลิลิตรต่อผงเนื้อในเมล็ดมะขามเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรจำนวน 100 มิลลิลิตร จึงเปรียบเสมือนเป็นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ โดยจากการเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 0.1 0.5 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 0.043 0.217 0.434 และ 2.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ดังผลการทดลองในรูปที่ 5.25 พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้เพิ่มขึ้น และกรณีที่ใช้เอนไซม์ช่วง 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความสามารถในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะคงที่ แสดงให้เห็นว่าที่เอนไซม์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจำนวน 1 มิลลิลิตร เพียงพอต่อการย่อยโปรตีนเพื่อแยกอนุภาคโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรจำนวน 100 มิลลิลิตรภายในเวลา 20 นาที การใช้เอนไซม์ดังกล่าวทำให้อนุภาคของโปรตีนหลุดออกจากอนุภาคของโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเมื่อกรองอนุภาคทั้งสองออกจากกันจะสามารถแยกโปรตีนออกได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.25 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

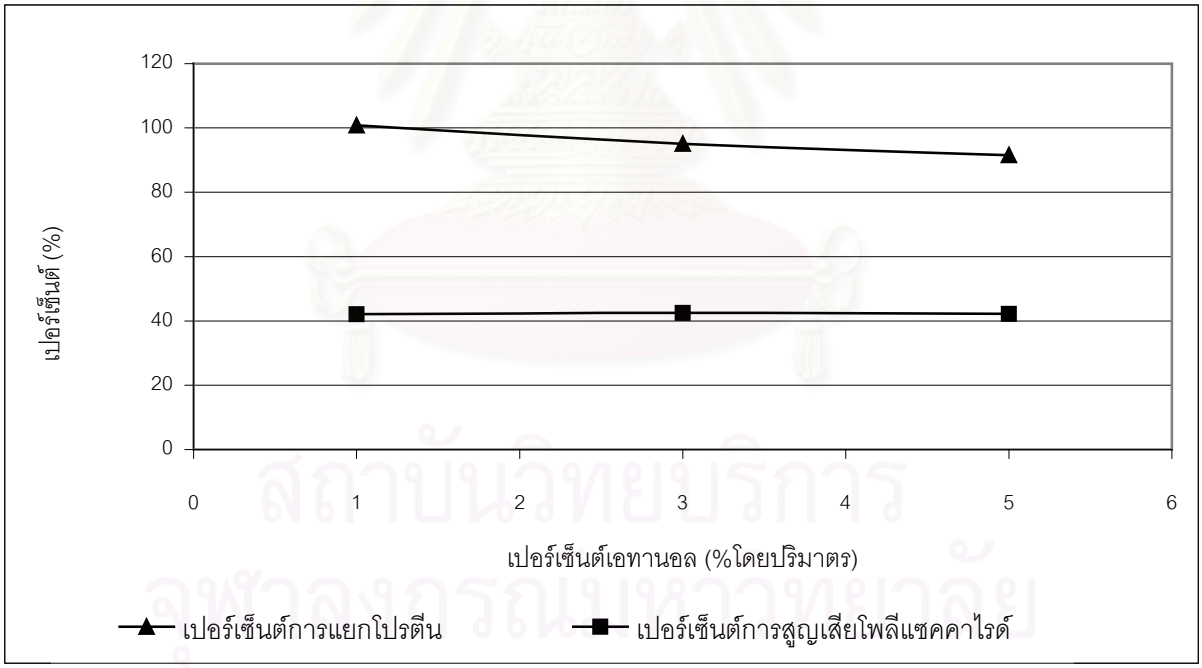
จากรูปที่ 5.26 จะพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะทำให้สัดส่วนของอนุภาคขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีความแตกต่างกันมากขึ้น และส่วนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ (อนุภาคขนาดใหญ่) ลดลง ในขณะที่ส่วนที่เป็นโปรตีน (อนุภาคขนาดเล็ก) มีปริมาตรมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้มากขึ้น ซึ่งอนุภาคขนาดเล็กที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่ใช่ปริมาณเอนไซม์ที่เติมเข้าไป เพราะเอนไซม์สามารถละลายน้ำได้ดี จึงไม่สามารถวัดอนุภาคได้ด้วยเครื่อง particle size analyzer และไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กลงเพราะจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ คืออยู่ในช่วง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ และจากรูปที่ 5.26 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคขนาดใหญ่มีลักษณะแคบลง ซึ่งต่างจากการกระจายตัวของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น (TKP)



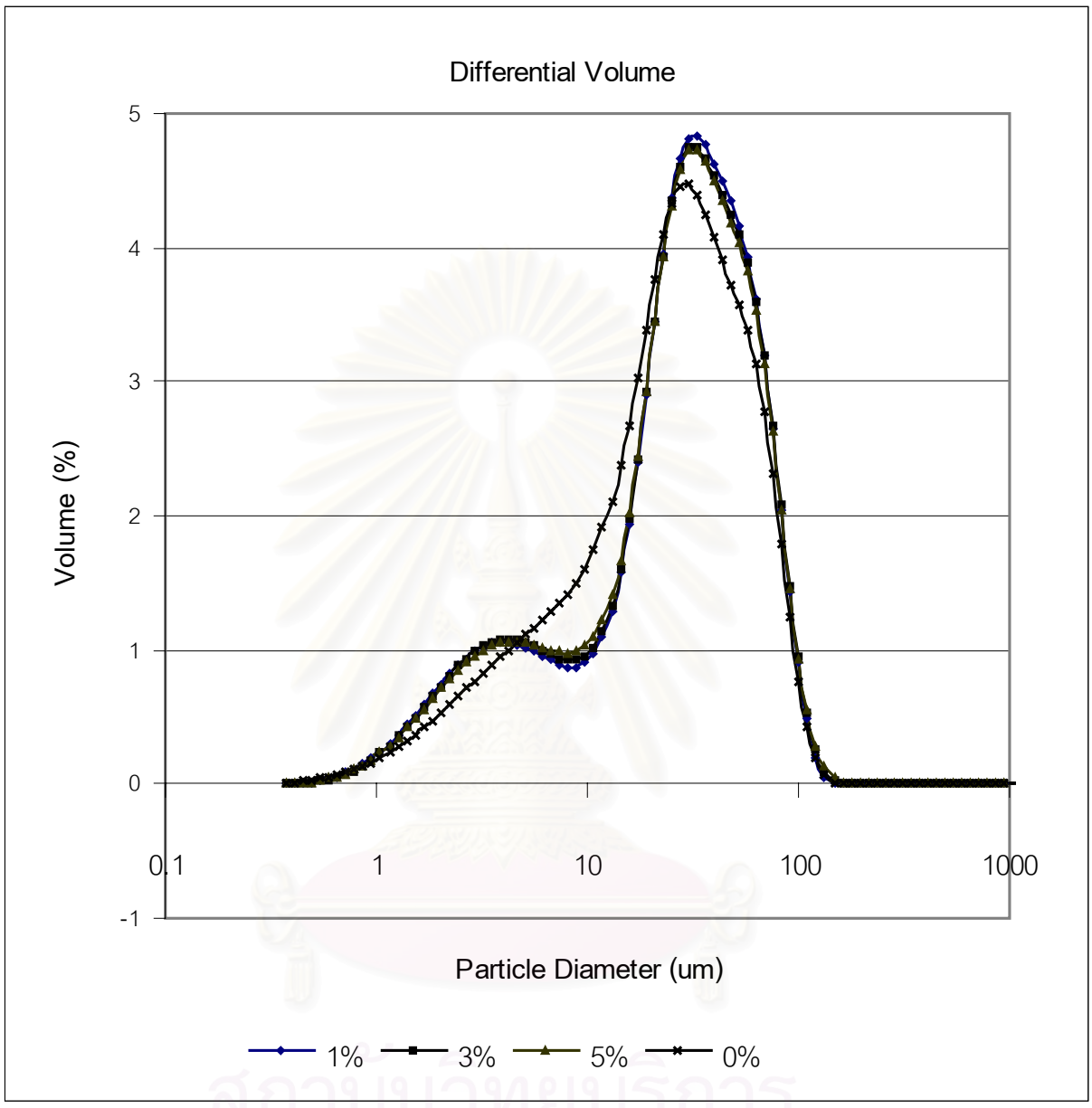
รูปที่ 5.26 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขามหลังทำปฏิกิริยา 20 นาที โดยใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ กัน

5.6 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

จากการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณเอทานอลเป็น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามลดลงดังรูปที่ 5.27 ทั้งนี้เพราะการเติมเอทานอล มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม และเอทานอลมีค่าคงตัวไดอีเล็กตริคน้อยกว่าน้ำ เมื่อเติมลงไปในสารแขวนลอยจะทำให้สารแขวนลอยนั้นมีค่าคงตัวไดอีเลคทริคน้อยลง ทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกกับลบเพิ่มขึ้น เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนจึงแสดงค่าประจุสุทธิเข้าใกล้ศูนย์ ทำให้จับกันเป็นก้อน เป็นเหตุให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ส่งผลให้ย่อยสลายโปรตีนได้น้อยลง ส่วนเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ที่ปริมาณเอทานอลต่างๆ นั้นมีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากอนุภาคโพลีแซคคาไรด์เมื่ออยู่ในสารละลายเอทานอลจะมีความคงตัวมากกว่าอยู่ในน้ำอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 5.28



รูปที่ 5.27 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์



รูปที่ 5.28 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ที่ผ่านการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเอทานอลที่ความเข้มข้นของ เอทานอลต่างๆ กัน เทียบกับผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น

5.7 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ตารางที่ 5.4 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ความเข้มข้นของเอทานอล (%v/v)	ปริมาณไขมันในผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่ผ่านการแยกโปรตีน (%wt/wt)	เปอร์เซ็นต์การแยกไขมัน
ผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น	7.05	-
0	0.43	93.972
1	0.45	93.617
3	0.41	94.184
5	0.38	94.610

จากตารางที่ 5.4 จะพบว่าการใช้เอนไซม์ในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ทั้งกรณีที่ใส่เอทานอล และไม่ใส่เอทานอล มีผลทำให้ไขมันถูกแยกออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยสามารถแยกไขมันออกได้ถึง 93.61 – 94.61 เปอร์เซ็นต์ จากผงมะขามเริ่มต้น ที่มีไขมัน 7.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เหลือเพียง 0.38 – 0.45 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เหลือน้อยกว่าการแยกโดยวิธีของวารีซึ่งแยกไขมันได้ 82 เปอร์เซ็นต์ (จากเริ่มมีไขมัน 8.687 เปอร์เซ็นต์ เหลือในผลิตภัณฑ์ 1.54 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้ทราบว่าโมเลกุลของโปรตีน และไขมัน ของผงเนื้อในเมล็ดมะขามอยู่รวมกันเป็นก้อน และในขณะที่โปรตีนถูกย่อยสลายไป ทำให้โมเลกุลของโปรตีนหลุดออกจากโพลีแซคคาไรด์ ไขมันซึ่งอยู่รวมกันกับโปรตีนจึงถูกแยกออกมาด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (TKP) พบว่ามีโพลีแซคคาไรด์ 68.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และส่วนที่ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน 17.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไขมัน 7.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารประกอบอื่นๆ 7.56 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจากการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ และกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าอนุภาคของโปรตีนและไขมัน เกาะติดอยู่กับพื้นผิวของอนุภาคโพลี-แซคคาไรด์ และจากการวัดขนาดของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ระหว่าง 1 –15 ไมโครเมตร มี 23.61 เปอร์เซ็นต์มีโปรตีนและไขมันเป็นส่วนใหญ่ และที่เหลือมีขนาด 15 – 100 ไมโครเมตร เป็นโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่

2. จากการศึกษาคุณสมบัติของผงเนื้อในเมล็ดมะขามพบว่า ความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิ ความเข้มข้น เวลาในการปั่นกวน และเมื่อปรับพีเอชให้สูงขึ้นจะทำให้ผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีขนาดเล็กลง มีการกระจายตัวเพิ่มขึ้นโดยที่พีเอชสูงประมาณ 12 ขึ้นไปจะมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ และไม่ตกตะกอน ส่งผลให้ความหนืดลดลงด้วย

3. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสโดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 8 โดยไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากการปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที แต่จะเสียสภาพธรรมชาติมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เข้มข้น ตามวิธีของ Raja และ คณะ โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรทพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรม 43.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที

4. จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม พบว่าการปรับพีเอชผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีผลทำให้โมเลกุลของผงเนื้อในเมล็ดมะขามมีขนาดเล็ดลง มีความหนืดลดลง มีการกระจายตัวมากขึ้น แต่การปรับพีเอชเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ได้

5. จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกอนุภาคของโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนคือ ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นผงเนื้อในเมล็ดมะขาม 40 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณเอนไซม์เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่พีเอช 8 และความเร็วรอบในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

6. เอนไซม์ช่วยในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้ โดยเอนไซม์จะเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยรอบอนุภาคของโปรตีน เพื่อย่อยสลายโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโน และทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลง และเมื่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนตรงส่วนที่เป็นผิวผัสอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ จะทำให้อนุภาคทั้งสองหลุดออกจากกันได้ การแยกโดยวิธีนี้จะทำให้แยกโปรตีนออกได้ 97.051 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับต้ม หรือ 100.369 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับไม่ต้มก่อนกรอง ซึ่งเพิ่มจากการแยกโดยการคัดขนาดอย่างเดียว 15.89 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มจากการแยกเมื่อปรับพีเอชเป็น 8 และไม่เติมเอนไซม์ 6.37 เปอร์เซ็นต์

7. จากการศึกษาผลของเอทานอลต่อการแยกโปรตีนและไขมันออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม พบว่าการแยกโปรตีนออกโดยใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอทานอลจะทำให้ไขมันซึ่งอยู่รวมกับอนุภาคโปรตีนในผงเนื้อในเมล็ดมะขามถูกแยกออกมาได้ 93.972 เปอร์เซ็นต์โดยเหลืออยู่ในผงเนื้อในเมล็ดมะขามเพียง 0.43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเท่านั้น และเมื่อผสมเอทานอลในสารแขวนลอยให้มีเอทานอลเข้มข้น 1 - 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าไม่ทำให้แยกไขมันออกจากผงมะขามได้มากขึ้น แต่กลับทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนลดลง

8. การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์จะทำให้สูญเสียโพลีแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าการแยกโดยใช้คลื่นเหนือเสียง (70 เปอร์เซ็นต์) และการใช้ไฮโดรไซโคลน (75 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากการแยกโดยใช้เอนไซม์ไม่ทำให้โพลีแซคคาไรด์มีขนาดเล็กลง

ตารางที่ 6.1 สรุปสภาวะที่เหมาะสม และผลของการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

สภาวะที่เหมาะสมของการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์	
ความเข้มข้นผงเนื้อในเมล็ดมะขาม	40 g/l
ปริมาณเอนไซม์	0.01 %v/v
พีเอช	8
อุณหภูมิ	45 ^{0} C
ความเร็วรอบในการกวน	600 rpm
เวลา	20 นาที
ผลของการแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์	
เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน (เทียบกับต้ม)	97.057 %
เปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์	58.267 %
เปอร์เซ็นต์การแยกไขมัน	93.972 %
เปอร์เซ็นต์ yield	28.4%

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามด้วยวิธีนี้ ยังมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลี-แซคคาไรด์มากอยู่เนื่องจากทำการทดลองที่ความเข้มข้นต่ำทำให้สูญเสียโพลีแซคคาไรด์ส่วนที่ละลายได้ในน้ำที่อุณหภูมิห้องไปมาก ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจะทำให้สูญเสียโพลีแซคคาไรด์ส่วนนี้ได้น้อยลงและได้ yield มากขึ้น ในขณะที่เอนไซม์ยังสามารถแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามได้อยู่ เนื่องจากเอนไซม์เกิดปฏิกิริยาเร็วและละลายน้ำได้ดี

2. ในการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยใช้เอนไซม์ ควรใช้ผ้ากรองที่มีขนาดเล็กกว่า 15 ไมโครเมตร (ก่อนเพื่อลดการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์) กรองอนุภาคโปรตีนอิสระในสารแขวนลอยออก แล้วจึงใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่เกาะติดอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ทีหลัง โดยวิธีนี้จะทำให้ใช้เอนไซม์น้อยลง

3. ควรมีการศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์จากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ที่ได้จากการแยกโดยใช้เอนไซม์อย่างละเอียด เพื่อนำไปผลที่ได้ไปใช้ในการ ปรับปรุงคุณสมบัติด้านความหนืดต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ข้อมูลเบื้องต้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขามจากบริษัท จีเอ็ม อิชิฮารา. 2542

กิตติพงษ์ รัตนาภรณ์. **การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยใช้ตัวกรองชนิดหมุนได้** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543

ดาวัลย์ ฉิมภู่. **โมเลกุลชีวภาพ เล่ม 1** ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2538

ทนง ภัครัชพันธุ์. เมล็ดมะขาม และกัม. **วารสารอุตสาหกรรมเกษตร**. 2(2534):29-34

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. **สารชีวโมเลกุล**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม, 2525

พัชรา วีระกะลัส **เอนไซม์** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541: 237-255

พวงเพ็ชร นิธยานนท์. **การผลิตและการใช้ประโยชน์ของกัมจากเมล็ดมะขาม**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2521

มนตรี จุฬาวัฒนพล และคณะ. **ชีวเคมี**. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2542

วารี จารุวัฒนายนต์. **การผลิตโพลีแซคคาไรด์ของเมล็ดมะขามจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามโดยการกรอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543

ศิริรัตน์ วรรณะศิริ. **การผลิตกัมจากเมล็ดมะขาม**. รายงานสัมมนา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2539

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน. **การใช้คอมพิวเตอร์ซอฟท์แวร์ช่วยศึกษาโครงสร้างและการทำงานของชีวโมเลกุล**. การใช้คอมพิวเตอร์ในเทคโนโลยีชีวภาพ. เอกสารประกอบการ สัมนาเชิงปฏิบัติการ. ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์คอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531

ภาษาอังกฤษ

Bhattacharya S, Bal S, Mukherjee RK, Bhattacharya S (1991) Rheological behaviour of tamarind kernel poweder suspension. **J Food Engg** 13:151-158

Bhattacharya S, Bal S, Mukherjec RK (1993) Some physical and engineering properties of tamarind sced. **J Food Engg** 18:77-89

Bhattacharya S, Bal S, Mukherjec RK, Bhattacharya S (1994a) Studies on the characteristics of some products from tamarind. **J Food Sci Technol** 31:372-376

Bhattacharya S, Bal S, Mukherjec RK, Bhattacharya S (1994b) Functional and nutritional properties of tamarind kernal protein. **Food Chem** 49:1-9

Bhattacharya S, Gangopadhyay H, Chaudhurt DR (1983) Tamarind kernel powder as pectin substitute in food industries. In: Procedings of National Conference on Fruit and Vegetable Processing Industries, **Association of Food Scientists and Technologists**, India, pp 61-64

Chakravarti IB (1961) Isolation, purification and fraction of tamarind kernel polysaccharide. **J Sci Indus Res** 20D:380-384

Das, D.B. and Basak, KK. A Study of the Viscosity of Decorticated Tamarind Seed Powder. **J. Ind. Chem. Soc.** 27 (1950): 115-122

Deguchi Y and Shiba T. Process for Obtaining Tamarind Seed Jellose. **U.S. Patent** ๆ 3287350, 1966

Gerald O. The Polysaccharides. **Academic Press,Inc.** 1985. Vol 1-3

Glickman M. Gum technology in the Food Industry. New York: **Academic Press**, 1969

Gordon AL. Tamarind Seed Polysaccharides Recovery. **U.S. Patent.** 3399189, 1968

Ishola MM, Agbaji EB, Agbaji AS (1990) A chemical study of tamarindus indica fruits grown in Nigeria. **J Sei Food Agric** 51:141-143

Johansson, L. and S. Kashemsanta. Industrial uses of Tamarind “Separation of tamarind seed testae”. **ASRCT.** pp. 1969

Jones DA (1978) Purification of tamarind gum **US Patent** No. 4074043

Jones et. al. Purification of Tamarind Gum. **U.S. Patent.** 4074043, 1978

Kooiman P. (1957) Partial enzymic degradation of tamarindus-Amyloid. **Nature** No. 4578, July 27 , p 201

Kooiman P. The Constitution of Tamarindus Amyloid. **Rec.Trav.Chem.** 80 (1961): 849-865

Lumen Bo de, Beeker R, Reyes PS (1986) .Legumes and a cereal with high methionine/cysteine contents. **J Agric Food Chem** 34:361-364

Marangoni A, Alli I, Kermasha S (1988) Composition and properties activities of seeds of the true legume tamarindus indica. **J Food Sci** 53:1452-1455

Morad MM, El Magoli Magoli SB, Sedky KA (978) Physico-chemical properties of Engyptian seed oil. **Fette-Seifen-Anstrichmittel** 80:357-359

Octave Levenspiel. **Chemical Reaction Engineering.** John Whiley & sons. Third Edition. 1999: 367-521

Rao KH, Subramanian N (1984) Nitrogen solubility and functional properties of tamarind seed kernel proteins. In: **Proceedings of National Symposium on Protein Foods and Feeds,** Madras, India

Rao PS (1948) Tamarind seed jellose (pectin) and its jellying properties. **J Sci Indus Res** 6B:89-90

Savur GR. Characteristic of Tamarind Seed Polysaccharide. **J. Ind Chem. Soc.** 19 (1959): 67-70

Shankaracharya N.B. Tamarind-Chemistry, Technology and Uses-A Critical Appraisal. **J. Food. Sci. Technol.** 35 (1998): 193-208

Siddaraju P, Vijayakumari K, Janardhanan K (1995) Nutritional and and antinutritional properties of the under exploited legumes. **J Food Compn Analysis** 8:351-362

Sila B. et. al. Functional and nutritional properties of Tamarind (Tamarindus indica) kernel protein. **Food. Chem.** 49 (1994): 1-9

Sivarama Reddy G, Jaganmohan Rao S, Achyutaramayya D, Azeemoddin G, Tirumala Rao SD (1979) Extraction, charateristies and fatty acid composition of tamarind kernel oil. **J oil Technol Assoc** India 11:91-93

Somsiri A. **Pilot Scale Production of Tamarind Seed Polysaccharide**. M.Sc Thesis in Pharmacy, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1997

Sone Y Sato K (1994) Measurement of oilgosaccharides derived from tamarind xyloglucan by competitive ELISA assay. **Bio Sci Biotech Bio Chem**

58:2295-2296

Srivastava HC and Singh PP. Structure of Polysaccharide from Tamarind Kernel Powder. **Carb.Res**. 4 (1967): 326-342

Standford. Clarified Tamarind Kernel Powder. **U.S. Patent**. 4429121, 1984

Suttananta W. **Reology Studies on Tamarind Seed Polysaccharide from Tamarind Kernel Powder**. M.Sc Thesis in Pharmacy, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1991

Teraoka et.al. Process for Separating Polysaccharides from Tamarind seeds. **U.S. Patent**. 4895938, 1990

Teraoka et.al. Process for Separating Polysaccharides from Tamarind seeds. **U.S. Patent**. 4895938, 1990

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

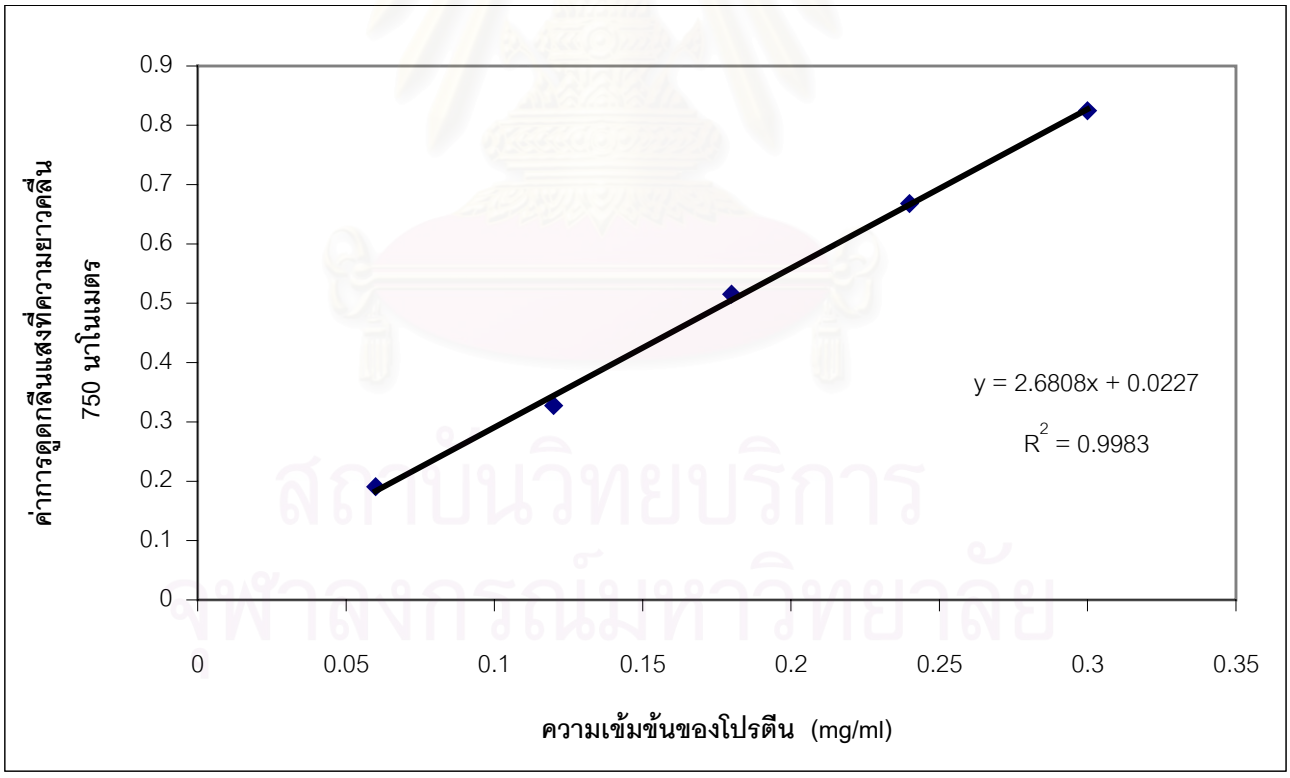
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เส้นกราฟมาตรฐาน

ข้อมูลกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ตาราง ก.1 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของโปรตีนในน้ำ

ความเข้มข้นของโปรตีน(mgm/l)	ค่า adsorbent 1	ค่า adsorbent 2	ค่า adsorbent เฉลี่ย
0.06	0.196	0.205	0.198
0.12	0.359	0.369	0.381
0.18	0.505	0.487	0.483
0.24	0.597	0.597	0.601
0.3	0.76	0.753	0.798

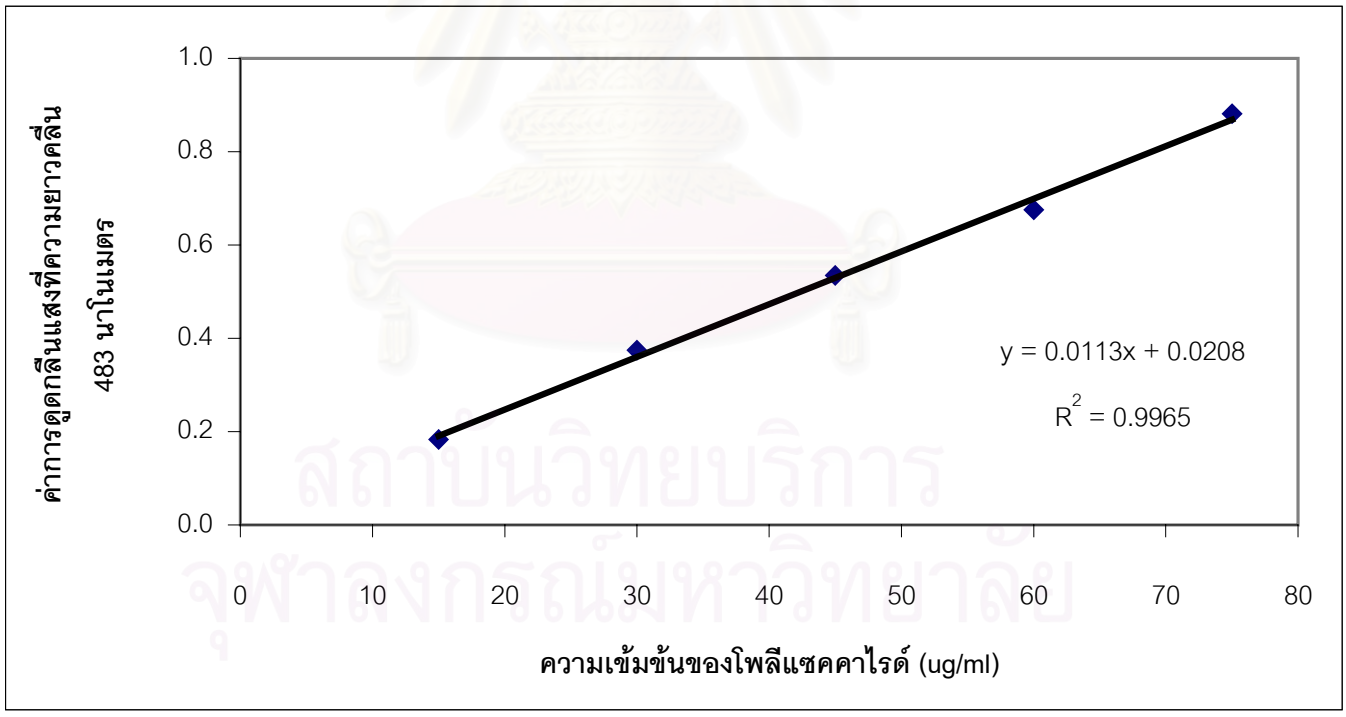


รูปที่ ก.1 เส้นกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ข้อมูลกราฟมาตรฐานของโพลีแซคคาไรด์มาตรฐาน TSP ความเข้มข้น 15 -75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย

ตาราง ก.2 ข้อมูลกราฟมาตรฐานของโพลีแซคคาไรด์

ความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์ (ug/ml)	ค่า adsorbent 1	ค่า adsorbent 2	ค่า adsorbent 3	ค่า adsorbent เฉลี่ย
15	0.185	0.201	0.164	0.183
30	0.4	0.361	0.362	0.374
45	0.556	0.514	0.534	0.535
60	0.692	0.664	0.67	0.675
75	0.901	0.871	0.871	0.881



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของโพลีแซคคาไรด์ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และ เวลาที่มีผลต่อความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ตารางที่ ข.1 ผลของความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และ เวลาที่มีผลต่อความหนืดของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ความเข้มข้นของผงเนื้อในเมล็ดมะขาม (g/l)	ความเร็วรอบ (rpm)	ความหนืด (cp)		
		อุณหภูมิห้อง	450C 30 min	450C 60 min
40	200 rpm	9.28	29.75	51.33
	400 rpm	9.28	37.23	70.73
	600 rpm	9.28	35.94	69.78
60	200 rpm	20.44	158.2	287.89
	400 rpm	20.44	163.85	289.54
	600 rpm	20.44	172.22	299.26
80	200 rpm	49.14	622.36	1183.25
	400 rpm	49.14	699.21	1195.26
	600 rpm	49.14	682.85	1200.25

2. การศึกษาผลของพีเอช (pH) ที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด

ตารางที่ ข.2 ผลของพีเอช (pH) ที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด

pH	Control 1	Control 2	Control เฉลี่ย	Abs1	Abs2	Abs3	Abs เฉลี่ย	activity (unit/ml)
5	0.225	0.234	0.230	0.691	0.727	0.692	0.703	2.369
6	0.285	0.263	0.274	0.701	0.757	0.754	0.737	2.317
7	0.276	0.26	0.268	0.847	0.829	0.834	0.837	2.843
8	0.276	0.308	0.292	0.952	0.992	0.945	0.963	3.355
9	0.282	0.281	0.282	0.953	0.95	0.971	0.958	3.383
10.5	0.282	0.264	0.273	0.84	0.849	0.904	0.864	2.957

3. การศึกษาผลของการปั่นกวนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ ข.3 ผลของการปั่นกวนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ความเร็วรอบการกวน	control 1	control 2	control	Abs1	Abs2	Abs3	Abs เฉลี่ย	activity (unit/ml)
0	-0.017	-0.014	-0.016	0.186	0.186	0.184	0.185	1.004
200	-0.016	-0.011	-0.014	0.184	0.184	0.180	0.183	0.981
400	-0.016	-0.017	-0.017	0.183	0.184	0.184	0.184	1.001
600	-0.009	-0.009	-0.009	0.185	0.184	0.184	0.184	0.967

4. การศึกษาผลของการมีสารละลายเอทานอลร่วมในปฏิกิริยา ที่กระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ ข.4 ผลของการมีสารละลายเอทานอลร่วมในปฏิกิริยา ที่กระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์

% ethanol	activity(unit/ml)	% การสูญเสีย activity
0	3.245	
5	3.107	4.263
10	2.837	12.583
15	2.196	32.332
20	1.667	48.639
25	1.238	61.839
30	0.628	80.637

5. เปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช (ตารางที่ ข.5 – ข.6)

ตารางทีท ข.5. ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม เมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์

ความเข้มข้นแป้งมะขาม = 40 g/l เวลา 30 นาที ความเร็วรอบ = 600 rpm

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein	%removal	%removal
	pH		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	removal (mg)		
with enz	6.58	ก่อนกรอง	90	4	0.766	0.702	0.734	0.3052	7.6289	686.601	658.428	95.897	92.738
1%v/v	เริ่มต้น	filtrate	74	4	0.731	0.746	0.739	0.3071	7.6775	568.136			
1 ml		ชะ 1	106	10	0.232	0.218	0.225	0.0852	0.8518	90.292			
	8	ก่อนกรอง	90	4	0.706	0.707	0.707	0.2933	7.3318	659.860	662.292	100.369	97.051
		filtrate	75	4	0.646	0.638	0.671	0.2779	6.9482	521.117			
		ชะ 1	104	10	0.337	0.347	0.342	0.1357	1.3574	141.175			
	10	ก่อนกรอง	90	4	0.705	0.763	0.734	0.3052	7.6289	686.601	559.624	81.506	78.821
		filtrate	70	4	0.639	0.667	0.653	0.2701	6.7537	472.762			
		ชะ 1	108	10	0.214	0.214	0.214	0.0804	0.8043	86.861			
No enz	6.63	ก่อนกรอง	90	4	0.639	0.636	0.638	0.2635	6.5863	592.765	500.702	84.469	83.102
30 min	เริ่มต้น	filtrate	61	4	0.563	0.563	0.563	0.2313	5.7814	352.663			
		ชะ 1	111	10	0.342	0.331	0.337	0.1334	1.3337	148.038			
	8	ก่อนกรอง	90	4	0.642	0.639	0.641	0.2647	6.6187	595.683	559.648	93.951	92.463
		filtrate	69	4	0.605	0.605	0.605	0.2494	6.2351	430.225			
		ชะ 1	102	10	0.333	0.31	0.322	0.1269	1.2689	129.423			
	10	ก่อนกรอง	90	4	0.599	0.544	0.572	0.2349	5.8732	528.588	489.589	92.622	91.123
		filtrate	72	4	0.578	0.583	0.581	0.2388	5.9704	429.872			
		ชะ 1	105	10	0.166	0.153	0.160	0.0569	0.5687	59.717			

ตารางที่ ข.6. ผลของพีเอชต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลีแซคคาไรด์	โพลีแซคคาไรด์	%สูญเสีย
pH			(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลีแซคคาไรด์
No enz	6.58	ก่อนกรอง	90	0.12	0.49702	0.45702	0.47702	40.373	33644.543	3.028	1.136	37.5100
	เริ่มต้น	filtrate	88	0.12	0.18	0.198	0.189	14.885	12404.130	1.092		
		ชะ 1	101	0.6	0.053	0.048	0.0505	2.628	438.053	0.044		
	8	ก่อนกรอง	90	0.12	0.425	0.487	0.456	38.513	32094.395	2.888	1.365	47.2622
		filtrate	87	0.12	0.213	0.218	0.2101	16.752	13960.177	1.215		
		ชะ 1	104	0.6	0.117	0.121	0.119	8.690	1448.378	0.151		
	10	ก่อนกรอง	90	0.12	0.492	0.462	0.477	40.372	33643.068	3.028	1.636	54.0251
		filtrate	87	0.12	0.261	0.247	0.253575	20.600	17166.298	1.493		
		ชะ 1	103	0.6	0.107	0.122	0.1145	8.292	1382.006	0.142		
with enz	6.58	ก่อนกรอง	90	0.12	0.45	0.46	0.455	38.425	32020.649	2.882	1.694	58.7060
1%v/v	เริ่มต้น	filtrate	73	0.12	0.308	0.312	0.31	25.593	21327.434	1.557		
1 ml		ชะ 1	126	0.6	0.074	0.115	0.0945	6.522	1087.021	0.137		
	8	ก่อนกรอง	90	0.12	0.455	0.463	0.459	38.779	32315.634	2.908	1.695	58.2670
		filtrate	74	0.12	0.306	0.292	0.299	24.619	20516.224	1.518		
		ชะ 1	106	0.6	0.134	0.134	0.134	10.018	1669.617	0.177		
	10	ก่อนกรอง	90	0.12	0.522	0.439	0.4805	40.681	33901.180	3.051	1.737	56.8990
		filtrate	70	0.12	0.314	0.321	0.318	26.301	21917.404	1.534		
		ชะ 1	108	0.6	0.155	0.141	0.148	11.257	1876.106	0.203		

7. เปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออก จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลา

ตารางที่ ข.7 ผลการแยกโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลา ที่พีเอช 6.58

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน	
	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์
3	85.491	88.511
5	78.798	96.927
10	84.195	93.321
15	80.671	91.799

ตารางที่ ข.8 ผลการแยกโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเวลา ที่พีเอช 8

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีน	
	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์
0.5	78.149	84.814
1	81.313	92.444
3	83.632	92.545
5	93.064	94.829
10	94.546	99.878

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.9. เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อไม่ใช้เอนไซม์ ที่พีเอช 6.58 ตามเวลา

ความเข้มข้นแป้งมะขาม 40 g/l ความเร็วรอบ = 600 rpm ความเร็วรอบ = 600 rpm

		ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
เวลา		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	ก่อนกรอง
3	ก่อนกรอง	120	5	0.666	0.667	0.667	0.2760	5.5197	662.362	566.258	85.491
	filtrate	98	5	0.606	0.603	0.605	0.2492	4.9838	488.412		
	ชะ 1	104	30	0.545	0.55	0.548	0.2246	0.7485	77.846		
5	ก่อนกรอง	120	5	0.714	0.707	0.711	0.2950	5.9000	707.999	557.889	78.798
	filtrate	98	5	0.587	0.603	0.595	0.2451	4.9017	480.365		
	ชะ 1	102	30	0.56	0.551	0.556	0.2280	0.7600	77.525		
10	ก่อนกรอง	120	5	0.717	0.688	0.703	0.2915	5.8308	699.702	589.113	84.195
	filtrate	99	5	0.619	0.633	0.626	0.2585	5.1696	511.793		
	ชะ 1	103	30	0.548	0.55	0.549	0.2252	0.7507	77.320		
15	ก่อนกรอง	120	5	0.685	0.664	0.675	0.2794	5.5888	670.660	541.030	80.671
	filtrate	92	5	0.62	0.612	0.616	0.2542	5.0832	467.654		
	ชะ 1	105	30	0.526	0.5	0.513	0.2096	0.6988	73.376		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.10 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อใช้เอนไซม์ ที่พีเอช 6.58 ตามเวลา

ความเข้มข้นแป้ง 40 g/l อุณหภูมิ 45 °C ความเร็วรอบ = 600 rpm

		ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
เวลา		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	ก่อนกรอง
3	ก่อนกรอง	120	5	0.651	0.656	0.654	0.2704	5.4073	648.879	574.330	88.511
	filtrate	98	5	0.637	0.617	0.627	0.2589	5.1783	507.471		
	ชะ 1	103	30	0.487	0.47	0.479	0.1947	0.6491	66.859		
5	ก่อนกรอง	120	5	0.628	0.622	0.625	0.2580	5.1610	619.318	600.286	96.927
	filtrate	98	5	0.648	0.682	0.665	0.2753	5.5067	539.659		
	ชะ 1	103	30	0.44	0.433	0.437	0.1766	0.5886	60.628		
10	ก่อนกรอง	120	5	0.694	0.697	0.696	0.2885	5.7703	692.441	646.196	93.321
	filtrate	105	5	0.719	0.635	0.677	0.2805	5.6104	589.096		
	ชะ 1	102	30	0.415	0.418	0.417	0.1679	0.5598	57.100		
15	ก่อนกรอง	120	5	0.723	0.723	0.723	0.3004	6.0080	720.965	661.838	91.799
	filtrate	102	5	0.727	0.718	0.723	0.3002	6.0037	612.379		
	ชะ 1	102	30	0.363	0.366	0.365	0.1455	0.4849	49.459		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.11 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อไม่ใช้เอนไซม์ ที่พีเอช 8 ตามเวลา

ความเข้มข้นแป้ง 40 g/l อุณหภูมิ 45 °C ความเร็วรอบ = 600 rpm

		ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
เวลา		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	ก่อนกรอง
0.5	ก่อนกรอง	120	5	0.782	0.761	0.772	0.3214	6.4272	771.269	602.739	78.149
	filtrate	99	5	0.585	0.676	0.631	0.2604	5.2085	515.644		
	ชะ 1	101	30	0.623	0.63	0.627	0.2587	0.8623	87.095		
1	ก่อนกรอง	120	5	0.766	0.744	0.755	0.3142	6.2846	754.155	613.224	81.313
	filtrate	98	5	0.65	0.654	0.652	0.2697	5.3944	528.647		
	ชะ 1	102	30	0.608	0.599	0.604	0.2488	0.8292	84.578		
3	ก่อนกรอง	120	5	0.744	0.679	0.712	0.2954	5.9086	709.037	592.979	83.632
	filtrate	96	5	0.626	0.629	0.628	0.2591	5.1826	497.529		
	ชะ 1	104	30	0.658	0.672	0.665	0.2753	0.9178	95.450		
5	ก่อนกรอง	120	5	0.654	0.677	0.666	0.2756	5.5110	661.325	615.456	93.064
	filtrate	99	5	0.635	0.636	0.636	0.2626	5.2517	519.922		
	ชะ 1	101	30	0.683	0.686	0.685	0.2838	0.9459	95.534		
10	ก่อนกรอง	120	5	0.699	0.654	0.677	0.2803	5.6061	672.734	636.044	94.546
	filtrate	99	5	0.672	0.641	0.657	0.2717	5.4333	537.892		
	ชะ 1	101	30	0.695	0.71	0.703	0.2915	0.9718	98.153		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.12 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเมื่อใช้เอนไซม์ ที่พีเอช 8 ตามเวลา

ความเข้มข้นแป้งมะขาม 40 g/l อุณหภูมิ 45 °C ความเร็วรอบ = 600 rpm

		ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
เวลา		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	ก่อนกรอง
0.5	ก่อนกรอง	120	5	0.79	0.691	0.741	0.3080	6.1593	739.116	626.871	84.814
	filtrate	99	5	0.626	0.664	0.645	0.2667	5.3339	528.051		
	ชะ 1	107	30	0.644	0.694	0.669	0.2771	0.9235	98.820		
1	ก่อนกรอง	120	5	0.625	0.585	0.605	0.2494	4.9881	598.574	553.348	92.444
	filtrate	102	5	0.538	0.597	0.568	0.2332	4.6640	475.727		
	ชะ 1	104	30	0.541	0.551	0.546	0.2239	0.7464	77.621		
3	ก่อนเติม TCA	95	5	0.817	0.867	0.842	0.3518	7.0366	668.477		
	ก่อนกรอง	120	5	0.67	0.701	0.686	0.2842	5.6839	682.069	631.223	92.545
	filtrate	99	5	0.668	0.669	0.669	0.2768	5.5370	548.160		
	ชะ 1	100	30	0.603	0.606	0.605	0.2492	0.8306	83.063		
5	ก่อนกรอง	120	5	0.711	0.758	0.735	0.3054	6.1074	732.893	694.997	94.829
	filtrate	99	5	0.75	0.764	0.757	0.3151	6.3019	623.890		
	ชะ 1	105	30	0.503	0.493	0.498	0.2032	0.6772	71.107		
10	ก่อนกรอง	120	5	0.731	0.676	0.704	0.2920	5.8395	700.739	699.886	99.878
	filtrate	103	5	0.724	0.752	0.738	0.3069	6.1377	632.182		
	ชะ 1	105	30	0.462	0.489	0.476	0.1934	0.6448	67.704		

8. ผลของความเร็วรอบต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ตารางที่ ข.13 สรุปผลของความเร็วรอบต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ความเร็วรอบในการกวน	% การแยกโปรตีน	%การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์
200	98.03	31.02
400	99.95	37.67
600	113.83	38.78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.14 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนและการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เมื่อปั่นกวน 200 รอบต่อนาที

วิเคราะห์โปรตีน

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein remova	(%removal)
	(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	
ก่อนเติมเอนไซม์	90	3	0.654	0.644	0.649	0.2684	8.9474	805.264	807.823	98.03
ก่อนกรอง	90	3	0.654	0.673	0.664	0.2747	9.1563	824.063		
filtrate	65	3	0.689	0.694	0.692	0.2868	9.5596	621.375		
ชะ 1	102	8	0.322	0.326	0.324	0.1280	1.5996	163.156		
ชะ 2	100	40	0.201	0.205	0.203	0.0757	0.1892	18.918		
ชะ 3	100	100	0.116	0.096	0.106	0.0338	0.0338	3.375		
ชะ 4	100	100	0.047	0.055	0.051	0.0100	0.0100	0.998		

วิเคราะห์ โพลีแซคคาไรด์

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์	%สูญเสีย
	(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลิแซคคาไรด์
ก่อนเติมเอนไซม์	90	0.1	0.643	0.487	0.565	48.1593	48159.2920	4.334	1.705	31.02
ก่อนกรอง	90	0.1	0.705	0.717	0.711	61.0796	61079.6460	5.497		เทียบกับก่อนกรอง
filtrate	65	0.1	0.266	0.233	0.250	20.2389	20238.9381	1.316		
ชะ 1	102	0.5	0.141	0.157	0.149	11.3451	2269.0265	0.231		
ชะ 2	100	2	0.221	0.239	0.230	18.5133	925.6637	0.093		
ชะ 3	100	5	0.233	0.258	0.246	19.8850	397.6991	0.040		
ชะ 4	100	5	0.148	0.184	0.166	12.8496	256.9912	0.026		

ตารางที่ ข.15 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนและการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เมื่อปั่นกวน 400 รอบต่อนาที

วิเคราะห์โปรตีน

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein remova	(%removal)
	(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	
ก่อนเติมเอนไซม์	90	3	0.654	0.644	0.649	0.2684	8.9474	805.264	861.256	99.95
ก่อนกรอง	90	3	0.691	0.694	0.693	0.2872	9.5740	861.662		
filtrate	63	3	0.726	0.757	0.742	0.3084	10.2799	647.634		
ชะ 1	105	8	0.359	0.365	0.362	0.1444	1.8049	189.510		
ชะ 2	100	40	0.215	0.221	0.218	0.0822	0.2054	20.539		
ชะ 3	100	100	0.1	0.102	0.101	0.0316	0.0316	3.159		
ชะ 4	100	100	0.043	0.032	0.038	0.0041	0.0041	0.415		

วิเคราะห์ โพลีแซคคาไรด์

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์	%สูญเสีย
	(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลิแซคคาไรด์
ก่อนเติมเอนไซม์	90	0.1	0.643	0.487	0.565	48.1593	48159.2920	4.334	1.736	37.67
ก่อนกรอง	90	0.1	0.617	0.582	0.600	51.2124	51212.3894	4.609		เทียบกับก่อนกรอง
filtrate	63	0.1	0.245	0.273	0.259	21.0796	21079.6460	1.328		
ชะ 1	105	0.5	0.2	0.165	0.183	14.3097	2861.9469	0.301		
ชะ 2	100	2	0.135	0.122	0.129	9.5310	476.5487	0.048		
ชะ 3	100	5	0.192	0.222	0.207	16.4779	329.5575	0.033		
ชะ 4	100	5	0.146	0.2	0.173	13.4690	269.3805	0.027		

ตารางที่ ข.16 เปอร์เซ็นต์การแยกโปรตีนและการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์เมื่อปั่นกวน 600 รอบต่อนาที

วิเคราะห์โปรตีน

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
	(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(g)	
ก่อนเติมเอนไซม์	90	3	0.654	0.644	0.649	0.2684	8.9474	805.264	862.036	113.83
ก่อนกรอง	90	3	0.608	0.616	0.612	0.2524	8.4144	757.293		
filtrate	58	3	0.723	0.741	0.732	0.3043	10.1430	588.297		
ชะ 1	108	8	0.462	0.455	0.459	0.1861	2.3262	251.225		
ชะ 2	100	40	0.213	0.215	0.214	0.0804	0.2011	20.107		
ชะ 3	100	100	0.073	0.076	0.075	0.0201	0.0201	2.014		
ชะ 4	100	100	0.033	0.041	0.037	0.0039	0.0039	0.393		

วิเคราะห์ โพลีแซคคาไรด์

ตัวอย่าง	ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์	%สูญเสีย
	(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลิแซคคาไรด์
ก่อนเติมเอนไซม์	90	0.1	0.643	0.487	0.565	48.1593	48159.2920	4.334	1.625	38.78
ก่อนกรอง	90	0.1	0.543	0.551	0.547	46.5664	46566.3717	4.191		เทียบกับก่อนกรอง
filtrate	58	0.1	0.226	0.21	0.218	17.4513	17451.3274	1.012		
ชะ 1	108	0.5	0.253	0.334	0.294	24.1327	4826.5487	0.521		
ชะ 2	100	2	0.137	0.131	0.134	10.0177	500.8850	0.050		
ชะ 3	100	5	0.142	0.155	0.149	11.3009	226.0177	0.023		
ชะ 4	100	5	0.126	0.131	0.129	9.5310	190.6195	0.019		

9. ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ตารางที่ ข.17 สรุปผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

% เอนไซม์	% Protein Removal	% สูญเสียโพลีแซคคาไรด์
0.1	91.722	48.876
0.5	93.419	50.548
1	100.316	47.054
5	100.623	46.801

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.18 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ความเข้มข้นแป้งมะขาม = 40 g/l เวลา 30 นาที ความเร็วรอบ = 600 rpm

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)	(%removal)
	pH		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(mg)	เทียบกับ	เทียบกับต้ม
	เริ่มต้น		90	4	0.5	0.53	0.516	0.2107	5.2682	474.135		ก่อนกรอง	
pH	8	ก่อนกรอง	90	4	0.63	0.62	0.624	0.2574	6.4350	579.152	531.212	91.722	85.887
Enz	0.10%	filtrate	70	4	0.67	0.68	0.673	0.2786	6.9644	487.510			
		ชะ 1	101	10	0.12	0.11	0.115	0.0376	0.3764	38.018			
		ชะ 2	100	40	0.07	0.09	0.081	0.0227	0.0568	5.683			
pH	8	ก่อนกรอง	90	4	0.62	0.63	0.626	0.2585	6.4620	581.583	543.309	93.419	87.843
Enz	0.50%	filtrate	71	4	0.69	0.67	0.680	0.2816	7.0401	499.844			
		ชะ 1	102	10	0.13	0.13	0.127	0.0426	0.4261	43.464			
		ชะ 2	100	40	0.07	0.06	0.066	0.0162	0.0406	4.062			
pH	8	ก่อนกรอง	90	4	0.62	0.62	0.621	0.2561	6.4026	576.235	578.055	100.316	93.461
Enz	1%	filtrate	72	4	0.68	0.69	0.687	0.2846	7.1157	512.330			
		ชะ 1	102	10	0.19	0.17	0.177	0.0644	0.6444	65.725			
		ชะ 2	100	40	0.06	0.06	0.061	0.0143	0.0358	3.576			
pH	8	ก่อนกรอง	90	4	0.63	0.62	0.626	0.2583	6.4566	581.097	584.718	100.623	94.538
Enz	5%	filtrate	73	4	0.69	0.69	0.689	0.2857	7.1427	521.417			
		ชะ 1	102	10	0.18	0.16	0.172	0.0621	0.6206	63.301			
		ชะ 2	100	40	0.05	0.04	0.044	0.0067	0.0169	1.685			

ตารางที่ ข.19 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์	%สูญเสีย	%สูญเสีย
pH			(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์
	เริ่มต้น		90	0.16	0.577	0.577	0.577	49.2212	30763.2743	2.769			
pH	8	ก่อนกรอง	90	0.16	0.476	0.513	0.495	41.9204	26200.2212	2.358	1.153	48.87632987	44.84488679
Enz	0.10%	filtrate	70	0.16	0.256	0.267	0.262	21.3009	13313.0531	0.932			
		ชะ 1	101	0.7	0.116	0.195	0.156	11.9204	1702.9077	0.172			
		ชะ 2	100	4	0.239	0.242	0.241	19.4425	486.0619	0.049			
pH	8	ก่อนกรอง	90	0.16	0.492	0.506	0.499	42.3186	26449.1150	2.380	1.203	50.54796758	46.81922602
Enz	0.50%	filtrate	71	0.16	0.278	0.29	0.284	23.2920	14557.5221	1.034			
		ชะ 1	102	0.7	0.105	0.094	0.100	6.9646	994.9431	0.101			
		ชะ 2	100	4	0.348	0.31	0.329	27.2743	681.8584	0.068			
pH	8	ก่อนกรอง	90	0.16	0.476	0.462	0.469	39.6637	24789.8230	2.231	1.050	47.05433374	40.84909512
Enz	1%	filtrate	72	0.16	0.258	0.248	0.253	20.5487	12842.9204	0.925			
		ชะ 1	102	0.7	0.092	0.064	0.078	5.0619	723.1353	0.074			
		ชะ 2	100	4	0.2	0.306	0.253	20.5487	513.7168	0.051			
pH	8	ก่อนกรอง	90	0.16	0.475	0.47	0.473	39.9735	24983.4071	2.249	1.052	46.80144498	40.94683256
Enz	5%	filtrate	73	0.16	0.243	0.238	0.241	19.4425	12151.5487	0.887			
		ชะ 1	102	0.7	0.074	0.077	0.076	4.8407	691.5297	0.071			
		ชะ 2	100	4	0.395	0.503	0.449	37.8938	947.3451	0.095			

14. ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ตารางที่ ข.20 สรุปผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามและเปอร์เซ็นการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

% เอทานอล	% Protein Removal	% สูญเสียโพลีแซคคาไรด์
1	100.785	42.126
3	95.122	42.478
5	91.546	42.194

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข.21 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อการแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขาม

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[protein in dilute sample]	[protein in sample]	ปริมาณโปรตีน	protein removal	(%removal)
	pH		(ml)	(%v/v)				(mg/ml dilute sample)	(mg/ml sample)	(mg)	(mg)	เทียบกับก่อนกรอง
	เริ่มต้น		190	4	0.666	0.72	0.693	0.2874	7.1859	1365.325		
pH	8	ก่อนกรอง	90	4	0.628	0.623	0.626	0.2583	6.4566	581.097	586.404	100.9132456
ethanol	0.00%	filtrate	73	4	0.687	0.691	0.689	0.2857	7.1427	521.417		
		ชะ 1	102	10	0.18	0.163	0.172	0.0621	0.6206	63.301		
		ชะ 2	100	40	0.049	0.038	0.044	0.0067	0.0169	1.685		
pH	8	ก่อนกรอง	190	4	0.661	0.662	0.662	0.2738	6.8456	1300.661	1310.871	100.784988
ethanol	1.00%	filtrate	163	4	0.709	0.686	0.698	0.2894	7.2345	1179.230		
		ชะ 1	105	10	0.323	0.313	0.318	0.1254	1.2537	131.641		
		ชะ 2	100	40	0.174	0.165	0.170	0.0612	0.1530	15.299		
pH	8	ก่อนกรอง	190	4	0.734	0.695	0.715	0.2967	7.4182	1409.460	1340.702	95.12165208
ethanol	3%	filtrate	163	4	0.735	0.698	0.717	0.2976	7.4398	1212.691		
		ชะ 1	105	10	0.325	0.295	0.310	0.1219	1.2192	128.011		
		ชะ 2	100	40	0.166	0.167	0.167	0.0599	0.1497	14.975		
pH	8	ก่อนกรอง	190	4	0.75	0.778	0.764	0.3181	7.9530	1511.074	1383.325	91.5457711
ethanol	5%	filtrate	163	4	0.737	0.756	0.747	0.3106	7.7639	1265.524		
		ชะ 1	105	10	0.293	0.282	0.288	0.1122	1.1219	117.801		
		ชะ 2	100	40	0.15	0.146	0.148	0.0519	0.1298	12.976		

ตารางที่ ข.22 ผลของการใช้เอทานอลร่วมกับเอนไซม์ต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโพลีแซคคาไรด์

ตัวอย่าง			ปริมาตร	[Sample dilute]	abs1	abs2	abs Av.	[polysac in dilute sample]	[polysac in sample]	โพลิแซคคาไรด์	โพลิแซคคาไรด์	%สูญเสีย
pH			(ml)	(%v/v)				(ug/ml dilute sample)	(ug/ml sample)	(g)	สูญเสีย (g)	โพลิแซคคาไรด์
	เริ่มต้น		190	0.16	0.503	0.512	0.508	43.0708	26919.2478	5.115		
pH	8	ก่อนกรอง	90	0.16	0.475	0.47	0.473	39.9735	24983.4071	2.249	1.052	46.801
ethanol	0.00%	filtrate	73	0.16	0.243	0.238	0.241	19.4425	12151.5487	0.887		
		ชะ 1	102	0.7	0.074	0.077	0.076	4.8407	691.5297	0.071		
		ชะ 2	100	4	0.395	0.503	0.449	37.8938	947.3451	0.095		
pH	8	ก่อนกรอง	190	0.16	0.499	0.503	0.501	42.4956	26559.7345	5.046	2.126	42.126
ethanol	1.00%	filtrate	163	0.16	0.221	0.243	0.232	18.6903	11681.4159	1.904		
		ชะ 1	105	0.7	0.146	0.148	0.147	11.1681	1595.4488	0.168		
		ชะ 2	100	4	0.269	0.263	0.266	21.6991	542.4779	0.054		
pH	8	ก่อนกรอง	190	0.16	0.518	0.512	0.515	43.7345	27334.0708	5.193	2.206	42.478
ethanol	3%	filtrate	163	0.16	0.236	0.231	0.234	18.8230	11764.3805	1.918		
		ชะ 1	105	0.7	0.176	0.165	0.171	13.2478	1892.5411	0.199		
		ชะ 2	100	4	0.442	0.411	0.427	35.9027	897.5664	0.090		
pH	8	ก่อนกรอง	190	0.16	0.542	0.511	0.527	44.7522	27970.1327	5.314	2.242	42.194
ethanol	5%	filtrate	163	0.16	0.253	0.222	0.238	19.1770	11985.6195	1.954		
		ชะ 1	105	0.7	0.166	0.172	0.169	13.1150	1873.5777	0.197		
		ชะ 2	100	4	0.436	0.437	0.437	36.7876	919.6903	0.092		

ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างการคำนวณ

1. ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีน คำนวณจากความสัมพันธ์

$$\text{ร้อยละการแยกโปรตีน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในฟิลเตรต+การชะ}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน ก่อนกรอง}} \times 100$$

แทนค่าผลการทดลองจากตารางที่ ข.5 ในภาคผนวก ข
จะได้

$$\text{ค่าร้อยละการแยกโปรตีน} = \frac{568.136 + 90.292}{686.601} \times 100 = 95.897$$

2. ค่าร้อยละการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์ คำนวณได้จากความสัมพันธ์

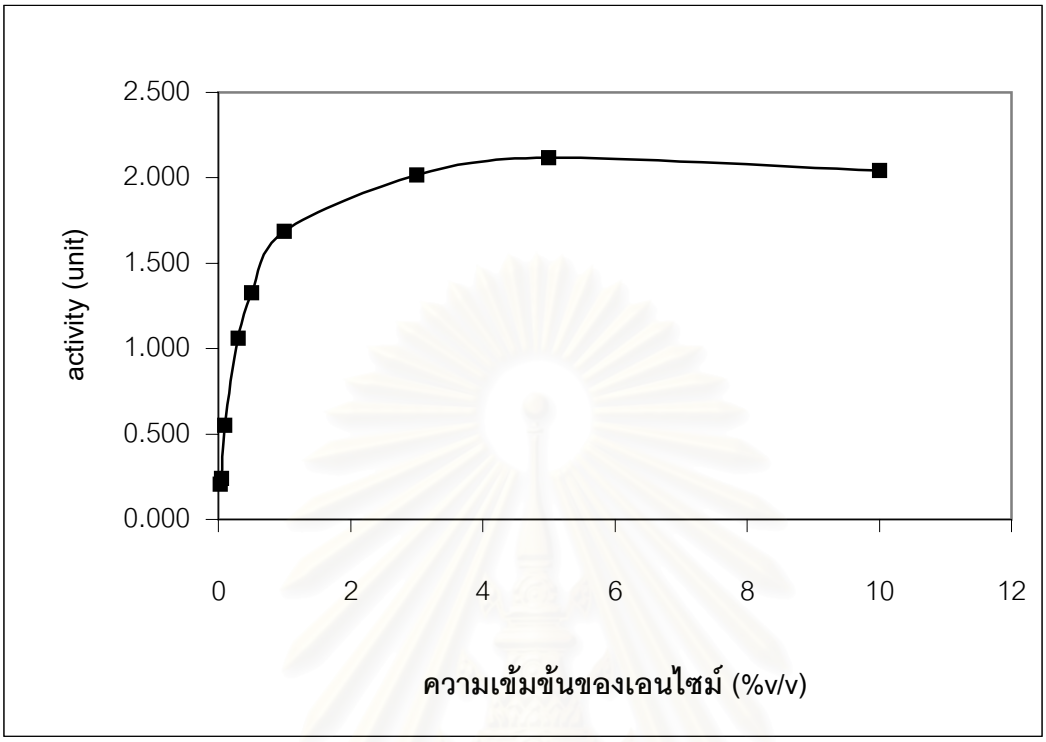
$$\text{ร้อยละการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์ในฟิลเตรต + การชะ}}{\text{ความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์ ก่อนกรอง}} \times 100$$

แทนค่าผลการทดลองจากตาราง ข.6 ในภาคผนวก ข
จะได้

$$\text{ร้อยละการสูญเสียโพลีแซคคาไรด์} = \frac{1.092 + 0.044}{3.028} \times 100 = 37.510$$

3. วิธีการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จำเป็นต้องหาปริมาณเอนไซม์และสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยาพอดีกัน จึงได้ทำการทดลองโดยนำเอนไซม์เข้มข้นมาเจือจาง เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วง 0.1 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วจึงเติมลงไปในสารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร



รูปที่ ค.1 กิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ

พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจะทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในที่นี้จะทำที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

นิยามของกิจกรรมของเอนไซม์ คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย ในเวลา 1 นาทีคือ1 ยูนิตของโปรทีเอส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในภาคผนวก ข
ค่าการดูดกลืนแสง เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย ในเวลา 1 นาที ได้กิจกรรมของโปรทีเอส 1 ยูนิต
ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป 0.434 หน่วย ในเวลา 20 นาที ได้กิจกรรมของโปรทีเอส 0.0217 ยูนิต

ในการวิเคราะห์ดูดเอนไซม์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรมา 100 ไมโครลิตร ได้กิจกรรมของโปรติเอส 0.0217 ยูนิต ถ้าเทียบกิจกรรมของโปรติเอสต่อ 1 มิลลิลิตร (1000 ไมโครลิตร) จะได้ กิจกรรมของโปรติเอส เท่ากับ 0.217 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถเขียน เป็นการคำนวณดังนี้

เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ได้ กิจกรรมของเอนไซม์ 0.0217 ยูนิต

เอนไซม์ 1000 ไมโครลิตร จะได้กิจกรรมของเอนไซม์ $= \frac{0.0217 \times 1000}{100}$

= 0.217 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองใช้เอนไซม์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มีกิจกรรม 0.217 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที ถ้าเอนไซม์เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ไม่มีการเจือจางจะมีกิจกรรม 4.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที

4. การหาเปอร์เซ็นต์ yield

จากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น 100 กรัม จะมีโพลีแซคคาไรด์ 68.06 กรัม หลังจากแยกโปรตีนออกจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามที่สภาวะที่ดีที่สุด จะทำให้สูญเสียโพลี-แซคคาไรด์ 58.267 เปอร์เซ็นต์ ของโพลีแซคคาไรด์ในผงเนื้อในเมล็ดมะขาม ซึ่งคิดเป็น

สูญเสียโพลีแซคคาไรด์ $= \frac{68.06 \times 58.267}{100}$

= 39.656 กรัม

ดังนั้นจะได้โพลีแซคคาไรด์หลังจากแยกโปรตีนแล้ว = 68.06 – 39.65 = 28.4 กรัม

ดังนั้นจากผงเนื้อในเมล็ดมะขามเริ่มต้น 100 กรัมจะได้โพลีแซคคาไรด์ 28.4 กรัม หรือ 28.4 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิภาวดี แสงยนต์ เกิดเมื่อวันที่ 22 มีนาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาในหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย