รายงานโครงการวิจัย

การสกัดโปรตีนด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตจากเมล็ดมะรุมปราศจากน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี $SCCO_2$

Subcritical water extraction of protein from oil-free Moringa seed obtained from $SCCO_2$ extraction

โดย

นางสาวชนนิกานต์ แสวงศิริผล รหัสนิสิต 5932911223

นางสาวอรวรา มหาวงค์ รหัสนิสิต 5932975423

อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.เรืองวิทย์ สว่างแก้ว

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การสกัดโปรตีนด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตจากเมล็ดมะรุมปราศจากน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี $SCCO_2$ (Subcritical water extraction of protein from oil-free Moringa seed obtained from $SCCO_2$ extraction)

ชื่อนิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวชนนิกานต์ แสวงศิริผล

นางสาวอรวรา มหาวงค์

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในโครงการ ดร. เรืองวิทย์ สว่างแก้ว

ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

มะรุมเป็นสมุนไพรไทยที่สามารถรับประทานได้ทุกส่วนและมีสรรพคุณมากมาย นอกจากนี้ยังสามารถสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดของมะรุมด้วยวิธี Supercritical CO_2 extraction เพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยภายหลังการสกัดน้ำมันด้วยวิธีนี้เมล็ดมะรุมจะยังคงมีสารสำคัญ เช่นโปรตีนที่สามารถสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต หรือ Subcritical water extraction ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม คงอยู่และไม่ถูกทำลาย โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างเมล็ดมะรุมกับน้ำ และเวลาในการสกัดโปรตีนเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ 10 % โดยมวลต่อปริมาตร และเวลาใช้ในการสกัด 60 นาที แสดงปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 1584.15 ไมโครกรัมซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay และจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดมีขนาดเท่ากับ 11-17 kDa

คำสำคัญ: การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต, เมล็ดมะรุม, การสกัดโปรตีน, SDS-page, Bradford assay

ภาควิชา เคมีเทคนิค ลายมือชื่อนิสิต ชนนิกานต์ แสวงศิริผล

ลายมือชื่อนิสิต อรวรา มหาวงค์

สาขา เคมีวิศวกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Title Subcritical water extraction of protein from oil-free Moringa seed obtained from $SCCO_2$ extraction

Student name Ms. Chonnikan Swangsiriphon

Ms. Onwara Mahawong

Advisor Prof. Dr. Somkiat Ngamprasertsith

Co-Advisor Dr. Ruengwit Sawangkeaw

Department of Chemical Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

ABSTRACT

Moringa is a Thai herb that can be eaten all parts and has many advantages. It can be also extracted substances as a food supplement such as oil by supercritical CO_2 method. After oil extraction, Moringa seed meal still contains important substances such as protein that can be extracted by subcritical water method. Consequently, this research was aimed to study the effect of temperature, ratio between Moringa seed and water and time for extracting protein to be most effective by subcritical water. The results found that at 110 °C, the ratio of 10% Moringa (w/v) and the extraction time of 60 minutes showed the maximum protein quantity of 1584.15 µg using Bradford assay method. The molecular size of protein extracted from Moringa seed was 11-17 kDa using SDS-PAGE.

Keywords: Subcritical water extraction, Moringa seed, Protein extraction, SDS-page, Bradford assay

Department of Chemical Technology Student's signature Chonnikan Swangsiriphon

Student's signature Onwara Mahawong

Major: Chemical Engineering Advisor's signature Somkiat Ngamprasertsith

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ อาจารย์ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและแนวความคิดในโครงการวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ดร.เรืองวิทย์ สว่างแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ แนวความคิด และแนวทางในการวางแผนการทำงาน ตลอดจนให้ความเห็นเพื่อปรับปรุงแก้ไขการทำโครงการวิจัยให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาววิลาสินี ศุภางค์ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเคมีเทคนิค ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดโครงการวิจัย คำปรึกษา และแนะนำชี้แนวทางการทำงาน รวมถึงกำลังใจที่มอบให้จนกระทั่งทำโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณบุคลากรสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือ และห้องปฏิบัติการ ตลอดจนคำแนะนำในการทำโครงการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนเสริมประสบการณ์ในการทำโครงการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวที่อยู่เบื้องหลังและเงินทุนสนับสนุนทางการศึกษาเพื่อโอกาสทางการศึกษาที่ดีตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญรูป 7
สารบัญตาราง 8
บทที่ 1 บทนำ 9
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ 9
1.2 วัตถุประสงค์ 10
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 10
1.4 วิธีการดำเนินงาน 10
บทที่ 2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
2.1 มะรุม (Moringa) 11
2.2 กรดอะมิโนและโปรตีน 14
2.3 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE) 21
2.4 Bradford assay 23
2.5 การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (Subcritical Water Extraction) 24
2.6 Autoclave 28
2.7 Isoelectric point 29
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 30
3.1 สารตั้งต้นและสารเคมี 30
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 30
3.3 วิธีการทดลอง 32
3.3.1 การสกัดโปรตีนด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต 32
3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 32
3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay 33

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 34
4.1 ผลการวิเคราะห์หาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 34
4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay 35
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 38
5.1 สรุปผลการทดลอง 38
5.2 ข้อเสนอแนะ 38
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 41
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay 42

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ดอก ผล และใบมะรุม 11

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโนโดยทั่วไป 14

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไปทั้ง 20 ชนิด 15

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของกรดอะมิโนแบบ zwitter หรือ dipolar ions 16

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ระดับ 18

รูปที่ 2.6 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีน มีรูปร่างเป็นเส้นเหยียดและมีประจุลบ 22

รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งเป็นสีย้อมใช้สำหรับ Bradford Assay 23

รูปที่ 2.8 สเปคตรัมของสี Coomassie brilliant Blue G-250 เมื่อไม่ไดจับกับโปรตีน (สีแดง) และสเปคตรัมของสี Coomassie brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีน (สีเขียว) 24

รูปที่ 2.9 แผนภาพเฟสของน้ำในฟังก์ชันของอุณหภูมิและความดัน 25

รูปที่ 2.10 ผลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยของ *Z.multiflora* ที่ได้จาก SWE โดยใช้น้ำหนักตัวอย่าง 4 g, อัตราการไหล 2 ml/min,ขนาดอนุภาค 0.5 mm, ความดัน 20 barและเวลาสกัด 60 min 27

รูปที่ 2.11 ผลของขนาดอนุภาคต่อประสิทธิภาพของ a) Thymol และ b) Carvacrol ของ *Z.multiflora* ที่ได้จาก SWE โดยใช้น้ำหนักตัวอย่าง 4 g, อัตราการไหล 2 ml/min, อุณหภูมิที่ 150°C และความดัน 20 bar 28

รูปที่ 2.12 การทำงานของหม้อนึ่งความดัน 29

รูปที่ 3.1 เครื่อง Autoclave ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVA-110 31

รูปที่ 3.2 เครื่อง Incubator และอุปกรณ์สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง 31

รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์หาขนาดโปรตีนของสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำและเวลาที่ต่างกัน 34

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ Standard protein (BSA) 42

รูปที่ ข.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (ก) ถาดที่ 1 (ข) ถาดที่ 2 (ค) ถาดที่ 3 (ง) ถาดที่ 4 43

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของใบมะรุม ผง เมล็ด และฝัก 12

ตารางที่ 2.2 ปริมาณ Thymol และ Carvacrol (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง) ของน้ำมัน Z.multiflora ที่สกัดด้วยวิธีน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (SWE), Hydrodistillation และ Soxhlet 26

ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขของสารตัวอย่างที่แทนบนแผ่นเจล 35

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณของโปรตีนที่ทดสอบด้วยวิธี Bradford assay 35

ตารางที่ ข.1 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 1 44

ตารางที่ ข.2 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 2 45

ตารางที่ ข.3 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 3 46

ตารางที่ ข.4 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 4 47

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรธรรมชาติ จึงส่งผลให้การเพาะปลูกพืชผลทางการเกษตรมีคุณภาพ ประเทศไทยจึงมีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรมากประเทศหนึ่งของโลก มะรุมเป็นไม้ยืนต้นที่เติบโตในพื้นที่เขตร้อน ประเทศไทยจึงมีต้นมะรุมอยู่มาก คนไทยส่วนใหญ่จะนำฝักของมะรุมมาปรุงอาหาร เช่น แกงส้ม หรือนำเมล็ดมะรุมมาสกัดน้ำมันเพื่อนำไปบำรุงผิวพรรณ การสกัดน้ำมันมะรุมนั้นถือเป็นการแปรรูปที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้เมล็ดมะรุมได้ แต่หลังจากการสกัดน้ำมันแล้ว ในเมล็ดมะรุมมีโปรตีนอยู่มาก ซึ่งโปรตีนสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ ซึ่งถือเป็นการแปรรูปที่ส่งผลให้สินค้ามีมูลค่าเพิ่มขึ้นและเป็นการใช้ประโยชน์จากมะรุมให้ได้มากที่สุด อีกทั้งเป็นการลดปริมาณขยะหรือแนวทางการทำของเสียเป็นศูนย์ (zero waste) โดยในการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดของมะรุมด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์ภาวะเหนือวิกฤต (Supercritical CO_2 extraction) คือการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความดันมากกว่า 300 เท่าของความดันบรรยากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสม ประมาณ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำหน้าที่คล้ายกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย ด้วยการลดความดันภายหลังการสกัด คาร์บอนไดออกไซด์จะเปลี่ยนสถานะกลับกลายเป็นแก๊ส ซึ่งจะทำให้สารที่สกัดนั้นปราศจากสิ่งปนเปื้อนใดๆ การใช้อุณหภูมิที่ต่ำ จะทำให้สารสำคัญ (active ingredients) ยังคงอยู่และไม่ถูกทำลาย มีความใกล้เคียงกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ เพราะเหตุนี้จึงทำให้สารสกัดด้วยวิธีนี้คงสมบัติของพืชนั้น 100% และปราศจากสารปนเปื้อนของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด หลังจากสกัดได้น้ำมันมะรุมแล้ว จะทำให้เหลือกากของเมล็ดมะรุม นำกากไปสกัดโปรตีนด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction) ซึ่งเป็นกระบวนการไฮโดรไลซิสอีกวิธีที่ได้รับความสนใจ ซึ่งสกัดโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดแต่ไม่เกินอุณหภูมิวิกฤต คือ 374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่สามารถรักษาสถานะของน้ำให้อยู่ในสถานะของเหลว ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้โดยการปรับอุณหภูมิหรือความดัน และสามารถนำน้ำที่ใช้ในกระบวนการกลับมาใช้ใหม่ ไม่เป็นอันตรายหรือมีสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และไม่จำเป็นต้องเตรียมวัตถุดิบก่อนเหมือนกับการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ทำให้การสกัดนี้มีประสิทธิภาพสูง ใช้เวลาสกัดน้อย และสารสกัดที่ได้มีคุณภาพสูง เหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงเป็นเหตุผลหลักที่สนใจและเลือกใช้ในการทำการวิจัยในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างน้ำและกากของเมล็ดมะรุม และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต

2. วิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการสกัดกากเมล็ดมะรุมที่ภาวะที่เหมาะสม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับความรู้จากการศึกษาค้นคว้าข้อมูล ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction) เพื่อสร้างประสบการณ์ใหม่ในการทำการทดลอง ฝึกความรับผิดชอบและระเบียบวินัยต่อตนเอง อีกทั้งยังสามารถนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการงานอาชีพในอนาคต

2. สามารถนำความรู้ ความเข้าใจจากการทำงานวิจัยนี้ไปช่วยพัฒนาและต่อยอดในการนำโปรตีนที่ได้จากการสกัดเมล็ดมะรุมไปเป็นอาหารเสริมหรือส่วนประกอบในเวชภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้กระบวนการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์มากที่สุด เป็นการลดปริมาณขยะหรือ zero waste

1.4 วิธีการดำเนินงาน

1. ศึกษาค้นคว้าทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับวิธีการสกัดโดยใช้น้ำภาวะกึ่งวิกฤต
2. ศึกษาค้นคว้าทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์โปรตีน
3. ศึกษาอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง และวางแผนการทดลอง
    - อุณหภูมิในการสกัด 105, 110 และ 120 องศาเซลเซียส
    - สัดส่วนของกากเมล็ดมะรุมกับน้ำร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
    - เวลาที่ใช้ในการสกัด 30 และ 60 นาที
4. ทดลองสกัดกากเมล็ดมะรุมด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตในเครื่อง Autoclave
5. วิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการสกัดกากเมล็ดมะรุมด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตที่ภาวะที่เหมาะสม
    - วิเคราะห์หาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
    - วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay
6. อภิปรายสรุปผลการทดลองและเขียนเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะรุม (Moringa)

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Moringa oleifera Lam. มีชื่อสามัญว่า Horse Radish Tree จัดอยู่ในวงศ์ Moringaceae มีถิ่นกำเนิดแถบใต้เชิงเทือกเขาหิมาลัย เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 3-4 เมตร ทรงต้นโปร่ง ใบเป็นแบบขนนก หรือคล้ายกับใบมะขาม ออกเรียงแบบสลับกัน ผิวใบสีเขียว ด้านล่างสีจะอ่อนกว่าด้านบน ดอกออกเป็นช่อสีขาว กลีบดอกมี 5 กลีบ ผลหรือฝักมีความยาว 20-50 เซนติเมตร ลักษณะเหมือนไม้ตีกลอง เปลือกผลหรือฝักเป็นสีเขียว มีส่วนคอดและส่วนมนเป็นระยะตามความยาวของฝัก ฝักแก่ผิวเปลือก เป็นสีน้ำตาล เมล็ดมีเยื่อหุ้มกลมเป็นสีน้ำตาล มีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ขยายพันธุ์ได้ด้วยการเพาะเมล็ด หรือการปักชำ หรือรากที่แตกหน่อ

รูปที่ 2.1 ดอก ผล และใบมะรุม [5]

2.1.1 ส่วนประกอบทางเคมีของมะรุม

ใบมะรุม ถือเป็นส่วนที่คนนิยมนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์ เนื่องจากใบมะรุมมีปริมาณโภชนะที่สำคัญสูง (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ใบมะรุมมีเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย ไนโตรเจนฟรีเอ็กแทรกซ์ แคลเซียม ฟอสฟอรัส และพลังงานรวม เท่ากับ 90.38, 23.21, 6.38, 11.10, 12.92, 39.61, 2.35, 0.28 และ 3,911 เมกะแคลอรีต่อกิโลกรัมวัตถุแห้ง ตามลำดับ ซึ่งโปรตีน และพลังงานรวมต่ำกว่าใบกระถิน แต่มีเถ้า และแคลเซียมรวมทั้งกรดอะมิโนหลายชนิดสูงกว่า ได้แก่ ฮิสทิดีน ลิวซีน ไลซีน ฟีนิล อะลานีน และทริปโตเฟน เป็นต้น องค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆ ของมะรุมแสดงในตารางที่ 1 [5]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของใบมะรุม ผง เมล็ด และฝัก [5]

Nutrients	Fresh leaves	Dry leaves	Leaf powder	Seed	Pods
Calories (cal)	92	329	205	-	26
Protein (g)	6.7	29.4	27.1	35.97 ± 0.19	2.5
Fat (g)	1.7	5.2	2.3	38.67 ± 0.03	0.1
Carbohydrate (g)	12.5	41.2	38.2	8.67 ± 0.12	3.7
Fiber (g)	0.9	12.5	19.2	2.87 ± 0.03	4.8
Vitamin B1 (mg)	0.06	2.02	2.64	0.05	0.05
Vitamin B2 (mg)	0.05	21.3	20.5	0.06	0.07
Vitamin B3 (mg)	0.8	7.6	8.2	0.2	0.2
Vitamin C (mg)	220	15.8	17.3	4.5 ± 0.17	120
Vitamin E (mg)	448	10.8	113	751.67 ± 4.41	-
Calcium (mg)	440	2185	2003	45	30
Magnesium (mg)	42	448	368	635 ± 8.66	24
Phosphorus (mg)	70	252	204	75	110
Potassium (mg)	259	1236	1324	-	259
Copper (mg)	0.07	0.49	0.57	5.20 ± 0.15	3.1
Iron (mg)	0.85	25.6	28.2	-	5.3
Sulphur (mg)	-	-	870	0.05	137

2.1.2 สรรพคุณ

มะรุมในทางการแพทย์จะช่วยใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน ควบคุมภาวะความดันโลหิตสูง ช่วยเพิ่มและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย

1. ใบ ใช้ถอนพิษไข้ แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้อักเสบ แก้แผล ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ขับปัสสาวะ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต

2. ยอดอ่อน ใช้ถอนพิษไข้

3. ดอก ใช้แก้ไข้หัวลม เป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ ขับน้ำตา ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันมะเร็ง

4. ฝัก แก้ไข้ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต

5. เมล็ด เมล็ดปรุงเป็นยาแก้ไข้ แก้บวม แก้ปวดตามข้อ ป้องกันมะเร็ง

6. ราก รสเผ็ด หวาน ขม สรรพคุณ แก้อาการบวม บำรุงไฟธาตุ รักษาโรคหัวใจ รักษาโรคไขข้อ (rheumatism)

7. เปลือกลำต้น รสร้อน สรรพคุณขับลมในลำไส้ ทำให้ผายลมหรือเรอ คุมธาตุอ่อน ๆ แก้ลมอัมพาต ป้องกันมะเร็ง คุมกำเนิด เคี้ยวกินช่วยย่อยอาหาร

8. ยาง (gum) ฆ่าเชื้อไทฟอยด์ ซิฟิลิส (syphilis) แก้ปวดฟัน earache, asthma

2.1.3 คุณค่าทางอาหาร

1. ใบ ใบสดใช้กินเป็นอาหาร ใบแห้งที่ทำเป็นผงเก็บไว้ได้นานโดยยังมีคุณค่าทางอาหารสูง ใบมะรุมมีวิตามินเอสูง มีแคลเซียมสูงเกือบเท่านม มีธาตุเหล็กสูงกว่าผักขม มีวิตามินซีมากพอ ๆ กับส้มและมีโพแทสเซียมเกือบเท่ากล้วย

2. ดอกฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แก้หวัด Helminths ป้องกันมะเร็ง

3. ฝัก ฝักมะรุม 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 32 กิโลแคลอรี ประกอบด้วย เส้นใย 1.2 กรัม แคลเซียม 9 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 26 มิลลิกรัม เหล็ก 1.5 มิลลิกรัม วิตามินเอ 532 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.05 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.6 มิลลิกรัม วิตามินซี 262 มิลลิกรัม

4. เมล็ด น้ำมันที่ได้จากการคั้นเมล็ดสดใช้เป็นน้ำมันปรุงอาหาร

5. การปรุงอาหาร ในประเทศไทย ฤดูหนาวจะมีมะรุมจำหน่ายทั่วไป ทั้งตลาดในเมืองและในท้องถิ่น คนไทยทุกภาคครับประทานมะรุมเป็นผัก ชาวภาคกลางนิยมนำมะรุมอ่อนไปปรุงเป็นแกงส้ม และนำดอกมะรุมลวกให้สุกหรือดองรับประทานกับน้ำพริก สำหรับชาวอีสาน ยอดอ่อน ใบอ่อน ช่อดอกอ่อนนำไปลวกให้สุกหรือต้มให้สุก รับประทานเป็นผักร่วมกับป่นแจ่วลาบ ก้อย หรือนำไปปรุงเป็นแกงอ่อม ส่วนฝักอ่อนหรือฝักที่ยังไม่แก่เต็มที่นำมาปอกเปลือกหั่นเป็นท่อนและนำไปปรุงเป็นแกงส้ม หรือแกงลาวได้ นอกจากนี้ ที่จังหวัดชัยภูมิ ยังรับประทานฝักมะรุมอ่อนสด เป็นผักแกล้มร่วมกับส้มตำโดยรับประทานคล้ายกับรับประทานถั่วฝักยาว และชาวบ้านเล่าว่าฝักมะรุมอ่อนนำไปแกงส้มได้โดยไม่ต้องปอกเปลือก ชาวเหนือนำดอกอ่อน ฝักอ่อนไปแกงกับปลา ในต่างประเทศ เช่น อินเดีย มีการทำผงใบมะรุมไว้เป็นอาหาร น้ำใบมะรุมอัดกระป๋อง [6]

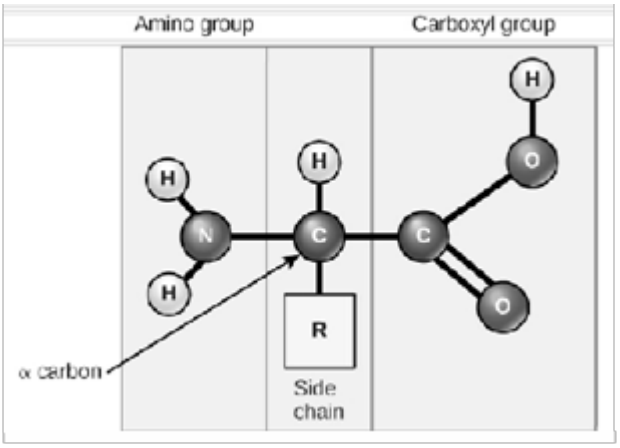
2.2 กรดอะมิโนและโปรตีน

2.2.1 กรดอะมิโน (amino acids)

โปรตีนมีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาวในเส้นพอลิเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ กรดอะมิโนเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีนหรือเป็นมอนอเมอร์ของโปรตีน พบว่าส่วนใหญ่โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด โดยที่ทุกกรดอะมิโนประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีอีกสองกรดอะมิโนที่มีธาตุซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบ

2.2.1.1 ลักษณะทางเคมีของกรดอะมิโน

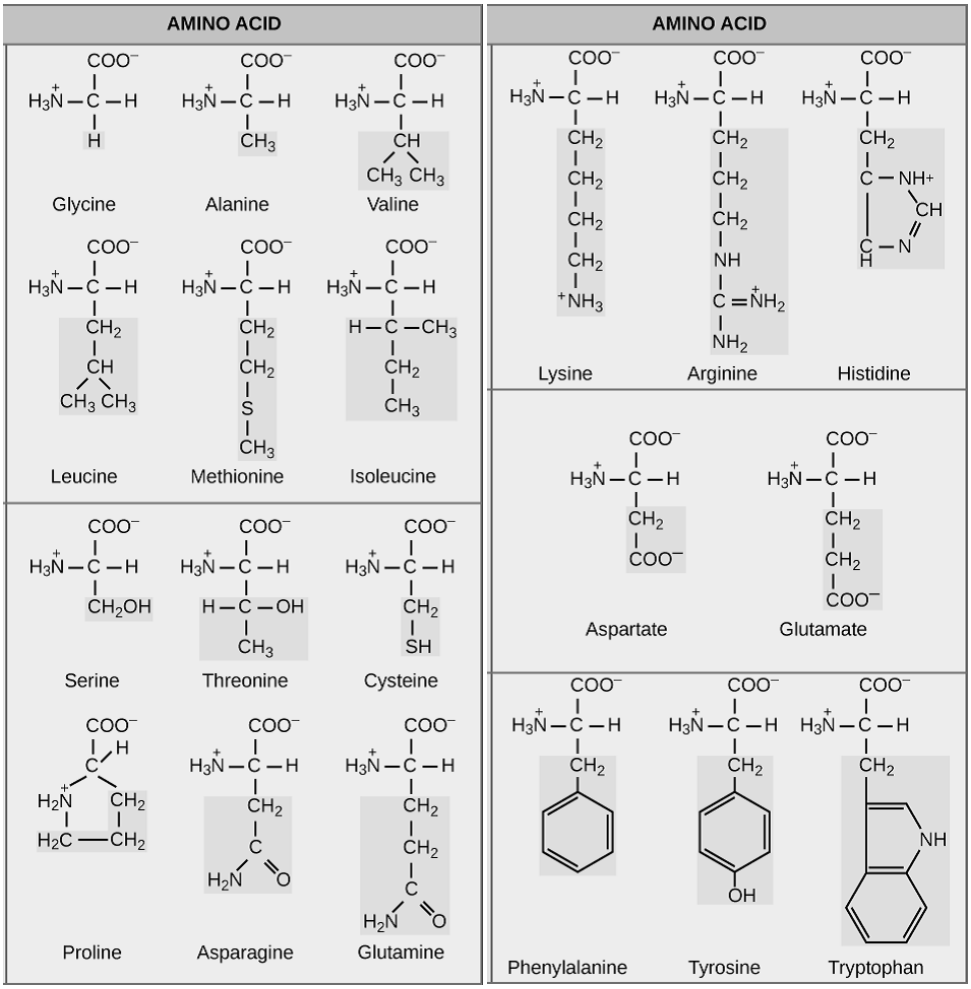
กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตเป็นชนิด L กรดอะมิโนประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เหมือนกันทั้ง 20 ชนิด โดยประกอบด้วย หมู่อะมิโน (-NH2) หมู่คาร์บอกซิก (-COOH) อะตอมไฮโดรเจน และหมู่ R (side chain) ติดอยู่กับคาร์บอนอะตอม ที่ตำแหน่งแอลฟา (α-carbon) โดยกรดอะมิโนชนิด L หมู่อะมิโนจะต้องอยู่ทางซ้ายมือของแอลฟาคาร์บอน สำหรับกรดอะมิโนชนิด D จะมีหมู่อะมิโนมาเกาะอยู่ทางด้าน ขวามือของแอลฟาคาร์บอนอะตอม และจะถูกใช้โดยแบคทีเรียบางชนิดในการสร้างผนังเซลล์และยาปฏิชีวนะบางอย่าง เช่น valinomycin, actino-mycin และ gramicidin S ทั้งนี้โครงสร้างของกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไป 20 ชนิด



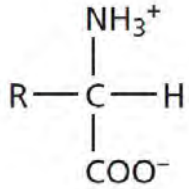
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโนโดยทั่วไป [7]

กรดอะมิโนจะเป็นโมเลกุลที่ไม่สมมาตร (ยกเว้นกรดอะมิโนไกลซีน) โดยจะเห็นได้ว่ากรดอะมิโน เป็นสารที่มีประจุทั้งบวกและลบในโครงสร้าง จากสมบัติของหมู่อะมิโนที่มีแอมโมเนียและหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งการที่สมบัติของกรดอะมิโนมีทั้งประจุบวกและประจุลบ จะเรียกว่าเป็น zwitterion หรือ dipolar ions ทำให้กรดอะมิโนละลายน้ำได้ดี กรดอะมิโนมีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาวมีจุด

เดือดและจุดหลอมเหลวสูง เพราะภายในโครงร้างผลึกจับกันด้วยแรงของประจุ การมีประจุทำให้กรดอะมิโนเป็นตัวนำกระแสไฟฟ้าในสารละลาย นอกจากนี้ยังทำให้กรดอะมิโนมีสมบัติของความเป็นกรดด่างในตัว โดยในภาวะที่ pH เท่ากับ 7 หมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลจะแตกตัวให้ประจุ ซึ่งการมีประจุของกรดอะมิโนจะมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่จุดสมดุลตลอดช่วงของค่า pH (1-14) โดยการมีบทบาทนี้จะทำให้มีผลต่อสมบัติของโปรตีน ซึ่งการจับและหลุดของโปรตอนในหมู่โครงสร้างทั้งสองนี้ทำให้มีผลต่อบทบาทของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นกรดอะมิโนแต่ละตัวอาจแสดงสมบัติเป็นกรด หรือเบสก็ได้ ขึ้นอยู่กับการแตกตัวของหมู่ amino, carboxyl และ side chain ของกรดอะมิโนนั้น กรดอะมิโนจึงจัดเป็น amphoteric compound



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไปทั้ง 20 ชนิด [7]



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของกรดอะมิโนแบบ zwitter หรือ dipolar ions [7]

2.2.1.2 ความสำคัญของกรดอะมิโน

1. ทำหน้าที่เป็นหน่วยโครงสร้างของโปรตีน (binding block) ซึ่งโปรตีนที่เกิดขึ้นอาจจะมีลักษณะและคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป ขึ้นกับสมบัติของกรดอะมิโนแต่ละตัวในสายพอลิเพปไทด์นั้นๆ

2. เป็นตัวส่งสัญญาณเคมีในการติดต่อกันระหว่างเซลล์ เช่น ส่งสัญญาณประสาท เช่น อนุพันธ์ของกรดอะมิโนไทโรซีน

2.2.2 โปรตีน

เป็นพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 100 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะต่างๆโปรตีนแต่ละชนิด ประกอบด้วยชนิดและจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วโปรตีนส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300 โมเลกุล ซึ่งจะมีการขดตัวให้มีรูปร่าง (conformation) ต่างๆ กัน เพื่อประโยชน์ในการทำหน้าที่ที่ต่างกัน

2.2.2.1 โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ สายเดียวหรือหลายสาย ที่ทำหน้าที่ต่างๆ กัน ดังนั้นพอลิเพปไทด์สายยาวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ จึงต้องมีการขดตัว (folding) ให้มีรูปร่างต่างๆ เพื่อทำหน้าที่ให้เหมาะสม โครงสร้างของโปรตีน แบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ

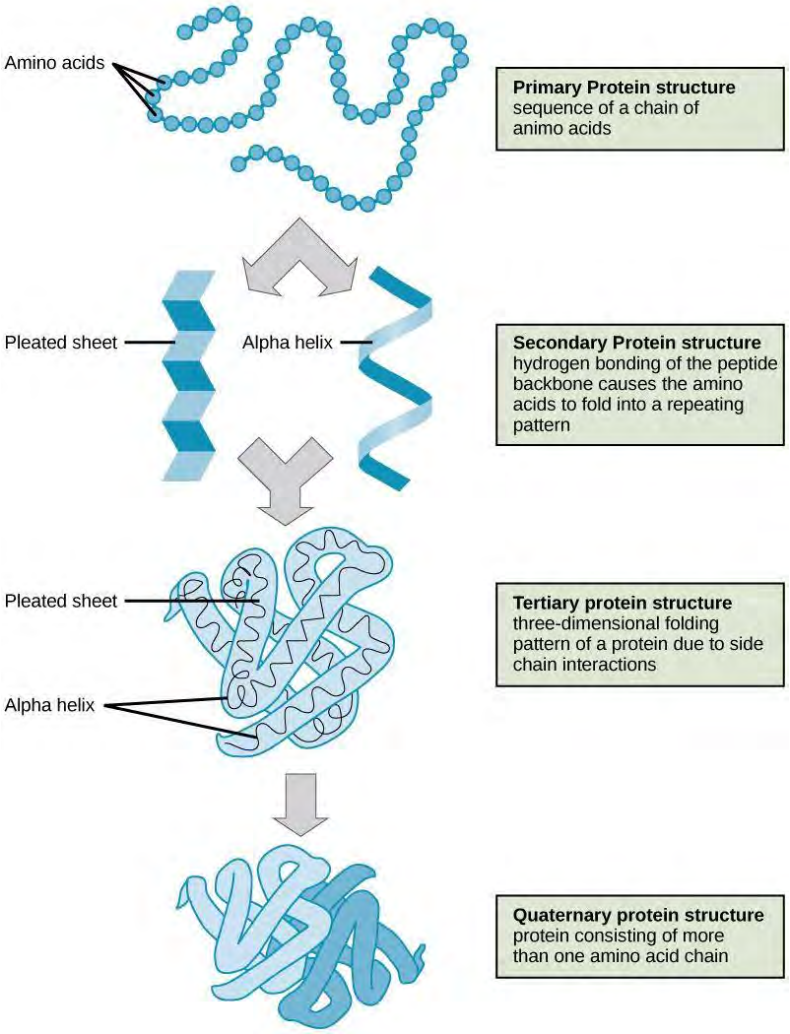
1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโปรตีนที่มีรูปโครงสร้างเป็นเส้นตรงได้จากการสังเคราะห์ใหม่ๆ และจะนำไปเปลี่ยนเป็นรูปโครงสร้างขั้นต่อไป โปรตีนแต่ละชนิดจะมีกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบที่แตกต่างกันและมีการเรียงลำดับที่แตกต่างกันด้วย ส่งผลให้มีการจัดเรียงตัวหรือการม้วนพับของโปรตีนในระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิ หรือจตุรภูมิแตกต่างกัน การอ่านลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างระดับปฐมภูมิจะอ่านจากปลายอะมิโนไปทางปลายคาร์บอกซี โปรตีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างระดับปฐมภูมิ เช่น ไมโอโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนที่จับออกซิเจน พบว่ามีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด เช่น

ไมโอโกลบินในเซลล์ของมนุษย์จะมีกรดอะมิโน 153 ลำดับ ซึ่งเหมือนกันกับไมโอโกลบินในปลาวาฬ หรือแม้แต่ไมโอโกลบินและฮีโมโกลบินก็มีความคล้ายกัน

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) สายพอลิเพปไทด์ จะมีการม้วนตัว (folding) เป็นรูปแบบที่ซ้ำกันและสม่ำเสมอทำให้เกิดลักษณะที่เป็นเกลียว (helix) หรือเป็นแผ่น (pleated sheet) ที่เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลและหมู่อะมิโนในสายของพอลิเพปไทด์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้าง 3 มิติ ของสายพอลิเพปไทด์ ที่เกิดจากการม้วนพับเข้าหากันของโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้ได้โครงสร้างที่เสถียรขึ้นและทำหน้าที่ได้ (native form) แต่ละบริเวณที่เกิดการม้วนพับนี้เรียกว่า domains ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยสายพอลิเพปไทด์ โครงสร้างระดับที่สามนี้เป็นโครงสร้างระดับสุดท้ายของสายพอลิเพปไทด์หรือโปรตีนบางตัวที่ประกอบด้วยโซ่เพปไทด์เพียงสายเดียว โครงสร้างระดับนี้มักพบในโปรตีนที่มีรูปร่างกลมรี (globular protein) ที่มักจะมีการม้วนพับโดยให้กรดอะมิโนที่ละลายน้ำได้ยาก (hydrophobic side chain) อยู่ภายในโมเลกุลและให้กรดอะมิโนที่มีหมู่ R ละลายน้ำง่ายอยู่ภายนอก ดังนั้นโปรตีนพวกนี้จึงเหมาะที่จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) โปรตีนหลายชนิดโดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักอณูสูงๆ มักจะมีการจับกลุ่มกันเองของสาย พอลิเพปไทด์มากกว่า 1 สาย ด้วย noncovalent bonds (เช่น salt bridges, H-bond, Van der Waals, hydrophobic) เป็น oligomers หรือ multisubunits ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสถียรขึ้นเป็นโครงสร้างระดับที่สี่ และทำให้โปรตีนทำงาน (function) ได้ในสิ่งมีชีวิต พอลิเพปไทด์แต่ละสายเรียกได้ว่าเป็น monomer หรือ subunit แต่ละ subunit นี้อาจมีโครงสร้างที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ globular protein ที่มีโครงสร้างจตุรภูมินี้ส่วนใหญ่จะเป็น allosteric enzymes หรือmultienzyme complexes ตัวอย่างของโปรตีนที่มีโครงสร้างจตุรภูมินี้คือ ฮีโมโกลบิน ซึ่งประกอบด้วยสายโกลบิน 4 สายมาจับตัวกันด้วยแรง noncovalent ดังกล่าว



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ระดับ [7]

2.2.2.2 การจำแนกประเภทของโปรตีน

สามารถแบ่งออกได้หลายประเภท ดังนี้

1. การจำแนกตามรูปร่าง

1.1 โปรตีนที่มีรูปร่างเป็นสายยาวหรือสานกันเป็นร่างแห (fibrous protein) มักเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำยากและให้ความเหนียว (tough) จึงเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เช่น collagen ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue), elastin, keratin เป็นโปรตีนที่พบที่ผิวหนัง ผม และเล็บ เป็นต้น

1.2 โปรตีนที่มีรูปร่างกลมหรือรี (globular protein) เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี ทำหน้าที่ต่างๆ เช่น เป็นเอนไซม์ฮอร์โมน อิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ

2. การจำแนกตามส่วนประกอบทางเคมี

2.1 Simple proteins เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนล้วนๆ ไม่มีสารอื่นปนอยู่ เช่น แอลบูมิน keratin

2.2 Complex หรือ conjugated protein ประกอบด้วย simple protein และสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน (prosthetic group) รวมอยู่ด้วย

3. การจำแนกตามคุณค่าทางโภชนาการ

3.1 Complete proteins เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสมบูรณ์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นครบทุกชนิด ได้แก่ โปรตีนจากสัตว์ (ยกเว้นเจลาติน) และถั่วเหลือง

3.2 Incomplete proteins เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพไม่สมบูรณ์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นไม่ครบทุกชนิด ได้แก่โปรตีนจากพืชทั่วๆ ไป ยกเว้นถั่วเหลือง

4. การจำแนกตามหน้าที่ในร่างกาย

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายที่สุดในสิ่งมีชีวิต จึงอาจแยกโปรตีนเหล่านี้ตามลักษณะการทำหน้าที่ต่างๆ ได้ดังนี้

4.1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในร่างกาย

4.2 เป็นโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ทำให้เกิดความแข็งแรง เช่น collagen, elastin, fibroin ซึ่งเป็นโปรตีนของเส้นไหม (silk) เป็นต้น

4.3 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว ในช่วงที่เซลล์กำลังมีกิจกรรมต่างๆ เช่น การแบ่งเซลล์ endocytosis exocytosis การเคลื่อนที่แบบ ameboid ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ตัวอย่างของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ actin, tubulin เป็นต้น

4.4 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่อาจจะเกิดกับเซลล์ของร่างกาย เช่น fibrinogen และ thrombin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด อิมมูโนโกลบูลิน หรือ แอนติบอดี้ ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันของร่างกาย และ ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

4.5 เป็นฮอร์โมน ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานต่างๆของร่างกายให้เป็นปกติ เช่น insulin glucagon ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด growth hormone ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย

4.6 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารต่างๆในร่างกาย เช่น ฮีโมโกลบิน ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนจากปอดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ลิโปโปรตีน ทำหน้าที่ขนส่งไขมันจากตับและลำไส้ไปยังอวัยวะต่างๆ transferrin ขนส่งเหล็ก เป็นต้น

4.7 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สะสม เช่น ferritin ทำหน้าที่สะสมเหล็กไว้ในเนื้อเยื่อ, thyroglobulin ทำหน้าที่เก็บไทรอยด์ฮอร์โมนไว้ในต่อมไทรอยด์ เป็นต้น

5. การจำแนกตามลักษณะส่วนอาหารโปรตีน

5.1 โปรตีนแท้ (true protein) ได้จากการจับกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ของกรดอะมิโน เช่น โปรตีนจากพืชและสัตว์หรือได้จากการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์

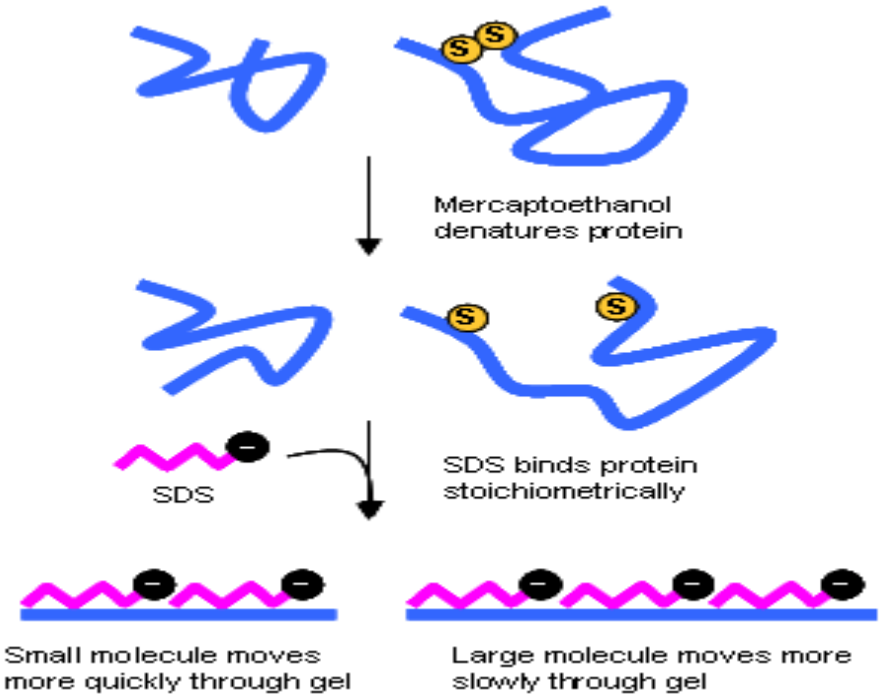
5.2 ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen, NPN) มีหลายชนิด ได้แก่ ยูเรีย ไนเทรต กรดอะมิโนอิสระ เป็นต้น

2.2.2.3 หน้าที่ของโปรตีน

1. เป็นส่วนประกอบของร่างกาย เช่น เลือด, เนื้อ, ขน, เขา, กีบสัตว์และอวัยวะอื่นๆ
2. ทำหน้าที่ขนส่ง (transport protein) คือโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง
3. มีหน้าที่ต่อการสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ที่สึกหรอไปภายในร่างกายสัตว์
4. ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (enzyme) คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาต่างๆในร่างกาย เช่น กระบวนการหายใจ กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการย่อยอาหาร
5. เป็นส่วนประกอบของฮอร์โมนและน้ำย่อย ซึ่งเป็นตัวคอยควบคุมการทำงานของต่อมต่าง ๆ และการย่อยอาหารภายในร่างกายสัตว์ให้เป็นปกติ
6. ช่วยสร้างความเจริญเติบโตของลูกสัตว์ในท้อง และสัตว์ที่กำลังเจริญเติบโต
7. ช่วยในการสร้างผลผลิตต่าง ๆ เช่นการให้นม การให้ไข่ และการให้เนื้อของสัตว์
8. โปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกัน (protective protein) เช่น ภูมิคุ้มกันโรคให้กับร่างกาย
9. ช่วยในการสืบพันธุ์ให้แก่สัตว์ เพราะ sperm และ ovum จะสร้างได้ก็ต้องมีโปรตีน
10. ทำหน้าที่เป็นโปรตีนสะสม (storage protein)
11. ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว (contractile protein) คือโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ของกล้ามเนื้อ คือ ไมโอซิน และแอกติน [7]

2.3 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE)

SDS-PAGE เป็นการวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน Polyacrylamide gel ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด โดย SDS เป็น Detergent ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนโครงสร้างจาก Tertiary structure ไปเป็น Primary structure โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย และ SDS จะจับโปรตีนในอัตราส่วน โดยน้ำหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจล ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัว จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว ไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ซึ่งหมายความว่าจะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว โดย Polyacrylamide gel เกิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลเดี่ยว (Monomer) ของ Acrylamide จนได้เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมกันเป็นโครงข่ายด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Ammonium persulfate และ N, N, N’, N’- Tetramethylenediamine (TEMED) โดย TEMED จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจาก Persulfate ทำให้เกิดการพอลิเมอไรซ์ขึ้น ปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุน รูพรุนของ Polyacrylamide gel จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ Acrylamide ในส่วนผสมของเจล เช่น ถ้าความเข้มข้นของ Acrylamide ต่ำ ขนาดของรูพรุนจะใหญ่ ซึ่งเหมาะสำหรับแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ สำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้น ตัวอย่างโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน เป็นเวลา 2 - 5 นาทีในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอ และมีสารประเภทไทออล (Thiol) เป็นองค์ประกอบ เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ในโปรตีน ภายใต้ภาวะดังกล่าว โปรตีนสวนใหญ่จะเกาะกับ SDS ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบและเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากก็จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า ในขณะที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เมื่อยอมด้วยสี เช่น สีคูแมซีบลู (Coomassie Blue) ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้น และ สามารถนำโปรตีนบนเจลไปศึกษาต่อได้ [1]



รูปที่ 2.6 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียดและมีประจุลบ [1]

2.3.1 โปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐาน (protein marker/protein ladder) คือการนำเอาโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนมาผสมรวมกัน เพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ โดยตัวอย่างของโปรตีนมาตรฐานมีดังนี้

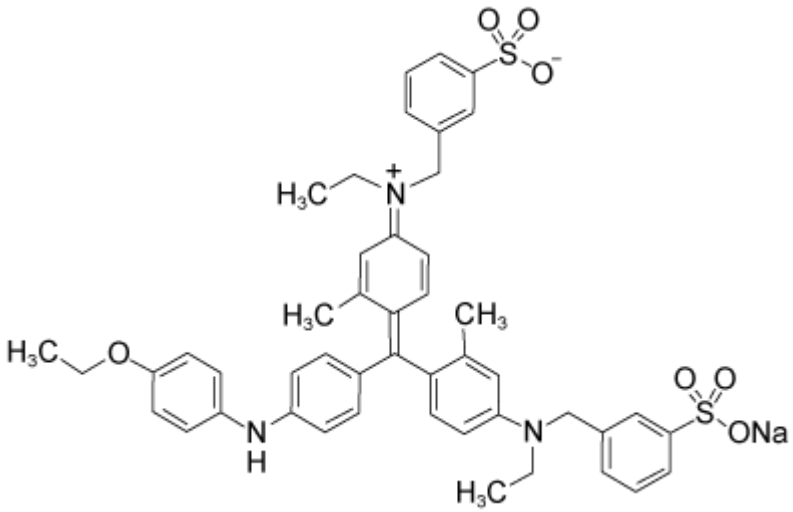
1. แอ็คคิวโปรตีนดีเทคเทเบิล (AccuProtein Detectable) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa โดยเกิดจากการผสมกันระหว่าง โปรตีนมาร์คเกอร์ที่ไม่ติดสี (unstained protein marker) กับโปรตีนมาร์คเกอร์ที่ติดสี (prestained protein marker) โดยแบนด์โปรตีนที่ติดสีนั้นมีอยู่แบนด์เดียวคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24.3 kDa ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับงานวิจัยที่ไม่ต้องติดตามการเคลื่อนที่ของแบนด์โปรตีนระหว่างการรัน ทั้งนี้หลังจากรัน SDS-PAGE เสร็จแล้ว หากนำเจลไปย้อมสี Coomassie หรือย้อม Silver ก็จะทำให้เห็นโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์

2. แอ็คคิวโปรตีนพรีสเตน (AccuProtein Prestained) เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนมาร์คเกอร์ที่ใช้บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 19.7 kDa ไปจนถึง 114.6 kDa ซึ่งโปรตีนทุกตัวในผลิตภัณฑ์นี้เป็นโปรตีนที่ย้อมติดสีมาแล้ว เหมาะสำหรับการศึกษาโปรตีนทุกชนิดใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ต้องการติดตามการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำ SDS-PAGE ขณะรัน

SDS-PAGE สามารถเห็นสีย้อมที่ติดอยู่บนโปรตีนอย่างชัดเจน และสามารถนำไปใช้ต่อในการทดลอง Western Blot ได้อีกด้วย [2]

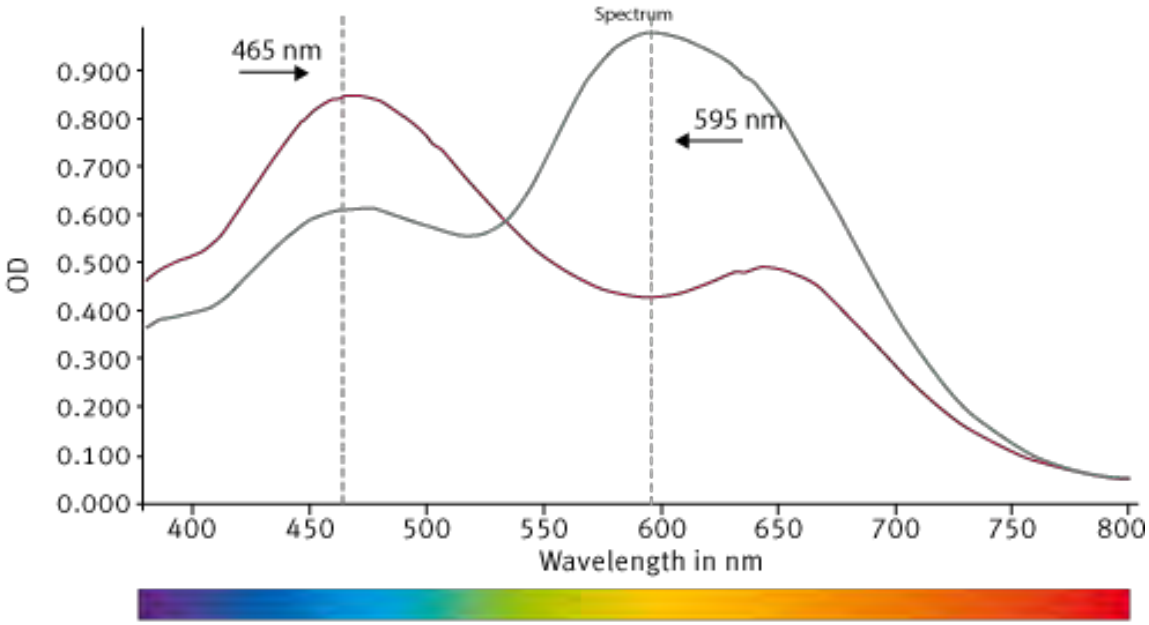
2.4 Bradford assay

เป็นวิธีวิเคราะห์หาโปรตีนโดยอาศัยหลักการความสุมดุลระหว่าง Coomassie Brillant Blue G-250 และการรวมตัวกันของ Coomassie Brillant Blue G-250 กับโปรตีนแบบเฉพาะเจาะจง โดย Coomassie Brillant Blue G-250 เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะกรดเข้มข้นจะให้สีน้ำตาลแดงอ่อนๆออกมา และเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะให้สีน้ำเงิน ซึ่งในการทดสอบหากยิ่งมีปริมาณของกรดอะมิโนมากเท่าใด การเกิดสีก็จะทำได้อย่างชัดเจนมากขึ้นเท่านั้น และจากนั้นจะเป็นการนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงต่อไป



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ Coomassie Brilliant Blue G-250
ซึ่งเป็นสีย้อมใช้สำหรับ Bradford Assay [4]

โปรตีนจะจับกับสี Coomassie Brilliant blue G-250 ด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงยึดเหนี่ยวไอออนิกรวมกัน ประจุบวกที่แขนงข้างของกรดอะมิโนโดยเฉพาะสวนที่เหลือของอารจีนีนมีบทบาทสำคัญในการจับกับโมเลกุลของสีซึ่งมีประจุลบ โมเลกุลของสีในสภาพที่มีประจุลบให้สีน้ำเงิน แต่เมื่อรับโปรตอนแล้วจะเปลี่ยนเปนสีแดงส้มออน ๆ การจับของสีกับโปรตีนในภาวะที่เปนกรดจึงชวยคงสภาพโครงสรางประจุลบของสีไวและใหสีน้ำเงินที่เขมขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่มีอยู นอกจากนี้ยังเปลี่ยนสมบัติการดูดแสงของสีจากเดิมที่มีคา λmax เปน 465 นาโนเมตร ไปเปน 595 นาโนเมตร [3]



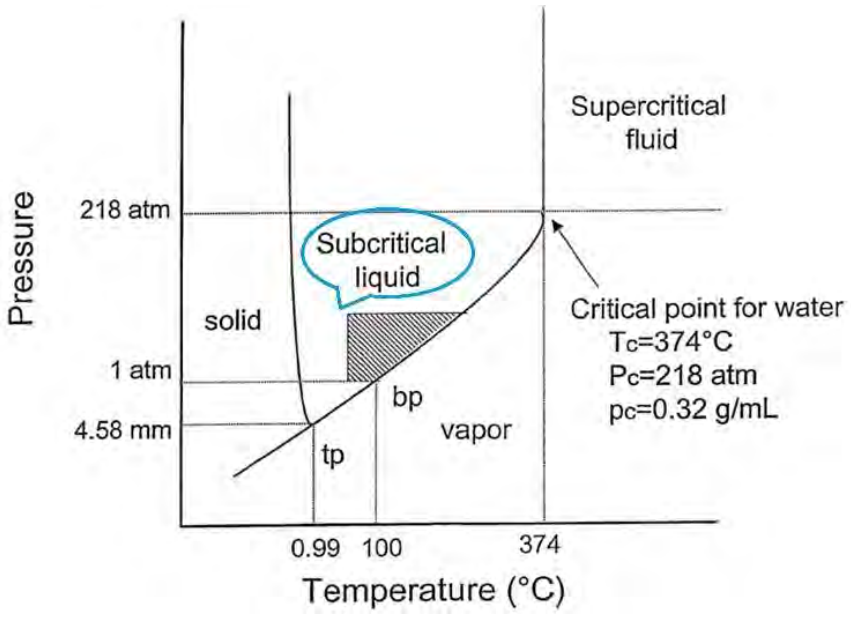
รูปที่ 2.8 สเปคตรัมของสี Coomassie brilliant Blue G-250 เมื่อไมไดจับกับโปรตีน (สีแดง) และสเปคตรัมของสีCoomassie brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีน (สีเขียว) [4]

2.5 การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (Subcritical Water Extraction)

2.5.1 บทนำ

การสกัดส่วนประกอบของพืช วิธีการสกัดใหม่ เช่น การสกัดโดยการใช้ไมโครเวฟช่วย (Microwave assisted extraction: MAE), การสกัดด้วยของไหลภาวะเหนือวิกฤต (Supercritical fluid extraction: SFE), การสกัดด้วยตัวทำละลายเร่งด่วน (Accelerated solvent extraction: ASE) หรือ การสกัดด้วยของเหลวแรงดันสูง (Pressurized liquid extraction: PLE) และ การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction: SWE) หรือที่เรียกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนยวดยิ่ง (Superheated water extraction) หรือการสกัดด้วยน้ำร้อนแรงดันสูง (Pressurized hot water extraction: PHWE) การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (Subcritical water extraction: SWE) เป็นเทคนิคใหม่และมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิระหว่าง 100 ถึง 374 องศาเซลเซียสและที่ความดันสูงพอที่จะรักษาสถานะของเหลว (ดังรูปที่ 1) สมบัติพิเศษของน้ำคือมีจุดเดือดสูงมากสำหรับมวลสารที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูงและขั้วสูง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราการแพร่ ความหนืดและแรงตึงผิวจะลดลงอย่างชัดเจน ด้วยเหตุนี้ทำให้วัตถุดิบที่มีขั้วมาก(มีความสามารถในการละลายในน้ำได้ดี) ที่ภาวะปกติจะถูกดึงออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำกว่า ขณะที่วัตถุดิบที่มีขั้วปานกลางและวัตถุดิบที่ไม่มีขั้วต้องการตัวกลางที่มีขั้วน้อยที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น

จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต เป็นวิธีการสกัดที่สะอาดขึ้น เร็วขึ้นและราคาถูกกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม น้ำมันหอมระเหยของ Z. multiflora ที่สกัดโดยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตเปรียบเทียบกับวิธีการทั่วไป 2 วิธี คือ Hydrodistillation และ Soxhlet พบว่าปริมาณที่สกัดได้ทั้งหมด คือ 2.58, 1.51 และ 2.21% (w/w) ตามลำดับ การเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของ Thymol และ Carvacrol (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง) โดยวิธีการสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต, Hydrodistillation และ Soxhlet ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าปริมาณส่วนประกอบของออกซิเจนจากการสกัดด้วยวิธีน้ำภาวะกึ่งวิกฤตมากกว่าอีก 2 วิธีอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโดยทั่วไปส่วนประกอบที่ไม่เป็นออกซิเจนจะมีความดันไอต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนประกอบที่มีออกซิเจน ดังนั้นส่วนประกอบที่มีออกซิเจนจะสกัดได้ดีกว่าสำหรับการสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต



รูปที่ 2.9 แผนภาพเฟสของน้ำในฟังก์ชันของอุณหภูมิและความดัน [8]

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของ Thymol และ Carvacrol (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง) ของน้ำมันของ *Z.multiflora* ที่สกัดด้วยวิธีน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (SWE), Hydrodistillation และ Soxhlet [8]

Components	SWE*	Hydrodistillation^{+}	Soxhlet extraction^{++}	RI§
Thymol	9.25 (4.77%)**	4.38 (2.97%)	0.94 (2.78%)	1,232
Carvacrol	11.51 (4.33%)	4.06 (3.31%)	1.39 (2.83%)	1,242

Sample weight = 4 g; particle size = 0.5 mm; flow rate = 2 mL/min; temperature = 150°C; pressure = 20 bar; and extraction time = 150 min.

* Extraction time = 150 min.

** Relative SD percent.

\+ Extraction time = 180 min.

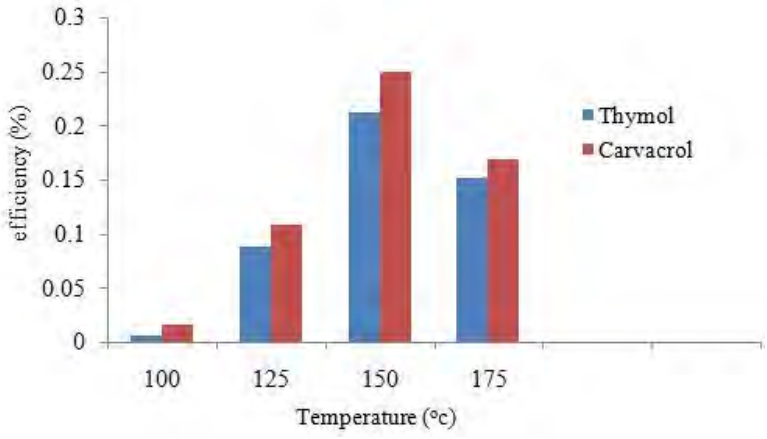
++ Extraction time = 210 min

§ Retention indices (RI) on the DB-5 column.

2.5.2 ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต

2.5.2.1 ผลของอุณหภูมิ

หนึ่งในตัวแปรที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ SWE คืออุณหภูมิของการสกัด เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แรงต้านสนามไฟฟ้าจะลดลง อัตราการแพร่จะเพิ่มขึ้น ความหนืดและแรงตึงผิวจะลดลง SWE สามารถสกัดได้จนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่มันจะอนุญาตหรือหมายถึงการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในการสกัดเหนือค่าค่าหนึ่งก่อให้เกิดการสลายตัวของส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหย อุณหภูมิที่ดีที่สุดจะอยู่ในช่วง 125 และ 175°C อุณหภูมิการสกัดสำหรับ *Z.multiflora* ได้รับการปรับให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ Thymol และ Carvacrol เป็นองค์ประกอบสำคัญ (มากกว่า 72%) โดยมันถูกศึกษาที่อุณหภูมิ 100 ถึง 175°C และเลือกขนาดอนุภาค อัตราการไหล เวลาในการสกัดและความดันที่ 0.5 mm, 2 ml/min, 60 min และ 20 bar ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.10

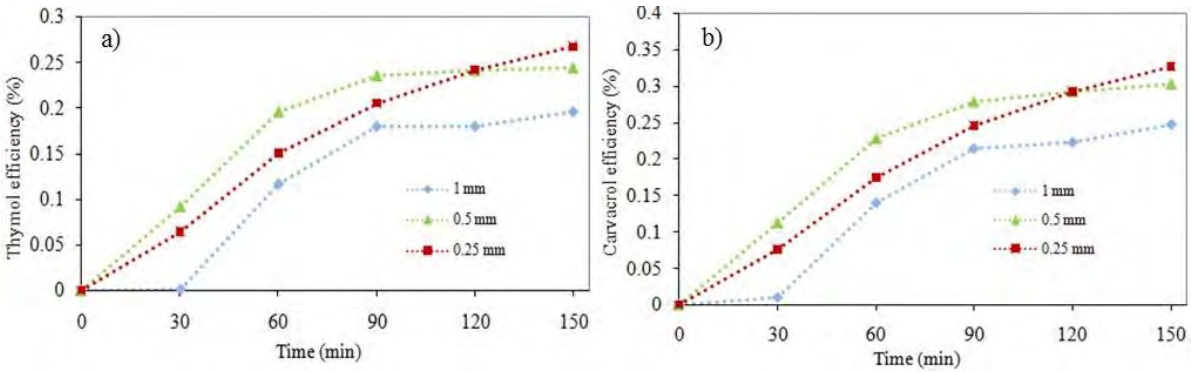


รูปที่ 2.10 ผลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยของ *Z.multiflora* ที่ได้จาก SWE โดยใช้น้ำหนักตัวอย่าง 4 g, อัตราการไหล 2 ml/min, ขนาดอนุภาค 0.5 mm, ความดัน 20 bar และเวลาสกัด 60 min

จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของ Thymol และ Carvacrol เพิ่มขึ้นอย่างคงที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 150˚C แต่ที่อุณหภูมิ 175˚C ประสิทธิภาพลดลงและมีกลิ่นไหม้ของการสกัดเกิดขึ้น มันอาจจะเป็นผลจากการสลายตัวขององค์ประกอบบางอย่าง

2.5.2.2 ผลของขนาดอนุภาค

ผลของอนุภาคต่อประสิทธิภาพการสกัดของ Thymol และ Carvacrol ที่อุณหภูมิ 150˚C, อัตราการไหล 2 ml/min, ความดัน 20 bar และเวลาในการสกัด 150 min ดังแสดงในรูปที่ 2.11 อนุภาคของใบไม้ที่ถูกเลือกมี 3 ขนาด ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1.0 mm ปริมาณสุดท้ายของ Thymol และ Carvacrol ที่ถูกสกัดจากขนาด 0.5 mm มีปริมาณใกล้เคียงกับขนาด 0.25 mm ซึ่งแสดงว่ากระบวนการสกัดอาจจะไม่ได้ถูกควบคุมด้วยการถ่ายโอนมวลของ Thymol และ Carvacrol เพราะมันถูกคาดเดาไว้ว่าขนาด 0.5 mm (ใหญ่กว่า) จะสกัดได้มากกว่าขนาด 0.25 mm



รูปที่ 2.11 ผลของขนาดอนุภาคต่อประสิทธิภาพการสกัดของ a) Thymol และ b) Carvacrol ของ *Z.multiflora* ที่ได้จาก SWE โดยใช้น้ำหนักตัวอย่าง 4 g, อัตราการไหล 2 ml/min, อุณหภูมิที่ 150°C และความดัน 20 bar [8]

การอธิบายที่เป็นไปได้สำหรับการทดลองนี้อาจจะเป็นเพราะอนุภาคอยู่ชิดติดกันที่เวลาเริ่มต้นและเวลาในการสกัดเป็นไปอย่างช้า หลังจากการสกัดเสร็จสมบูรณ์การติดกันของอนุภาคได้แยกห่างออกจากกันและที่ปริมาณการสกัดสุดท้ายของอนุภาคขนาด 0.25 mm มีมากกว่า 0.5 mm สำหรับอนุภาคขนาดใหญ่กว่า 1.0 mm ประสิทธิภาพจะลดลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่ากระบวนการนี้อาจถูกควบคุมโดยการถ่ายโอนมวลของ Thymol และ Carvacrol สำหรับขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำมันหอมระเหยในระหว่างการบดใบไม้และเพื่อให้การทำงานของตัวกรองง่ายขึ้น สำหรับการทดลองเพิ่มเติมค่าของขนาดอนุภาคที่ดีที่สุดคือ 0.5 mm [8]

2.6 Autoclave

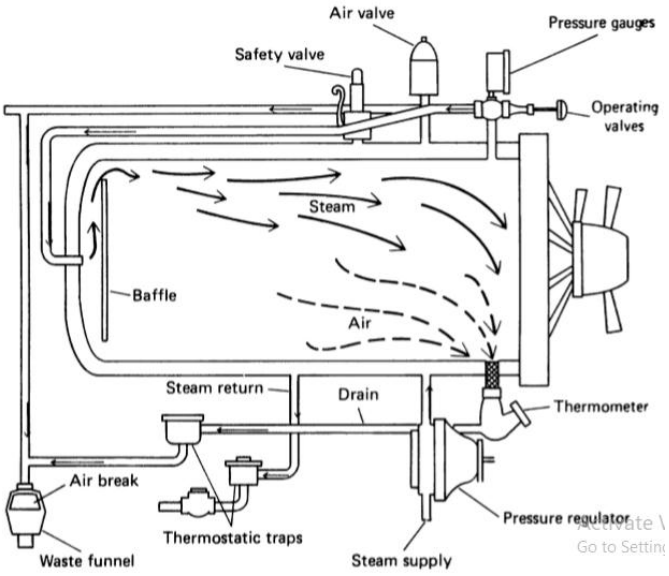
2.6.1 อุณหภูมิและความดันมาตรฐานของหม้อนึ่งความดัน

กระบวนการของหม้อนึ่งความดันดำเนินการที่อุณหภูมิสูงในช่วงเวลาสั้น ๆ มากกว่าอุณหภูมิต่ำแต่เป็นเวลานาน อุณหภูมิและความดันมาตรฐานที่ใช้คือ 115°C/10 psi. , 121°C/15 psi. และ 132°C/27 psi (psi = ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) โดยทั่วไปการนึ่งด้วยความร้อนจะใช้ความร้อนในไอน้ำอิ่มตัวภายใต้ความดันประมาณ 15 psi เพื่อให้ได้อุณหภูมิอย่างน้อย 121°C (250°F)

2.6.2 การทำงานของหม้อนึ่งความดัน

แผนภาพของหม้อนึ่งความดันแสดงให้เห็นถึงความเรียบง่ายของการดำเนินงาน โดยพื้นฐานแล้วไอน้ำจะเข้าสู่แจ็คเก็ตแชมเบอร์ (chamber jacket) ผ่านวาล์วปฏิบัติการ (operating valve) และเข้าไปทางด้านหลังของห้องด้านหลังแผ่นกั้น (baffle plate) ไอน้ำไหลไปข้างหน้าและลงผ่านห้อง (chamber) และโหลดออกจากหม้อที่ด้านล่างด้านหน้า (front bottom) เครื่องปรับความดันรักษาความดันแจ็คเก็ต (jacket) และ แชมเบอร์ (chamber) ที่ความดันอย่างน้อย 15 psi ซึ่งเป็นความดัน

ที่จำเป็นสำหรับไอน้ำอุณหภูมิ 121°C (250°F) มีการป้องกันแรงดันเกิน (overpressure) โดยวาล์วนิรภัย มีการควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ความร้อน (ไอน้ำมากขึ้น) ถูกนำไปใช้จนกว่าจะถึง 121°C ซึ่งจะเริ่มจับเวลาเริ่มทำงานและจะรักษาอุณหภูมิไปจนถึงเวลาที่กำหนด [9]



รูปที่ 2.12 การทำงานของเครื่องหม้อนึ่งความดัน [9]

2.7 Isoelectric point

จุดไอโซอิเลกทริก (isoelectric point) คือค่า pH ที่ประจุรวมของกรดอะมิโน (amino acid) หรือโปรตีน (protein) เป็นศูนย์ เนื่องจากโมเลกุลของกรดอะมิโน และโปรตีน มีทั้งหมู่อะมิโน (amino group) ที่เป็นเบสอ่อน และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่เป็นกรดอ่อน รวมถึง หมู่ R ที่เป็นได้ทั้งที่มีขั้ว หรือมีประจุบวก หรือประจุลบ ทำให้กรดอะมิโนเป็นได้ทั้งกรดและเบส ขึ้นอยู่กับค่า pH

กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ มีประจุรวมเป็นลบ (negative charge) ซึ่งประจุลบที่เหมือนกันจะเกิดแรงจะผลักกัน ทำให้กรดอะมิโนแขวนลอยหรือละลายในน้ำได้ หากมีการปรับค่า pH ของกรดอะมิโนให้ลดลงเท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งประจุรวมของกรดอะมิโนเป็นศูนย์ แรงผลักกันระหว่างประจุที่เหมือนกันจะลดลง ประจุบวกและลบที่มีอยู่เท่าๆ กัน ณ.จุดนี้จะดูดกัน มีผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (protein denaturation) และตกตะกอน (precipitation) ถึงแม้กรดอะมิโนบางชนิดจะยังละลายได้ แต่ค่า pH ที่จุดนี้กรดอะมิโนจะมีการละลายได้น้อยที่สุด ถ้าหากปรับค่า pH ของโปรตีนต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกจะทำให้กรดอะมิโนมีประจุรวมเป็นบวก (positive charge) [11]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตในเครื่อง autoclave

3.1 สารตั้งต้นและสารเคมี

1. กากเมล็ดมะรุม
2. น้ำกลั่น
3. Tris
4. Glycine
5. ผง SDS
6. 10% APS
7. 30% Acrylamide – 0.8% Bisacrylamide
8. TEMED
9. 10% SDS
10. 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8
11. 1.5 M Tris-HCL, pH 6.8
12. Standard protein (BSA)
13. Bradford reagent
14. Protein marker
15. Destaining solution
16. Coomassie blue G-250

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ SDS-PAGE
3. เครื่อง Autoclave
4. เครื่อง Incubator

5. ตู้อบ

6. กระดาษกรอง

7. ชุดกรองสุญญากาศประกอบด้วยปั๊มดูดอากาศที่ต่อกับชุดเครื่องแก้ว

8. กระดาษฟรอยด์

9. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

10. ช้อนตักสาร

11. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กรวยกรอง แท่งแก้วคนสาร เป็นต้น

12. ขวดใส่ตัวอย่าง

13. ไมโครปิเปต ขนาด 1000, 200 และ 100 µl

14. หลอดไมโครเซนติฟิวก์

15. ถาดหลุม 96 well-plate

รูปที่ 3.1 เครื่อง Autoclave ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVA-110

รูปที่ 3.2 เครื่อง Incubator และอุปกรณ์สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1. การสกัดโปรตีนด้วยวิธีน้ำภาวะกึ่งวิกฤต

ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด 105, 110 และ 120 องศาเซลเซียส สัดส่วนของกากเมล็ดมะรุมกับน้ำร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาที่ใช้ในการสกัด 30 และ 60 นาที

3.3.1.1 เตรียมอุปกรณ์และสารตัวอย่างตามแต่ละเงื่อนไข

3.3.1.2 ตั้งค่าเงื่อนไขที่เครื่อง Autoclave

3.3.1.3 นำตัวอย่างที่ได้มากรองแยกระหว่างของเหลวและของแข็งโดยการดูดสุญญากาศ

3.3.1.4 นำของเหลวที่ได้บรรจุใส่ขวดเก็บสารตัวอย่างแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำของแข็งที่ได้จากการกรองไปชั่ง

3.3.1.5 นำของแข็งที่ชั่งเรียบร้อยแล้วเข้าตู้อบโดยทำการอบข้ามคืน แล้วนำมาชั่งใหม่อีกครั้งในวันถัดไป

3.3.2. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.3.2.1. เตรียมสารละลาย Glycine-buffer, 10% APS, 15% Separating gel และ 5% Stacking gel

3.3.2.2. เตรียมแผ่นเจล โดยหยอด 15% Separating gel ลงใน gel sandwich โดยใช้ pipette เติมสารละลายลง โดยหยอดให้ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของความสูงของกระจก ต่อมาจึงหยดน้ำกลั่นลงไปเพื่อทำการไล่ฟองอากาศ จากนั้นรอให้เจลแข็งตัว โดยใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้ทำการเทน้ำกลั่นออกและใช้กระดาษทิชชู่ซับที่ขอบของกระจกให้แห้งจากนั้นหยอด 5% Stacking gel ลงใน gel sandwich โดยใช้ pipette เติมสารละลายให้ท่วมกระจกและทำการไล่ฟองอากาศออก จากนั้นเสียบหวีลงไปในเจลเพื่อทำหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง และเมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ให้ดึงหวีออกจากเจล

3.3.2.3. เตรียมสารตัวอย่างนำเจลที่ได้มาประกอบกับอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นทำการหยอด protein marker และ สารตัวอย่างลงในเจล เมื่อหยอดสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จึงทำการเทสารละลาย Glycine-buffer ลงในอุปกรณ์สำหรับรันเจล โดยใส่ให้ถึงขีดบอกปริมาตรที่กำหนด จากนั้นประกอบอุปกรณ์ให้เรียบร้อย และทำ

การวิเคราะห์โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์ และจะทำการหยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อสารตัวอย่างลงมาถึงขอบล่างของกระจก โดยจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที

3.3.2.4. ย้อมสีแผ่นเจล นำสีย้อมเทใส่กล่องพลาสติกและเขย่าเป็นเวลา 5 นาทีก่อนจะนำเจลใส่ลงไป จากนั้นนำเจลออกจากอุปกรณ์วิเคราะห์ และตัดส่วน Stacking gel ออก และนำส่วน Separating gel มาใส่ไว้ในสีย้อม และเขย่าต่อเป็นเวลา 30 นาที

3.3.2.5. เมื่อย้อมสีเจลเรียบร้อยแล้ว เท Destain ลงในกล่องพลาสติก เขย่าเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดเท Destain ใส่ขวด waste และทำซ้ำอีก 2 รอบ

3.3.2.6. วิเคราะห์โปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบแถบที่ได้กับ protein marker เพื่อประมาณค่าของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของสารตัวอย่าง

3.3.3. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

3.3.3.1. เตรียมสารละลาย Standard protein (BSA) โดยมีความเข้มข้น 100, 80, 60, 40, 20 และ 0 µg/ml

3.3.3.2. ปรับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยสารตัวอย่าง 1 ตัวปรับความเข้มข้นเป็น 3 ความเข้มข้นดังนี้ 1/3, 1/9 และ 1/18 µg/ml

3.3.3.3. ดูดสารตัวอย่างมาปริมาตร 40 µl และดูด Bradford reagent มาปริมาตร 200 µl แล้วหยอดลงในถาดหลุม 96 well-plate

3.3.3.4. นำถาดหลุมพลาสติกใส่ในเครื่อง Incubator ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

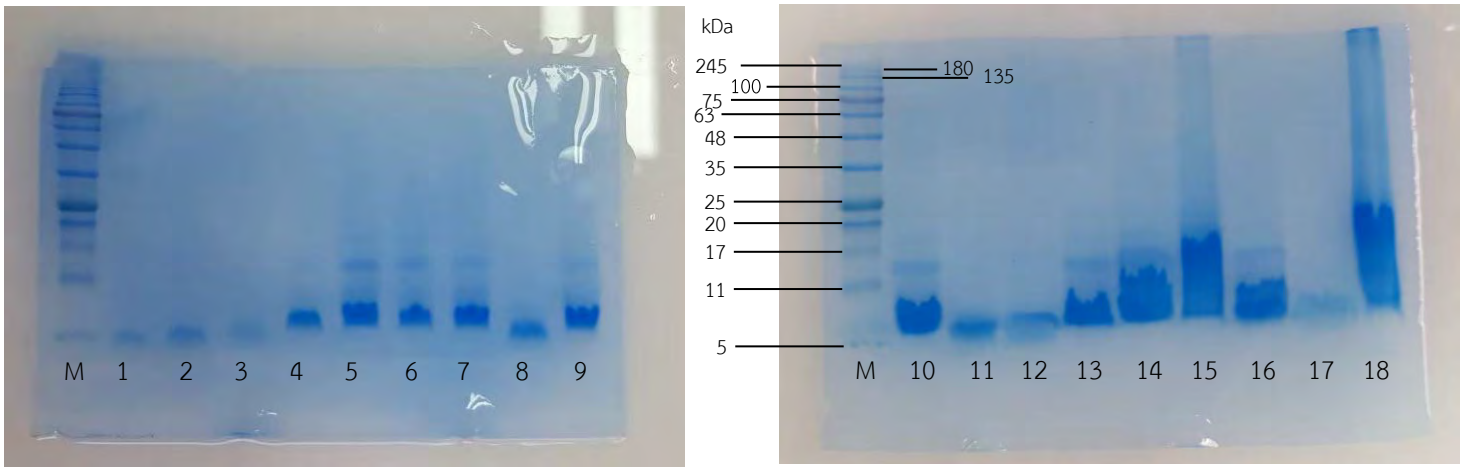
3.3.3.5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณและวิเคราะห์ความเข้นข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง [10]

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตในเครื่อง autoclave โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด 105, 110 และ 120 องศาเซลเซียส สัดส่วนของกากเมล็ดมะรุมกับน้ำร้อยละ 5, 10 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาที่ใช้ในการสกัด 30 และ 60 นาที และทำการทดลองวิเคราะห์หาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

4.1. ผลการวิเคราะห์หาขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์หาขนาดโปรตีนของสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำและเวลาที่ต่างกัน

จากรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดโปรตีนที่สกัดได้กับโปรตีนมาตรฐานพบว่าโปรตีน (ช่อง M) สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างส่วนมากมีขนาดโมเลกุลอยู่ที่ช่วง 11 ถึง 17 kDa ซึ่งขนาดที่ได้ถือว่าเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ง่ายต่อการดูดซึมมากกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ทำให้ลดขั้นตอนในการย่อยโปรตีนลง ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นขนาดโปรตีนที่ได้จึงเหมาะแก่การนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น

ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขของสารตัวอย่างที่แทนบนแผ่นเจล

หมายเลข	อุณหภูมิ/ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ/ เวลาในการสกัด	หมายเลข	อุณหภูมิ/ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ/ เวลาในการสกัด
1	105℃/ 5%/ 30min	10	105℃/ 5%/ 60min
2	105℃/ 10%/ 30min	11	105℃/ 10%/ 60min
3	105℃/ 20%/ 30min	12	105℃/ 20%/ 60min
4	110℃/ 5%/ 30min	13	110℃/ 5%/ 60min
5	110℃/ 10%/ 30min	14	110℃/ 10%/ 60min
6	110℃/ 20%/ 30min	15	110℃/ 20%/ 60min
7	120℃/ 5%/ 30min	16	120℃/ 5%/ 60min
8	120℃/ 10%/ 30min	17	120℃/ 10%/ 60min
9	120℃/ 20%/ 30min	18	120℃/ 20%/ 60min

4.2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน สามารถสรุปการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณของโปรตีนที่ทดสอบด้วยวิธี Bradford assay

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ (%w/v)	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)
105	30	5	38.90
		10	NA
		20	195.13
	60	5	1582.62
		10	151.46
		20	179.32

110	30	5	658.50
		10	เกินค่าสอบเทียบ
		20	1290.31
	60	5	1467.23
		10	1584.15
		20	เกินค่าสอบเทียบ
120	30	5	1533.39
		10	77.10
		20	เกินค่าสอบเทียบ
	60	5	1114.92
		10	197.10
		20	เกินค่าสอบเทียบ

จากตารางที่ 4.2 พบว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำเท่ากับ 10 %w/v และใช้เวลาในการสกัด 60 นาที มีปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากที่สุดซึ่งมีค่าอยู่ที่ 1584.15 ไมโครกรัม ต่อตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำเท่ากับ 5 %w/v และเวลาในการสกัด 60 นาที ซึ่งมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากรองลงมาเป็นอันดับสอง โดยปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่ที่ 1582.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำเท่ากับ 10 %w/v ใช้เวลาในการสกัด 30 นาทีนั้นไม่สามารถตรวจสอบปริมาณโปรตีนได้เนื่องจากมีปริมาณน้อยกว่าสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบอยู่มาก นอกจากนี้ในส่วนของค่าที่แสดงว่า “เกินค่าสอบเทียบ” นั้นแสดงถึงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของสารตัวอย่างที่มีค่ามากกว่าค่าสูงสุดของ Standard protein (BSA) ซึ่งวัดได้จากการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Standard protein (BSA)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 30 นาทีเป็น 60 นาทีที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ 5%w/v โปรตีนที่ละลายน้ำได้มีปริมาณลดลงจาก 1533.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 1114.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากระยะเวลาในการสกัดนาน (มากกว่า 30 นาที) สัมพันธ์กับการตกตะกอนของโปรตีนขนาดเล็กบางโมเลกุล ณ จุดไอโซอิเล็กทริค [12]

(isoelectric point) ซึ่งหมายถึงโปรตีนที่ละลายในน้ำจะลดน้อยลง แต่ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ 5%w/v โปรตีนที่ละลายน้ำได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 658.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็น 1467.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสนี้ยังสามารถสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่โดยระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 30และ60 นาทีตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 110 องศาเซลเซียส ไปเป็น 120 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ 5%w/v และเวลาที่ใช้ในการสกัด 60 นาที ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้นั้นลดลง แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ทำให้การสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ถึงจุดไอโซอิเล็กทริค เมื่อวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จึงพบว่าปริมาณนั้นลดลง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการเพิ่มระยะเวลาในการสกัดที่ 120 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ 5%w/v ดังกล่าวข้างต้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำ และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน สามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1. ในการวิเคราะห์หาขนาดโปรตีน พบว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำเท่ากับ 10%w/v และเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 30 นาที เหมาะสมในการสกัดหาขนาดโปรตีนมากที่สุด

5.1.2. ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้อยู่ที่ช่วง 11 ถึง 17 kDa

5.1.3. ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่าผลการทดลองที่ได้ไม่เห็นแนวโน้มที่ชัดเจน แต่พอสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างกากเมล็ดมะรุมกับน้ำเท่ากับ 10%w/v และเวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 60 นาที เหมาะสมในการสกัดหาปริมาณโปรตีนมากที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. ควรวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ร่วมด้วย เพื่อความแม่นยำในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

5.3 ข้อจำกัด

เนื่องจากสถานโควิด-19 (Covid-19) จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้อาจมีแนวโน้มไม่ชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

[1] Luksanawilas P. (2015). Qualitative and quantitative studies of Boesenbergia Rotundal (L.) Mansf. and Kaempferia Parviflora Rhizomes using Label-free LC-MS/MS Quantitative Proteomics. Master thesis in Department of Allied Health Chemistry, Chulalongkorn University.

[2] Enzmart Biotech. SDS-page (Online). Available: https://www.enzmart.com/sds.php [2020, January 14]

[3] ชัยวัฒน วามวรรัตน. (2556). การทดลองที่ 4 กรดอะมิโนและโปรตีน 1. Available: http://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab04aminoprotein1156.pdf [2020, January 14]

[4] BMG Labtech. Bradford assay performed on BMG LABTECH microplate readers (Online). Available: https://www.bmglabtech.com/bradford-assay-performed-on-bmg-labtech-microplate-readers/ [2020, January 14]

[5] ชุติมา เกียรติสโร. (2560). ผลของการให้ใบมะรุมเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อการกินได้ การย่อยได้ และระบบนิเวศในกระเพาะรูเมน. รายงานวิชาสัมมนาภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

[6] swyworakan. มะรุม (Online). Available: https://sites.google.com/site/swyworak/sak/marum [2020, January 14]

[7] ดร. อนุสรณ์ เชิดทอง. บทที่ 3 โปรตีนและกรดอะมิโน. Available: https://ag2.kku.ac.th/eLearning/137748/Doc%5CChapter%203%20Protein%20and%20amino%20acids.pdf [2020, January 14]

[8] Haghighi Asl A. and Khajenoori M. (2012). Subcritical Water Extraction. (Online). Available: https://www.intechopen.com/books/mass-transfer-advances-in-sustainable-energy-and-environment-oriented-numerical-modeling/subcritical-water-extraction [2020, February 15]

[9] Howard Judelson. (2004). OPERATION OF THE AUTOCLAVES. Available: http://www.vliz.be/docs/Zeecijfers/autoclaveoperation.pdf

[10] MolBio. Protocol Bradford assay (Online). Available: http://himedialabs.com/TD/ML106.pdf [2019, December 7]

[11] จุดไอโซอิเลกทริก (isoelectric point) (Online). Available: https://docs.google.com/document/preview?hgd=1&id=1j1VKdD3Vmxh1r7ULoy9lwuw5ETtoA3xR0bZOCntZ0SE [2020, May 15]

[12] Wei Lu, Xiao-Wei Chen, Jin-Mei Wang, Xiao-Quan Yang, Jun-Ru Qi, Enzyme-assisted subcritical water extraction and characterization of soy protein from heat-denatured meal, Journal of Food Engineering. 169 (2016) 250-258.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ก.1. Glycine-buffer 1 L

- Tris	3.028	g
- Glycine	14.413	g
- SDS	1.000	g

ก.2. 10% APS (Total 300 µl for 4 gels)

- 10% APS	0.03	g
- Distilled water	300	µl

ก.3. 15% Separating gel for 4 gels (Thick layer)

- 30% Acrylamide – 0.8% Bisacrylamide	10	ml
- 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8	5	ml
- Distilled water	4.6	ml
- 10% SDS	200	µl
- 10% APS	200	µl
- TEMED	16	µl

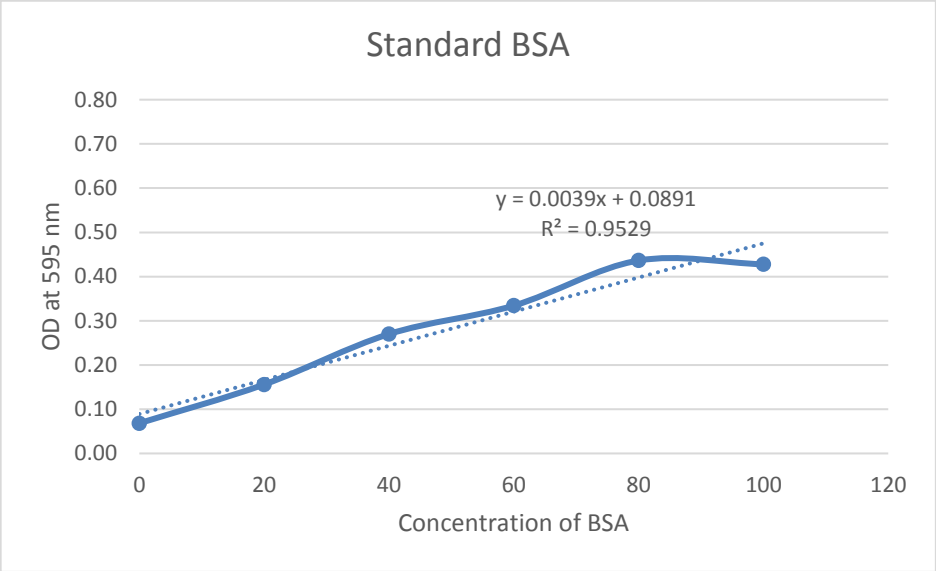
ก.4. 5% Stacking gel (Thin layer)

- 30% Acylamide – 0.8% Bisacrylamide	1.7	ml
- 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8	1.25	ml
- Distilled water	6.8	ml
- 10% SDS	100	µl
- 10% APS	100	µl
- TEMED	20	µl

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ในการวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในสารตัวอย่างนั้นได้ทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน (BSA) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์มาแทนลงในสมการของกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณของโปรตีนต่อไป

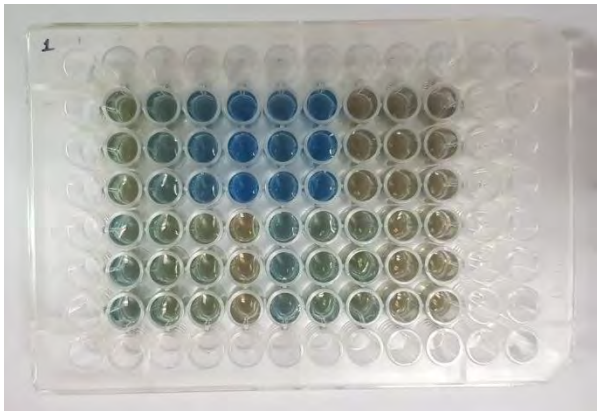


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ Standard protein (BSA)

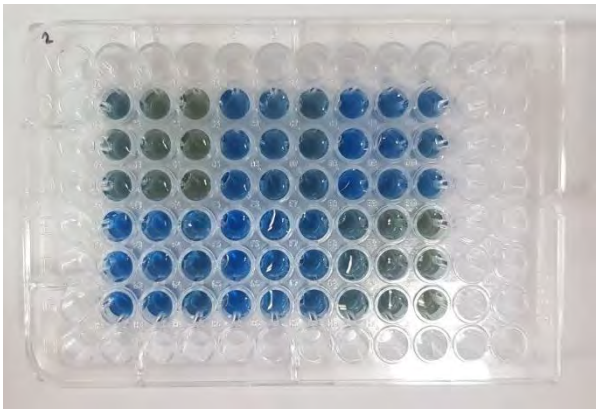
จากกราฟมาตรฐานเมื่อนำมาสร้างสมการเส้นตรงจะได้ว่า y = 0.0039x + 0.0891

โดย y = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

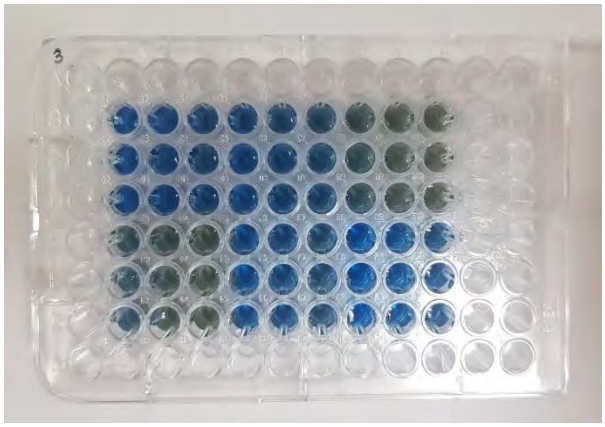
x = ความเข้มข้นของสาร (µg/ml)



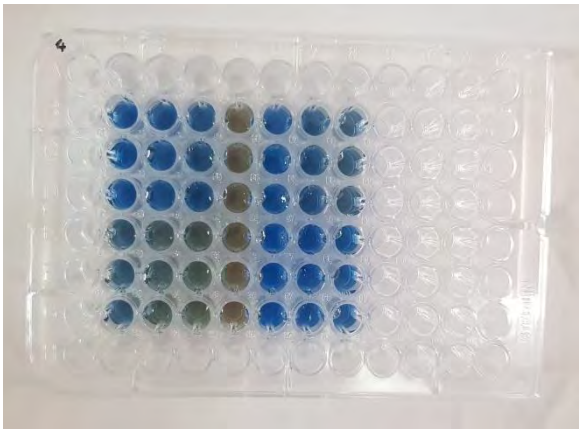
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ ข.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (ก) ถาดที่ 1 (ข) ถาดที่ 2 (ค) ถาดที่ 3 (ง) ถาดที่ 4

ตารางที่ ข.1 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 1

<table>
<tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr>
<tr><td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>B</td><td></td><td rowspan="3">BSA 0
µg/ml</td><td rowspan="3">BSA 20
µg/ml</td><td rowspan="3">BSA 40
µg/ml</td><td rowspan="3">BSA 80
µg/ml</td><td rowspan="3">BSA 60
µg/ml</td><td rowspan="3">BSA 100
µg/ml</td><td rowspan="3">Bradford
reagent</td><td rowspan="6">Bradford
reagent</td><td rowspan="6">Bradford
reagent</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>C</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>D</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>E</td><td></td><td rowspan="3">105C/5%/
30min
1/3 µg/ml</td><td rowspan="3">105C/5%/
30min
1/9 µg/ml</td><td rowspan="3">105C/5%/
30min
1/18µg/ml</td><td rowspan="3">Bradford
reagent</td><td rowspan="3">105C/10%/
30min
1/3 µg/ml</td><td rowspan="3">105C/10%/
30min
1/9 µg/ml</td><td rowspan="3">105C/10%/
30min
1/18 µg/ml</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>F</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>G</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>H</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

หมายเหตุ: สารตัวอย่างแต่ละตัวทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ข.2 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		105C/20%/ 30min 1/3 µg/ml	105C/20%/ 30min 1/9 µg/ml	105C/20%/ 30min 1/18 µg/ml	110C/5%/ 30min 1/3 µg/ml	110C/5%/ 30min 1/9 µg/ml	110C/5%/ 30min 1/18 µg/ml	110C/10%/ 30min 1/3 µg/ml	110C/10%/ 30min 1/9 µg/ml	110C/10%/ 30min 1/18 µg/ml		
C												
D												
E		110C/20%/ 30min 1/3 µg/ml	110C/20%/ 30min 1/9 µg/ml	110C/20%/ 30min 1/18 µg/ml	120C/5%/ 30min 1/3 µg/ml	120C/5%/ 30min 1/9 µg/ml	120C/5%/ 30min 1/18 µg/ml	120C/10%/ 30min 1/3 µg/ml	120C/10%/ 30min 1/9 µg/ml	120C/10%/ 30min 1/18 µg/ml		
F												
G												
H												

หมายเหตุ: สารตัวอย่างแต่ละตัวทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ข.3 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		120C/20%/ 30min 1/3 µg/ml	120C/20%/ 30min 1/9 µg/ml	120C/20%/ 30min 1/18 µg/ml	105C/5%/ 60min 1/3 µg/ml	105C/5%/ 60min 1/9 µg/ml	105C/5%/ 60min 1/18 µg/ml	105C/10%/ 60min 1/3 µg/ml	105C/10%/ 60min 1/9 µg/ml	105C/10%/ 60min 1/18 µg/ml		
C												
D												
E		105C/20%/ 60min 1/3 µg/ml	105C/20%/ 60min 1/9 µg/ml	105C/20%/ 60min 1/18 µg/ml	110C/5%/ 60min 1/3 µg/ml	110C/5%/ 60min 1/9 µg/ml	110C/5%/ 60min 1/18 µg/ml	110C/10%/ 60min 1/3 µg/ml	110C/10%/ 60min 1/9 µg/ml	110C/10%/ 60min 1/18 µg/ml		
F												
G												
H												

หมายเหตุ: สารตัวอย่างแต่ละตัวทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ข.4 แสดงสารตัวอย่างที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในถาดที่ 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		110C/20%/ 60min 1/3 µg/ml	110C/20%/ 60min 1/9 µg/ml	110C/20%/ 60min 1/18 µg/ml	Bradford reagent	120C/5%/ 60min 1/3 µg/ml	120C/5%/ 60min 1/9 µg/ml	120C/5%/ 60min 1/18 µg/ml				
C												
D												
E		120C/10%/ 60min 1/3 µg/ml	120C/10%/ 60min 1/9 µg/ml	120C/10%/ 60min 1/18 µg/ml		120C/20%/ 60min 1/3 µg/ml	120C/20%/ 60min 1/9 µg/ml	120C/20%/ 60min 1/18 µg/ml				
F												
G												
H												

หมายเหตุ: สารตัวอย่างแต่ละตัวทำการทดลอง 3 ซ้ำ