

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่แยกจาก
กากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ

Functional properties of protein isolated from
detoxified physic nut seed cake

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรพจน์ สุนทรสุข

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเพื่อการวิจัยประจำปี 2553-54

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรัฐบาลที่ให้การสนับสนุนงบประมาณประจำปี 2553-54 สำหรับงานวิจัยนี้ และ
ขอขอบคุณ นางสาว คลพร แซ่แต้ ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้งบริษัท ลัดดา จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างกากเมล็ดสนูป
คำ

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ส่วนต่างๆของสบู่ดำถูกนำไปประยุกต์ใช้หลายรูปแบบทั้งในภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม โดยกากเมล็ดสบู่ดำซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการบีบอัดน้ำมันเมล็ดสบู่ดำ มีปริมาณโปรตีนสูงซึ่งอาจนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกในอุตสาหกรรมอาหารหรืออาหารสัตว์ได้ อย่างไรก็ตาม กากเมล็ดสบู่ดำยังมีองค์ประกอบจำพวกสารพิษ Phorbol esters และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ Phytic acid, Trypsin inhibitor, Lectin และ Saponin วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาวิธีการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดสารพิษ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการจากกากเมล็ดสบู่ดำ ได้แก่ การสกัดด้วยสารละลาย Ethanol 90% ปริมาตร 15 มล. เป็นเวลา 5 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และสกัดซ้ำ 4 ครั้ง ต่อกากเมล็ดสบู่ดำ 5 กรัม การศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านและผ่านการกำจัดสารพิษด้วย Ethanol พบว่า คุณสมบัติด้านการละลายของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงสุดและต่ำสุดที่ pH 12.0 และ 4.0 ตามลำดับ ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษมีค่ามากกว่าโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการกำจัดสารพิษถึงสองเท่า ความสามารถในการจับกับน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านและผ่านการกำจัดสารพิษ มีค่า 1.86 และ 1.07 มิลลิลิตร น้ำมัน/ กรัม โปรตีน ตามลำดับ ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง รวมทั้งความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้ง 2 ชนิด มีค่าสูงในช่วง pH เป็นค่าต่ำ โดยความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ : สบู่ดำ / กากเมล็ดสบู่ดำ / สารต้านคุณค่าทางโภชนาการ / โปรตีน / คุณสมบัติเชิงหน้าที่

Abstract

Jatropha curcas is an economic important plant because of its several potential industrial and medicinal uses. Its seed cake, a by-product generated from oil extraction process of *J. curcas* seed, is rich in protein which could be used as an alternative protein source for the food or feed industries. However, the seed cake contains toxic agents, phorbol esters, and also anti-nutritional factors which are phytic acid, trypsin inhibitors, lectin and saponin. The objectives of this study were to study the best condition to reduce toxin and anti-nutritional factors of the *J. curcas* seed cake, and to study the functional properties of proteins isolated from the *J. curcas* seed cake and its detoxified seed cake. To optimize the condition of toxin and anti-nutritional factor reduction, the best condition was achieved by using 90% ethanol as a solvent at a volume of 15 ml to 5 g of the seed cake with 4 time repeated extraction and 5 min for each time, using a shaker at 150 rpm. Functional properties of proteins isolated from *J. curcas* seed cake and the seed cake detoxified by ethanol extraction were studied. The solubilities of both protein isolates were maximum and minimum at pHs of 12.0 and 4.0, respectively. The water binding capacity of protein isolated from the seed cake was 2-fold higher than that of protein isolated from the detoxified seed cake. The proteins from the seed cake and the detoxified seed cake provided the oil binding capacities of 1.86 and 1.07 ml oil/g protein, respectively. The foam capacities and stabilities including emulsion activities and stabilities of both protein isolates were high in a range of basic pHs. Their foam and emulsion stabilities decreased with increasing time.

Keywords : *Jatropha curcas* / seed cake / anti-nutritional factors / protein / functional properties

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
การตรวจเอกสาร	9
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล	13
สรุปผลการทดลอง	27
ข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำ	13
2 ปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสบู่ดำ	14
3 ปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการตากแดด	15
4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณ Phorbol esters ที่สกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ	16
5 ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำหลังการสกัดด้วย Ethanol	19
6 ปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสบู่ดำหลังการสกัดด้วย Ethanol	20
7 ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำและกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ	23

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ผลของปริมาตร Ethanol ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสนุ่นดำ	16
2 ผลของจำนวนครั้งในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสนุ่นดำ	17
3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสนุ่นดำ	18
4 ผลของความเร็วรอบที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสนุ่นดำ	18
5 ผลของ pH ต่อปริมาณ โปรตีนที่สกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำ	21
6 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ โปรตีนที่สกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำ	22
7 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติด้านการละลายของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ	23
8 ผลของค่า pH ต่อความสามารถในการเกิดโฟมของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ	24
9 ผลของค่า pH และระยะเวลาต่อความคงตัวของ โฟมของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำ	25
10 ผลของค่า pH และระยะเวลาต่อความคงตัวของ โฟมของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ	25
11 ผลของค่า pH ต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ	26
12 ผลของค่า pH ต่อความคงตัวของอิมัลชันของ โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ	27

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาทางด้านพลังงานโดยราคาน้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้น รัฐบาลใช้การรณรงค์เพื่อการประหยัดพลังงานน้ำมันและลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ รวมทั้งส่งเสริมการใช้พลังงานทางเลือกทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิง อาทิ การผลิตแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อผสมเป็นก๊าซโซฮอล์ และการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel) จากพืชน้ำมัน ได้แก่ ปาล์มน้ำมันและสบู่ดำ โดยเฉพาะสบู่ดำรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมการเพาะปลูกและการผลิตน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซลตามยุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมไบโอดีเซล นอกจากนี้หน่วยงานภาคเอกชนจากต่างประเทศสนใจพื้นที่ของประเทศไทยในการปลูกพืชพลังงานสำหรับแลกเปลี่ยนประโยชน์ของคาร์บอนเครดิต

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดจากทวีปอเมริกาใต้ในแถบประเทศเม็กซิโก (Dehgan and Webster, 1979) เมล็ดสบู่ดำมีองค์ประกอบหลักคือ โปรตีน 30-32 % และน้ำมัน 60-66 % โดยส่วนของเนื้อเมล็ดและเปลือกมีน้ำมันประมาณ 51.99-62 % และ 0.98 % ตามลำดับ (Becker and Francis, 2000) จึงเหมาะแก่การนำมาสกัดน้ำมันเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล นอกจากนี้ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นสบู่ดำเป็นอย่างดี ปัจจุบันสบู่ดำมีการปลูกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยประมาณ 50,000 ไร่ เกิดผลิตผลเมล็ดสบู่ดำประมาณ 40,000 ตัน ซึ่งสามารถผลิตเป็นไบโอดีเซลประมาณ 10 ล้านลิตร (สอบถามส่วนตัว) ก่อให้เกิดกากเมล็ดสบู่ดำประมาณ 30,000 ตัน ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์เนื่องจากกากเมล็ดสบู่ดำประกอบด้วยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสัตว์ อาทิ Phorbol esters ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม diterpenes ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งในสิ่งมีชีวิต และ Curcin ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ก่อให้เกิดการแพ้อย่างรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ หายใจติดขัด อาจถึงขั้นเสียชีวิต และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการหลายชนิด เช่น Trypsin inhibitor ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin Phytic acid ซึ่งเป็นน้ำตาล inositol ที่มีความสามารถในการสร้างพันธะกับแร่ธาตุที่เป็นไควาเลนท์หรือไตรวาเลนท์ก่อให้เกิดการขัดขวางกระบวนการดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็น Saponins เป็นสารในกลุ่ม steroid มีความสามารถในการขัดขวางการดูดซึมไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน Lectin เป็น glycoprotein ที่มีความสามารถในการทำให้เลือดตกตะกอนและขัดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Makkar et al., 1997)

กากเมล็ดสบู่ดำหลังการบีบอัดน้ำมันมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 50-62 % และมีกรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิดในปริมาณมากยกเว้น lysine (Makkar et al., 1998) ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรได้เหมือนกับโปรตีนจากกากถั่วเหลือง อาทิการใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำหรับมนุษย์ การใช้เป็นแหล่งอาหารเสริม การใช้เป็นโปรตีนผสมในอาหารเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติด้านต่างๆ ของอาหาร และเป็นแหล่งของเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน

เนื่องจากกากเมล็ดสบู่ดำมีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นจำเป็นต้องกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนนำไปใช้ โดยอาจทำได้โดยใช้ความร้อนแบบต่าง ๆ สารเคมี อาทิ กรด ค่าง หรือตัวทำละลายอินทรีย์ หรือวิธีทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์และเอนไซม์ เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะกำจัดสารพิษออกจากกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือทิ้ง จากนั้นสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษเพื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่และองค์ประกอบของโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้โปรตีนดังกล่าวในอุตสาหกรรมอาหารคน อาหารเสริมและอาหารสัตว์ต่อไป ซึ่งจะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากเมล็ดสบู่ดำ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษและกากเมล็ดสบู่ดำที่มีสารพิษ
- 2 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษและกากเมล็ดสบู่ดำที่มีสารพิษ
- 3 เพื่อศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. เมล็ดสบู่ดำมีองค์ประกอบหลักคือ โปรตีน 30-32 % และน้ำมัน 60-66 % โดยส่วนของเนื้อเมล็ดและเปลือกมีน้ำมันประมาณ 51.99-62 % และ 0.98 % ตามลำดับ (Becker and Francis, 2000) อย่างไรก็ตามเมล็ดสบู่ดำประกอบด้วยสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการหลายชนิด ดังนั้น ผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำยังไม่เหมาะกับการบริโภคของมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามเมล็ดสบู่ดำเหมาะสำหรับการนำมาใช้สกัดน้ำมันเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลสำหรับใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล แต่กากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

กากเมล็ดสบู่ดำมีโปรตีนสูงและต้องกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการก่อนนำมาใช้ประโยชน์เพื่อให้ปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งสิ่งแวดล้อม การกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำอาจทำได้โดยใช้ความร้อนแบบต่าง ๆ ค่าง รังสี หรือตัวทำละลายอินทรีย์ (Aderibigbe et al., 1997; Aregheore et al., 1998; Martinez-Herrera et al., 2006) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวอาจยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้งาน ดังนั้นการศึกษการใช้แสงแดดหรือการแช่น้ำ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดน่าจะถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการต่าง ๆ ข้างต้น

โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อาทิ อาหารเจ/โปรตีนเจ อาหารเสริมโปรตีน ขนมขบเคี้ยวโปรตีน เด็กและอาหารเสริมสุขภาพ เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชสำหรับอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยด้านคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร เช่น คุณสมบัติการละลาย

ความสามารถในการเกิดเจล ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม และความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน รวมทั้งการเกิดสีของผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นที่นิยมในปัจจุบัน แต่มีราคาแพง แหล่งโปรตีนของพืชอื่น เช่น โปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำน่าจะใช้ทดแทนได้ แต่จำเป็นต้องกำจัดสารพิษและศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการบีบน้ำมันออกแล้ว

การกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากสบู่ดำอาจทำได้โดยการใช้ความร้อนแบบต่าง ๆ สารเคมี อาทิ ค้าง หรือตัวทำละลายอินทรีย์ อาทิ Phorbol esters สามารถกำจัดออกด้วยเอทานอลหรือเมทานอล รวมทั้งการใช้เอทานอล ร่วมกับสารโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตและความร้อนขึ้น (Martinez-Herrera et al., 2006) Trypsin inhibitor ถูกทำลายด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 25 นาที (Martinez-Herrera et al., 2006) หรืออุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 90 นาที หรืออุณหภูมิ 130/160°C เป็นเวลา 60 นาที หรือความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 120 นาที จะเห็นได้ว่าความร้อนขึ้นมีประสิทธิภาพในการทำลาย Trypsin inhibitor ดีกว่าความร้อนแห้ง (Aderibigbe et al., 1997) Phytic acid ถูกทำลายได้เล็กน้อยด้วยการฉายรังสีที่ 10 K Gy และส่วนความร้อนไม่มีผลต่อการลดปริมาณของ Phytic acid (Aderibigbe et al., 1997; Martinez-Herrera et al., 2006) ปริมาณ Saponins ลดลงด้วยการใช้เอทานอล ร่วมกับการฉายรังสีและความร้อนไม่มีผลต่อการลดปริมาณของ Saponins เช่นกัน (Aderibigbe et al., 1997; Martinez-Herrera et al., 2006) สำหรับ Lectin ถูกกำจัดด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ทั้งนี้ความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 60 นาที หรือความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 130/160°C เป็นเวลา 60 นาที ไม่มีผลต่อการทำลาย Lectin (Aregheore et al., 1998) นอกจากนี้กระบวนการทำให้น้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์สามารถกำจัดสารพิษ Phorbol esters ได้ประมาณ 50% โดยเฉพาะขั้นตอนการทำให้อะซิของน้ำมันเป็นกลาง (deacidification) และการฟอกสีของน้ำมัน (bleaching) (Haas and Mittelbach, 2000)

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่แยกจากเมล็ดธัญพืชและพืชโปรตีนชนิดต่าง ๆ อาทิ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย cowpea, chickpea, safflower, rapeseed, great northern bean, winged bean, faba bean, mucuna bean, lupin seed และ pigeon pea ถูกรายงานโดย Sathe และ Salunkhe (1981), Sathe และคณะ (1982a), Sathe และคณะ (1982b), Abdel-Aal และคณะ (1986), Paredes-Lopez และ Ordorica-Falomir (1986), Paredes-Lopez และคณะ (1991), Mansour และคณะ (1992), Fernandez-Quintela และคณะ (1997), Mwasaru และคณะ (1999), Tsiliki และคณะ (2002), Adebawale และ Lawal (2003) และ Yu และคณะ (2007)

จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องจนถึงปัจจุบันของคณะผู้วิจัย พบว่ายังไม่มีรายงานคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งในและต่างประเทศ

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสนุ่นดำ โดยการวิเคราะห์แบบประมาณ (proximate analysis) ได้แก่ ปริมาณความชื้น (moisture content) ปริมาณไขมัน (crude fat content) ปริมาณเยื่อใย (crude fiber content) ปริมาณเถ้า (crude ash content) ปริมาณโปรตีน (crude protein content) และปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate content) ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (1995)

2. ศึกษาปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสนุ่นดำ โดยสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่วิเคราะห์ได้แก่

2.1 Phorbol ester คัดแปลงจากวิธีการของ Hass และ Mittelbach (2000)

2.2 Trypsin inhibitor ตามวิธีการของ Kakade และคณะ (1974)

2.3 Saponin ตามวิธีการของ Thilborg และคณะ (1994)

2.4 Lectin ตามวิธีการของ Gordon และ Marquardt (1974)

2.5 Phytic acid คัดแปลงจากวิธีการของ Vaintraub และ Lapteva (1995)

3. การกำจัดสารพิษในกากเมล็ดสนุ่นดำ ใช้วิธีการดังนี้

3.1 วิธีทางกายภาพ โดยเกลี่ยกากเมล็ดสนุ่นดำบนถาดอะลูมิเนียมให้มีความหนาสม่ำเสมอประมาณ 0.5 ซม. นำไปตากแดดเป็นระยะเวลา 8 ชม. ตั้งแต่ 9.00-17.00 น. เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่เหลือในกากเมล็ดสนุ่นดำ

3.2 วิธีทางเคมี โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

- ชนิดของตัวทำละลาย ได้แก่ Methanol, Ethanol, Dichloromethane (ความเข้มข้น 50%, 70%, 90%, 95% และ 99.5% (v/v)) และน้ำ

- ปริมาตรของตัวทำละลาย ได้แก่ 15, 20 และ 25 มล.

- จำนวนครั้งของการสกัด ได้แก่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ครั้ง

- ระยะเวลาในการสกัด ได้แก่ 5, 10, 15 และ 30 นาที

- ความเร็วที่ใช้ในการเขย่า ได้แก่ 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่เหลือในกากเมล็ดสนุ่นดำ

4. เลือกวิธีและสภาวะที่กำจัดสารพิษมากที่สุดในการเตรียมกากเมล็ดสนุ่นดำปราศจากสารพิษสำหรับการสกัดโปรตีน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสนุ่นดำ ดังนี้

4.1 ศึกษาผลของ pH ต่อปริมาณโปรตีนสกัด โดยผสมกากเมล็ดสนุ่นดำกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (W/V) ปรับค่า pH ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 0.1 M NaOH และ 0.1 M HCl กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้น centrifuge สารละลายตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 2,000xg เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส (Lowry et al., 1951)

4.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณโปรตีนสกัด โดยเลือกค่า pH ที่สามารถสกัดโปรตีนได้สูงสุดจากข้อ 4.1 โดยใช้อุณหภูมิในการสกัดช่วง 30-80°C วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส (Lowry et al., 1951)

4.3 ศึกษาผลของระยะเวลาต่อปริมาณโปรตีนสกัด โดยเลือกค่า pH และอุณหภูมิที่สามารถสกัดโปรตีนได้สูงสุดจากข้อ 4.1 และ 4.2 โดยใช้ระยะเวลาในการสกัด 1, 3 และ 15 ชม. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส (Lowry et al., 1951)

5. สกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำและกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ โดยใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากการศึกษาในข้อ 4. จากนั้นปรับค่า pH ของสารละลายโปรตีนส่วนใสให้มี pH 4.0 ด้วย 0.1 M HCl กวนเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อตกตะกอนโปรตีน และ centrifuge สารละลายตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 2,000xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนโปรตีน ซึ่งตะกอนโปรตีนที่ได้คือโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำ

6. ศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำและกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ ทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากทั้ง 2 แหล่ง ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิด

7. ศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำและกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้จากทั้ง 2 แหล่งทั้งนี้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ทำการศึกษา ได้แก่

7.1 คุณสมบัติการละลาย (Protein solubility) โดยทำการหาค่าการละลายของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ pH 2.0-12.0

7.2 ความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมัน (Water and oil binding capacities) โดยนำโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำผสมให้เข้ากันกับน้ำ เพื่อทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ และนำโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำผสมให้เข้ากันกับน้ำมันถั่วเหลือง เพื่อทดสอบความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีนตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Beuchat (1997) และ Chakraborty (1986)

7.3 ความสามารถในการเกิดฟอง (Foam capacity) โดยนำโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำผสมน้ำ ปรับค่า pH ในช่วง 2.0-12.0 คนให้เข้ากันและนำเข้าเครื่องปั่นเพื่อทำให้เกิดฟอง แล้วทดสอบตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Makri และคณะ (2005)

7.4 ความคงตัวของฟอง (Foam stability) โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการเกิดฟอง วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15, 30, 45 และ 60 นาที วัดปริมาตรฟองที่เวลาต่าง ๆ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Makri และคณะ (2005)

7.5 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsion activity) โดยนำโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำผสมให้เข้ากันกับน้ำ ปรับค่า pH ในช่วง 2.0-12.0 คนให้เข้ากัน เติมน้ำมันถั่วเหลือง แล้วนำไป centrifuge เพื่อกำหนดเปอร์เซ็นต์ความเป็นอิมัลชัน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Naczek และคณะ (1985)

7.6 ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability) โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C จากนั้นรอให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง คำนวณจำนวนเปอร์เซ็นต์ความคงตัวของอิมัลชัน ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Naczka และคณะ (1985)

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

1. ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ

กากเมล็ดสบู่ดำมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 23.5% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีปริมาณใกล้เคียงกับรายงานของ Makkar และคณะ (2008) สำหรับปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสบู่ดำ (ตารางที่ 2) พบว่า มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดโดย FAO/WHO (1991) ยกเว้นปริมาณ methionine และ cystine

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในตารางที่ 1 สารพิษ Phorbol esters ในกากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณ 0.73 mg/g ซึ่งสูงกว่าปริมาณสูงสุดที่หนูทดลองสามารถทนได้ (0.09 mg/g) (Aregheore et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตาม Phorbol esters ที่พบมีปริมาณน้อยกว่าในกากเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์อื่น ๆ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ไม่มีพิษจากประเทศ Mexico (Marker et al., 1998)

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำ

Components	Content ¹
Crude protein (% w/w)	23.5 ± 1.5
Phorbol esters (mg/g dry sample) ²	0.73 ± 0.06
Phytic acid (% w/w)	8.55 ± 0.51
Trypsin inhibitor (TIU ³ /g dry sample)	7.42 ± 1.64
Lectin activity (HU ⁴ /mg protein)	13.15 ± 0.45
Saponin ⁵ (µg/g dry sample)	27.82 ± 0.68

¹ Means ± standard deviation of triplicate determinations

² Equivalent to phorbol 12-myristate,13 acetate

³ Trypsin inhibitor units

⁴ Hemagglutinating units

⁵ Diosgenin equivalents

สำหรับปริมาณสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ Phytic acid, Trypsin inhibitor, Lectin และ Saponin พบว่ากากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณ Trypsin inhibitor และ Lectin เท่ากับ

7.42 TIU/g sample และ 13.15 HU/mg protein ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์อื่นๆ (Marker et al., 1998) ผลการวิเคราะห์ Phytic acid และ Saponin ในกากเมล็ดสบู่ดำพบว่าปริมาณ 8.55% และ 27.82 µg/g sample ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณ Phytic acid และ Saponin ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์อื่น ๆ (Marker et al., 1998)

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสบู่ดำ

Amino acid (g amino acid/100 g seed cake)	<i>J. curcas</i> seed cake¹	FAO/WHO reference value² (g/100 g)
<i>Essential</i>		
Methionine	2.37	2.5 ³
Cystine	1.10	
Tyrosine	0.31	6.3 ⁴
Phenylalanine	0.77	
Isoleucine	0.73	2.8
Leucine	1.30	6.6
Valine	0.90	3.5
Histidine	0.45	1.9
Threonine	0.73	3.4
Lysine	0.86	5.8
Total essential amino acids	9.52	32.8
<i>Non-essential</i>		
Aspartic acid	1.82	
Serine	0.93	
Glutamic acid	3.20	
Glycine	0.83	
Arginine	2.31	
Alanine	6.25	
Proline	2.69	

¹ All values are means of duplicate determinations.

² FAO/WHO. Protein quality evaluation, Daily requirements for human adults, 1991

³ Methionine + cystine

⁴ Tyrosine + phenylalanine

2. การกำจัดสารพิษในกากเมล็ดสับดำ

2.1 วิธีทางกายภาพ

การศึกษาผลของความร้อนจากแสงแดดต่อปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสับดำ พบว่า กากเมล็ดสับดำที่ผ่านการตากแดดเป็นเวลานาน 8 ชม. สามารถลดปริมาณ Lectin ได้ทั้งหมด (หรือลดลงคิดเป็น 100%) และลดปริมาณ Phorbol esters, Phytic acid, Trypsin inhibitor และ Saponin ได้บางส่วน หรือลดลงคิดเป็น 29%, 13%, 20% และ 74% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสับดำที่ผ่านการตากแดด

Components	Content ¹
Phorbol esters (mg/g dry sample) ²	0.52 ± 0.09
Phytic acid (% , w/w)	7.40 ± 0.05
Trypsin inhibitor (TIU ³ /g dry sample)	5.96 ± 0.98
Lectin activity (HU ⁴ /mg protein)	ND
Saponin ⁵ (µg/g dry sample)	20.60 ± 0.50

¹ Means ± standard deviation of triplicate determinations

² Equivalent to phorbol 12-myristate,13 acetate

³ Trypsin inhibitor units

⁴ Hemagglutinating units

⁵ Diosgenin equivalents

ND: Not detected

2.2 วิธีทางเคมี

การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายและความเข้มข้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในการสกัด Phorbol esters แสดงผลในตารางที่ 4 พบว่าน้ำกลั่นไม่สามารถสกัด Phorbol esters ส่วน Methanol 100% และ Ethanol 90% ปริมาตร 20 ml สกัดซ้ำ 5 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 5 นาที และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที สามารถสกัด Phorbol esters ออกจากกากเมล็ดสับดำ 0.47 และ 0.43 mg/g ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ Dichloromethane ที่ความเข้มข้นต่างๆสามารถสกัด Phorbol esters ได้น้อยกว่าการใช้ Methanol และ Ethanol จึงเลือกใช้ Ethanol 90 % เป็นตัวทำละลายในการสกัด Phorbol esters เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตมากกว่าการใช้ Methanol

ตารางที่ 4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อปริมาณ Phorbol esters ที่สกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำ

Concentration (%, v/v)	Phorbol esters (mg phorbol esters ¹ /g dry sample) ²			
	Methanol	Ethanol	Dichloromethane	Distilled water
50	0.08 ^a ± 0.02	0.09 ^a ± 0.02	0.04 ^a ± 0.01	NA
70	0.27 ^b ± 0.09	0.20 ^b ± 0.02	0.03 ^a ± 0.01	NA
90	0.36 ^b ± 0.05	0.43 ^d ± 0.00	0.03 ^a ± 0.02	NA
95	NA	0.35 ^c ± 0.04	NA	NA
99.5	0.47 ^c ± 0.00	NA	0.08 ^b ± 0.01	NA
100	NA	NA	NA	ND

Mean values with different letters (a, b,...) in the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

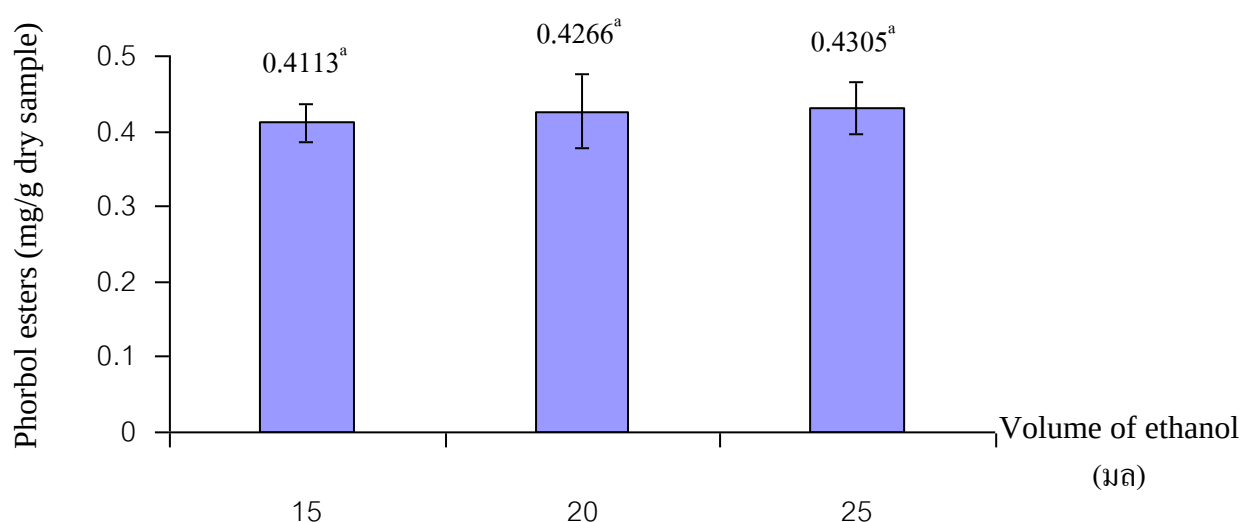
NA: Not analysed

ND: Not detected

¹ Equivalent to phorbol 12-myristate13-acetate (การทดลองนี้ Phorbol esters เริ่มต้น เท่ากับ 0.45 mg/g)

² Mean ± SD of triplicate analyses

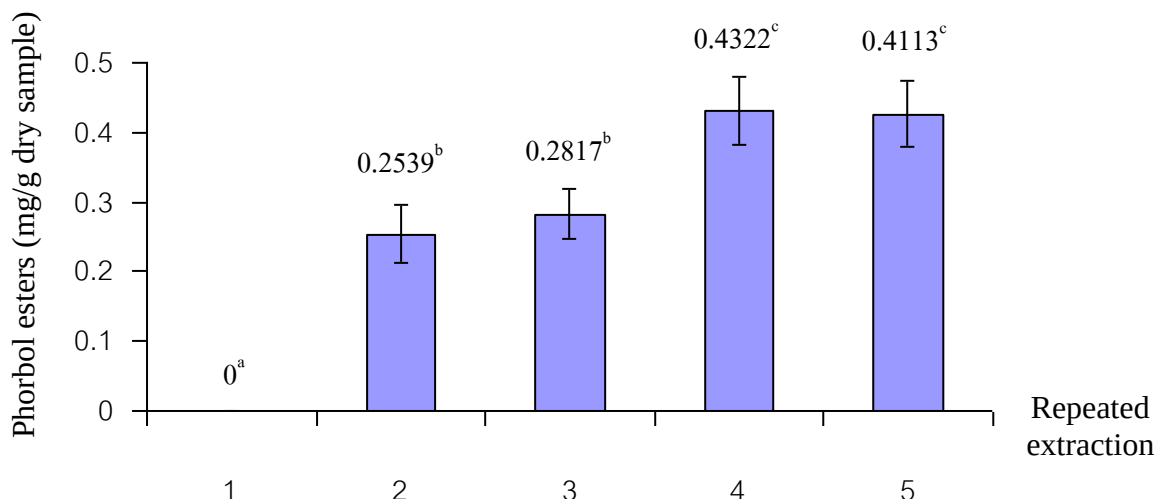
การศึกษาผลของปริมาตร Ethanol 90 % ที่เหมาะสมในการสกัด Phorbol esters พบว่าการใช้ Ethanol ปริมาตร 15, 20 และ 25 ml สกัดซ้ำ 5 ครั้ง นาน 5 นาทีต่อครั้ง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที สามารถสกัด Phorbol esters ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยปริมาณ Phorbol esters ที่สกัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.41 – 0.43 mg/g (รูปที่ 1) จึงเลือกใช้ Ethanol 90 % ปริมาตร 15 ml ซึ่งเป็นปริมาตรที่น้อยที่สุด เพื่อการสกัด Phorbol esters ในการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป



รูปที่ 1 ผลของปริมาตร Ethanol ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสนุ่นดำ

Mean values with different letters (a, b, ...) are significantly different ($p \leq 0.05$).

ผลของจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัด Phorbol esters แสดงในรูปที่ 2 โดยใช้ Ethanol 90% ปริมาตร 15 ml สกัดซ้ำ 1-5 ครั้ง นาน 5 นาทีต่อครั้ง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที พบว่าการสกัดเพียง 1 ครั้ง ไม่สามารถสกัด Phorbol esters ออกจากตัวอย่างได้ ส่วนการสกัดซ้ำ 2 และ 3 ครั้ง สามารถสกัด Phorbol esters ได้ในปริมาณ 0.25 และ 0.28 mg/g ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่การสกัดซ้ำ 4 และ 5 ครั้ง พบปริมาณ Phorbol esters เท่ากับ 0.43 และ 0.41 mg/g ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงเลือกใช้การสกัดซ้ำ 4 ครั้ง เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

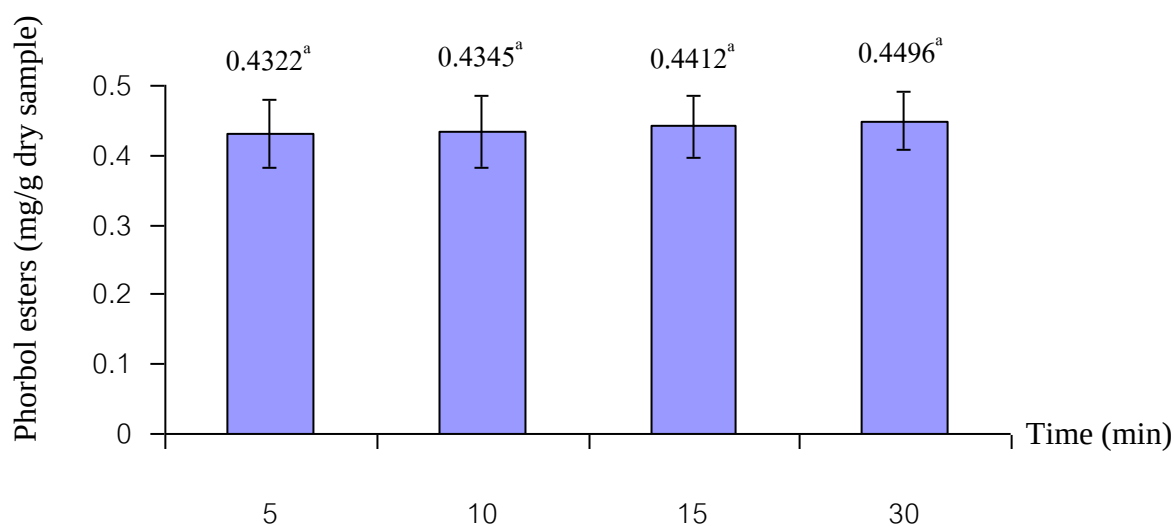


รูปที่ 2 ผลของจำนวนครั้งในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสบู่ดำ

Mean values with different letters (a, b, ...) are significantly different ($p \leq 0.05$).

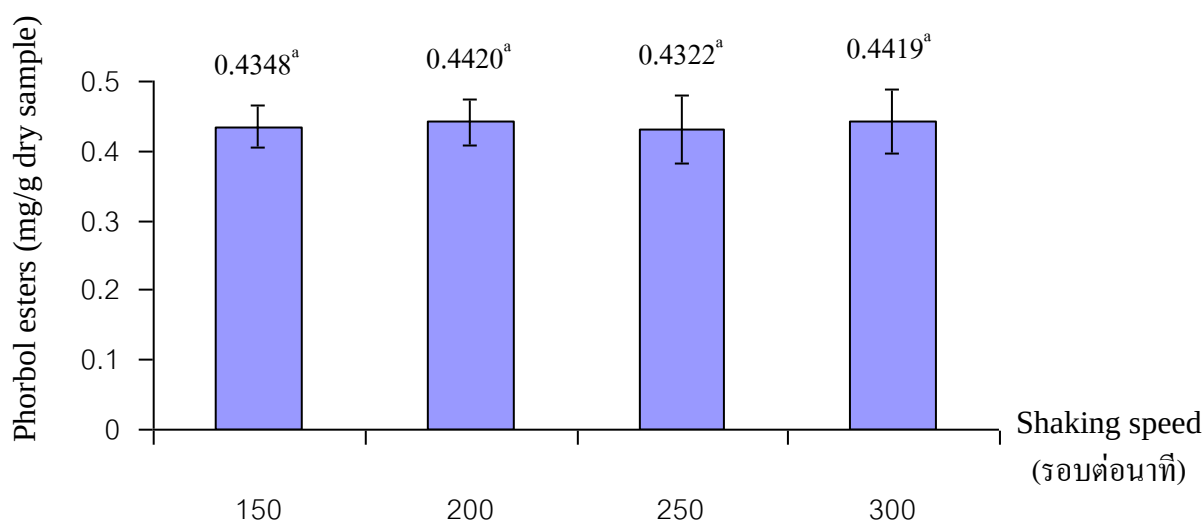
การวิเคราะห์ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด Phorbol esters พบว่าการใช้ Ethanol 90% ปริมาตร 15 ml สกัดซ้ำ 4 ครั้ง ใช้เวลา 5, 10, 15 และ 30 นาทีต่อครั้ง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที สามารถสกัด Phorbol esters ได้ในช่วง 0.43 – 0.45 mg/g (รูปที่ 3) ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัด 5 นาทีต่อครั้ง สำหรับการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป เนื่องจากเป็นระยเวลานาน้อยที่สุดที่สามารถสกัด Phorbol esters

สำหรับผลของความเร็วยรอบของเครื่องเขย่าในการสกัด Phorbol esters พบว่าการใช้ Ethanol 90% ปริมาตร 15 ml สกัดซ้ำ 4 ครั้ง ใช้เวลา 5 นาทีต่อครั้ง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150, 200, 250, 300 รอบต่อนาที สามารถสกัด Phorbol esters ได้ 0.43 – 0.44 mg/g (รูปที่ 4) ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จึงเลือกใช้ความเร็วรอบในการสกัด 150 รอบต่อนาที เนื่องจากเป็นความเร็วรอบน้อยที่สุดในการสกัด Phorbol esters



รูปที่ 3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสบู่ดำ

Mean values with different letters (a, b, ...) are significantly different ($p \leq 0.05$).



รูปที่ 4 ผลของความเร็วรอบที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณ Phorbol esters ของกากเมล็ดสบู่ดำ

Mean values with different letters (a, b, ...) are significantly different ($p \leq 0.05$).

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด Phorbol esters จากกากเมล็ดสบู่ดำปริมาณ 5 กรัม คือการสกัดด้วยสารละลาย Ethanol 90% ปริมาตร 15 มล. สกัดซ้ำ 4 ครั้ง ระยะเวลา 5 นาทีต่อครั้ง ด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

3. ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสับดูดำหลังการสกัดด้วย Ethanol

ภายหลังจากการจัดสารพิษด้วย Ethanol 90% ในสถานะที่เหมาะสม พบว่ากากเมล็ดสับดูดำมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 23% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับโปรตีนจากกากเมล็ดสับดูดำก่อนการจัดสารพิษ (ตารางที่ 1) สำหรับกรดอะมิโนของกากเมล็ดสับดูดำหลังการสกัดด้วย Ethanol 90% (ตารางที่ 6) พบว่า มีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในกากเมล็ดสับดูดำก่อนการจัดสารพิษ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสับดูดำหลังการสกัดด้วย Ethanol มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดโดย FAO/WHO (1991) ยกเว้นปริมาณ methionine และ cystine

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสับดูดำ (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่า การกำจัดสารพิษด้วย Ethanol ในสถานะที่เหมาะสม สามารถลดปริมาณ Phorbol esters และ Lectin ถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (หรือลดลงคิดเป็น 100%) นอกจากนี้ Phytic acid, Trypsin inhibitor และ Saponin พบว่ามีปริมาณลดลงเหลือเพียง 1.87%, 1.12 TIU/g sample และ 10.04 µg/g sample ตามลำดับ หรือลดลงคิดเป็น 78%, 85% และ 64% ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีน สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสับดูดำหลังการสกัดด้วย Ethanol

Components	Content ¹
Crude protein (% , w/w)	23.0 ± 1.0
Phorbol esters (mg/g dry sample) ²	ND ³
Phytic acid (% , w/w)	1.87 ± 0.11
Trypsin inhibitor (TIU ⁴ /g dry sample)	1.12 ± 0.09
Lectin activity (HU ⁵ /mg protein)	ND ³
Saponin ⁶ (µg/g dry sample)	10.04 ± 0.60

¹ Means ± standard deviation of triplicate determinations

² Equivalent to phorbol 12-myristate,13 acetate

³ ND: Not detected

⁴ Trypsin inhibitor units

⁵ Hemagglutinating units

⁶ Diosgenin equivalents

ดังนั้น การสกัดด้วย Ethanol จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสับดูดำมากกว่าวิธีการตากแดด เนื่องจากสามารถกำจัด Phorbol esters และ Lectin ได้

อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งสามารถกำจัด Phytic acid, Trypsin inhibitor และ Saponin ได้บางส่วน กากเมล็ดสนุ่น
 คำที่ผ่านการสกัดด้วย Ethanol จึงจัดเป็นกากเมล็ดสนุ่นคำปลอดสารพิษ

ตารางที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนของกากเมล็ดสนุ่นคำหลังการสกัดด้วย Ethanol

Amino acid (g amino acid/100 g seed cake)	Content ¹	FAO/WHO reference value ² (g/100 g)
<i>Essential</i>		
Methionine	2.21	2.5 ³
Cystine	1.02	
Tyrosine	0.36	6.3 ⁴
Phenylalanine	0.69	
Isoleucine	0.63	2.8
Leucine	1.14	6.6
Valine	0.78	3.5
Histidine	0.35	1.9
Threonine	0.66	3.4
Lysine	0.55	5.8
Total essential amino acids	8.39	32.8
<i>Non-essential</i>		
Aspartic acid	1.54	
Serine	0.81	
Glutamic acid	2.50	
Glycine	0.74	
Arginine	1.71	
Alanine	5.82	
Proline	2.42	

¹ All values are means of duplicate determinations.

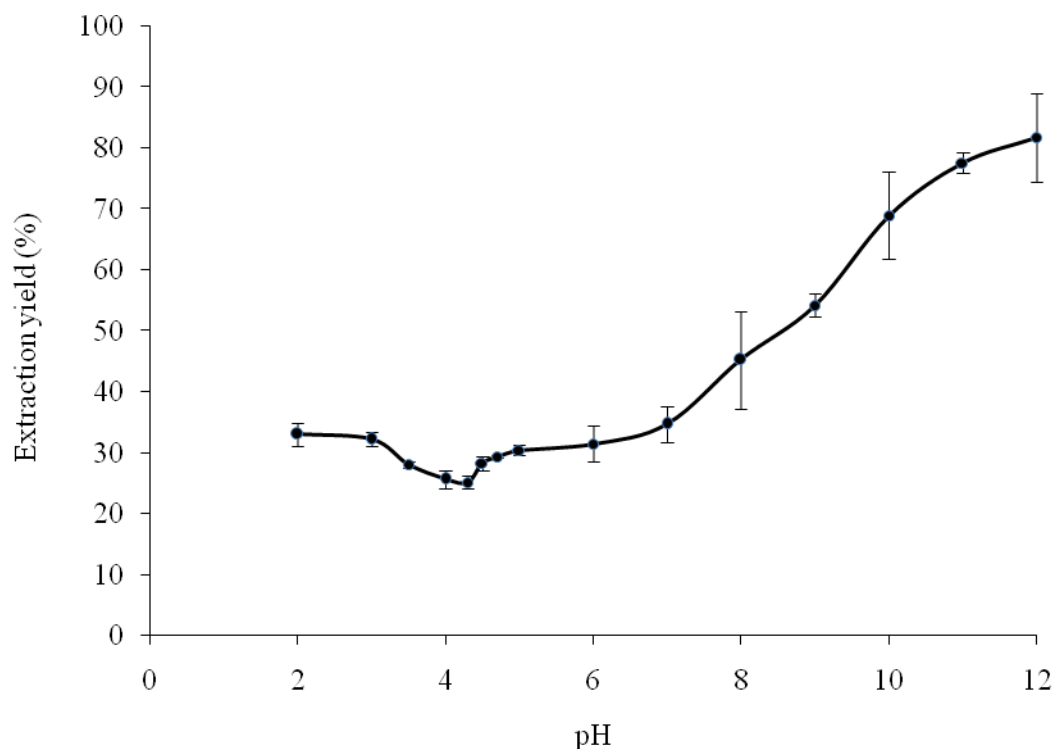
² FAO/WHO. Protein quality evaluation, Daily requirements for human adults, 1991

³ Methionine + cystine

⁴ Tyrosine + phenylalanine

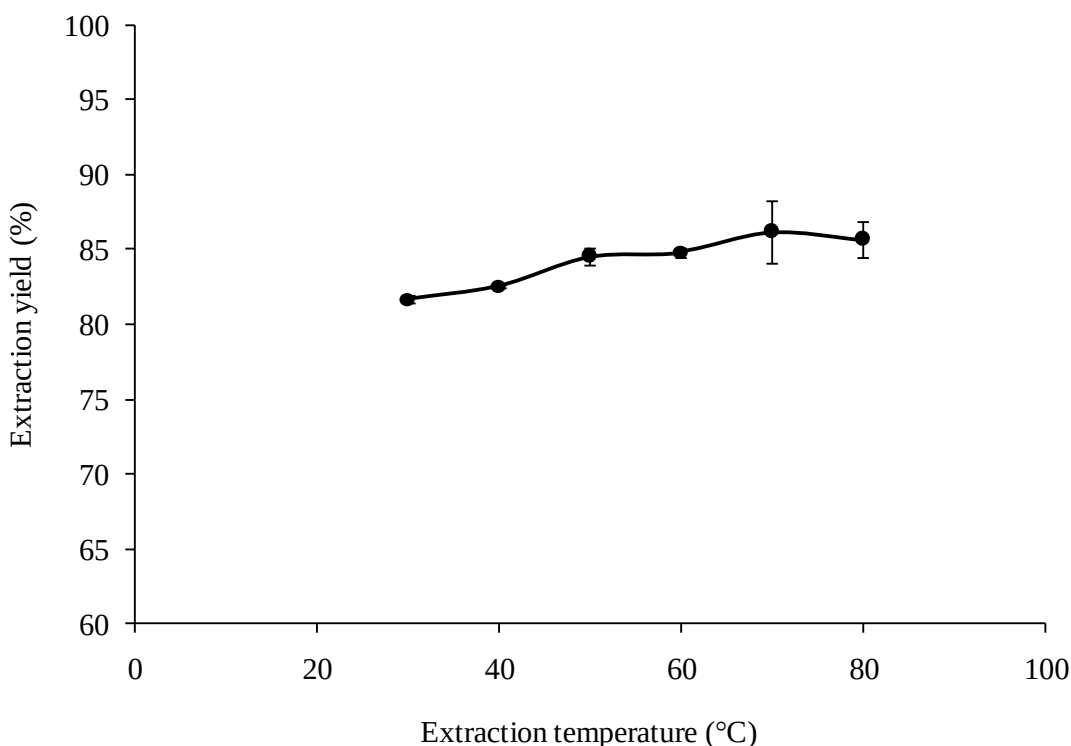
4. การสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ

ผลของค่า pH ต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในรูปที่ 5 พบว่า ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีค่าน้อยที่สุดที่ระดับ pH 4.0-4.3 และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ของกากเมล็ดสบู่ดำละลายได้ดีในช่วง pH ต่าง โดยปริมาณโปรตีนมีค่ามากที่สุด (81.7%) ที่ pH 12 ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่า pH 12 ในการศึกษาปัจจัยอื่นในการสกัดโปรตีนต่อไป เนื่องจากเป็นค่า pH ที่สามารถสกัดโปรตีนได้ในปริมาณสูงสุด



รูปที่ 5 ผลของ pH ต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ

ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในรูปที่ 6 เมื่อปรับสารละลายให้มี pH 12 และสกัดโปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (30-50°C) และโปรตีนมีปริมาณสูงสุด (84.6%) เมื่อสกัดด้วยอุณหภูมิ 50°C ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับปริมาณโปรตีนที่สกัดด้วยอุณหภูมิสูงกว่า 50°C ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 50°C เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นในการสกัดโปรตีนต่อไป



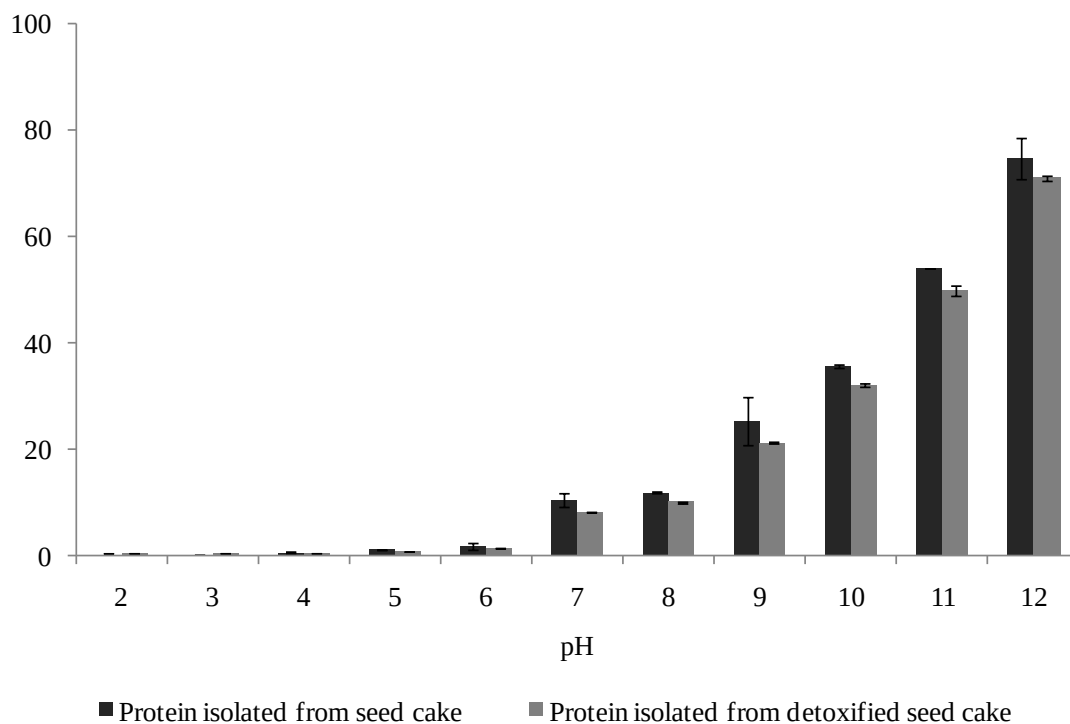
รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดจากกากเมล็ดสับดูดำ

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสับดูดำ พบว่า เมื่อปรับสารละลายให้มี pH 12 อุณหภูมิ 50°C ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัดนานขึ้น โดยปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัด 1 ชม. ในขณะที่การสกัดโปรตีนนาน 3 และ 15 ชม. พบว่ามีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัด 3 ชม. เนื่องจากเป็นระยะเวลาด้านที่สั้นที่สุดที่สามารถสกัดโปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด (88.2%)

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดสับดูดำคือ ปรับสารละลายให้มี pH 12 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 50°C และระยะเวลา 3 ชม.

5. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัด

คุณสมบัติด้านการละลายของโปรตีนสกัดจากทั้งกากเมล็ดสับดูดำและกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษ มีลักษณะเป็นกราฟรูปตัว U (U-shape curve) ดังแสดงในรูปที่ 7 โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำทั้งสองชนิดมีค่าการละลายต่ำในช่วง pH กรด (2.0-6.0) และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โดยโปรตีนจากกากเมล็ดสับดูดำทั้งสองมีค่าการละลายต่ำสุดที่ pH 4.0 แสดงถึงจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของโปรตีน ซึ่งประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์ โปรตีนจึงรวมตัวกันตกตะกอนและมีค่าการละลายต่ำ และโปรตีนสกัดสามารถละลายได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 12.0



รูปที่ 7 ผลของ pH ต่อคุณสมบัติด้านการละลายของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำและกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษ

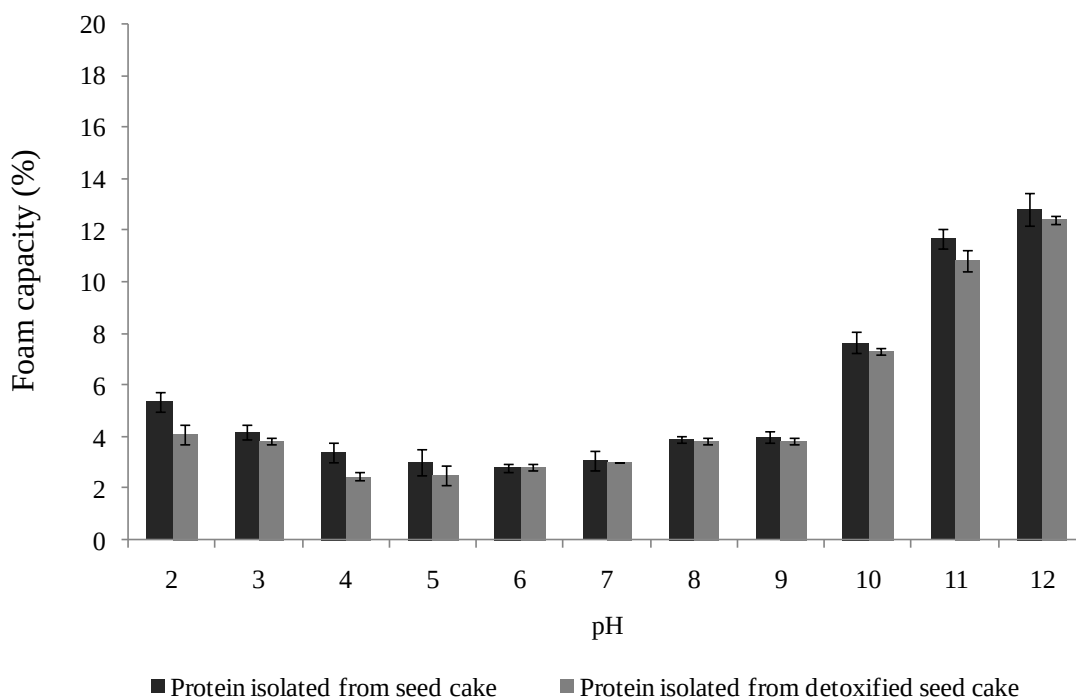
ผลการศึกษาความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำและกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษ (ตารางที่ 7) พบว่า โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษมีความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันต่ำกว่าโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำปกติประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากการลดสารพิษด้วย Ethanol ส่งผลให้โครงสร้างภายในและประจุบนพื้นผิวโปรตีน รวมทั้งความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษจึงแตกต่างจากโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำปกติ

ตารางที่ 7 ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสับดูดำและกากเมล็ดสับดูดำปลอดสารพิษ

Functional properties	Protein isolate from <i>J. curcas</i> seed cake ¹	Protein isolate from detoxified seed cake ¹
Water binding capacity (g water/g protein)	3.22 ± 0.19	1.76 ± 0.01
Oil binding capacities (ml oil/g protein)	1.86 ± 0.08	1.07 ± 0.14

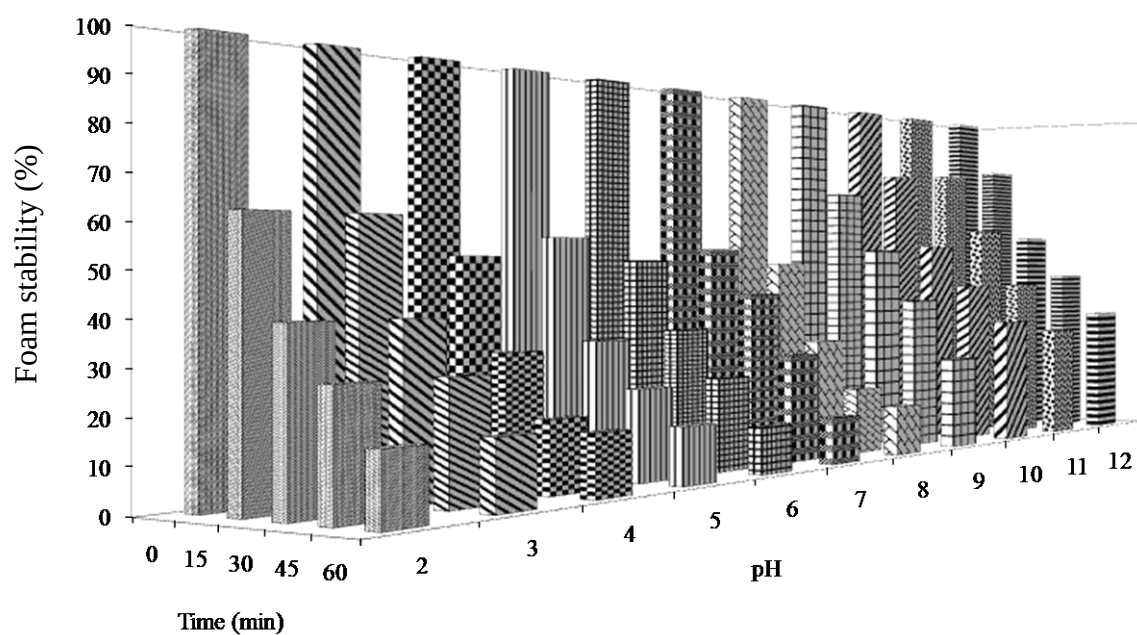
¹ Means ± standard deviation of triplicate determinations

ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำและกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ ที่ระดับ pH ต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 8) โดยมีค่าต่ำในช่วง pH 4.0-6.0 และมีค่ามากขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โดยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งสองชนิดมีความสามารถในการเกิดโฟมมากที่สุดที่ pH 12.0 ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการละลายของโปรตีน เนื่องจากโปรตีนที่ละลายได้จะช่วยลดแรงดึงผิวระหว่างฟองอากาศและของเหลวที่ล้อมรอบ ดังนั้นที่ pH 12.0 โปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งสองชนิดจึงมีความสามารถในการเกิดโฟมสูงสุด

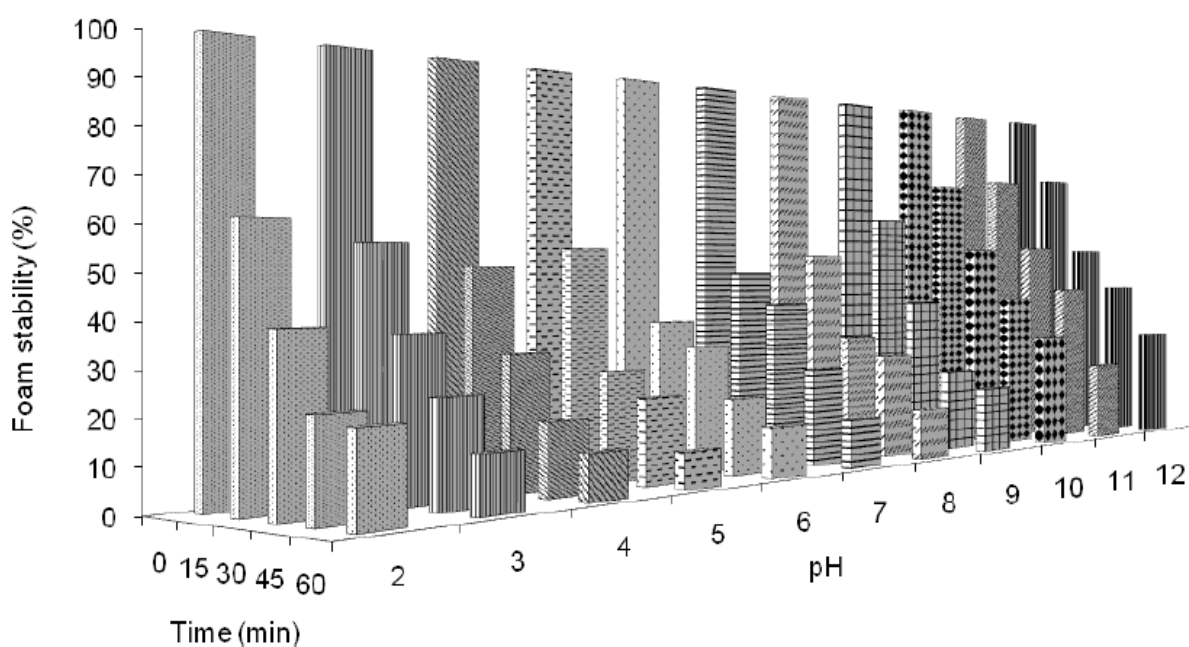


รูปที่ 8 ผลของค่า pH ต่อความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ และกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ

สำหรับการศึกษาความคงตัวของโฟมของโปรตีนที่ pH และระยะเวลาต่างๆ พบว่าโฟมของโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งสองชนิดในทุกๆ ระดับ pH มีความคงตัวลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (รูปที่ 9 และ 10) โดยปริมาณโฟมลดลงอย่างรวดเร็วใน 15 นาทีแรก และค่อยๆ ลดลงในช่วง 30-60 นาที จากการเปรียบเทียบความคงตัวของโฟมใน 15 นาทีแรก พบว่าโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งสองชนิดมีความคงตัวของโฟมต่ำในช่วง pH 4.0-6.0 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการละลายของโปรตีน

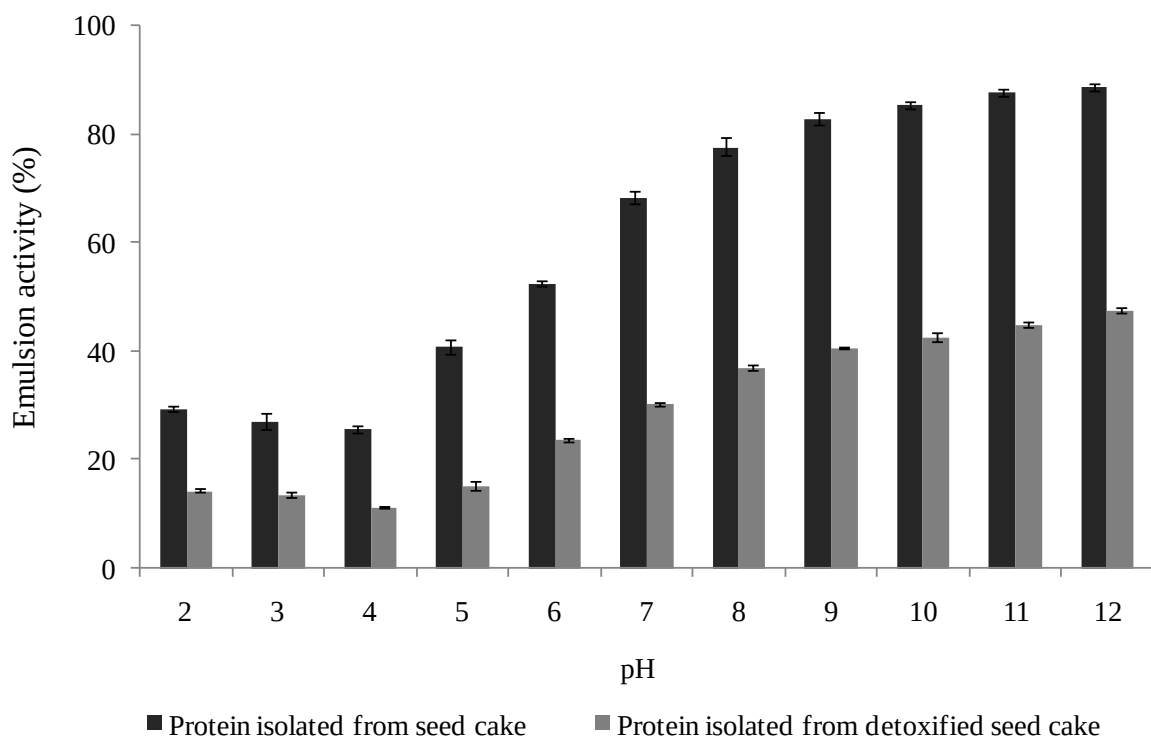


รูปที่ 9 ผลของค่า pH และระยะเวลาต่อความคงตัวของโฟมของโพรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำ



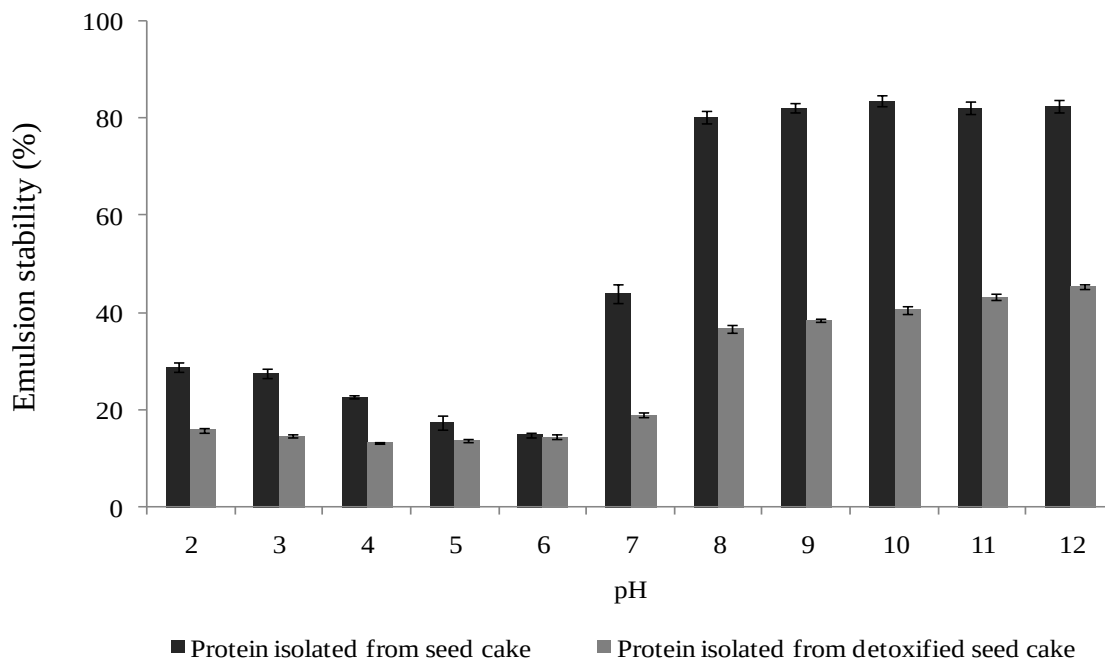
รูปที่ 10 ผลของค่า pH และระยะเวลาต่อความคงตัวของโฟมของโพรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษมีค่าต่ำกว่าโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปกติประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 11) อาจเป็นผลจากการสกัดสารพิษด้วย Ethanol ที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีน อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนทั้งสองมีแนวโน้มเดียวกัน คือมีค่าต่ำในช่วง pH 2.0-4.0 และมีค่าเพิ่มขึ้นตาม pH ที่มากขึ้น โดยที่ pH 12.0 โปรตีนทั้งสองมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุด สอดคล้องกับความสามารถในการละลายของโปรตีนนั้น



รูปที่ 11 ผลของค่า pH ต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษ

การศึกษาความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำและกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C นาน 15 นาที พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับความสามารถในการเกิดอิมัลชัน คือมีค่าต่ำในช่วง pH กรด และมีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วง pH ด่าง (รูปที่ 12) นอกจากนี้ พบว่าความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปลอดสารพิษมีค่าต่ำกว่าโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำปกติประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน



รูปที่ 12 ผลของค่า pH ต่อความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ และกากเมล็ดสบู่ดำปลอดสารพิษ

สรุปผลการทดลอง

กากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงประมาณ 23.5% นอกจากนี้มีสารพิษ Phorbol esters และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ Phytic acid, Trypsin inhibitor, Lectin และ Saponin ซึ่งไม่เหมาะกับการใช้เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์โดยตรง จากการศึกษาวิธีการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ พบว่า การสกัดด้วย Ethanol สามารถลดปริมาณ Phorbol esters, Phytic acid, Trypsin inhibitor, Lectin และ Saponin ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แสงแดด ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ คือการสกัดด้วย Ethanol 90% ปริมาตร 15 มล. นาน 5 นาทีต่อครั้ง และสกัดซ้ำ 4 ครั้งบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สำหรับคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดสารพิษด้วย Ethanol พบว่า คุณสมบัติด้านการละลายของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงสุดและต่ำสุดที่ pH 12.0 และ 4.0 ตามลำดับ ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษมีค่ามากกว่าโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการกำจัดสารพิษถึงสองเท่า ความสามารถในการจับกับน้ำมันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านและผ่านการกำจัดสารพิษมีค่า 1.86 และ 1.07 มิลลิลิตร น้ำมัน/ กรัม โปรตีน ตามลำดับ ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง รวมทั้งความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้ง 2 ชนิด มีค่าสูงในช่วง pH เป็นค่าต่าง โดยความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองลดลงตามระยะเวลา

ที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากากเมล็ดสบู่ดำมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์

ข้อเสนอแนะ

1. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำอาจเปลี่ยนแปลงตามวิธีการสกัดโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำ ดังนั้นควรศึกษาผลของวิธีการสกัด โปรตีนหรือการตกตะกอนโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีการต่าง ๆ อาทิ การใช้ตัวทำละลาย หรือการใช้สารละลายเกลือ ต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ
2. ควรศึกษาการพัฒนาหรือปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีการต่าง ๆ อาทิ วิธีทางเคมี หรือกระบวนการแปรรูปอาหาร เพื่อให้สอดคล้องกับการนำโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Aal, E. S. M., Shehata, A. A., Mahdy, E. A. R. and Youssef, M. M. 1986. Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37: 553–559.
- Adebowale, K. O. and Lawal, O. S. 2003. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrate. *Food Chemistry* 83: 237–246.
- Aderibigbe, A. O., C. O. L. E. Johnson, H. P. S. Makkar, K. Becker, and N. Foidl. 1997. Chemical composition and effect of heat on organic matter-and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. *Animal Feed Science and Technology* 67:223-243.
- Aregheore, E. M., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1998. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:349-352.
- Aregheore, E.M., Becker, K. and Makkar, H.P.S. 2003. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatment and preliminary nutritional evaluation with rats. *South Pacific Journal of Natural Science*. 21: 50-56.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., AOAC Press, Arlington, VA, USA.
- Becker, K. and G. Francis. 2000. Bio-diesel from *Jatropha* Plantations on Degraded Land, Department of Aquaculture Systems and Animal Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Beuchat, L.R. 1977. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25: 258-261.
- Chakraborty, P. 1986. Coconut protein isolate by ultrafiltration. In *Food Engineering and Process Applications*, LeMeguer, M. and Jelen, P. (Eds.), Elsevier Applied Science Publishers, NY, USA, 308-315.
- Dehgan, B. and G.L. Webster. 1979. Morphology and infrageneric relationships of the Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *University of California Publications in Botany* 74: 76.
- Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S. and Martinez, J.A. 1997 Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition* 51: 331–342.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1991. Protein quality evaluation : FAO food and nutrition paper No. 51, A joint FAO/WHO expert consultation, Rome, Italy, 4-66.

- Gordon, J.A. and Marquardt, M.D. 1974. Factors affecting hemagglutination by concanavalin A and soybean agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta* 332: 136-144.
- Haas, W., and M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products* 12:111-118.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E. and Puski, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51: 376-382.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-273.
- Makkar, H.P.S., A. O. Aderibigbe, and K. Becker. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry* 62: 207 - 215.
- Makkar, H.P.S., K. Becker, F. Sporer, and M. Wink, 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3152 - 3157.
- Makkar, H.P.S., Francis, G. and Becker, K. 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 1542-1548.
- Makri, E., Papalamprou, E. and Doxastakis, G. 2005. Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocolloid*. 19: 583-594.
- Mansour, E. H., Peredi, J. and Dworschak, E. 1992. Preparation and functional properties of rapeseed protein products. *Acta Alimentarius* 21: 293-305.
- Martinez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Daivila-Ortiz, and K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* 96:80-89.
- Mwasaru, A. M., Muhammad, K., Bakar, J. and Cheman, Y. B. 1999. Effect of isolation technique and conditions on the extractability, physiochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cow pea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. *Food Chemistry* 67: 445-452.
- Naczk, M., Diosady, L.L. and Rubin, L.J., 1985. Functional properties of canola meals produced by a two phase solvent extraction system. *Journal of Food Science*. 50: 1685-1692.

- Paredes-Lopez, O. and Ordorica-Falomir, C. 1986. Functional properties of safflower protein isolates: water absorption, whipping and emulsifying characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37: 1104–1108.
- Paredes-Lopez, O., Ordorica-Falomir, C. and Olivares-Vazquez, M. R. 1991. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science* 56(3): 726–729.
- Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. 1981. Functional properties of great northern bean proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science* 46: 71–75.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. 1982a. Functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) proteins. *Journal of Food Science* 47: 503–509.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. 1982b. Functional properties of lupin seeds (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science* 47: 491–497.
- Thilborg, S. T., Christensen, S. B., Comett, C., Olsen, C. E. and Lemmich, E. 1994. Molluscicidal saponins from a Zimbabwean strain of *Phytolacca dodecandra*. *Phytochemistry* 36: 753–759.
- Tsaliki, E., Kechagia, U. and Doxastakis, G. 2002. Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocolloids* 16: 645–652.
- Vaintraub, I.A. and Lapteva, N.A. 1995. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Analytical Biochemistry* 225: 206–212.
- Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. 2007. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry* 103: 121–129.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี

ก1. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธี Kjeldahl (AOAC, 1995)

1.1 สารละลาย Mix indicator

ผสม Methyl red 0.2 กรัม กับ Methylene blue 0.1 กรัม ใน Ethanol เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

1.2 สารเร่งปฏิกิริยา (Catalyst)

ผสม Copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัม กับ Potassium sulphate (K_2SO_4) 4 กรัม

1.3 สารละลาย Boric acid เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ละลาย Boric acid 40 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ละลาย NaOH 400 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.5 สารละลาย HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ผสมสารละลาย HCl 8.58 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ก2. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธี Lowry (Lowry et al, 1951)

2.1 สารละลาย A : สารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย B : สารละลาย $\text{KNaO}_6\text{C}_4\text{H}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ละลาย $\text{KNaO}_6\text{C}_4\text{H}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลาย C : สารละลาย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Na_2CO_3 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ละลาย NaOH 4 กรัม และ Na_2CO_3 20 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย Copper reagent

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย C ปริมาตร 48 มิลลิลิตร

2.5 สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin

ละลาย Bovine serum albumin 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Stock solution

ก3. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ Trypsin inhibitor (Kakade et al., 1974)

3.1 สารละลาย Tris buffer เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ 8.2 และมี CaCl_2 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ละลาย Tris-HCl 6.057 กรัม ในสารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (CaCl_2 1.47 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.2

3.2 สารตั้งต้น (Substrate solution)

ละลาย Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) 40 มิลลิกรัม ด้วย Dimethylsulfoxide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Tris buffer ความเป็นกรด-ด่างที่ 8.2 ซึ่งมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (สารนี้เตรียมไว้ใช้ต่อวัน)

3.3 Trypsin solution

ละลาย Crystalline porcine trypsin 0.01 กรัม ในสารละลาย HCl เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่มี CaCl_2 เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (0.2775 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ก4. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ Phytic acid (Vaintraub และ Lapteva, 1995)

4.1 Wade's Reagent

ผสมสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ กับ Sulfosalicylic acid เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

4.2 สารละลาย HCl เข้มข้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ผสมสารละลาย HCl 32.4 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายมาตรฐาน Phytic acid

ละลาย Phytic acid 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ได้ความเข้มข้นของสารละลาย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ก5. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ Lectin (Gordon และ Marquardt, 1974)

5.1 Phosphate buffer saline (PBS)

ละลาย NaCl 8 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ K_2HPO_4 0.24 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ค่าความปั่นกรด-ด่าง เท่ากับ 7

5.2 สารละลายเลือดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (1%RCB) (v/v)

ล้างสารละลายเลือด 0.5 มิลลิลิตร ด้วย Phosphate buffer saline 50 มิลลิลิตร โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 1,050 xg นาน 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างซ้ำ 3 ครั้ง

ก6. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ Saponins (Thilborg et. al., 1994)

6.1 สารละลาย A

ผสม p-anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร กับ Ethyl acetate 99.5 มิลลิลิตร

6.2 สารละลาย B

ผสม Sulfuric acid 50 มิลลิลิตร กับ Ethyl acetate 50 มิลลิลิตร

6.3 สารละลายมาตรฐาน Diosgenin

ละลาย Diosgenin 0.005 กรัม ใน Methanol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นของสารละลาย 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ก7. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ Phorbol esters (Haas และ Mittelbach, 2000)

7.1 Ethanol เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ผสมสารละลาย Ethanol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,985 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2,000 มิลลิลิตร

7.2 สารมาตรฐาน Phorbol esters (Phorbol-12-Myristate 13-Acetate)

เติม Methanol 1 มิลลิลิตร ลงในสารมาตรฐาน Phorbol esters 5 มิลลิกรัม จะได้สารละลาย Phorbol-12-Myristate 13-Acetate 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น Stock solution

ก8. การเตรียมสารเคมีในการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ

8.1 สารละลาย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย NaOH 40 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

8.2 HCl เข้มข้น 1 โมลาร์

ผสม HCl 82.85 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์

ข1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)

- 1.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างบดละเอียด 2 กรัม ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน
- 1.2 อบแห้งตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 1.3 นำตัวอย่างออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

คำนวณความชื้นจากสมการ

$$\text{Moisture (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_s}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

W_s = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างและถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

ข2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1995)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเป็นวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน โดยการเปลี่ยนสารไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic nitrogen) ให้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียด้วยวิธี Volumetric หรือ Colorimetric การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl มีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การย่อย

- 2.1.1 ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดย่อย
- 2.1.2 เติม Catalyst 0.5 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- 2.1.3 ย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

2.2 การกลั่น

- 2.2.1 เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยที่เย็นแล้วปริมาตร 75 มิลลิลิตร และ NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 2.2.2 ต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องกลั่น โดยให้ด้านปลายสายด้ายหนึ่งจุ่มในขวดรูปชมพู่ที่มี Boric acid เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเติม Mixed indicator 2-3 หยด
- 2.2.3 กลั่นเป็นเวลา 4 นาที

2.3 การไตเตรท

- 2.3.1 ไตเตรทสารละลายที่ได้กับ HCl มาตรฐาน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งได้สีชมพูของ Methylred

2.3.2 ทำ Blank เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยไม่ใส่ตัวอย่าง นำปริมาตรการไตเตรทของ Blank กับ HCl มาตรฐาน ลบออกจากปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

คำนวณปริมาณโปรตีนจากสมการ

$$N (\%) = \frac{(V_A - V_B) \times C \times 1.4007}{W}$$

$$\text{Protein (\%)} = N (\%) \times \text{Conversion factor}$$

เมื่อ N = ปริมาณไนโตรเจน (%)

V_A = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรดสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_B = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรด Blank (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 (โมลาร์)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6.25 = Conversion factor

ข3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันวิธี Soxhlet (AOAC, 1995)

2.1 ชั่งตัวอย่างหนัก 2 กรัม ใส่ในทิมเบิล (Thimble)

2.2 นำทิมเบิล (Thimble) ใส่ในชุดแยกสกัด (Extraction unit) ของเครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)

2.3 เติมน้ำมัน Petroleum ether 100 มิลลิลิตร

2.4 ตั้งอุณหภูมิการสกัดที่ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 5 ชั่วโมงหรือจนเกิดการสกัดสมบูรณ์

2.5 ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) ในบีกเกอร์โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2.6 วางทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

คำนวณปริมาณไขมันจากสมการ

$$\text{Fat (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_s}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนัก flask เป่า (กรัม)

W_1 = น้ำหนัก flask และไขมัน (กรัม)

W_s = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

ข4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995)

- 4.1 เผาครูชีเบิลในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของครูชีเบิล
- 4.2 ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ครูชีเบิล นำไปเผาด้วยตะเกียงจนควันหมด
- 4.3 เผาตัวอย่างในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือกระทั่งได้เถ้าสีขาว
- 4.4 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ปิดฝาครูชีเบิล แล้วนำออกจากเตาเผา
- 4.5 ใส่ตัวอย่างที่เผาเสร็จแล้วในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเถ้าที่แน่นอน

คำนวณปริมาณเถ้าจากสมการ

$$\text{Moisture (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_s}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนักครูชีเบิลหลังเผา (กรัม)

W_s = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างและครูชีเบิลหลังเผา (กรัม)

ข5. การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (AOAC, 1995)

- 5.1 ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ในปิកเกอร์ เติมน้ำ H_2SO_4 เข้มข้น 0.1275 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้ม นาน 3 นาที
- 5.2 กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างตัวอย่างด้วยน้ำเดือดผ่านกระดาษกรองสองครั้ง
- 5.3 ต้มตัวอย่างอีกครั้งใน NaOH เข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที
- 5.4 กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างตัวอย่างด้วยน้ำเดือดผ่านกระดาษกรองสองครั้ง
- 5.5 ล้างกากที่เหลืออยู่อีกสองครั้งด้วยสารละลาย Ethanol 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ล้างต่อด้วยเอทิลอีเทอร์ 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยในตู้ดูดควัน
- 5.6 อบแห้งกากตัวอย่างที่เหลือในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

5.7 ถ่ายตัวกากตัวอย่างลงในครุชชีเบลที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว เฝานในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือกระทั่งได้แก่สีเทาขาว

5.8 ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของกากใยที่ได้

คำนวณปริมาณเชื้อใยจากสมการ

$$\text{Mositure (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_s}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนักครุชชีเบลหลังเผา (กรัม)

W_s = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างและครุชชีเบลหลังเผา (กรัม)

ข6. การวิเคราะห์ปริมาณ Trypsin inhibitor (Kakade, 1974)

6.1 ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Shaker ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.2 เติม Tris buffer solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที

6.3 กรองสารละลายด้วยเครื่อง Vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1

6.4.เก็บสารละลายส่วนใส (Extract solution) ที่แยกได้ไปวิเคราะห์ Trypsin inhibitor โดยเตรียมตัวอย่างตามตารางภาคผนวก ข.1 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ Trypsin แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ Trypsin ที่ถูกยับยั้ง (Trypsin inhibitor: TIU) ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่าง (TIU/g dry sample) ดังนี้

คำนวณปริมาณ Trypsin inhibitor จากสมการ

$$\text{TIU/g dry sample} = \frac{(A_b - A_a) - (A_d - A_c) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

ตารางที่ ข.1 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ Trypsin inhibitor

Step	Solution	Volume (ml)			
		Control		Sample	
		a	b	c	d
1	Water	1	1	0.7	0.7
2	BAPNA	2	2	2	2
3	Extract solution	-	-	0.3	0.3
4	Trypsin	-	0.5	-	0.5
Warm the mixture in water bath at 37°C for 10 min					
5	30% Acetic acid	0.5	0.5	0.5	0.5
6	Trypsin	0.5	-	0.5	-
Total Volume		4	4	4	4

ข7. การวิเคราะห์ปริมาณ Phytic acid ในกากเมล็ดสับดำ (Vaintraub และ Lapteva, 1995)

7.1 ชั่งกากเมล็ดสับดำ 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

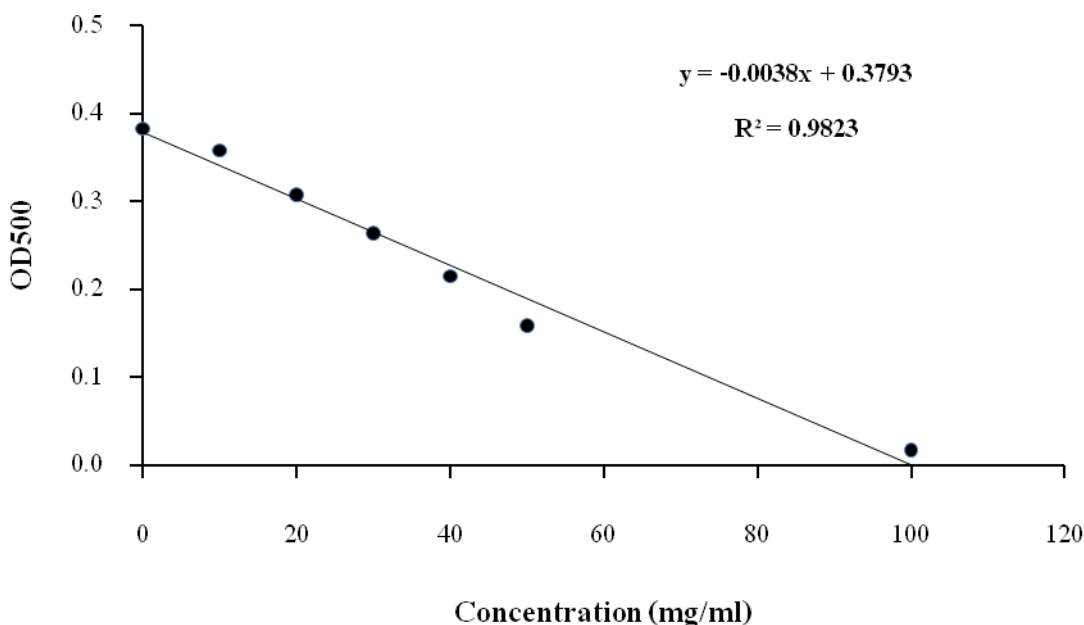
7.2 เติมน้ำละลาย HCl เข้มข้น 2.4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.3 กรองสารละลายด้วยเครื่อง Vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใส

7.4 นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำ Wade reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

7.5 นำค่าที่ได้หาปริมาณ Phytic acid จากกราฟมาตรฐาน ทำกราฟมาตรฐานของ Phytic acid โดยใช้สารละลาย Phytic acid ที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟระหว่างค่า OD 500 นาโนเมตร และความเข้มข้นของ Phytic acid ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข.1

$$\text{Phytic acid (g/g dry sample)} = \frac{\Delta\text{OD 500} \times \text{ปริมาตรกรดที่ใช้สกัด (ml)} \times \text{Dilution}}{\text{Slope} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times 1000 \times 10^{-6}}$$



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ Phytic acid

ข8. การวิเคราะห์ปริมาณ Lectin ในกากเมล็ดสับปะรด (Gordon และ Marquardt, 1974)

8.1 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ลงใน Flask เติม Phosphate buffer saline 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 1,430 xg นาน 20 นาที

8.3 เก็บส่วนใสมาทำการวิเคราะห์โดยหยดสารสกัด 50 ไมโครลิตร ลงใน Microtitration plate ทำ Serial dilution อัตราส่วน 1:2 ด้วย Normal saline และหยดสารละลายเลือดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน Microtitration plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง บันทึกอัตราส่วนที่ต่ำที่สุดของเลือดต่อ Normal saline ที่ทำให้เกิดการตกตะกอน

ข9. การวิเคราะห์ปริมาณ Saponin ในกากเมล็ดสับปะรด (Thiborg et al., 1994)

9.1 บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างหนัก 0.5 กรัม ลงในภาชนะ

9.2 เติม Methanol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่า Overnight ด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

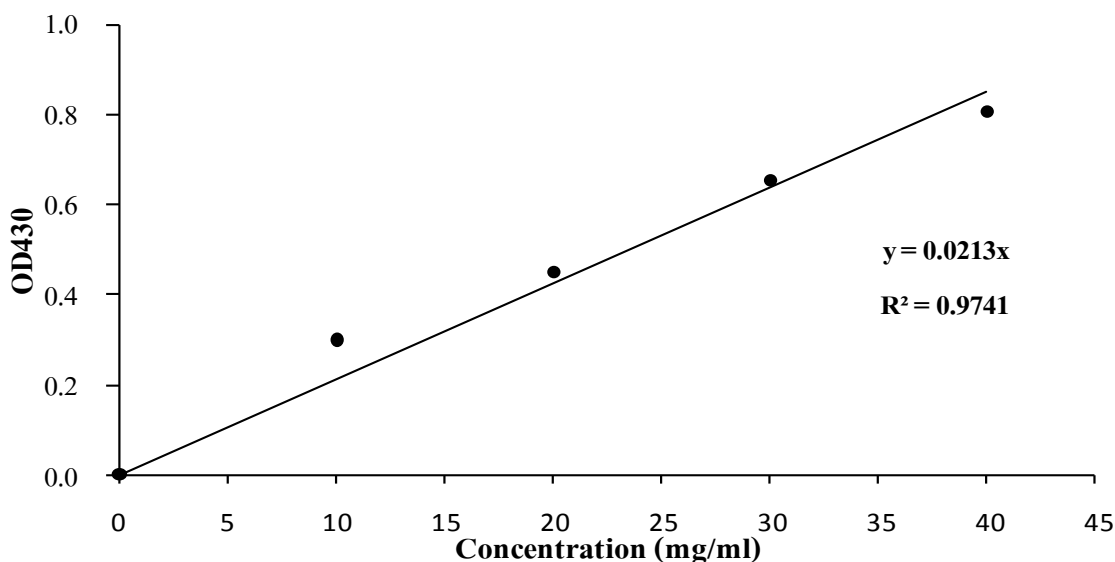
9.3 กรองสารละลายด้วยเครื่อง Vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1

9.4 เก็บสารละลายส่วนใส ล้างตะกอนด้วย Methanol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง

9.5 กรองสารละลายและเก็บส่วนใส ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย Methanol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์

9.6 นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ Saponin โดยนำสารสกัด 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A และ B (ภาคผนวก ก6) อย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

9.7 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อให้เกิดสี จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย Spectrophotometer ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้ Ethyl acetate 2 มิลลิลิตร เป็น Reagent blank ใช้ Diosgenin มาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Diosgenin ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข.2



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของ Diosgenin

ข10. การวิเคราะห์ปริมาณ Phorbol esters (Haas และ Mittelbach, 2000)

10.1 ชั่งตัวอย่างกากเมล็ดสับดำ 5 กรัม ลงในภาชนะ เติม 90% Ethanol 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

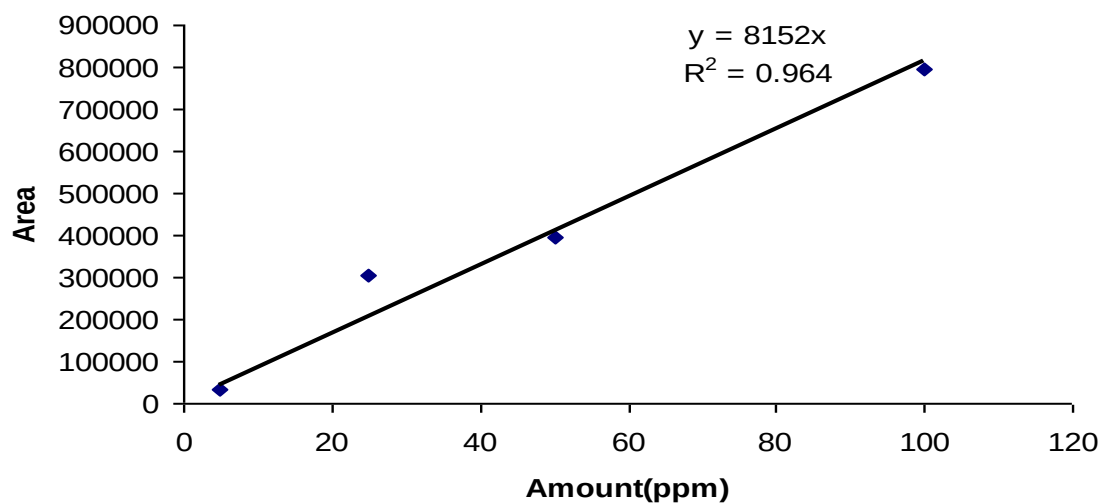
10.2 กรองสารละลายด้วยเครื่อง Vacuum pump เก็บสารละลายส่วนใสในปิกเกอร์ และนำกากเมล็ดสับดำที่เหลือจากการกรองมาผ่านการสกัดอีก 3 ครั้ง

10.3 เก็บสารละลายส่วนใสทั้งหมดรวมกัน ระเหย Ethanol จากสารละลายส่วนใส ด้วยเครื่อง Vacuum oven จนกระทั่งเหลือเป็นของแข็งติดกันปิกเกอร์ เติม Methanol 1 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์ คนให้ของแข็งละลาย และนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

10.4 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Phorbol-12-Myristate-13-Acetate ที่ความเข้มข้น 5 25 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข.3

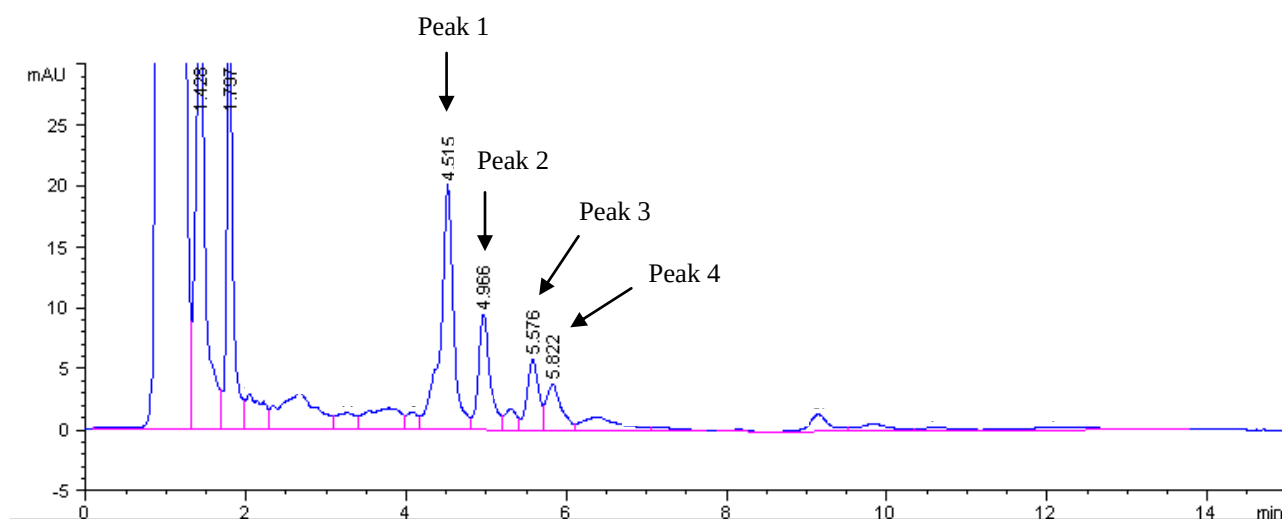
โดยใช้สภาวะ HPLC ดังนี้

- Column : Reversed phase chromatography : Inertsil[®] ODS-3 4.6 x 250 mm
- Mobile phase : Acetonitrile : water (80 : 20)
- Flow rate : 1.3 ml/min
- Temperature : 25°C
- Detector : 280 nm

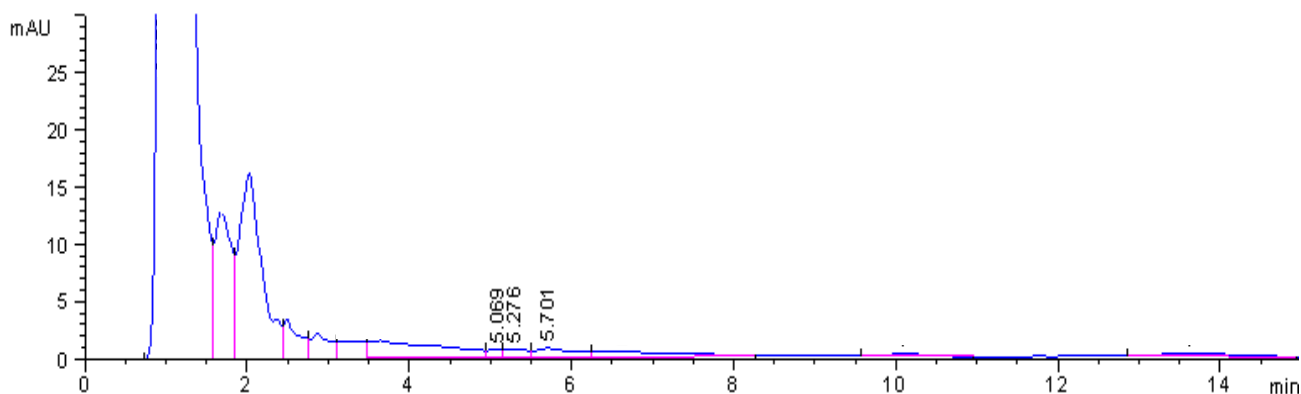


รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของ Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์ Phorbol esters ดังรูป ข.4 และ ข.5



รูป ข.4 โครมาโตแกรมแสดงกลุ่มสาร Phorbol esters ที่สกัดจากกากเมล็ดสนุ่นดำก่อนสกัดด้วย Ethanol



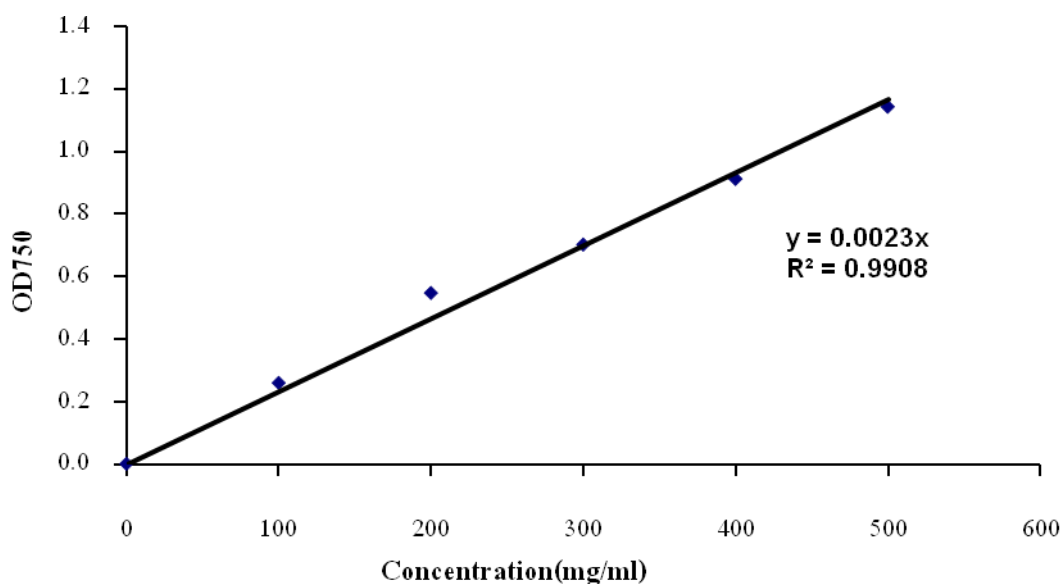
รูป ข.5 โครมาโตแกรมแสดงกลุ่มสาร Phorbol esters ที่สกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำหลังสกัดด้วย Ethanol

ข11. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธี Lowry (Lowry et al, 1951)

11.1 นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนสกัดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

11.2 เติมสารละลาย Copper reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และเติมสารละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนสกัด เทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin

11.3 สร้างกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปภาคผนวก ข.6



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin