ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกโปรตีน สารประกอบฟีนอลิค และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากมัสตาร์ด

ชื่อผู้เขียน นางสาววรวิมล ตระการศิรินนท์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม	ประธานกรรมการ
อ. ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช	กรรมการ
อ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

แม้มัสตาร์ดจะมีปริมาณโปรตีนอยู่สูง แต่การนำมาใช้ประโยชน์ถูกจำกัดเนื่องจากมีสารที่ลดคุณค่าทางโภชนาการ เช่น สารประกอบฟีนอลิค ซึ่งสามารถถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส แล้วเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ำ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกโปรตีนออกมาให้ได้มากที่สุด รวมทั้งหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในกากมัสตาร์ด อีกทั้งยังทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการ

ในการศึกษาการแยกโปรตีนจากกากมัสตาร์ดด้วยสารละลาย Na_2CO_3, $(NaPO_3)_6$ pH 1 และ pH 11 พบว่า การสกัดโปรตีนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยสารละลาย $(NaPO_3)_6$ pH 1 จะได้โปรตีนมากที่สุดถึง 51.85% ของโปรตีนในกากมัสตาร์ด รองลงมาคือ สารละลาย Na_2CO_3 ซึ่งสกัดโปรตีนได้ 45.98% แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสิ่งที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย $(NaPO_3)_6$ pH 1 และ Na_2CO_3 ดังกล่าว โดยวิธี Kjeldahl พบว่า โปรตีนที่ได้จากการสกัดทั้งสองแบบ จะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่จริงในปริมาณเพียง 10.00 และ 23.32% ของโปรตีนเริ่มต้น ตามลำดับ

ในการตรวจสอบหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในกากและเมล็ดมัสตาร์ด โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ และแบบผิวบาง พบ sinapic acid เป็นส่วนประกอบหลัก ทั้งในรูปอิสระ รูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกาก โดยในกากและเมล็ดมัสตาร์ด พบสารประกอบฟีนอลิคในรูปอิสระมากที่สุด ในปริมาณ 37.9 และ 117.8 mg/100 g กาก และเมล็ด ตามลำดับ ส่วนรูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับกากในกากมัสตาร์ด มีปริมาณ 15.1, 7.7 และ 36.7 mg/100 g กากมัสตาร์ด ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดมัสตาร์ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในรูปเอสเทอร์ รูปที่จับกับโปรตีน และรูปที่จับกับเมล็ด 57.6, 25.2 และ 59.3 mg/100 g เมล็ด ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเมล็ดมัสตาร์ดนั้น พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ ได้แก่ การสกัดด้วยสารละลาย 0.1 M Citric acid- 0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80 % $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ CM Sephadex ตามด้วย Con A Sepharose จะได้เอนไซม์สุดท้ายออกมาในปริมาณ 1.92 % และมีความบริสุทธิ์ 104.71 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น แต่ถ้านำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน ultrafiltration แล้วตามด้วยคอลัมน์ CM Sephadex และ Con A Sepharose จะได้เอนไซม์ในปริมาณ 12.86 % และมีความบริสุทธิ์ 33.14 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ Con A Sepharose มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS polyacrylamine gel electrophoresis พบโปรตีนที่เด่นชัด 1 แถบ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 40,700 ดาลตัน เมื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ได้หลังผ่าน Con A Sepharose พบว่า อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 ตามลำดับ เมื่อใช้ gallic acid เป็นสับสเตรท เอนไซม์สามารถออกซิไดส์สับสเตรทได้หลายตัว เช่น gallic acid และ pyrogallol โดยที่เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเมื่อใช้ p-cresol เป็นสับสเตรท เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.01 mM และ 0.02 μmole/min ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่า 2-mercaptoethanol, cysteine, citric acid และ sinapic acid สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ potassium metabisulphite และ NaCl สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้บางส่วน ในทางตรงกันข้าม $CaCl_2$ สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ประมาณ 2 เท่า

Thesis Title	Extraction of Protein, Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase from Mustard
Author	Miss Worravimon Trakarnsirinont
M.S.	Biotechnology
Examining Committee	Asst. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham — Chairman
	Lect. Dr. Pairoje Kijjanapanich — Member
	Lect. Dr. Hataichanoke Niamsup — Member

ABSTRACT

Mustard has a high protein content but its utilization is limited due to the presence of antinutritional factors such as phenolic compound, which can be oxidized by polyphenol oxidase to form unfavorable brown product. Therefore, the objective of this study was to extract protein with maximum yield, to estimate phenolic content and to purify and characterize some properties of polyphenol oxidase.

Established approaches for the protein isolation from mustard meal involve extraction of protein using Na_2CO_3 or $(NaPO_3)_6$ solution at pH 1 and pH 11. The maximum yield of protein was obtained by extracting mustard meal at 80 degree celcius for 4 h with $(NaPO_3)_6$ pH 1 (51.85 %) followed by Na_2CO_3 (45.98 %). However, the protein content of $(NaPO_3)_6$ pH 1 and Na_2CO_3 extracts determined by Kjeldahl method were merely 10.00 and 23.32 %, respectively.

Identification and quantitative determination of phenolic compounds in mustard meal and seed by paper and thin layer chromatography were carried out. It

was found that sinapic acid was the major component of phenolic compounds present in all free, esterified, protein-bound and meal-bound forms of mustard meal and seed. Phenolic compounds in free form was the most abundant found in mustard meal and seed (37.9 and 117.8 mg/100 g meal or seed respectively). The amounts of phenolic compounds in esterified, protein-bound and meal-bound forms from mustard meal were found to be 15.1, 7.7 and 36.7 mg/100 g meal, respectively while the mustard seed contained 57.6, 25.2 and 59.3 mg/100 g seed, respectively.

Purification and characterization of polyphenol oxidase from mustard seed was performed. Polyphenol oxidase was optimally extracted with 0.1 M Citric acid-0.2 M Na_2HPO_4 pH 7 for 1 h. Precipitation with 80% $(NH_4)_2SO_4$ saturation followed by CM Sephadex and Con A Sepharose chromatography were used in order to purify enzyme. After the final step, 1.92 % yield with 104.71 purification fold was obtained. However if the crude enzyme was concentrated using ultrafiltration instead of $(NH_4)_2SO_4$ precipitation followed by CM Sephadex and Con A Sepharose chromatography, the yield was 12.86 % with 33.14 purification fold. The SDS polyacrylamine gel electrophoresis of the enzyme fraction from Con A Sepharose column showed one distinct band with molecular weight ca 40,700 daltons. Some properties of the purified polyphenol oxidase were studied. The purified enzyme had an optimum temperature and pH of 55 degree celcius and 8.0 respectively with gallic acid as substrate. Gallic acid and pyrogallol were good substrates for the enzyme with no detectable monophenolase activity with p-cresol. The K_m and V_{max} of enzyme were 1.01 mM and 0.02 μmole/min respectively. 2-mercaptoethanol, cysteine, citric acid and sinapic acid could completely inhibit enzyme while potassium metabisulphite and NaCl could partially inhibit enzyme activity. On the other hand, $CaCl_2$ could activate enzyme by 2 fold.