

การวิเคราะห์ปริมาณกรดมีโยที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพด
หลังจากอยู่ในสภาวะละลายของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ปริญญาโท

ของ

ประไพพรรณ กงวัฒนา

THE LIBRARY
COLLEGE OF EDUCATION
BANGKOK, THAILAND

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตร
ปริญญาโท การศึกษามหาบัณฑิต

7 มีนาคม 2518

• คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้.

วรงค์ เดชกิจวิกรม ประธาน

สุวิทย์ ธรรมการ กรรมการ

7 มีนาคม 2518

ประกาศกฎมณเฑียรบาล

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากผู้เขียนได้รับคำแนะนำและช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวนีย์ จักรพิทักษ์ และ อาจารย์สุภาพ สอนปาน แห่งกองโภชนาการ กรมการแพทย์และอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในด้านการทดลองศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนการเขียนปริญญานิพนธ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อำพล เสนาณรงค์ และคุณวัชรวิ เลิศมงคล แห่ง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ได้กรุณาให้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดมาทำการทดลองและได้กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลองด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณสมศรี ภูสีม่วง ที่ได้กรุณาช่วยเหลือและช่วยเหลือในการทดลอง

ในการทดลอง ผู้เขียนได้รับความสะดวกเป็นอย่างยิ่ง เพราะได้รับความอนุเคราะห์ของกองโภชนาการ กรมการแพทย์และอนามัย ให้ใช้สถานที่และเครื่องมือในการทดลอง ผู้เขียนขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย.

ประไพพรรณ กองวัฒนา

สารบัญ

บทที่	หน้า
1	1
บทนำ	
ความมุ่งหมายในการศึกษาค้นคว้า	4
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	4
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	4
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	5
หลักในการวิเคราะห์	6
คำจำกัดความและศัพท์เฉพาะ	13
2	16
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า	
3	20
วิธีดำเนินการทดลอง	
กลุ่มตัวอย่าง	20
การดำเนินการทดลอง	20
การหากรกอมิโนที่จำเป็นแกร่างกายบกไว้น tryptophan	21
การหา tryptophan	24
การหาโปรตีนโคยวิธี Macro Kjeldahl	25
4	29
การวิเคราะห์ข้อมูลและผลการทดลอง	
การวิเคราะห์ข้อมูล	29
อธิบายผลการทดลอง	31

บทที่		หน้า
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	44
	สรุปผลการทดลอง	44
	ข้อเสนอแนะในการทดลอง	46
	ข้อเสนอแนะ	47
	บรรณานุกรม	49
	ภาคผนวก	52

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 คุณค่าอาหารของข้าวโพด ข้าวเจ้า และข้าวไร่	2
2 การหาค่าเฉลี่ยของค่ามิลลิกรัม/ O.D unit ของสารมาตรฐาน tryptophan	31
3 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส	33
4 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลฟรุกโทส	34
5 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลซูโครส	35
6 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ PB 9 ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส	35
7 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ PB 9 ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลฟรุกโทส	37
8 ปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ PB 9 ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลซูโครส	38
9 อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่จำเป็นกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ค่า E / T) ในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet	39
10 อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่จำเป็นกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ค่า E / T) ในปลายรากข้าวโพดพันธุ์ PB 9	40

บัญชีภาพประกอบ

รูป		หน้า
1	Macro Kjeldahl Apparatus กราฟแสดงชนิดและปริมาณของกรคอมิโน	27
2	กรคอมิโนมาตรฐาน (standard)	53
3	Super Sweet control	54
4	Super Sweet กลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง	55
5	Super Sweet กลูโคส 1.5 % 3 ชั่วโมง	56
6	Super Sweet กลูโคส 2.0 % 3 ชั่วโมง	57
7	Super Sweet กลูโคส 1.0 % 6 ชั่วโมง	58
8	Super Sweet กลูโคส 1.5 % 6 ชั่วโมง	59
9	Super Sweet กลูโคส 2.0 % 6 ชั่วโมง	60
10	Super Sweet ฟรุคโทส 1.0 % 3 ชั่วโมง	61
11	Super Sweet ฟรุคโทส 1.5 % 3 ชั่วโมง	62
12	Super Sweet ฟรุคโทส 2.0 % 3 ชั่วโมง	63
13	Super Sweet ฟรุคโทส 1.0 % 6 ชั่วโมง	64
14	Super Sweet ฟรุคโทส 1.5 % 6 ชั่วโมง	65
15	Super Sweet ฟรุคโทส 2.0 % 6 ชั่วโมง	66
16	Super Sweet ซูโครส 1.0 % 3 ชั่วโมง	67
17	Super Sweet ซูโครส 1.5 % 3 ชั่วโมง	68
18	Super Sweet ซูโครส 2.0 % 3 ชั่วโมง	69
19	Super Sweet ซูโครส 1.0 % 6 ชั่วโมง	70
20	Super Sweet ซูโครส 1.5 % 6 ชั่วโมง	71
21	Super Sweet ซูโครส 2.0 % 6 ชั่วโมง	72

หน้า		หน้า
22	PB 9 Control	73
23	PB 9 กลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง	74
24	PB 9 กลูโคส 1.5 % 3 ชั่วโมง	75
25	PB 9 กลูโคส 2.0 % 3 ชั่วโมง	76
26	PB 9 กลูโคส 1.0 % 6 ชั่วโมง	77
27	PB 9 กลูโคส 1.5 % 6 ชั่วโมง	78
28	PB 9 กลูโคส 2.0 % 6 ชั่วโมง	79
29	PB 9 ฟรุกโทส 1.0 % 3 ชั่วโมง	80
30	PB 9 ฟรุกโทส 1.5 % 3 ชั่วโมง	81
31	PB 9 ฟรุกโทส 2.0 % 3 ชั่วโมง	82
32	PB 9 ฟรุกโทส 1.0 % 6 ชั่วโมง	83
33	PB 9 ฟรุกโทส 1.5 % 6 ชั่วโมง	84
34	PB 9 ฟรุกโทส 2.0 % 6 ชั่วโมง	85
35	PB 9 ซูโครส 1.0 % 3 ชั่วโมง	86
36	PB 9 ซูโครส 1.5 % 3 ชั่วโมง	87
37	PB 9 ซูโครส 2.0 % 3 ชั่วโมง	88
38	PB 9 ซูโครส 1.0 % 6 ชั่วโมง	89
39	PB 9 ซูโครส 1.5 % 6 ชั่วโมง	90
40	PB 9 ซูโครส 2.0 % 6 ชั่วโมง	91
41	Model KLA - 3B Amino Acid Analyzer	92

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญอย่างหนึ่งของโลก สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้นานาประการ ตั้งแต่เป็นอาหารของคน สัตว์ ตลอดจนใช้เป็นเครื่องอุปโภคบริโภคอีกหลายประเภท สำหรับประเทศไทยนั้นถึงแม้ข้าวโพดจะมีใช้เป็นอาหารหลักของคนไทยเหมือนข้าว แต่ในปัจจุบันข้าวโพดได้เลื่อนอันดับจากพืชที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของชาติใกล้เคียงกับข้าวและยางพารา¹ ข้าวโพดนับเป็นสินค้าออกที่สำคัญ เพราะทางประเทศได้ซื้อข้าวโพดของไทยไปเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ข้าวโพดยังเป็นอาหารประจำวันในประเทศอื่น ๆ² เช่น ประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย อเมริกาใต้ อิตาลี ทั้งนี้เพราะข้าวโพดหัวแข็งสีแดงแฉะเหลือง (Reddish yellow flint) มีปริมาณโปรตีนและวิตามินสูง ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมกันมาก ในประเทศญี่ปุ่น

จากการค้นคว้าของนักวิทยาศาสตร์ในประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1966³ ได้พบข้าวโพดพันธุ์ใหม่ซึ่งมีโปรตีนชนิดที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายคือ ไลซีน (lysine) สูงมาก จึงทำให้หวังว่าในอนาคตอันใกล้นี้ ข้าวโพดจะมีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับอาหารพวกเนื้อสัตว์ ซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารของคนหรือสัตว์ ในขณะนั้นผลการวิจัยพบว่าปริมาณของโปรตีนในข้าวโพดนี้พอ ๆ กับในข้าว ฉะนั้นนักโภชนาการจึงแนะนำให้คนที่อยู่ในแถบพื้นที่ปลูกข้าวได้ผลิตผลต่ำ และที่กินสามารถปลูกข้าวโพดได้แทน ให้ทำการปลูกข้าวโพดสำหรับรับประทานเป็นอาหารประจำวันร่วมกับข้าว เช่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการปลูกข้าวโพดรับประทานผักสดมากขึ้น⁴ ปริมาณของโปรตีนในข้าวโพด

^{1,2,3} อ่ำพล เสนาณรงค์ "การปลูกข้าวโพดในประเทศไทย" เอกสารทางวิชาการที่ 4 กองการค้นคว้าและทดลอง กรมกสิกรรม 2515 หน้า 1 - 4.

⁴ ประภัทร ปรินุณะ "ราษฎรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ควรใช้ข้าวโพดเป็นอาหารประจำวันร่วมกับข้าวสาร" กสิกร ปีที่ 32 เล่ม 1 ม.ค. 2502 หน้า 53.

ข้าวเจ้าและข้าวฟ่าง คู่ออกจากตาราง 1

ตารางที่ 1 คุณค่าอาหารของข้าวโพด ข้าวเจ้า และข้าวฟ่าง⁵

องค์ประกอบ	ข้าวโพด	ข้าวเจ้า*	ข้าวฟ่าง**
โปรตีน	8.75	7.69	9.73
คาร์โบไฮเดรต	68.36	75.47	74.73
ไขมัน	5.08	2.39	0.63
กาก	0.63	0.61	1.57
เถ้า	0.53	0.69	1.68
ความชื้น	14.58	13.15	1.28

* ข้าวซ้อมมือพันธุ์เหลืองอ่อน

** พันธุ์เฮกการี

นักวิทยาศาสตร์ เกษตรกร โภชนากร และนักชีวเคมี ได้พยายามที่จะปรับปรุงให้ข้าวโพดมีปริมาณและคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น เช่น Oaks Ann และ Johnson F.J., (1970)⁶ นักชีววิทยาและชีวเคมี แห่ง Biology Department, (McMaster, Hamilton, Ontario, Canada ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพด และขบวนการเผาผลาญโปรตีน (Protein Metabolism)

⁵ สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ "การปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในข้าวโพด"

วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 4 : 1 ม.ค. 2514 หน้า 60 - 61.

⁶

Oaks Ann, and Johnson F.J., "Effect on Sugars On Amino Acid Biosynthesis in Maize Root Tips, Canadian Journal of Botany, (1970), 48(1), pp. 177 - 24.

ในข้าวโพดโดยวิธีโครมาโตกราฟี (Chromatographic Method) และเทคนิคการถ่ายภาพกัมมันตรังสี (autoradiography) ในที่สุดพบว่าน้ำตาลกลูโคส (glucose) หรือซูโครส (sucrose) มีอิทธิพลสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในปลายรากข้าวโพด และทำให้ปริมาณของกรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพดสูงขึ้น Oaks เชื่อว่าถ้านำเมล็ดข้าวโพดที่จะปลูกมาแช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส หรือซูโครสก่อนนำไปปลูก จะมีผลทำให้ข้าวโพดที่เกิดขึ้นมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น

กรดอะมิโนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของสิ่งมีชีวิต ผลการทดลองทางโภชนาการแสดงให้เห็นว่า ร่างกายของคนและสัตว์สร้างกรดอะมิโนบางชนิดขึ้นเองไม่ได้ หรือสร้างได้แต่ไม่พอ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร กรดอะมิโนเหล่านี้ช่วยส่งเสริมร่างกายให้เติบโต⁷ ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ควบคุมการทำงานของอวัยวะภายใน และช่วยป้องกันอันตรายโรค ถ้าร่างกายขาดกรดอะมิโนเหล่านี้จะไม่เติบโตเต็มที่หรืออาจหยุดการเจริญเติบโต ฉะนั้นกรดอะมิโนเหล่านี้จึงเรียกว่า กรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย (Essential amino acids) ส่วนกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่ง ร่างกายสร้างขึ้นเองได้เพียงพอ ไม่จำเป็นต้องได้รับจากภายนอก กรดอะมิโนเหล่านี้จึงเรียกว่า กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นแก่ร่างกาย (Nonessential amino acids)

ด้วยเหตุที่ข้าวโพดมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของชาติ และใช้ประโยชน์เป็นอาหารของคนและสัตว์ได้ เพราะข้าวโพดมีปริมาณของโปรตีน และวิตามินสูง และยังมีกรดอะมิโนบางตัวที่จำเป็นและสำคัญแก่ร่างกายด้วย จึงเห็นควรปรับปรุงให้ข้าวโพดมีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายสูงขึ้น โดยใช้วิธีการที่จะให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพดจากน้ำตาล วิธีการดังกล่าว ง่าย สะดวก และมีประโยชน์ สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาเคมีในระดับอุดมศึกษาได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลาย

ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกับปลายรากข้าวโพดที่ได้ทำการควบคุม (control) ไว้ ว่าปริมาณของกรดยูริกในที่เป็นแร่ร่างกาย ในปลายรากข้าวโพด ภายหลังการแช่ในสารละลายน้ำตาลจะสูงกว่าปริมาณของกรดยูริกในที่เป็นแร่ร่างกาย ในปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล หรือไม่ และมากน้อยเพียงใด

ความมุ่งหมายในการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ และชนิดของน้ำตาลกับอัตราการสังเคราะห์โปรตีนในปลายรากข้าวโพด
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำตาลแต่ละชนิดที่รากข้าวโพดถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดยูริกในที่เป็นแร่

ความสำคัญของการศึกษาและค้นคว้า

1. ผลของการศึกษาค้นคว้า ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของกรดยูริกในที่เป็นแร่ที่สังเคราะห์ขึ้นในปลายรากข้าวโพด เพื่อจะได้นำผลการวิจัยไปประยุกต์ในค่านอาหารและการเกษตร
2. เทคนิคและวิธีการต่าง ๆ จากการศึกษาค้นคว้าและทดลองเรื่องนี้อาจจะนำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาเคมีในระดับอุดมศึกษาได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ศึกษาผลของการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการสังเคราะห์กรดยูริกในที่เป็นแร่ในร่างกายในปลายรากข้าวโพด น้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กลูโคส (glucose) ฟรุคโทส (fructose) และซูโครส (sucrose)
2. ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการสังเคราะห์กรดยูริกในที่เป็นแร่ในปลายรากข้าวโพดได้มากที่สุด โดยใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันนี้

- 2.1 สารละลาย กลูโคส 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์
- 2.2 สารละลาย ฟรุคโทส 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์
- 2.3 สารละลาย ซูโครส 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์
3. ศึกษาเวลาที่ไซแซปลาयरากข้าวโพดในสารละลายของน้ำตาล เพื่อให้การสังเคราะห์กรคอมินที่จำเป็นได้มากที่สุด โดยใช้เวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง
4. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรคอมินที่จำเป็น ในปลายรากข้าวโพดสองพันธุ์ คือ
 - 4.1 ข้าวโพดไรชนิดหัวแข็ง (Flint Corn) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Zea mays Indurata พันธุ์ PB 9 ใช้สำหรับเป็นอาหารสัตว์
 - 4.2 ข้าวโพดหวาน (Sweet Corn) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Zea Mays Saccharata พันธุ์ Super Sweet ใช้สำหรับรับประทานผัก
5. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ
 - 5.1 เครื่อง Hitachi Perkin - Elmer Amino Acid Analyzer
 - 5.2 เครื่อง Hitachi Spectrophotometer
6. เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า คือ Ion-exchange Chromatographic Technique และ Light Absorption

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. จัดหาของตัวอย่าง คือ ข้าวโพดพันธุ์ PB 9 และ Super Sweet ที่จะใช้ในการทดลอง
2. เพาะข้าวโพดให้รากข้าวโพดงอกออกมาจากยาวประมาณ 4 - 5 เซนติเมตร
3. แช่ปลายรากข้าวโพดยาวประมาณ 5 มิลลิเมตรในสารละลายน้ำตาล โดยใช้เวลาดัง ๆ กัน คือ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง
4. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรคอมินที่จำเป็นโดยใช้เครื่องมือดังต่อไปนี้

4.1 Hitachi Perkin - Elmer Amino Acid Analyzer

วิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายทุกชนิด ยกเว้น Tryptophan

4.2 Hitachi Spectrophotometer วิเคราะห์หาปริมาณของ

tryptophan

5. นำผลที่ได้จากข้อ 4. มาคำนวณหาชนิด (qualitative) และปริมาณ (quantitative) ของกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายต่อไป

หลักในการวิเคราะห์

คำว่า กรดอะมิโน⁸ ทางทฤษฎี หมายถึง สารประกอบต่าง ๆ ที่ประกอบด้วย amino group และ carboxylic group ส่วนในทางปฏิบัติคำนี้มักจะใช้เฉพาะกรดอะมิโนที่เป็น α -amino carboxylic acids ซึ่งแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ทางธรรมชาติ กรดอะมิโนกว่า 100 ชนิด ได้ถูกแยกและวิเคราะห์ แต่มีเพียง 20 ชนิดเท่านั้นที่ได้จากการ hydrolysis ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ

กรดอะมิโน 20 ชนิดดังกล่าว ประกอบด้วย primary amino group ทั้งสิ้นจาก (residue) ทั้งหมดนี้จะปรากฏในโปรตีนทุกชนิด⁹ เช่น ในผิวหนัง ในกระดูก ในกล้ามเนื้อ และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ต่าง ๆ

เทคนิคของการวิเคราะห์กรดอะมิโนได้แพร่หลายในระหว่าง 20 ปีที่ผ่านมา และปัจจุบันได้มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยทางชีววิทยา (Biological Research)

ขั้นที่สำคัญของการวิเคราะห์กรดอะมิโน คือการแยกและการบอกลักษณะของกรดอะมิโนอย่างง่ายจากโปรตีนที่แตกตัว (hydrolyze) แล้ว ขั้นตอนของการวิเคราะห์

⁸Bates, Robert B., Research Techniques in Organic Chemistry, Prentice - Hall Inc., New Jersey, 1971, pp. 414 - 417.

⁹Kopple, Kenneth D., Peptides and Amino Acids, W.A. Benjamin Inc., New York, 1966, pp. 4.

ประกอบควาวิธีการตกตะกอน และวิธีคั่นเอสเทอร์ (ester - distillation method)

การหากรดามิโนอีกวิธีหนึ่งที่โดยด คือ การตกตะกอน¹⁰ และแยกตะกอนออกมา เช่น การวิเคราะห์หา arginine และ histidine โดยทำให้ arginine และ histidine ตกตะกอนเป็นเกลือเงิน (silver salts) แล้วแยกตะกอนออก โดยอาศัยการละลายในน้ำ และในสารละลาย alkaline ที่แก่ (strong alkaline solutions) ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน และใช้กรด Phosphotungstic และกรด picric ทำให้กรดามิโน lysine ตกตะกอนจาก filtrate ได้ด้วย วิธีการที่กล่าวนี้เสียเวลามาก และเปลืองสาร เพราะต้องใช้โปรตีนในการทดลองประมาณ 25 - 50 กรัม และต้องใช้สารละลายเป็นจำนวนมากในการตกตะกอนซ้ำหลาย ๆ ครั้ง นอกจากนี้ยังต้องกรองและล้าง barium sulfate ซึ่งมีจำนวนมากให้ออกไป และยังมี ขบวนการอื่น ๆ อีก ซึ่งนับว่าไม่สะดวกอย่างยิ่ง

วิธีการที่นำมาใช้กันมากในการวิเคราะห์หาชนิดของกรดามิโนในในคอนแรกคือ ester - distillation ของ Fischer¹¹ โดยเขารน สารที่มีโปรตีนมา hydrolyze ด้วยกรดเกลือ (HCl) แล้วทำ hydrolyzates ที่ได้ให้มีความเข้มข้นขึ้นในสูญญากาศ จากนั้นนำมาละลายใน ethanol กรดามิโนจะถูก esterified โดยการทำให้สารละลายอิ่มตัวด้วยก๊าซ HCl ที่อุณหภูมิห้อง และอยู่บน water bath ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ต่อจากนั้นใส่ NaOH เพื่อได้ ester ออกจาก HCl แล้วแยกด้วย ether ในที่เย็น ether จะระเหยออกไป ส่วนที่เหลือ (residue) ของ esters ไปกลั่นในสูญญากาศ เมื่อผสมกับน้ำ ether ในแต่ละ function จะเปลี่ยนไปเป็นกรดามิโน วิธีการข้างต้นได้รับการปรับปรุงให้เหมาะกับกรดามิโนแต่ละตัว ฉะนั้นจึงใช้เวลานาน และมักจะมีสิ่งที่ทำนายไม่ได้

¹⁰Gabb, H.H., Latchen, W.F., A Hand - Book of Laboratory Solutions, Cornmarket Hinchinson Ltd., London, 1969, pp. 221.

¹¹Fischer E., Ber 39, 1906, pp. 530.

เกิดขึ้นบ่อย ๆ ก็มีการสูญเสียผลิตภัณฑ์บางอย่างในระหว่างขั้นตอนการมาก

ในปี ค.ศ. 1912 Folin และ Denis¹² ได้ศึกษาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน tyrosine และ tryptophan โดยใช้ phenol reagent และ colorimetric method

Sakaguchi¹³ (1925) ได้ค้นพบกรดอะมิโนด้วย Sakaguchi reaction

Hanke¹⁴ ได้ค้นพบกรดอะมิโน histidine โดยทำปฏิกิริยา coupling กับ diazotized sulfanilic acid

ต่อมาได้มีการปรับปรุงวิธีการแยกกรดอะมิโนทางคุณภาพวิเคราะห์ให้ดีขึ้น และโดยแน่นอนขึ้น วิธีการที่ใช้ไม่ยุ่งยากและประหยัดเวลา คือ chromatography¹⁵ ขั้นแรกทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ของโปรตีนแยกออกจากกันอย่างอิสระ โดยการนำโปรตีนมา hydrolyze ด้วย 6N HCl เกิด protein hydrolyzate ซึ่งมีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ แยกตัวออกมา ต่อมานำ hydrolyzate นี้มาทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนโดยใช้ paper chromatography และ ion - exchange chromatography

Paper Chromatography¹⁶ เป็นเทคนิคที่ง่ายและธรรมดา สามารถทำการทดลองหรือวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยมากได้ วิธีการคือ apply สารที่จะแยกบนกระดาษ

¹²Folin, O., and Denis W., J. Biol Chem. 12 :, 1912, pp.245.

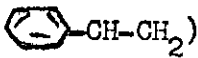
¹³Sakaguchi S., J. Biochem. (Tokyo), 5, 15, 25, 133, (1925)

¹⁴Hanke M.T., and Kaessles, K.K., J. Biol. Chem. 43:, 1920, pp. 527.

¹⁵Henrickson, James B., Organic Chemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 1970, pp. 12 - 14.

¹⁶Peter Karlson, Introduction to Modern Biochemistry, 3rd edition, Academic Press Inc., New York, 1968, pp. 31 - 34.

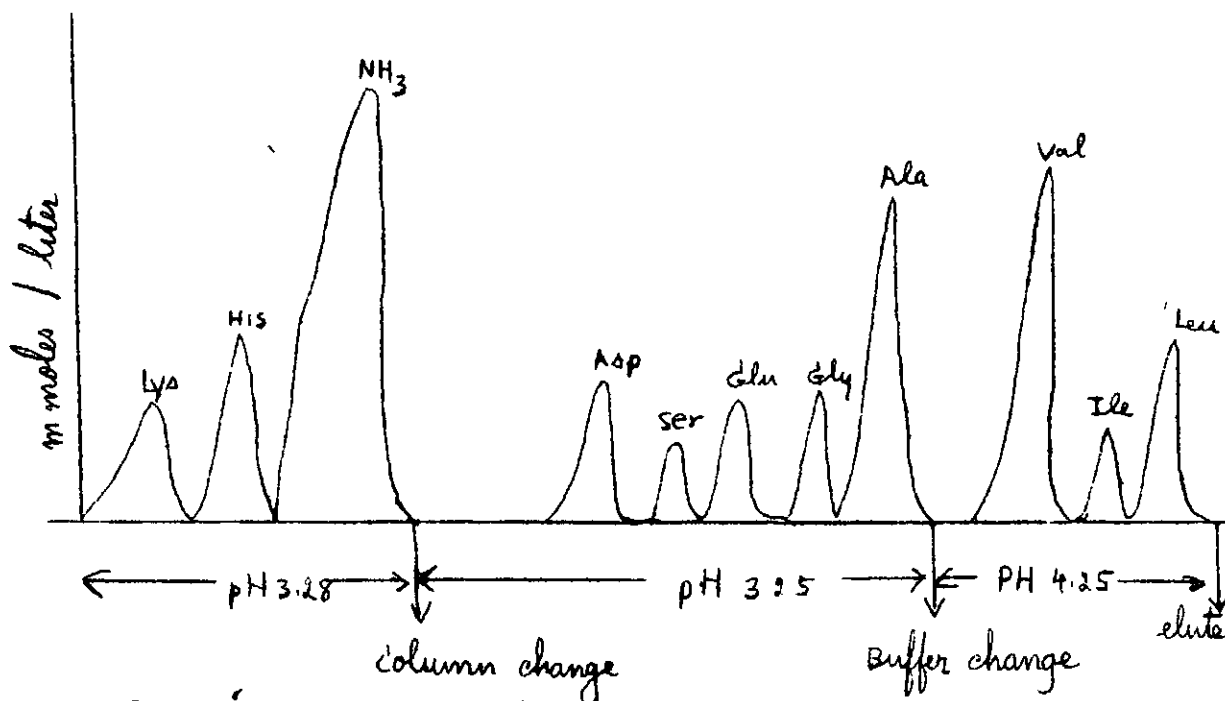
chromatography แล้วปล่อยให้วางไว้ใน beaker ที่บรรจุตัวทำละลาย (solvent) ไว้ เพื่อให้เกิดความสมดุลภายในของตัวทำละลายนั้น ตัวทำละลายนี้จะพาสารผสมที่จะทำการแยกบนกระดาษให้เคลื่อนที่ไปตามทางของมัน สารที่ละลายในตัวทำละลายได้มากกว่า จะถูกพาให้เคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยกว่า ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ในสารผสมแตกต่างกัน สารต่าง ๆ จะแยกจากกัน ตามความสัมพันธ์กับการละลายในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ฉะนั้นการแยกตัวของสารขึ้นอยู่กับ "partition coefficients" ระหว่างตัวทำละลายทั้งสองที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน หรือเรียกเทคนิคนี้ว่า "Partition Chromatography"

Ion - exchange Chromatography ใช้วิเคราะห์สารเคมีใน hydrolyzate ทั้งในคุณภาพและปริมาณ Ion - exchange resin เป็นของแข็ง และทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนอย่างรวดเร็วระหว่างไอออนของ resin กับสารละลาย resin นี้เป็น synthetic co - polymer ของ styrene () และ divinyl benzene ($H_2C = CH -$  $- CH=CH_2$) ต่อจากนั้นนำมา sulfonated ทำให้เกิด sulfonic group

ในทางปฏิบัติใช้ column บรรจุ ion - exchange resin เมื่อผ่านกรดอะมิโนลงใน sulfonated polystyrene resin แล้วทำการชะล้าง (elute) ให้กรดอะมิโนแยกออกมา โดยค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของ HCl (1.5 - 4N) กรดอะมิโนจะถูกชะล้าง (elute) ออกมาไม่พร้อมกัน ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของ hydrogen ion (H^+) โดยวิธีนี้ Moore และ Stein ¹⁷ (1951) ได้แยกกรดอะมิโนโดยใช้ buffer solution ที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ pH 1 - 3 เพื่อจะทำให้ความเข้มข้นของ H^+ คงที่ กรดอะมิโนซึ่งอยู่ในรูปของ cation จะถูก adsorb ที่ pH สูงกว่า 3 ฉะนั้นเมื่อใช้ buffer solution pH 1 - 3 จึงทำให้กรดอะมิโนเคลื่อนที่ออกจาก column ไม่พร้อมกัน ทำให้สามารถแยกกรดอะมิโน

¹⁷ Moore S., Speckman D.H., and Stein W.H., "Automatic apparatus for Use in Chromatography" Federation Proc., 17 : 1958, pp. 1107 - 15.

ออกจากรันได้ กรดอะมิโนที่แยกออกมาให้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อโดยการทำให้เกิด
สีด้วยการทำปฏิกิริยากับ ninhydrin reagent จากนั้นใช้เทคนิคของ absorption
ก็จะเกิด curve ดังในภาพ จาก curve เมื่อเทียบกับ standard ก็สามารถ
หาปริมาณของกรดอะมิโนได้



การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนโดย Hitachi Perkin - Elmer Amino Acid
analyzer¹⁸

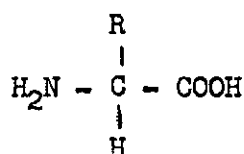
Amino Acid Analyzer เป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่สร้างขึ้นเพื่อวิเคราะห์หา
ปริมาณของกรดอะมิโน และสารประกอบที่คล้ายคลึงกัน โดยใช้หลักของ Ion - exchange
Chromatography ข้างต้น แยกกรดอะมิโนแต่ละชนิดออกจาก Protein hydrolyzate
กรดอะมิโนที่แยกได้เหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสารละลายสีม่วงกับน้ำยา ninhydrin
ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงจะถูกวัดโดย photometer ที่ช่วงคลื่นต่าง ๆ และ

¹⁸ Instruction Manual for the Model KLA-3R, Amino Acid
Analyzer, Hitachi Perkin-Elmer, December, 1967, pp. 196.

บันทึกความเข้มข้นของสปีโดย Recorder ในรูปของ curve สามเหลี่ยม

หลักในการวิเคราะห์ของ Amino Acid Analyzers^{19,20,21}

กรดอะมิโนที่ถูกย่อยแล้วจาก Protein hydrolyzate คือ Primary α - amino acids ซึ่งมีหมู่ carboxyl และหมู่ amino จับที่คาร์บอนอะตอมเดียวกัน คือ



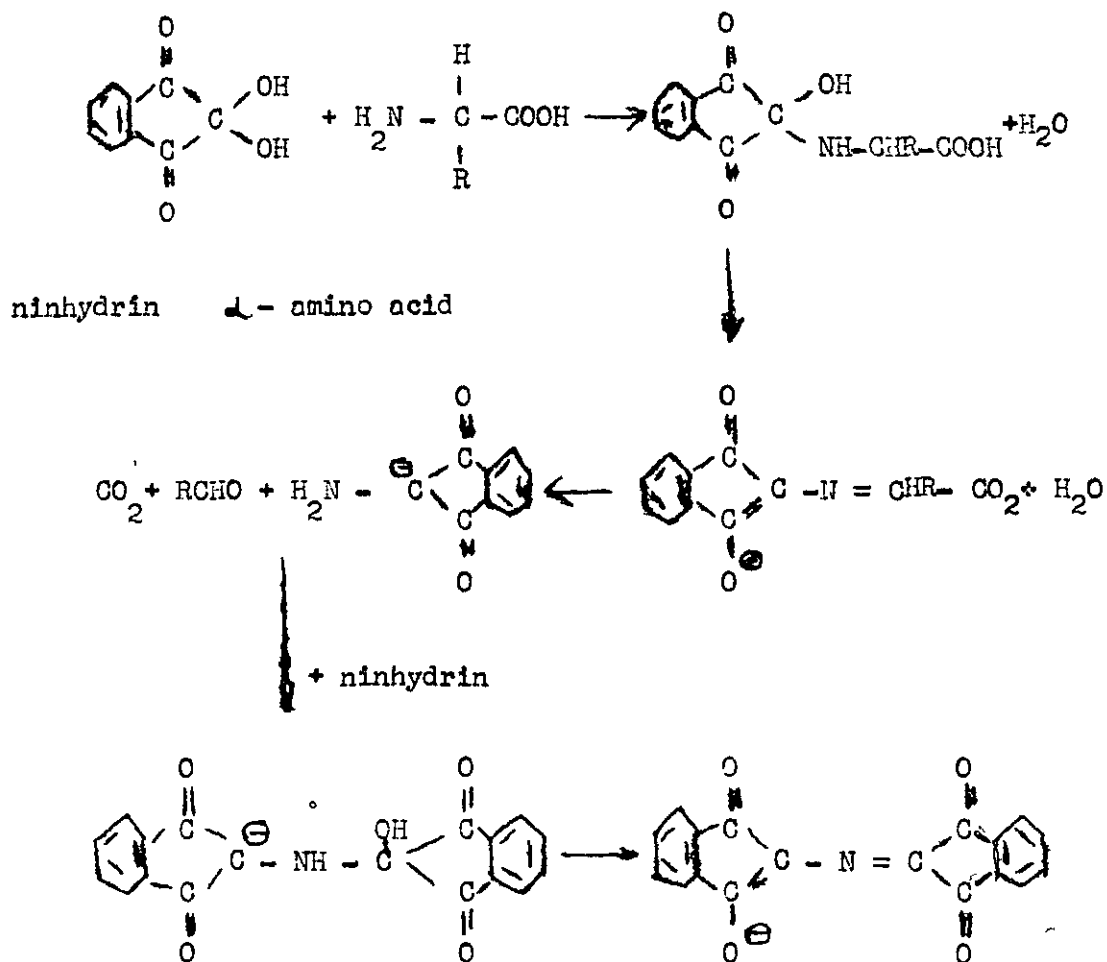
สำหรับ R นั้นเป็นกลุ่มต่าง ๆ ที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนต่างกันไป เมื่อนำกรดอะมิโนมาผ่านลงบน Sulfonated polystyrene ion - exchange resin กรดอะมิโนแต่ละชนิดจะถูกดูดไว้ด้วยอำนาจของประจุซึ่งมีค่าต่าง ๆ กัน เมื่อนำน้ำยาชะล้าง (eluent) ของสารละลาย sodium citrate buffer ที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ 2.00, 4.25 และ 6.1 ตามลำดับ กรดอะมิโนจะถูกพาไปในน้ำยาชะล้างตามลำดับชนิด คือ acid, neutral และ basic กรดอะมิโนเหล่านี้ได้แก่ aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, ammonia, และ tryptophan ตามลำดับ เมื่อนำน้ำยาชะล้างที่มีกรดอะมิโนผสมอยู่ให้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ninhydrin ที่อุณหภูมิ 115°C. จะเกิดสารละลายสีม่วงของ Diketohydrin Dyliden Diketohydrindromine

¹⁹ Blackburn S., Amino Acid Determination, Marcel, Dekkes Inc., New York, 1968, pp. 81 - 101.

²⁰ Todd Aucrey, Analytical Method of Protein Chemistry, Vol II, 1960, pp. 245 - 283.

²¹ Moore S., Speckman D.H., "Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins and Improved System" Anal Chem. 30, 1958, pp. 1185 - 1190.

(DYDA) กังสมการ



DYDA color product

ท่อจากนั้นวัดความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงที่เกิดจากรวมโมโนด้วย Photometer ที่ช่วงคลื่น 570 มิลลิเมตรจน ยกเว้น proline และ hydroxyproline ซึ่งใช้ ช่วงคลื่น 440 มิลลิเมตรจน จะบันทึกลงใน chart paper ของ Recorder เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ครึ่งบนของ curve สามเหลี่ยมของสารละลายตัวอย่างกับ สารละลายมาตรฐาน (Pure amino acid solution) ที่ทราบความเข้มข้นก็สามารถ คำนวณหาปริมาณของกรอมโมโนในสารละลายตัวอย่างได้

การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโน ควรใช้ตัวอย่างที่มีกราวามีน
แต่ละชนิดในปริมาณ 0.25 ไมโครโมลต่อ 0.5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ผล

กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ประกอบด้วย curve ต่าง ๆ ของกรดอะมิโนแต่ละชนิด
จะเป็นข้อมูลในการกำหนดหาปริมาณ และชนิดของกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้
curve ที่ได้จากการคำนวณกับพื้นที่ใต้ curve ของกรดอะมิโนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการ
ทดลอง

คำจำกัดความและศัพท์เฉพาะ

1. กรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย (Essential Amino Acids)
ได้แก่กรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้ หรือสังเคราะห์ได้แต่ปริมาณไม่เพียงพอ
กับความต้องการของร่างกาย จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับผู้ใหญ่
มี 8 ชนิด คือ isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine,
threonine, tryptophan และ valine เด็กที่กำลังเจริญเติบโตต้องการกรดอะมิโน
ที่จำเป็นแก่ร่างกาย 9 ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับผู้ใหญ่ 8 ชนิด และ
histidine สำหรับสัตว์บางชนิด เช่น ไก่ ต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็น 10 ชนิด คือ
กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับเด็ก 9 ชนิดรวมกับ arginine

2. ปลายรากข้าวโพด (maize root tips) หมายถึงปลายของรากข้าวโพด
ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ซึ่งตัดออกจากรากที่งอกออกจากเมล็ดข้าวโพดได้ยาวประมาณ
4 - 5 เซนติเมตร

3. น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครส คือสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ซึ่ง
มีอยู่ทั่วไปในพืชและสัตว์ ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยปกติ
อัตราส่วนโดยจำนวนอะตอมของไฮโดรเจนต่อออกซิเจนเป็น 2 : 1 เช่นเดียวกับน้ำ

อาจมีสูตรเป็น $(CH_2O)_x$ หรือ $C_x(H_2O)_y$ เช่น $C_6H_{12}O_6$

น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโทส เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกไฮโดรไลสหรือถูกย่อยต่อไปอีก อาจเรียกน้ำตาลเหล่านี้ว่า น้ำตาลชั้นเดียว (monosaccharide)

สำหรับน้ำตาลซูโครส เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เมื่อถูกไฮโดรไลสหนึ่งโมเลกุลจะให้ monosaccharide สองโมเลกุล อาจเรียกน้ำตาลนี้ว่า น้ำตาลสองชั้น (disaccharide)

4. เครื่องมือวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino Acid Analyzer)

เป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่ออกแบบสร้างเพื่อการวิเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกัน (related compound) การแยกกรดอะมิโนใช้หลักของ ion - exchange chromatography โดยขบวนการทำให้เกิดสีกับ ninhydrin จากการทำงานของเครื่องจะทำให้ได้ข้อมูลทั้งคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ออกมาเป็นกราฟโดยอัตโนมัติ

5. Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารเคมีที่ละลายได้ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อสารเคมีนั้นมีมากกว่าสองชนิดขึ้นไป และผสมกันอยู่ทั้งในอัตราส่วนที่แน่นอนและไม่แน่นอน โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในสภาวะการวิ่งที่กำหนดให้ ซึ่งเมื่ออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกันตามชนิดของสารเคมีนั้น ๆ อันเป็นผลมาจากตัวกลาง ซึ่งหมายถึงสารที่กำหนดเป็นสภาวะการวิ่ง มีผลบังคับต่อสารเคมีแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และอาศัยหลักความสามารถในสารละลายของตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เท่ากัน

6. Column Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารประกอบที่มีอยู่ในของผสมโดยใช้เครื่องมือเป็นหลอดแก้ว ซึ่งบรรจุด้วยตัวกลาง (adsorbent) ชนิดที่เหมาะสมกับการแยกสารประกอบแต่ละชนิด ขบวนการนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งคุณภาพ วิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์

7. Adsorbent หมายถึงสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในขบวนการของ chromatographic technique ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเพื่อการดูดเกาะของสารเคมีชนิดอื่น ๆ ที่จะนำมาแยกออกจากของผสม และทำให้บริสุทธิ์

8. Paper Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารประกอบออกจากของผสม โดยใช้กระดาษกรองเป็น adsorbent หรือเป็นตัวกลางรองรับสารเคมีในขบวนการแยกนั้น ๆ

9. Adsorption Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารประกอบออกจากของผสมโดยอาศัยหลักการที่สารเคมีต่างชนิดกัน มีความสามารถในการดูดเกาะและมีพลังยึดกับตัวกลางคือ adsorbent ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังต้องอาศัยเทคนิคในการเลือกตัวทำละลาย เพื่อจัดการดูดเกาะ (adsorb) หรือพลังยึดโดยอาศัยวิธีชะล้าง (develop) เพื่อให้สารเคมีทั้งหลายที่นำมาแยก เคลื่อนผ่านตัวกลางด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จนในที่สุดสารเคมีเหล่านี้จะเคลื่อนตัวไปบนตัวกลางในตำแหน่งที่ตัวมันเองอยู่อย่างบริสุทธิ์ และหลุดออกจากตัวกลางไปเป็นสารบริสุทธิ์

10. Partition Chromatography หมายถึงขบวนการแยกส่วนประกอบที่มีอยู่ในของผสม โดยอาศัยหลักการแพร่พื้นผิวของตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากคุณสมบัติเกี่ยวกับความสามารถของการทำละลาย โดยที่ตัวทำละลายทั้งสองนั้นไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

11. Ion - exchange Chromatography เป็นขบวนการแยกสารประกอบออกจากของผสม โดยอาศัยการแลกเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ (reversible process) ของไอออนระหว่างของเหลวกับของแข็ง

12. Spectrophotometry หมายถึงเทคนิคอย่างหนึ่งที่ใช้ในการหาค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) หรือหาความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากสารละลาย (Transmittance) ที่ช่วงคลื่นหนึ่งโดยใช้เครื่องมือ Spectrophotometer เทคนิคนี้ใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งคุณภาพวิเคราะห์ และปริมาณวิเคราะห์.

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า

ในปี ค.ศ. 1956 - 1957 Jensen²² และ Clowes²³ ทำการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนในปลายรากของพืชชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคของการถ่ายภาพกัมมันตรังสี (autoradiography) พบว่า อัตราการสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดขึ้นสูงสุดในเขตปลายราก และพบว่าการ supply radio tracer ของ acetate เข้าไปในปลายรากของพืชเพียงปริมาณเล็กน้อย acetate C¹⁴ ก็สามารถจะเปลี่ยนเป็นโปรตีนได้ โดยก่อนที่จะ supply พวก radiotracer ของ acetate เข้าไปในปลายรากของพืช ให้ excised ปลายรากของพืชด้วยสารละลายน้ำตาลเสียก่อน การที่ acetate carbon เพิ่มขึ้นจนสามารถเปลี่ยนเป็นโปรตีนได้นั้นก็เพราะอิทธิพลของน้ำตาล นอกจากนี้ Jensen ยังพบว่า การควบคุมการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นกรดอะมิโนต่าง ๆ จะต้องเกิดขึ้นในรากที่กำลังเจริญเติบโต

Margerie และ Lancel²⁴ ศึกษาทดลองหาปริมาณของ กรามีโน ในปลายรากข้าวสาลีที่ไคลเช่นเดียวกัน และพบว่าการใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้การบ่มรวมตัวกันมากขึ้น และเปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตพวก polysaccharaides

²² Jensen, W.A., "The Incorporation of C¹⁴-adenine and C¹⁴-phenylalanine by Developing Root Tips Cells." Proc-Natl Acad. Sci. U.S. 1957, pp. 1038-46.

²³ Clowes, F.A.L., "Protein Synthesis in Root Meristems" J. Exptl. Botany. 7:1958, pp. 307 - 12.

²⁴ Oaks A., "The Control of Amino Acids Synthesis in Maize Root Tips." Biochem. Biophys. Acta., 79, 1963, 638 - 41.

Kursanov²⁵ และ Ziegler²⁶ ศึกษาเกี่ยวกับความสำคัญของน้ำตาล ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนพบว่า นอกจากน้ำตาลจะมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากของพืชแล้ว น้ำตาลยังเป็นสิ่งสำคัญในการสังเคราะห์กรดอะมิโนในส่วนต่าง ๆ ของพืชที่กำลังเจริญเติบโต โดยเฉพาะในของพืชซึ่งเป็นแหล่งที่มีการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) หรือปรุงอาหารอีกด้วย น้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจะถูกส่งไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช และมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญโปรตีนในส่วนนั้น ๆ ด้วย

ในปี ค.ศ. 1964 Oaks, Ann²⁷ ศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพด และศึกษาขนานการเผาผลาญโปรตีนในข้าวโพด โดยการเพาะข้าวโพดจนเกิดรากงอกออกมายาวประมาณ 4 - 5 เซนติเมตร แล้วตัดตรงปลายรากยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ออกมาแช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีความเข้มข้น 1% และนำไปแช่ใน acetate carbon พาก acetate - 1 - C¹⁴ และ acetate - 2 - C¹⁴ จากนั้นนำปลายรากข้าวโพดนี้ไปแช่ในสารละลายของ L-amino acids ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในระยะเวลาหนึ่ง แล้วนำปลายรากข้าวโพดมาคั้นให้ละเอียด นำไป hydrolyze เป็นสารละลาย จากนั้นนำสารละลายผ่าน column Dowex -1 แล้วทำการแยก neutral และ basic amino acids ให้ออกจากกันด้วย 1 - dimensional paper chromatography กรวาสารกัมมันตรังสีที่ติดอยู่บน chromatographic paper ด้วย X - ray film ต่อจากนั้นทำการ elute สารที่ปรากฏบน chromatographic paper ออกมาและทำให้แห้งบน nickel - plated planchets แล้วนำไปวัดรังสี

25

Kursanov A.L., "Metabolism and Transport of Organic Substances in the Phlaem" Advan. Botan. Res. 1 : 1963, 209 - 78.

26

Oaks A., "Transport of Amino Acids to Maize Root" Plant Physiol. 41, 1966, 173 - 180.

27

Oaks A., "The Effect of Leucine on the Biosynthesis of Leucine in Maize Root Tips" Plant - Physical. 40, 1964, 149 - 55.

(count) ด้วย glass flow Geiger - Muller tube จากการศึกษโดยใช้เทคนิคของ chromatography วิเคราะห์ทางคุณภาพวิเคราะห์และเทคนิคของการถ่ายภาพด้วยรังสีวิเคราะห์ทางปริมาณวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า การ apply สารละลาย L - amino acids จากภายนอกเข้าไปในปลายรากข้าวโพดนั้น สารละลายของ L - amino acids นี้จะเป็นตัวขัดขวาง (inhibitor) ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่สำคัญ ๆ ได้แก่ threonine, proline, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine และ lysine ในปลายรากข้าวโพด

Oaks ศึกษาถึงขบวนการ metabolism และ transportation ของโปรตีนในข้าวโพด และพยายามหาองค์ประกอบที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพดตามจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1970 Oaks ได้ศึกษาค้นคว้าร่วมกับ Johnson²⁸ โดยนำปลายรากข้าวโพดยาวประมาณ 5 มิลลิเมตรแช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำปลายรากข้าวโพดนี้มาแช่ในสารละลาย acetate - 2 - C¹⁴ และ aspartate - UL - C¹⁴ ต่อจากนั้นใช้เทคนิคของ Chromatography และการถ่ายภาพด้วยรังสีวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนพบว่าน้ำตาลเป็นองค์ประกอบสำคัญในการทำให้ acetate carbon เพิ่มขึ้นมากขึ้น และเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญ ๆ เช่น proline, threonine, valine, leucine, glutamic และ aspartic สรุปได้ว่าน้ำตาลกลูโคสมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่สำคัญต่อขบวนการเผาผลาญในร่างกาย คือ tricarboxylic acid cycle or Kreb's cycle.

จากการศึกษาของ Oaks เกี่ยวกับอิทธิพลของน้ำตาลที่มีต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพดนั้น พบว่า การแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลนานเกินไป ทำให้เกิดสารประกอบคาร์โบไฮเดรต พวก polysaccharides เพิ่มขึ้นมากกว่าที่จะเพิ่มโปรตีน กล่าวคือถ้าถ้าน้ำหนักแห้งของปลายรากข้าวโพดที่ยาว 10 มิลลิเมตร

²⁸ Oaks, Ann, and Johnson F.J., "Effect of Sugars on Amino Acids Biosynthesis in Maize Root Tips" Can. J. of Bot. 1970, 48(1), 117 - 24.

(แช่ในสารละลายน้ำตาลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง) จะประกอบด้วย acid hydrolyze carbohydrate 60 % และโปรตีน 35% แต่ถ้าแช่ไว้นาน 6 ชั่วโมง รากข้าวโพดซึ่ง เฝ้ายาว 10 มิลลิเมตรจะยาวประมาณ 20 มิลลิเมตร และจะประกอบด้วย acid hydrolyze carbohydrate 75% และถ้าแช่ไว้นาน 44 ชั่วโมง จะมีคาร์โบไฮเดรต 90% ฉะนั้นเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายรากข้าวโพดในน้ำตาลจึงมีความสำคัญมาก นอกจากนี้ Oaks ยังพบว่า ถ้าใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปก็จะเพิ่ม acid hydrolyze carbohydrate มากกว่าโปรตีน เช่นเดียวกัน.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง

1. จัดหาตัวอย่างกิ่งเนื้อสีขาวโพกพันธุ์ Super Sweet และ PB 9 ซึ่งได้จากสถานีทดลองไม้ผลเมืองเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
2. นำเนื้อสีขาวโพกแต่ละพันธุ์มา sterile ด้วยสารละลาย chlorox (5 % sodium hypochlorite มีขายในท้องตลาด) แล้วล้าง (rinse) ด้วยน้ำจากน้ำเนื้อสีขาวโพกแช่ในน้ำไว้ค้างคืน
3. แกะเนื้อสีขาวโพกให้เกิดรากสีขาวงอกออกมาประมาณ 4 - 5 เซนติเมตร โดยวางเนื้อสีขาวโพกไว้บนกระดาษที่เปียกชื้น (ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 วัน)
4. แช่ปลายรากสีขาวโพกที่ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตรในสารละลายน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโทส และ ซูโครส ที่มีความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 % ตามลำดับ และใช้เวลาในการแช่ปลายรากสีขาวโพกในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 0, 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ
5. นำปลายรากสีขาวโพกที่แช่ในสารละลายน้ำตาลแล้วมาทำให้แห้ง โดยอบในเตาอบ (oven) ที่อุณหภูมิ 70 - 80 °C. อบค้างคืนไว้ 1 คืน แล้วนำปลายรากสีขาวโพกที่แห้งมาทำให้ละเอียดเตรียมไว้สำหรับการทดลองต่อไป

การดำเนินการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ตอน

1. การหากรดามิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ยกเว้น tryptophan

ควยเครื่อง Hitachi Perkin - Elmer Amino Acid Analyzer

2. การหา tryptophan ด้วยเครื่อง Hitachi

Spectrophotometer

3. การหาโปรตีน ด้วย Macro Kjeldahl Method

1. การหากรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ยกเว้น tryptophan

1.1 ซึ่งตัวอย่างที่กลละเอียดแล้ว แต่ละอย่างให้หนักไม่เกิน 1.0 กรัม ใส่ลงใน Bombelroll tube ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 20 % (6N HCl) ลงไปจนครบ 50 ml. ปิดฝาให้แน่น นำไป hydrolyze ใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง

1.2 นำ hydrolyzate ที่ทำให้เย็นแล้วที่อุณหภูมิห้องมา 25 ml. ระเหยเอากรดเกลือออกจนหมดโดยใช้เครื่อง Handy Aspirator และ Rotary Evaporator ละลายตะกอนที่เหลือด้วย buffer ของโซเดียมซิเตรท pH 2.2 (sodium citrate buffer pH 2.2) ถ่ายใส่ใน Volumetric flask ขนาด 50 ml. ปรับปริมาตรจนครบด้วย buffer ของโซเดียมซิเตรท pH 2.2 ทำการกรองเก็บสารละลายที่ได้ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

1.3 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนในสารละลายที่ได้จากข้อ 1.2 โดยวิธี one - column วิธีเตรียมเครื่องมือก่อนทำการวิเคราะห์มีดังนี้

1.3.1 เปิด Switch ต่าง ๆ ของเครื่อง เพื่อให้ระบบต่าง ๆ พร้อมที่จะทำงานได้คือ

1.3.1.1 Main Switch จ่ายกระแสไฟฟ้าตลอดเครื่อง

1.3.1.2 Heater และ Circulating water bath เพื่อปรับอุณหภูมิของ column ให้คงที่อยู่ที่ 55°C.

1.3.1.3 Reaction bath ให้อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาอยู่ที่ 115°C .

1.3.2 ตั้งเวลาการไหลของ sodium citrate buffer pH 2.80, 4.25 และ 6.1 เวลาของการไหลของสารละลาย ninhydrin เวลาการหยุดทำงานของระบบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์โดย Programming drum และตั้งลำดับการไหลของสารละลายให้อยู่ที่ตำแหน่ง Automatic

1.3.3 pipet สารละลายที่ได้จากข้อ 1.2 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน column ของเครื่อง Amino Acid Analyzer ขนาด 9×500 มิลลิเมตร ให้สารละลายไหลผ่านลงไปใน resin จนพอที่แห้งด้วยความดันของก๊าซไนโตรเจน (เพื่อไล่อากาศออกซิเจน) ล้างผิวบนของ column เหนือ resin ด้วยสารละลาย sodium citrate buffer pH 2.2 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ไล่อากาศด้วย sodium citrate buffer pH 2.20 จนพอที่แห้งด้วยก๊าซ N_2 เติมสารละลาย sodium citrate buffer pH 2.80 จนเต็มส่วนบนของ column ปิด column ด้วยปลาน้ำกดของ Pump I ซึ่งเปิด pump ส่งสารละลาย buffer pH 2.80, 4.25 และ 6.1 ตามลำดับ และเวลาที่ไถ่ตั้งไว้แล้วโดย Programming drum

ในกรณีที่ตัวอย่างได้ผ่านการย่อยมาแล้ว หรือเป็นสารละลายผสมของ กรามีโน นำมาผ่านลงบน column ของเครื่อง Amino Acid Analyzer ได้เลย ไม่ต้องมาทำการย่อยอีก แต่ทั้งนี้จะต้องผ่านการตรวจหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนโดยประมาณก่อน ซึ่งมีวิธีการตรวจดังนี้

pipet สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสองหลอด เติมสารละลาย ninhydrin หลอดละ 0.5 ml. เขย่าทั้งสองหลอดจนสารละลายเข้ากัน นำเอาไปต้มให้เดือด ตั้งไว้ประมาณ 2 นาที นำหลอดทั้งสองออกจากน้ำเดือด เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เทียบความเข้มข้นของสีของทั้งสองหลอด ซึ่งจะต้องนำสารละลายตัวอย่างมาทำให้เข้มข้นขึ้นหรือเจือจางลง เพื่อให้ได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานก่อนทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง Amino Acid Analyzer.

1.3.4 เริ่มให้เครื่อง Amino Acid Analyzer ทำงานโดย
เปิด Switch ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ Pump I, Ninhydrin Programming drum, Start
และ Recorder เปิดหม้อของสารละลาย buffer และสารละลาย ninhydrin
ให้อยู่ในตำแหน่ง Chromatography (C) aspartic acid เป็นกรดอะมิโนชนิดแรก
ซึ่งจะปรากฏบน Chart paper ภายหลังเครื่องเริ่มต้นทำงานประมาณ 45 นาที
curve สามเส้นที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนโดย
Amino Acid Analyzer มีความคล้ายคลึงกันดังนี้

aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid
proline, glycine, alanine, cystine, valine, methionine, isoleucine,
leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, ammonia,
tryptophan

curve สามเส้นของ cystine และ tryptophan จะ
ไม่ปรากฏจากสารละลายตัวอย่าง ซึ่งหมายความว่ากรดอะมิโนเหล่านี้จะคงทำการวิเคราะห์
ต่างไปจากวิธีนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโน โดยวิธี one - column
ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 6 ชั่วโมง

1.4 การเตรียมสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin reagent)

เตรียมสารละลาย ninhydrin ให้มีความเข้มข้น 2 % ปริมาตร
ทั้งหมด (final volume) 3 ลิตร ด้วยวิธีการดังนี้

- | | | | |
|-------|-----------------------------|------|-----------|
| 1.4.1 | ทวง methyl cellosolve | 2250 | มิลลิลิตร |
| 1.4.2 | สารละลาย acetic acid buffer | 750 | มิลลิลิตร |
| 1.4.3 | หึ่ง ninhydrin | 60 | กรัม |
| 1.4.4 | ผ่านกานไนโตรเจน | | |
| 1.4.5 | Stannous chloride | 1140 | มิลลิลิตร |
| 1.4.6 | ผ่านกานไนโตรเจน | | |

1.4.7 นำเข้าติดตั้งในเครื่องทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงนำมาใช้

1.5 การคำนวณ

run curve ของกรดอะมิโนที่ทำเป็นแก๊สร่างกายของสารละลายตัวอย่าง
ที่ได้จากเครื่อง Amino Acid Analyzer นำมาคำนวณหาปริมาณของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ
โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ curve ของสารละลายมาตรฐาน กับสารละลายตัวอย่างซึ่งใช้
สารละลาย ninhydrin ที่เตรียมขึ้นในเครื่องเดียวกัน

1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ใช้สารละลายมาตรฐาน ซึ่งมีกรดอะมิโน
ที่บริสุทธิ์ (pure amino acid solution) แต่ละชนิดในปริมาณ 0.25 ไมโครโมล
ณ 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนมาตรฐาน จากเครื่อง Amino
Acid Analyzer ด้วยวิธีเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง

2. การหา tryptophan

2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

2.1.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้กับสารมาตรฐาน

ตวงกรด H_2SO_4 เข้มข้น 98 มิลลิลิตร น้ำ 63 มิลลิลิตร
และกรด HNO_3 เข้มข้น 84 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากัน

2.1.2 ชั่ง tryptophan มาตรฐาน 0.1 กรัม ละลายในน้ำ
100 มิลลิลิตร ใช้ pipet ทุบสารละลาย tryptophan ใส่ใน Erlenmeyer
flask ขนาด 100 มิลลิลิตร 5 ใบ โดยใส่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ
แล้วเติมน้ำลงไป 4, 3, 2, 1 และ 0 มิลลิลิตรตามลำดับ ต่อจากนั้นในแต่ละ flask
เติมสารละลายข้อ 2.1.1 ลงไป 35 มิลลิลิตรจนครบทุกใบ

2.1.3 นำสารละลายมาตรฐานข้อ 2.1.2 ทุก flask ต้มบน
water bath นาน 16 - 18 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายกรด
จากข้อ 2.1.1 ลงไป ให้สารละลายใน flask ทุกใบมีปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร
โดยใช้ Volumetric flask ขนาด 50 ml. จากนั้นนำมารองผ่าน glass wool
เติมสารละลายที่ใส่ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า optical density หรือ absorbancy โดยเครื่อง Hitachi Spectrophotometer ที่ wave length 440 มิลลิไมครอน เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งตั้งให้มีค่า optical density เป็นศูนย์

2.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

2.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้กับสารตัวอย่าง

ทวงกรด H_2SO_4 เข้มข้น 550 มิลลิลิตร น้ำ 350 มิลลิลิตร และกรด HNO_3 เข้มข้น 84 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากัน

2.2.2 ชั่งสารตัวอย่างไม่เกิน 0.5 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดจากข้อ 2.2.1 ลงไปใน flask 40 มิลลิลิตร นำไปต้มบน water bath นาน 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดจากข้อ 2.2.1 ลงไปให้สารละลายมีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร กรองด้วย glass wool นำสารละลายที่ได้ไปทำการทดลองต่อไป

2.2.3 เตรียม blank โดยตวงสารละลายกรดจากข้อ 2.2.1 มา 40 มิลลิลิตร ต้มบน water bath 16 - 18 ชั่วโมง แล้วดำเนินการตามข้อ 2.2.2 ทุกประการ

2.2.4 นำสารละลายตัวอย่างและ blank ที่ได้ไปวัดค่า optical density โดยเครื่อง Hitachi Spectrophotometer ที่ wave length 440 มิลลิไมครอน โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งตั้ง (set) ให้มีค่า optical density เป็นศูนย์

3. การหาโปรตีนโดยวิธี Macro Kjeldahl

หลักการของวิธีนี้คือ การเปลี่ยนไนโตรเจนในสารที่มีไนโตรเจนเป็นสารประกอบ (nitrogenous substance) เป็นเกลือของแอมโมเนียม (ammonium salt) โดยวิธี digestion สารประกอบอินทรีย์ (organic substance)

ด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น คาร์บอนและไฮโดรเจน จะเกิดออกไซด์ (oxidize) เป็น
คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) ในขณะที่ไนโตรเจนเปลี่ยนเป็น
แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากนั้นทำสารละลายที่ได้นี้เป็นกลางด้วยสารละลาย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เมื่อทำไปกลั่นก็จะเกิดก๊าซแอมโมเนีย (NH_3)
ผ่านก๊าซแอมโมเนียที่ไต่ลงไปในสารละลายกรดมาตรฐานที่ทราบปริมาตรแน่นอน หาปริมาณของ
แอมโมเนียได้โดยการไทเทรต กรดมาตรฐานที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย
ด้วยสารละลายข้างมาตรฐาน โดยวิธีนี้จะทราบปริมาณของไนโตรเจน จากปริมาณของ
ไนโตรเจนเมื่อคูณด้วย 6.25 ก็จะเป็นปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสารนั้น

การทดลองหาโปรตีนว่าเป็นวิธีการดังนี้

3.1 การ Digest สารตัวอย่าง (Digestion of sample)

3.1.1 ชั่งสารตัวอย่างหนักประมาณ 0.7 - 2 กรัมใส่ใน

digestion flask (Kjeldahl flask)

3.1.2 เติม K_2SO_4 4 กรัม Cu SO_4 1 กรัม และ

กรดกำมะถันเข้มข้น 25 มิลลิลิตรเข้าเบา ๆ ใส่สารละลายผสมกับ

3.1.3 วาง flask ในท่าเอียงบน heater ปรับไฟอ่อน ๆ

ให้เกิดควัน ๆ ใน 10 นาทีแรก แล้วจึงค่อยเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นกว่าเดิม ให้ความร้อน
ต่อไปจนกระทั่งสารละลายใส ปรากฏผลสีฟ้าของ Cu SO_4 จากนั้นให้ความร้อน
สารละลายต่อไปอีก 2 ชั่วโมง 30 นาที แล้วจึงปิดสวิทช์ของ heater ปล่อยให้
สารละลายเย็นที่อุณหภูมิของห้อง

3.2 การกลั่นและการไทเทรต (Distillation and titration)

3.2.1 หลังจากสารละลายใน digestion flask เย็นแล้ว

เติมน้ำกลั่นลงไปใน flask 200 มิลลิลิตร พร้อมกับการเขย่า flask
ให้ตะกอนใน flask ที่อาจเกิดขึ้นละลายได้หมด

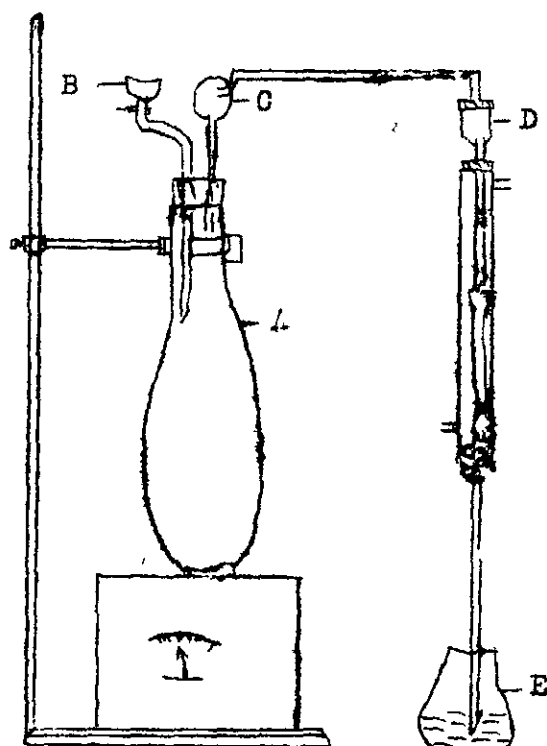
3.2.2 เติมก้อนสังกะสี (Zinc granule) ประมาณกำมือ

หนึ่งลงใน flask แล้วเติมสารละลาย NaOH 40 % จำนวน 100 มิลลิลิตร

เข้า flask ไปต่อกับเครื่องกลั่น (Distillation Apparatus) (ดูใบรูป) ที่มี
โปลายของ condenser กอกับสายยางที่เชื่อมต่อกับ adapter ซึ่งพ่วงอยู่ใน
Erlenmeyer flask ขนาด 300 มิลลิลิตร ภายใน flask บรรจุสารละลายกรด
 H_2SO_4 มาตรฐาน ($0.2\ N\ H_2SO_4$) 25 ml. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (methyl red
indicator) 2 - 3 หยด

3.2.3 เปิดสวิทช์ของ heater ปรับอุณหภูมิประมาณ $75 - 85^\circ C$.
(คอยระวังป้องกันมิให้สารละลายใน flask เกือบพุ่งขึ้นมาจนเข้าไปใน Kjeldahl
trap) ปล่อยให้แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการกลั่นสารละลายข้างลงไปใน flask
ที่บรรจุกรดมาตรฐาน จนกระทั่งปริมาตรของสารละลายใน flask เหลือประมาณ
150 ml ปิดสวิทช์ นำ flask ที่บรรจุกรดมาตรฐานและแอมโมเนียมาทำการไทเทรต
ต่อไป

ภาพที่ 1



A = Kjeldahl flask

B = tap funnel

C = Kjeldahl trap

D = Liebig's condenser

E = Erlenmeyer flask

ซึ่งบรรจุกรด H_2SO_4

มาตรฐาน

3.2.4 ไตเตรตสารละลายกรดกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH

3.2.5 จากปริมาณของสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH

ที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณของโปรตีนโดยใช้สูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Protein} = N \times 6.25$$

$$N = \frac{\text{ml. H}_2\text{SO}_4 \times 0.2\text{NH}_2\text{SO}_4 \times 14 \times 100}{\text{wt. of sample} \times 1000}$$

$$25 \times 0.2 \times 14 \times 100$$

บทที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูลและผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

จาก curve ที่ได้จากเครื่อง Amino Acid Analyzer นำมาคำนวณหาพื้นที่ทรงบนของแต่ละ curve โดยเปรียบเทียบกับแต่ละ curve ของสารมาตรฐาน (standard) ก็จะทราบปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดต่าง ๆ ส่วนกรดอะมิโน tryptophan ไม่ปรากฏเพราะกรดอะมิโนชนิดนี้ถูกทำลายเมื่อ hydrolyze ด้วย 6N.HCl ฉะนั้นจึงต้องทำการทดลองแยกออกไปโดยเฉพาะ

สูตร ในการคำนวณหาปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นแต่ละชนิด ยกเว้น tryptophan

$$\text{ปริมาณของกรดอะมิโน} = \frac{H' \times W' \times 0.25 \times \text{M.W.} \times 1000}{M \times H \times W \times 1000} \text{ กรัม} / 100 \text{ กรัม}$$

- เมื่อ H' = ความสูงของ curve ของกรดอะมิโนในสารละลายตัวอย่าง
 W' = ความกว้างของ curve ของกรดอะมิโนในสารละลายตัวอย่าง
 H = ความสูงของ curve ของสารละลายมาตรฐาน
 W = ความกว้างของ curve ของสารละลายมาตรฐาน
 M = น้ำหนักของสารตัวอย่าง
 M.W. = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโน (ไมโครกรัม)
 0.25 = ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสารละลายมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

การหาความกว้างของ curve ทำได้ดังนี้

$$W = (n-1) \times 4 + \text{ส่วนที่เหลือให้จุดค่าเหนือเส้นที่แบ่งครึ่ง curve ทั้งสองข้างของ curve}$$

$$n = \text{จำนวนของจุดค่าที่อยู่ระหว่าง space (สี่เหลี่ยม 4 จุด)}$$

การหาปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan

อ่านค่า optical density (O.D) ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างโดยเครื่อง Hitachi Spectrophotometer ที่ wave length 440 millimicrons

จากค่า optical density (O.D) หรือค่า absorbance (A) ของสารละลายมาตรฐานที่อ่านได้มาคำนวณหาเป็นหน่วยของ optical density (หน่วยของ O.D)

$$\text{หน่วยของ O.D} = \text{O.D} \times 1000$$

สูตร คำนวณหาปริมาณของ tryptophan ในสารละลายตัวอย่าง กรัม/100 กรัม

$$\% \text{ tryptophan} = \frac{F \times \text{O.D (unit)} \times 100}{W \times 1000}$$

เมื่อ F = มิลลิกรัม / O.D unit ของสารมาตรฐาน (ค่าเฉลี่ย)

O.D(unit) = ค่าหน่วยของ O.D ของสารละลายตัวอย่าง

W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง

การหาค่า F ทำได้ดังนี้

ตารางที่ ๑ การหาค่าเฉลี่ยของค่ามิลลิกรัม / O.D unit ของสารมาตรฐาน
tryptophan

หมายเลข	มิลลิกรัม tryptophan	O.D	หน่วยของ D	มิลลิกรัม/หน่วยของ O.D
1	1	0.015	15	0.0667
2	2	0.021	21	0.0952
3	3	0.027	27	0.1111
4	4	0.044	44	0.0909
5	5	0.059	59	0.0847

5) 0.4486

ดังนั้นค่า F = 0.08972

ผลการทดลอง

ผลจากการคำนวณหาปริมาณของกรกณินที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดทั้งสองพันธุ์ คือ พันธุ์ Super Sweet และพันธุ์ PB ๑ ซึ่งใช้ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทส และซูโครสที่มีความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 % โดยใช้เวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง คูณค่าตาราง 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

1. พันธุ์ Super Sweet

1.1 ปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด ในโทรเจนทั้งหมดและโปรตีนใน ปลายรากข้าวโพดที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1.0 % เวลา 3 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด ในโทรเจนทั้งหมด และโปรตีนในปลาย

รากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control)

1.2 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงชัน มีปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด ในโตรเจนทั้งหมด และโปรตีนลดลง เช่น ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1.0 % เวลา 3 ชั่วโมง มีปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด = 13.425 กรัม ในโตรเจนทั้งหมด = 5.424 กรัม และโปรตีน = 33.903 กรัม ส่วนปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1.5 % เวลา 3 ชั่วโมง มีปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด = 9.187 กรัม ในโตรเจนทั้งหมด = 4.904 กรัม และโปรตีน = 30.652 กรัม และถ้าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสยิ่งสูงชันปลายรากข้าวโพดจะมีปริมาณโปรตีน กรกณินที่จำเป็น และในโตรเจนทั้งหมดลดลง

1.3 ปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด ในโตรเจนทั้งหมด และโปรตีนลดลง เมื่อเวลาการแช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคสนานขึ้น ปริมาณในโตรเจนทั้งหมดในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1.0 % 3 ชั่วโมง = 5.424 กรัม โปรตีน = 33.903 กรัม tryptophan = 2.774 กรัม ส่วนปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1.0 % 6 ชั่วโมง มีปริมาณในโตรเจนทั้งหมด = 5.029 กรัม โปรตีน = 31.432 กรัม และ tryptophan = 2.631 กรัม ปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมดในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 2.0 % 3 ชั่วโมง = 9.292 กรัม ส่วนปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 2.0 % 6 ชั่วโมง มีปริมาณของกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด 8.279 กรัม

1.4 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1.0 % 3 ชั่วโมง และ 1.5 % 6 ชั่วโมง มีปริมาณ tryptophan สูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control)

1.5 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส มีปริมาณของโปรตีน ในโตรเจนทั้งหมด และกรกณินที่จำเป็นทั้งหมด ลดลงกว่าปลายรากข้าวโพดที่

ร ๓๓ ร องกรดอม นพจา น ารทวอยาง 10 กรม

สารตัวอย่าง	ผลการวิเคราะห์													
	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุคโตส	น้ำตาลแลคโตส	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลมอลโตส	น้ำตาลดีออกไซ	น้ำตาลไซโตส	น้ำตาลอินนูลิน	น้ำตาลโกลิโคเจน	น้ำตาลอะมิโด	น้ำตาลอะมิโด	น้ำตาลอะมิโด	น้ำตาลอะมิโด	
Super Sweet	5.511	34.448	2.702	1.986	1.092	1.554	1.114	1.448	0.418	1.028	1.944	1.084	14.370	25.781
กลูโคส 1.0% 3 ชั่วโมง	5.424	33.903	2.774	1.650	0.855	1.497	1.121	1.306	0.404	0.942	1.840	1.036	13.425	23.776
กลูโคส 1.5% 3 ชั่วโมง	4.904	30.652	1.926	1.385	0.539	1.177	0.527	0.807	0.298	0.566	1.215	0.747	9.187	14.960
กลูโคส 2.0% 3 ชั่วโมง	4.644	29.026	2.002	1.401	0.385	1.111	0.760	0.846	0.299	0.584	1.200	0.704	9.292	16.886
กลูโคส 1.0% 6 ชั่วโมง	5.029	31.432	2.631	1.878	0.858	1.512	1.110	1.353	0.360	0.926	1.908	1.098	13.574	24.654
กลูโคส 1.5% 6 ชั่วโมง	4.764	29.781	2.855	1.400	0.441	1.136	0.787	0.893	0.352	0.584	1.270	0.712	10.430	17.834
กลูโคส 2.0% 6 ชั่วโมง	4.488	28.056	2.132	0.968	0.330	0.946	0.567	0.708	0.252	0.552	1.106	0.718	8.279	13.008

สารตัวอย่าง	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลฟรุคโตส	น้ำตาลซูโครส	น้ำตาลแลคโตส	น้ำตาลมัลโตส	น้ำตาลดีออกซีซูโครส	น้ำตาลไซลิท	น้ำตาลเอริทริท	น้ำตาลอินนูลิน	น้ำตาลไซลิท	น้ำตาลเอริทริท	น้ำตาลอินนูลิน	น้ำตาลไซลิท	น้ำตาลเอริทริท	น้ำตาลอินนูลิน	น้ำตาลไซลิท	น้ำตาลเอริทริท	น้ำตาลอินนูลิน
Super Sweet																		
ควบคุม (control)	5.511	34.448	1.702	1.986	1.092	1.554	1.114	1.448	0.418	1.028	1.944	1.084			14.370	25.781		
ฟรุคโตส 1.0% 3 ชั่วโมง	5.197	32.485	1.676	0.946	0.314	0.923	0.674	0.785	0.279	0.538	1.054	0.698			7.827	13.169		
ฟรุคโตส 1.5% 3 ชั่วโมง	4.827	30.172	2.042	0.774	0.314	1.098	0.697	0.780	0.280	0.609	1.160	0.678			8.432	14.580		
ฟรุคโตส 2.0% 3 ชั่วโมง	4.467	27.921	1.897	0.932	0.328	0.851	0.538	0.629	0.243	0.503	0.962	0.647			7.543	11.741		
ฟรุคโตส 1.0% 6 ชั่วโมง	4.398	27.492	1.400	0.895	0.314	0.932	0.648	0.726	0.260	0.511	1.060	0.690			7.436	13.193		
ฟรุคโตส 1.5% 6 ชั่วโมง	4.206	26.291	1.644	0.937	0.404	0.841	0.597	0.682	0.240	0.493	1.026	0.538			7.402	12.368		
ฟรุคโตส 2.0% 6 ชั่วโมง	3.861	24.135	1.916	1.093	0.364	1.034	0.764	0.852	0.318	0.630	1.208	0.896			9.075	15.894		

สารตัวอย่าง	ปริมาณน้ำในผลไม้ กรัม	น้ำตาล กรัม	พลังงานรวม กรัม	ไขมัน กรัม	โปรตีน กรัม	คาร์โบไฮเดรต กรัม	ใยอาหาร กรัม	วิตามินซี กรัม	วิตามินเอ กรัม	วิตามินบี ₆ กรัม	วิตามินอี กรัม	วิตามินเค กรัม	วิตามินดี กรัม	วิตามินซี กรัม	วิตามินเอ กรัม	วิตามินบี ₆ กรัม	วิตามินอี กรัม	วิตามินเค กรัม
Super Sweet ควบคุม (control)	5.511	34.448	2.702	1.986	1.092	1.554	1.164	1.448	0.418	1.128	1.944	1.084	14.370	25.781	8.489	8.171	14.824	13.976
ซูโครส 1.0% 3 ชั่วโมง	5.382	33.642	2.145	1.015	0.326	0.958	0.622	0.766	0.278	0.508	1.058	0.813	8.489	13.976	8.489	8.171	14.824	13.976
ซูโครส 1.5% 3 ชั่วโมง	4.778	29.864	1.821	0.978	0.316	0.969	0.660	0.801	0.261	0.514	1.091	0.760	8.171	14.824	8.171	8.171	14.824	14.824
ซูโครส 2.0% 3 ชั่วโมง	4.539	28.371	2.142	0.906	0.270	0.898	0.633	0.765	0.298	0.380	0.888	0.540	7.720	13.837	7.720	7.720	13.837	13.837
ซูโครส 1.0% 6 ชั่วโมง	4.094	25.589	1.804	0.996	0.290	0.982	0.665	0.825	0.270	0.533	0.985	0.620	7.970	14.467	7.970	7.970	14.467	14.467
ซูโครส 1.5% 6 ชั่วโมง	3.834	23.966	1.800	1.174	0.336	0.965	0.717	0.822	0.272	0.584	1.138	0.682	8.490	15.562	8.490	8.490	15.562	15.562
ซูโครส 2.0% 6 ชั่วโมง	3.720	23.253	1.817	1.204	0.319	1.014	0.686	0.788	0.261	0.626	1.011	0.675	8.401	14.759	8.401	8.401	14.759	14.759

สารตัวอย่าง	แบคทีเรียในดินปนเปื้อน กรัม	แบคทีเรียในน้ำปนเปื้อน กรัม	แบคทีเรียในพืช กรัม	เชื้อรา กรัม	เชื้อราเขียว กรัม	เชื้อราขาว กรัม	เชื้อราสีน้ำตาล กรัม	เชื้อราสีชมพู กรัม	เชื้อราสีส้ม กรัม	เชื้อราสีม่วง กรัม	เชื้อราสีเหลือง กรัม	เชื้อราสีฟ้า กรัม	เชื้อราสีเทา กรัม
PB9													
ควบคุม (control)	6.261	39.133	1.874	1.573	0.848	1.294	0.953	1.066	0.510	0.766	1.546	0.893	11.323
พริกไทยสด 1.0% 3 ชั่วโมง	5.747	35.921	1.874	1.112	0.406	1.196	0.742	0.876	0.340	0.571	1.140	0.972	9.229
พริกไทยสด 1.5% 3 ชั่วโมง	5.304	33.152	1.860	0.919	0.323	0.876	0.612	0.674	0.286	0.530	0.964	0.740	7.784
พริกไทยสด 2.0% 3 ชั่วโมง	4.942	30.891	1.756	1.171	0.403	1.163	0.734	0.844	0.336	0.582	1.134	0.881	9.004
พริกไทยสด 1.0% 6 ชั่วโมง	4.588	28.678	2.301	1.441	0.443	1.132	0.717	0.844	0.404	0.548	1.098	0.814	9.742
พริกไทยสด 1.5% 6 ชั่วโมง	4.319	26.997	1.882	1.022	0.344	1.032	0.740	0.838	0.324	0.568	1.124	0.802	8.676
พริกไทยสด 2.0% 6 ชั่วโมง	4.117	25.734	1.608	1.184	0.371	1.102	0.691	0.852	0.328	0.579	1.134	0.334	8.683

การรังสี อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่จำเป็นกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
ในสารตัวอย่าง 100 กรัม Ratio of Essential amino
acids and total nitrogen (E / T)

ตัวอย่าง	E / T
Super Sweet control	2.607
กลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง	2.475
กลูโคส 1.5 % 3 ชั่วโมง	1.873
กลูโคส 2.0 % 3 ชั่วโมง	2.000
กลูโคส 1.0 % 6 ชั่วโมง	2.699
กลูโคส 1.5 % 6 ชั่วโมง	2.189
กลูโคส 2.0 % 6 ชั่วโมง	1.844
ฟรุคโทส 1.0 % 3 ชั่วโมง	1.525
ฟรุคโทส 1.5 % 3 ชั่วโมง	1.746
ฟรุคโทส 2.0 % 3 ชั่วโมง	1.688
ฟรุคโทส 1.0 % 6 ชั่วโมง	1.690
ฟรุคโทส 1.5 % 6 ชั่วโมง	1.759
ฟรุคโทส 2.0 % 6 ชั่วโมง	2.350
ซูโครส 1.0 % 3 ชั่วโมง	1.577
ซูโครส 1.5 % 3 ชั่วโมง	1.710
ซูโครส 2.0 % 3 ชั่วโมง	1.700
ซูโครส 1.0 % 6 ชั่วโมง	1.946
ซูโครส 1.5 % 6 ชั่วโมง	2.214
ซูโครส 2.0 % 6 ชั่วโมง	2.258

ตารางที่ 9 อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่จำเป็นกับปริมาณไนโตรเจน
ทั้งหมดในสารตัวอย่าง 100 กรัม Ratio of Essential
amino acids and total nitrogen (E / T)

สารตัวอย่าง				E / T
P B 9	control			1.808
กลูโคส	1.0 %	3 ชั่วโมง		1.998
กลูโคส	1.5 %	3 ชั่วโมง		1.748
กลูโคส	2.0 %	3 ชั่วโมง		1.728
กลูโคส	1.0 %	6 ชั่วโมง		1.780
กลูโคส	1.5 %	6 ชั่วโมง		1.736
กลูโคส	2.0 %	6 ชั่วโมง		1.752
ฟรุคโทส	1.0 %	3 ชั่วโมง		1.605
ฟรุคโทส	1.5 %	3 ชั่วโมง		1.467
ฟรุคโทส	2.0 %	3 ชั่วโมง		1.821
ฟรุคโทส	1.0 %	6 ชั่วโมง		2.123
ฟรุคโทส	1.5 %	6 ชั่วโมง		2.008
ฟรุคโทส	2.0 %	6 ชั่วโมง		2.109
ซูโครส	1.0 %	3 ชั่วโมง		1.297
ซูโครส	1.5 %	3 ชั่วโมง		1.831
ซูโครส	2.0 %	3 ชั่วโมง		1.699
ซูโครส	1.0 %	6 ชั่วโมง		1.374
ซูโครส	1.5 %	6 ชั่วโมง		1.456
ซูโครส	2.0 %	6 ชั่วโมง		2.080

ควบคุม (control) และถ้าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลฟรุคโทสสูงขึ้น หรือเวลาในการแช่เพิ่มขึ้น ปริมาณของโปรตีน ในโครเจนและกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดจะลดลง ดังผลการทดลองในตาราง 3

1.6 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส มีปริมาณของโปรตีนในโครเจนทั้งหมด และกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดลดลงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control) และเมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาล ซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น หรือเวลานานขึ้น ปริมาณโปรตีน ในโครเจนทั้งหมดและกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดจะลดลง เช่นเดียวกับการแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทส

1.7 ค่าของอัตราส่วนระหว่างกรกมิโนที่จำเป็นกับปริมาณในโครเจนทั้งหมด (E / T) ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพิ่มขึ้น 1.0 % 6 ชั่วโมง สูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control) ส่วนปลายรากข้าวโพดตัวอย่างอื่น ๆ ค่าของ E / T ลดลงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control)

2. พืช PB 9

2.1 ปริมาณของกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1.0 % 3 ชั่วโมง สูงกว่าปริมาณของกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดในปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control) ส่วนปริมาณในโครเจนทั้งหมดและโปรตีนต่ำกว่าเล็กน้อย

2.2 ปริมาณของกรกมิโน tryptophan ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส สูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control) อย่างเห็นได้ชัด และการสังเคราะห์กรกมิโน tryptophan เกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1.5 % 3 ชั่วโมง

2.3 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และใช้เวลาในการแช่ปลายรากข้าวโพดนานขึ้น ปริมาณในโครเจนทั้งหมด โปรตีน และกรกมิโนที่จำเป็นทั้งหมดลดลง

2.4 ค่าของอัตราส่วนระหว่างกรกมิโนที่จำเป็นกับปริมาณในโครเจนทั้งหมด

(E / T) ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง สูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control) และค่าของ E / T จะลดลง เมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และเวลานานขึ้น ถึงผลการทดลองในตาราง 9

2.5 ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทส มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมดลดลงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control)

ส่วนปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan ก็ลดเช่นกัน ยกเว้นเมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทสเข้มข้น 1.0 % เวลา 6 ชั่วโมง จะได้อาปริมาณของ tryptophan สูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control) มาก

2.6 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมดลดลงเมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และเวลาแช่ปลายรากข้าวโพดนานขึ้น

2.7 ค่าของอัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่จำเป็นกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (E / T) ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทสสูงกว่าข้าวโพดที่ควบคุม (control) ยกเว้นปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลฟรุคโทส 1.0 % 3 ชั่วโมง และ 1.5 % 6 ชั่วโมง

2.8 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และกรดอะมิโนทั้งหมด ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส ลดลงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control)

ส่วนปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan ในปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสสูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control) ปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 1.5 % 6 ชั่วโมง จะมีการสังเคราะห์กรดอะมิโน tryptophan ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับปลายรากข้าวโพด

ตัวอย่างอื่น ๆ ที่ใช้ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเหมือนกัน ถึงผลการทดลองในตาราง 7

2.9 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และกรกอมินที่จำเป็นทั้งหมดลดลง เมื่อแช่ปลายรากข้าวโพดในสารละลายน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และเวลาที่แช่นานขึ้น ยกเว้นปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 1.5 % 3 ชั่วโมง และ 2.0 % 6 ชั่วโมง มีปริมาณของกรกอมินที่จำเป็นทั้งหมดสูงกว่าปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 1.0 % เวลา 3 ชั่วโมง

ส่วนค่า E/T ของปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสจะต่ำกว่าค่า E/T ของปลายรากข้าวโพดที่ควบคุม (control) ยกเว้นปลายรากข้าวโพดที่แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1.5 % 3 ชั่วโมง และ 2.0 % 6 ชั่วโมง.

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ควยเหตุที่ข้าวโพดมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของชาติ และใช้ประโยชน์เป็นอาหารของคนและสัตว์โค เพราะในข้าวโพดมีปริมาณของโปรตีน และวิตามินสูง และยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นและสำคัญแก่ร่างกายควย จึงเห็นควรปรับปรุงให้ข้าวโพดมีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายสูงขึ้นโดยใช้วิธีการที่จะให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในปลายรากข้าวโพดจากสารละลายน้ำตาล

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้าเรื่องนี้ก็เพื่อจะได้ทราบถึงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นที่สังเคราะห์ขึ้นในปลายรากข้าวโพด หลังจากแช่ในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน และเวลาต่าง ๆ กันว่ามีมากน้อยเพียงใด เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดที่ไม่ได้แช่ในสารละลายน้ำตาล (control) และยังได้ศึกษาถึงคุณค่าอาหารของข้าวโพด (ค่า E / T) อีกด้วย ทั้งนี้เพื่อจะได้นำผลของการวิจัยไปประยุกต์ในค่านอาหารและการเกษตรต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การแช่ปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet ในสารละลายน้ำตาล ไม่ได้ช่วยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดหรือกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายทั้งหมดสูงขึ้น หรือกล่าวคือการแช่ปลายรากข้าวโพดพันธุ์ (Super Sweet) ในสารละลายน้ำตาลนั้นไม่ได้เพิ่มการสังเคราะห์ปริมาณโปรตีนหรือกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ดังนั้นจึงไม่ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของโปรตีน หรือไม่ช่วยเพิ่มคุณค่าอาหารของข้าวโพด. ดังจะเห็นได้จากค่า E / T ของปลายรากข้าวโพดที่ไม่เพิ่มขึ้นเลยหลังจากแช่ในสารละลายน้ำตาล
2. การแช่ปลายรากข้าวโพดพันธุ์ Super Sweet ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง มีผลคือทำให้ tryptophan ในปลายรากข้าวโพดสูงขึ้นกว่า

control เล็กน้อย แต่ขณะเดียวกันกลับทำให้กรดอมินที่จำเป็นแก่ร่างกายอื่น ๆ ลดลง

3. ผลที่ได้ขึ้น ๆ สอดคล้องกับการทดลองของ Oaks Ann และ Johnson F.J. ซึ่งปรากฏว่า การเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป หรือนานเกินไปจะไปเร่งการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตพวก Polysaccharides มากกว่าการสังเคราะห์โปรตีนหรือกรดอมิน

4. สำหรับพันธุ์ PB 9 นั้น ถึงแม้การเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลงก็ตาม แต่คุณภาพของโปรตีนหรือคุณค่าทางโภชนาการ (ค่า E / T) ของรากล้ำโพทกลับสูงขึ้น เห็นได้ชัดเกินกว่าพันธุ์ Super Sweet กล่าวคือค่า E / T เพิ่มขึ้นเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทพันธุ์นี้ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1.0 % 3 ชั่วโมง ทำให้การสังเคราะห์กรดอมินที่จำเป็นแก่ร่างกายสูงกว่า control หรือสูงกว่าการเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทประเภทอื่น

5. สิ่งที่สำคัญที่สุดคือ tryptophan ซึ่งเป็น limiting amino acid ในรากล้ำโพทอื่นทำให้รากล้ำโพทมีคุณภาพด้อยกว่าชนิดที่อื่น ๆ ในแง่ของโปรตีนนั้น จะเพิ่มขึ้นเมื่อเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทพันธุ์ PB 9 ในน้ำตาลกลูโคสและซูโครส ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และเวลาต่าง ๆ กัน

6. การสังเคราะห์กรดอมินที่จำเป็นทั้งหมดในปลายรากล้ำโพทที่แช่ในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ นั้น เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับการสังเคราะห์โปรตีนในปลายรากล้ำโพท กล่าวคือ เมื่อปริมาณของกรดอมินที่จำเป็นทั้งหมดในปลายรากล้ำโพทลดลง ปริมาณของโปรตีนในปลายรากล้ำโพทก็จะลดลงด้วย

ส่วนการสังเคราะห์กรดอมิน tryptophan ในปลายรากล้ำโพทที่แช่ในสารละลายน้ำตาลสูงขึ้น ถึงแม้ว่าปริมาณของกรดอมินที่จำเป็นทั้งหมด และโปรตีนทั้งหมดในปลายรากล้ำโพทลดลง

7. ผลการทดลองสรุปได้ว่า การปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในรากล้ำโพท โดยการเปลี่ยนแปลงรากล้ำโพทในสารละลายน้ำตาลนั้น ไม่เหมาะสมสำหรับพันธุ์ Super Sweet แต่เหมาะสมกับพันธุ์ PB 9 มากกว่า และควรใช้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าน้ำตาลประเภทอื่น

สำหรับความเข้มข้นและเวลานั้นจะได้มีการทดลองซ้ำให้กว้างขวางกว่านี้ เพื่อผลที่ได้จะได้แน่นอนยิ่งขึ้น และควรจะให้ทดลองกับข้าวโพดภายหลังปลูกลงดินแล้วด้วย

ขอแนะนำในการทดลอง

1. การใส่สารลงใน column ของเครื่อง *Amino Acid Analyzer* เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนนั้น ต้องพิจารณาถึงปริมาณของโปรตีนในสารตัวอย่างนั้น ๆ ด้วย ถ้าสารตัวอย่างนั้นมีปริมาณโปรตีนสูง ใช้สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรก็พอเพราะในสารละลาย 0.5 มิลลิลิตรมีปริมาณของกรดอะมิโนต่าง ๆ พอที่จะแยกได้ แต่ถ้ามีปริมาณของโปรตีนน้อยก็ต้องใช้สารละลายตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร การดูว่าในสารละลายตัวอย่างมีปริมาณของกรดอะมิโนพอที่จะแยกได้หรือไม่นั้นดูได้จากค่าของโปรตีนในสารตัวอย่างนั้น หรือใช้วิธีทดสอบเทียบกับสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง
2. เมื่อได้ค่าของกรดอะมิโนของสารตัวอย่างแล้ว สามารถตรวจค่าของกรดอะมิโนที่ใดว่ามีความถูกต้องหรือไม่ ให้นำค่าปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมดไปเทียบกับค่าของโปรตีนของสารตัวอย่างนั้น ถ้าค่าของกรดอะมิโนทั้งหมดที่ได้มีประมาณ 40 – 60 % ของปริมาณโปรตีน แสดงว่าค่าของกรดอะมิโนที่ทดลองมีผลเชื่อถือได้
3. ในการทดลองหาปริมาณของ tryptophan เนื่องจากสีของสารตัวอย่างมีอิทธิพลต่อค่า optical density (O.D) มาก ฉะนั้นการทำปลายรากข้าวโพดให้แห้งจึงสำคัญ จะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 70 – 80°ซ. เสมอ ระมัดระวังอย่าให้เกิดการไหม้ ถ้าสีของสารตัวอย่างเข้มมาก ค่า optical density ของ tryptophan ที่ได้อาจผิดไปจากค่าที่แท้จริง
4. การเตรียมกรรสำหรับสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างไม่ควรเตรียมไว้นาน ๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียของกรรในตริกซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารละลายที่จะนำมาใช้ในการทดลองลดลงได้ และเมื่อใช้สารละลายดังกล่าวหมดแล้ว และจะต้องผสมสารละลายกรรนี้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปอีก จะต้องทำการวัดค่า optical

density ของสารมาตรฐาน tryptophan ใหม่ทุกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของ tryptophan ในสารตัวอย่างที่ใช้สารละลายกรดที่เตรียมขึ้นใหม่

5. เนื่องจากการคำนวณหาปริมาณของโปรตีนในปลายรากข้าวโพดจะต้องใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรด H_2SO_4 ฉะนั้นเมื่อต้องเตรียมสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 และ $NaOH$ ขึ้นใหม่ทุกครั้งจะต้องเป็นสารมาตรฐานจริง ๆ และนำค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานนั้นมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างที่ใช้สารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองควรใช้พันธุ์เมล็ดข้าวโพดที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง เพื่อประหยัดเวลาในการเพาะเมล็ดข้าวโพด ควรใช้พันธุ์ข้าวโพดที่ประเทศเรานิยม—นำมาใช้ในการรับประทานหรือใช้เลี้ยงสัตว์ และสามารถปลูกได้ดีในสภาพภูมิประเทศดินฟ้าอากาศของประเทศไทยด้วย

2. ในการทดลองควรใช้เมล็ดข้าวโพดที่มีความสมบูรณ์ ไม่มีโรค และเมล็ดข้าวโพดที่ใช้ นอกจากเป็นพันธุ์เดียวกันแล้วสภาวะในการทำเป็นพันธุ์จะต้องเหมือนกันด้วย ควรเป็นเมล็ดพันธุ์รุ่นเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อจะลดผลของการวิจัยที่ถูกทดลอง

3. ในการวิจัยครั้งนี้เพียงแค่เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอมิโนที่จำเป็นในปลายรากข้าวโพดหลังจากแฉในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน และเวลาที่ใช้ต่างกันเท่านั้น ผู้เขียนเห็นว่าควรจะได้ทำการทดลองให้กว้างขวางกว่านี้ โดยนำเมล็ดข้าวโพดที่งอกมาแล้วแฉในสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน และใช้เวลาในการแฉต่างกัน จากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดเหล่านี้ไปทำการปลูกลงดินจริง ๆ แล้วทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอมิโนที่จำเป็น โปรตีนและค่า E / T ของข้าวโพดในทุกระยะของการเจริญเติบโต เพื่อดูว่าระยะใดที่ข้าวโพดมีคุณค่าทางอาหารสูงสุด และนำผลมาเปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้แฉในสารละลายน้ำตาล (control) ว่าปริมาณของกรดอมิโนที่จำเป็น โปรตีนและค่า E / T ของข้าวโพดที่ทำการทดลองจะสูงขึ้นหรือ

ลดลงกว่าชาวโพลที่ control ทั้งนี้ก็อาจจะไ้ผลแน่นอนยิ่งขึ้น และสามารถนำผลของการวิจัยไปใช้เป็นประโยชน์ในด้านอาหารและเกษตรกรรมได้ดียิ่งขึ้น

4. ผู้ที่สนใจในการค้นคว้าวิจัยหาชนิดและปริมาณของกรกณีนโนในสารอื่น ๆ สามารถนำวิธีการทดลองนี้ไปศึกษาได้.

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ประภัทร ปรีพณะ "ราษฎรภาคตะวันออกเฉียงเหนือควรใช้ข้าวโพดเป็นอาหารประจำวัน
รวมกับข้าวสาร" กสิกร ปีที่ 32 เล่ม 1 มกราคม 2512 หน้า 53

สุทัศน์ ศรีวัฒนาพงศ์ "การปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในข้าวโพด" วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร
4 : 1, มกราคม 2514 หน้า 60 - 61.

อภาพล เสนาณรงค์ "การปลูกข้าวโพดในประเทศไทย" เอกสารทางวิชาการที่ 4
กองการคนควาและทดลอง กรมกสิกรรม 2515 หน้า 1 - 4.

Bates, Robert B., Research Techniques in Organic Chemistry, Printice-
Hall Inc., New Jersey, 1971, pp. 414 - 417.

Blackburn S., Amino Acid Determination, Marcel Dekker Inc., New York,
1968, pp. 81-101.

Brewoster, Ray, Q., and McEwen, William E., Organic Chemistry, 3rd
edition, Prentice-Hall Inc., Maruzen Co, 1971 pp. 415 - 416.

Clowes F.A.L., "Protein Synthesis in Root Meristems," J. Exptl.
Botany, 7 : , 1958, pp. 307 - 12.

Fisher, E, Ber., 39, 1906, pp. 530.

Folin, O., and Dennis, W., J. Biol Chem., 12, 1912, p.p. 245

Gabb, M.H., Latonen, W.E., A Hand-Book of Laboratory Solutions
Cornmarket Hunchinson Ltd. London, 1969, pp. 122.

Hanke, M.T., and Kaessler K.K., J. Biol, Chem., 43 : 527(1920).

Henrickson, James B., Organic Chemistry, Mc-Graw - Hill Book Company,
New York, 1970, pp. 12 - 14

Instruction Manual for the Model KLA - 3R, Amino Acid Analyzer,
Hitach-Berkin - Elmer, December, 1967, pp. 196.

Jensen, W.L., "The Incorporation of C¹⁴ - adenine and C¹⁴- Phenylalanine
by Developing Root Tips Cells," Proc. Natl Acad. Sci. U.S.,
43., 1957, 1038 - 46.

- Kopple, Kenneth, D., Peptides and Amino Acids, W.A., Benjamin Inc., New York, 1966, p.p. 4
- Kursanov A.L., "Metabolism and Transport of Organic Substances in the Phloem," Advan Botan. Res. 1 : 1963 pp. 209 - 78.
- Moore S., Speckman, D.H., and Stein, W.H., "Automatic Apparatus for Use in Chromatography" Federation Proc. 17, 1958, pp. 1107-25.
- Moore S., "Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins and Improved System" Anal Chem. 30 :, 1958, pp. 1185-90.
- Oaks A., and John F.J., "Effect of Sugars on Amino Acid Biosynthesis in Maize Root Tips," Canadian Journal of Botany, 1970, 48(1), 117 - 24.
- Oaks A., "The Control of Amino Acids Synthesis in Maize Root Tip" Biochem. Biophys Acta 79 : 1963, pp. 638 - 41.
- Oaks A., "Transport of Amino Acids to Maize Root" Plant Physiol 41 :, 1966, pp. 173 - 180.
- Peter Karlson, Introduction to Modern Biochemistry, 3rd. edition, Academic Press. Inc., New York, 1968, pp. 31 - 3/.
- Sakaguchi S., J. Biochem. (Tokyo) 5:, 1925, 13, 25, 133 p.p.
- Todd Audrey Analytical Method of Protein Chemistry, Vol II, 1960, p.p. 245 - 283,

การคำนวณ