บทที่ 2 ทฤษฎี

2.1 สบู่ดำ

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

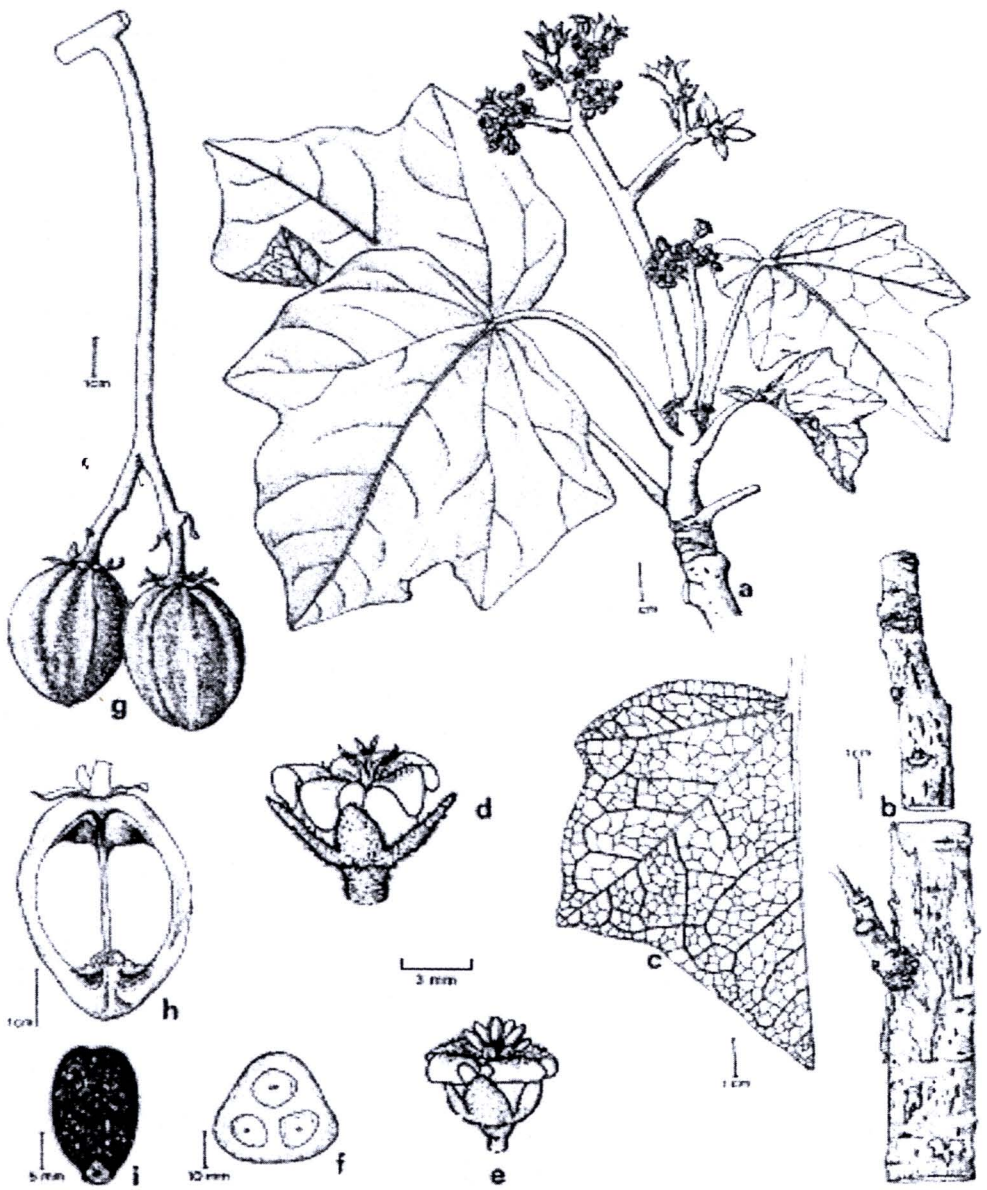
สบู่ดำ (Physic nut) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. อยู่ในกลุ่ม Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพาราและมันสำปะหลัง พบในประเทศเม็กซิโกและประเทศแถบอเมริกากลาง ลักษณะของสบู่ดำเป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 6 เมตร และจัดเป็นไม้ยืนต้นเพราะมีอายุมากกว่า 20 ปี ลักษณะใบเป็นใบเลี้ยงคู่ แต่ละใบมีหยัก 5-7 แฉก แสดงในรูปที่ 2.1 ก ลักษณะผลเกลี้ยง รูปทรงค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน เมื่อแก่จัดจะมีสีเหลือง และกลายเป็นสีน้ำตาลเทาผลมี 3 เมล็ด ลักษณะเมล็ดสบู่ดำ (รูปที่ 2.1 ข) คล้ายเมล็ดละหุ่ง สีดำกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แสดงลักษณะองค์ประกอบส่วนต่างๆ ของสบู่ดำแสดงในรูปที่ 2.2 เนื้อในของเมล็ดสีขาวมีน้ำมันที่นำมาใช้ประโยชน์ เมล็ดสบู่ดำมีองค์ประกอบหลักคือ น้ำมัน (40-60%) และโปรตีน (19-27%) (Makkar et al., 1997)

ก ข

รูปที่ 2.1 ก) ลักษณะใบของต้นสบู่ดำ ข) ลักษณะเมล็ดสบู่ดำ

ที่มา: http://www.oknation.net/blog/print.php?id=321929 และ

http://www.bidnetwork.org/page/55861/en



รูปที่ 2.2 ลักษณะของส่วนประกอบของสบู่ดำโดย a) ก้านชูดอก b) เปลือกหุ้มต้น c) ท่อลำเลียงในใบ d) เกสรตัวเมีย e) เกสรตัวผู้ f) ภาพตัดขวางของผลอ่อน g) ผล h) ภาพตัดแนวตั้งของผลสบู่ดำและ i) เมล็ดสบู่ดำ

ที่มา: Heller (1996)

2.1.2 ประโยชน์ของสบู่ดำ

สบู่ดำสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ โดยสามารถใช้น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์ทางการเกษตร (ระพีพันธุ์และสุขสันต์ 2543) ใช้เป็นอาหาร สมุนไพรรักษาโรค สารป้องกันและกำจัดแมลงและเครื่องสำอาง (รังษีและอมรรัชฎ์ 2548) ทั้งนี้การใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆของสบู่ดำมีดังนี้

- เปลือกและลำต้น

สาร hydrocyanic พบในเปลือกและลำต้นของสบู่ดำเช่นเดียวกับมันสำปะหลัง ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียว ช่วยป้องกันการบุกรุกของวัว ม้า ในสวนไร่นา จึงนิยมปลูกต้นสบู่ดำ เป็นขอบเขตเพื่อป้องกันสัตว์บุกรุกทำลายพืชที่ปลูกไว้ (Budowski, 1987) เปลือกและลำต้นใช้เป็นยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง และสามารถสกัดสารแทนนิน ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

- ใบของต้นสบู่ดำ

ใบของต้นสบู่ดำสามารถนำมานึ่งหรือต้มรับประทานได้อย่างปลอดภัย ใช้เป็นยารักษาอาการไอและมีฤทธิ์เป็นสารต้านจุลินทรีย์ แก้พิษตานซาง แก้ปากและลิ้นพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง ถอนพิษที่ทำให้ตัวร้อน ยางจากก้านใบใช้ป้ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด และแก้ปวดฟัน (Nath และ Dutta, 1992) น้ำที่สกัดได้จากใบของสบู่ดำมีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นพาหะของโรคพืชบางชนิด และสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pyogenes* และ *Candida albicans* (Thomas, 1989)

- เมล็ดสบู่ดำ

เมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นยาถ่ายหรือยาระบายและเป็นแหล่งน้ำมันสบู่ดำ ขั้นตอนการสกัดน้ำมันสบู่ดำ เริ่มจากนำผลสบู่ดำที่แก่จัดและแห้งมากะเทาะเปลือกให้เหลือเฉพาะเมล็ด จากนั้นบดเมล็ดให้แตกหยาบ ให้ความร้อนโดยการอบหรือตากแดด จากนั้นจึงนำเข้าเครื่องหีบสกัดน้ำมัน น้ำมันที่ออกมาจะมีลักษณะขุ่น นำน้ำมันขุ่นที่ได้ผ่านเข้าเครื่องกรองละเอียดเพื่อแยกสิ่งปนเปื้อน จึงได้เป็นน้ำมันสะอาดพร้อมนำไปใช้งาน น้ำมันเมล็ดสบู่ดำซึ่งเป็นผลผลิตที่สำคัญของสบู่ดำ ประกอบด้วย กรดโอเลอิก 41.5-48 เปอร์เซ็นต์ กรดไลโนเลอิก 34.6-44.4 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มมิติก 10.5-13.0 เปอร์เซ็นต์ และกรดสเตียริก 2.3-2.8 เปอร์เซ็นต์ (Herrera et al., 2006) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ เครื่องสำอางและถนอมผิว ใช้ทาแก้โรคผิวหนัง รวมทั้งสามารถบรรเทาอาการปวดข้อเนื่องจากรูมาตอยด์ กรดไลโนอิคในน้ำมันเมล็ดในของสบู่ดำสามารถนำไปทำเป็นครีมถนอมผิว สารเคมีกำจัดศัตรูพืช น้ำมันและสารสกัดจากน้ำมันของสบู่ดำ สามารถนำมาใช้กำจัดศัตรูพืช โดยมีตัวอย่างในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูฝ้าย โดยเฉพาะหนอนเจาะสมอฝ้าย ศัตรูผัก มันฝรั่ง และข้าวโพด การใช้ประโยชน์ในการทำเชื้อเพลิง จัดเป็นการใช้ประโยชน์สูงสุดของสบู่ดำ น้ำมันจากสบู่ดำยังสามารถนำมาผลิตสบู่ (Heller, 1996)

- กากเมล็ดสบู่ดำ

กากเมล็ดสบู่ดำซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีสารพิษคล้ายกับสารไรซินในละหุ่งไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงสัตว์ แต่สามารถนำไปทำปุ๋ยหรือนำไปทำเป็นเชื้อเพลิง (Alexander et al., 2008) เมื่อสกัดสารพิษ phorbol ester ออกจากกากเมล็ดสบู่ดำโดยใช้เอธานอล พบว่าสารสกัดมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านเชื้อรา (antifungal agent) โดยสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* (Saetae and Suntornsuk, 2010a) รายงานของ Kumar et al. (2010a และ 2010b) นำกากเมล็ดสบู่ดำหลังสกัดสารพิษ phorbol ester ออกด้วย petroleum benzene มาเป็นแหล่งโปรตีนแทนโปรตีนจากถั่วเหลืองผสมกับอาหารปลาคาร์พและปลาเทร้าสีรุ้ง

2.1.3 พิษวิทยาของสบู่ดำ

ความเป็นพิษของสบู่ดำจากส่วนต่างๆ กับสัตว์ทดลองมีรายงานดังนี้

- ใบ มีฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์และพยาธิ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* sp., *Bacilius* sp. และ *Micrococous* sp. ยางจากใบ (sap) ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าไข่พยาธิไส้เดือนและพยาธิปากขอ และมีความเป็นพิษสูงมากต่อหนูทดลองเมื่อได้รับทางปาก หรือฉีดเข้าบริเวณร่องท้อง (Gubitz et. al., 1997)

- ผลสบู่ดำ เมื่อทดสอบกับปลาคาร์พ พบว่าพิษของ phorbol ester ทำให้ปลา เจริญเติบโตช้าลง มีมูกในอุจจาระและไม่กินอาหาร แต่ถ้าหยุดให้ phorbol ester ปลาจะกลับมาเจริญเป็นปกติ และเมื่อทดสอบกับตัวอ่อนในครรภ์ของหนู พบว่าผลสบู่ดำทำให้หนูแท้ง (Goonasekera et. al., 1995)

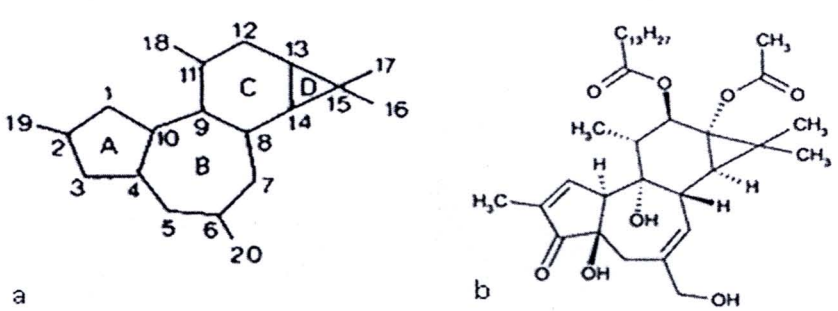
- เมล็ด สารพิษในเมล็ดมีฤทธิ์ต่อสัตว์และมนุษย์ โดยพบสารพิษยับยั้งการสร้างโปรตีนและบางกรณีเป็น tumor promoter กระตุ้นเซลล์เกิดความผิดปกติแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและอาจพัฒนาเจริญเป็นมะเร็ง นอกจากนี้สารพิษก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันกับหนู ทำให้หนูตาย เนื่องจากเกิดการคั่งในหลอดเลือด และมีเลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปอด (Li et al., 2010) สำหรับพิษกับลูกไก่ พบว่าทำให้ลูกไก่โตช้า ตับและไตโต พิษในสัตว์อื่น เช่น แกะและแพะ จะทำให้ท้องเสีย ขาดน้ำ ไม่กินอาหาร และมีเลือดออกในอวัยวะภายใน เช่น กระเพาะอาหาร ปอด ไต หัวใจผิดปกติ มีเลือกออกหลายแห่งในร่างกาย พิษที่พบในเด็กที่รับประทานเม่ล็ดสบู่ดำ ได้แก่ อาการกระสับกระส่าย คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และขาดน้ำ พิษที่พบในผู้ใหญ่ กรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่มีสารพิษสูง หากรับประทานเพียงแค่ 3 เมล็ด จะเป็นอันตรายแก่ระบบทางเดินอาหาร บางสายพันธุ์ที่มีสารพิษต่ำรับประทานถึง 50 เมล็ดยังไม่พบอันตราย (Begg and Gaskin, 1994)

2.1.4 สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดสบู่ดำ

สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่พบในเมล็ดสบู่ดำมีหลายชนิด โดยสารพิษหลักที่พบคือ phorbol esters สำหรับสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่พบได้แก่ trypsin inhibitor, lectin, phytic acid และ saponin (Francis et al., 2005)

2.1.4.1 Phorbol esters

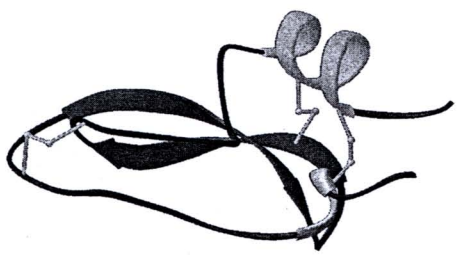
สาร phorbol esters เป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในพืชตระกูล Euphorbiaceae และ Thymelaeceae เช่น สลอด (*Croton tiglium*) ซึ่งสาร phorbol esters นี้เป็นรูป ester ของสาร tigliane diterpenes โดยสาร tigliane (รูปที่ 2.3a) เป็น tetracyclic diterpene เมื่อเกิดปฏิกิริยา hydroxylation หมู่ hydroxyl (OH) จะจับกับสาร tigliane ที่ตำแหน่งต่างๆ เกิดเป็นสารประเภท alcohol และเมื่อสารนี้ทำปฏิกิริยากับกรดจะเกิดเป็นสารกลุ่ม ester ซึ่งเรียกว่า phorbol ester สาร phorbol ester ที่พบทั่วไปเป็น 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (รูปที่ 2.3b) ส่วนที่พบในน้ำมันและกากเมล็ดสบู่ดำเรียกว่า 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'-[12',14'- butadienyl] -6'- [16',18',20'–nonatrienyl]- bicycle [3.1.0] hexane- (13-*0*) -2'[carboxylate] -(16-*0*)-3'- [8' butenoic -10']ate หรือ DHPB (Hass et al., 2000) วิทยาและคณะ (2549) วิเคราะห์ปริมาณสาร phorbol ester ในส่วนต่างๆของสบู่ดำ พบว่า phorbol ester เป็นสารพิษที่ใช้บ่งบอกถึงสายพันธุ์ของสบู่ดำว่าเป็นพันธุ์ที่มีพิษหรือไม่มีพิษโดยพันธุ์ที่ไม่มีพิษจะมีปริมาณสาร phorbol ester น้อยกว่า 0.011% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก สำหรับสาร phorbol ester เป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอก (tumor promotion) การอักเสบและการบวมของผิวหนัง การเพิ่มขึ้นของเซลล์อย่างรวดเร็ว กระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว (Adolf et al., 1984) รายงานของ Makkar และ Becker (2010) พบว่าจุลินทรีย์ในลำไส้ของโคกระบือไม่สามารถย่อยสลายสาร phorbol ester



รูปที่ 2.3 โครงสร้าง tigliane (a) และ phorbol 12-myristate 13-acetate (b)
ที่มา: http://www.proteinkinase.de/html/protein_kinase_activators.html

2.1.4.2 Trypsin inhibitor

Trypsin inhibitor เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กประกอบด้วย cysteine 6 โมเลกุล เชื่อมกันด้วยพันธะ disulfide (Cys5-Cys55, Cys14-Cys38 และ Cys30-Cys51) (Berndt et al., 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 สารนี้พบในพืชและจุลินทรีย์ สารนี้มีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร โดยโปรตีนชนิดนี้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ trypsin ในลำไส้ ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานผิดปกติ สารชนิดนี้ไม่ทนต่อความร้อน

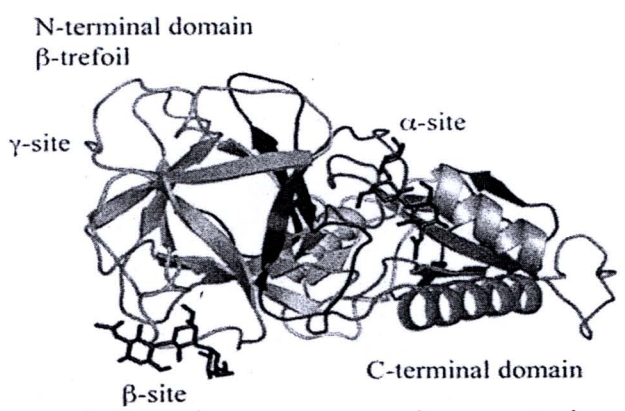


รูปที่ 2.4 โครงสร้างจำลองสามมิติของ trypsin inhibitor

ที่มา: http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/proteins/htm/page15.html

2.1.4.3 Lectin

Lectin หรือ phytohaemagglutinins เป็นโปรตีนที่จับกับน้ำตาลหรือไกลโคโปรตีน โครงสร้างของ lectin มีตำแหน่งที่จับกับน้ำตาล 3 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 2.5 สารนี้มีคุณสมบัติละลายน้ำสลายตัวที่อุณหภูมิสูง และมีคุณสมบัติในการควบคุมระดับโปรตีนในกระแสเลือด สารชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของไรโบโซมที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน และรบกวนการสังเคราะห์ไกลโคโปรตีน นอกจากนี้ lectin ยังสามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ในลำไส้ เป็นการขัดขวางการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ทำให้ระบบการดูดซึมสารอาหารผิดปกติ ทำให้เกิดโรคขาดสารอาหารในคนและสัตว์ สารชนิดนี้พบในสัตว์ พืช แบคทีเรียและไวรัส (Aregheore et al., 1998)

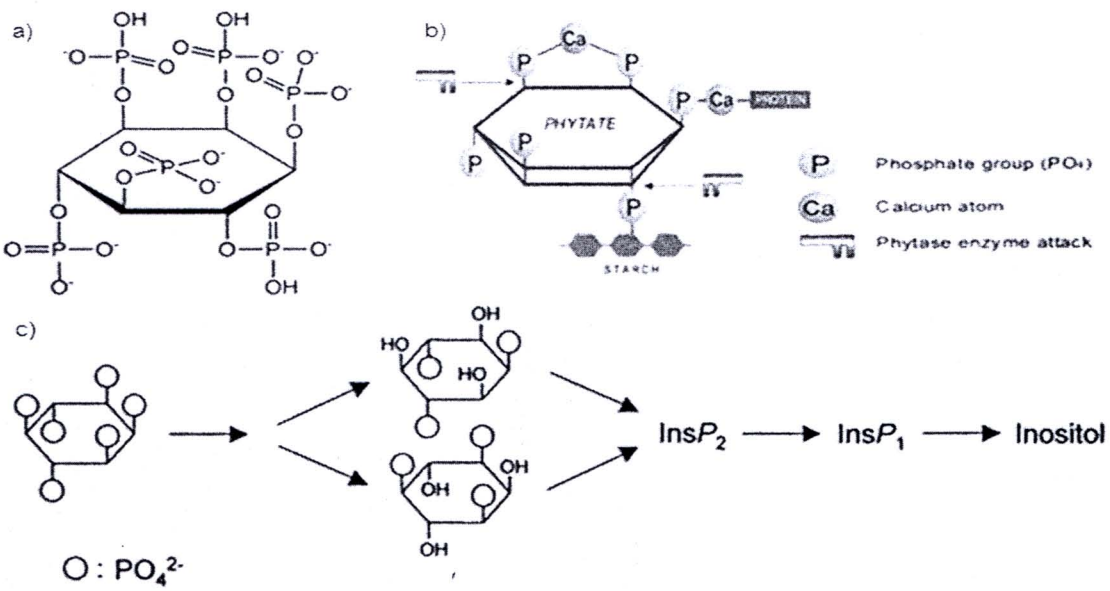


รูปที่ 2.5 โครงสร้างจำลองสามมิติของ lectin ที่พบในเห็ดซึ่งมีตำแหน่งที่จับกับน้ำตาล 3 ตำแหน่ง คือ α, βและ γ

ที่มา:http://folk.uio.no/utek/projects/lectins.shtml

2.1.4.4 Phytic acid

สาร phytic acid หรือ inositol hexakisphosphate พบในเนื้อเยื่อของพืช โดยเฉพาะในเมล็ดพืช ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานในรูปหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) และโลหะไอออนสองบวก (divalent cation) ในพืช เมื่ออยู่ในรูปของเกลือแคลเซียมหรือแมกนีเซียมจะเรียกว่า phytin โดยโครงสร้างของ phytic acid (รูปที่ 2.6a) มีคุณสมบัติเป็น chelating agent ซึ่งสามารถจับกับพวก metal ion หลายชนิด ได้แก่ Ca^{2+}, Zn^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น สาร phytic acid ถือเป็นสารต้านคุณค่าทางโภชนาการเนื่องจากเมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนและโลหะไอออน เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้การดูดซึมแร่ธาตุลดลง และขัดขวางการรับออกซิเจนของเม็ดเลือดแดงในสัตว์กระเพาะเดี่ยว (monogastric animals) นอกจากนี้ยังสามารถจับกับเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร ทำให้ระบบทางเดินอาหารมีความผิดปกติทำให้เกิดโรคขาดสารอาหารในคนและสัตว์ อย่างไรก็ตาม phytic acid เป็นสารป้องกันมะเร็ง โดยต่อต้านการทำปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนกับเนื้อเยื่อ (สุวลี, 2548) สาร phytic acid ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ phytase ที่พบในแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราบางชนิดและกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant animals) เอนไซม์ phytase สามารถย่อย phytic acid จากโครงสร้างที่เป็น inositol hexakisphosphate กลายเป็น inositol 2-monophosphate และกลายเป็น inositol ในที่สุด (รูปที่ 2.6b และ 2.6c) ในการย่อยนี้จะทำให้เกิดหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถในไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์

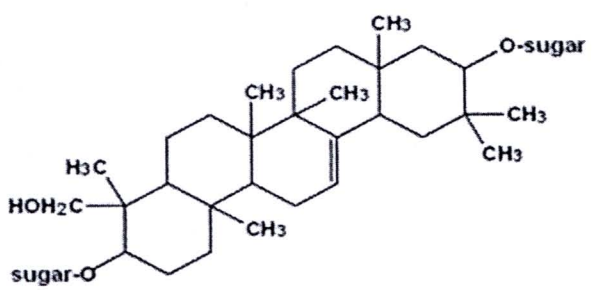


รูปที่ 2.6 a) โครงสร้างของ phytic acid b) ตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase และ c) ลำดับโครงสร้างสารที่ได้จากการย่อย phytic acid ด้วยเอนไซม์ phytase

ที่มา: http://www.food-info.net/uk/qa/qa-fp162.htm และ http://excelanimalhealth.com/phytox.html

2.1.4.5 Saponin

Saponin เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิดบริเวณเปลือกและใบ สารนี้มีโครงสร้างเป็น amphipathicglycosides ที่มีส่วน aglycone เป็นสารในกลุ่ม steroids ซึ่งจะจับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C_3 ได้เป็น O-glycoside ซึ่งน้ำตาลที่พบในโครงสร้างมักเป็น oligosaccharide 1-5 หน่วย สูตรเคมีของ saponin แสดงในรูปที่ 2.7 สารชนิดนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ surfactant คือเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี สามารถดูดซับสารจำพวก lipid, cholesterol, vitamin A และ vitamin E เป็นสาเหตุให้เกิดสภาวะขาดสารอาหารในคนและสัตว์ และทำให้เกิดอาการผื่นแพ้ในคน นอกจากนี้ saponin ยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และแมลง (Jenkins and Atwal, 1994)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ saponin

ที่มา: http://www.phytochemicals.info/pictures/phytochemicals/saponins.gif

2.1.5 องค์ประกอบของกากเมล็ดสบู่ดำ

กากเมล็ดสบู่ดำภายหลังจากการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดแล้ว มีองค์ประกอบทางเคมีแสดงในตารางที่ 2.1 โดยมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 50-58% (Makkar et al., 1997) ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี ทั้งยังพบแร่ธาตุและกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3 สารอาหารที่มีอยู่ในกากเมล็ดสบู่ดำ สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ แต่เนื่องด้วยกากเมล็ดสบู่ดำมีสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการดังแสดงในตารางที่ 2.4 จึงทำให้ไม่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยตรง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบเคมีและปริมาณที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำ (% โดยน้ำหนักแห้ง) จากเมืองต่างๆในประเทศเม็กซิโก

องค์ประกอบ (%)	สายพันธุ์		
	Cape Verde	Nicaragua	Non-toxic Mexico
Crude protein	56.4	61.2	63.8
Lipid	1.5	1.2	1.0
Ash	9.6	10.4	9.8
Neutral detergent fibre	9.0	8.1	9.1
Acid detergent fibre	7.0	6.8	5.7
Acid detergent lignin	0.4	0.3	0.1
Gross energy (MJ/kg)	18.2	18.3	18.0

ที่มา: Gubitz et al. (1997)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณและชนิดกรดอะมิโนที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำ (% โดยน้ำหนักแห้ง)

Amino acids (%)	*Jatropha* seed meal
Methionine	1.79
Cystine	1.58
Valine	5.30
Isoleucine	4.85
Leucine	7.50
Phenylalanine	4.89
Tyrosine	3.78
Histidine	3.08
Lysine	3.40
Arginine	12.9
Threonine	3.59
Tryptophan	1.31

ที่มา: Francis et al. (2005)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 2.3 ปริมาณและชนิดแร่ธาตุที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำ (% โดยน้ำหนักแห้ง)

Mineral (%)	Minimum	Maximum	Mean
P	0.45	0.76	0.61
Ca	0.27	0.80	0.47
Mg	0.36	0.46	0.42
Na	0.021	0.057	0.040
K	0.74	1.39	1.03

ที่มา: Heller (1996)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณและชนิดสารพิษและสารต้านโภชนาการที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำ (% โดยน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	**สายพันธุ์ที่มีพิษ**	**สายพันธุ์ที่ไม่มีพิษ**
Phorbol esters (mg/g kernel)	2.79	0.11
Total phenols (% tannic acid equivalent)	0.36	0.22
Tannins (% tannic acid equivalent)	0.04	0.02
Phytic acid (% dry matter)	9.40	8.90
Saponins (% diosgenin equivalent)	2.60	3.40
Trypsin inhibitors (mg trypsin inhibited per g sample)	21.3	26.5
Lectins (1/mg of meal that produces haemagglutination per ml of assay medium)	102	51

ที่มา: Francis et al. (2005)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 05 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249119
เลขเรียกหนังสือ

2.2 กระบวนการหมัก

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง (Fungal Solid State Fermentation)

การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งขึ้นกับชนิดของอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งนับว่าเป็นแหล่งของสารอาหารสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทั้งนี้การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งเป็นการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ น้ำที่อยู่ในระบบอยู่ในสภาพของความชื้นที่ถูกดูดซับบนวัตถุดิบ ดังนั้นปริมาณน้ำที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้จะมีค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้การเจริญของเชื้อรายังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมต่างๆ อาทิ ขนาดของวัตถุดิบ ความชื้นและ pH เป็นต้น

การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง เป็นวิธีการเลียนแบบสภาพการเจริญแบบธรรมชาติ ซับเสตรทที่นำมาใช้นั้นหาได้ง่ายทั่วไป ซึ่งรวมถึงวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่มีราคาถูก ลักษณะของอาหารที่เลี้ยงจะมีปริมาณของน้ำอยู่เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบอื่น ด้วยลักษณะเช่นนี้จึงช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น การให้อากาศในระหว่างการเลี้ยงนั้นจะทำได้ง่ายกว่ากระบวนการเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากมีช่องว่างระหว่างอนุภาคของซับเสตรท ทำให้อากาศสามารถแพร่ผ่านอนุภาคของน้ำที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มพื้นที่กว้างบนผิวซับเสตรท เมื่อออกซิเจนในอากาศสามารถแพร่ได้ง่าย จะทำให้ลดขั้นตอนการกวนอาหารได้ การเติมเชื้อที่เป็นลักษณะสารแขวนลอยลงบนอาหาร จะทำให้เชื้อราที่เจริญเริ่มต้นมีความสม่ำเสมอ วิธีการนี้จะทำให้เกิดของเสียจากกระบวนการน้อย เนื่องจากเป็นการเลี้ยงแบบครั้งเดียว (batch fermentation) ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ประหยัดพลังงานเนื่องจากใช้พลังงานในกระบวนการเพียงเล็กน้อยทั้งยังพบว่ากระบวนการเลี้ยงบนอาหารแข็งยังให้ผลผลิตที่สูงอีกด้วย (นงลักษณ์และปรีชา, 2548)

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแบบอาหารแข็งมีข้อจำกัด ได้แก่ การควบคุมปัจจัยต่างๆ ทำได้ยาก อาทิ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความชื้นและปริมาณเชื้อ สำหรับระยะเวลาในการงอกของสปอร์บนอาหารแข็งจะใช้ระยะเวลานาน และเกิดปัญหาความร้อนสะสมในระหว่างการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งได้แก่

2.2.1.1 ขนาดของวัตถุดิบ

ขนาดของวัตถุดิบเป็นปัจจัยทางกายภาพของของแหล่งอาหารที่เชื้อรานำไปใช้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายมวล การแพร่ของก๊าซ เอนไซม์และสารจากกระบวนการภายในเซลล์ การแพร่ของสารอาหารในสิ่งแวดล้อม ความสามารถในการย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารไปใช้ ขนาดของอนุภาคซับเสตรทที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมตาบอไลท์ของ *Aspergillus flavipes* อยู่ในช่วง 0.3 ถึง 0.5 มิลลิเมตร (Valera *et al.*, 2005)

2.2.1.2 ความชื้น

ความชื้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการสร้างสารเมตาบอไลท์ชนิดต่างๆ ของเชื้อรา การควบคุมความชื้นเพื่อการเจริญของเชื้อรา ต้องควบคุมความชื้นทั้งในซับเสตรทและในสภาวะแวดล้อม โดยทั่วไปภายหลังการเจริญของเชื้อรา ระดับความชื้นสุดท้ายของซับเสตรทจะอยู่ในช่วง 75-80% ทั้งนี้ความชื้นที่สูงเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์อื่นโดยเฉพาะแบคทีเรียปนเปื้อนได้ง่าย ความชื้นต่ำจะส่งผลให้การดูดซึมสารอาหารของเชื้อราลดลง รวมทั้งการเจริญของเชื้อราและการผลิตสารต่างๆ ลดลง (นงลักษณ์และปรีชา, 2548)

2.2.1.3 pH

ค่าความเป็นกรดด่างของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อรา เกี่ยวข้องกับประจุและการนำสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ ส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (นงลักษณ์และปรีชา, 2548)

2.2.2 การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว (Fungal Submerged Fermentation)

การเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว เป็นลักษณะการเจริญที่เชื้อราได้รับสารต่างๆ ที่อยู่ในรูปของสารละลาย สภาวะของสิ่งแวดล้อม อาทิ อุณหภูมิและ pH มีผลต่อการเจริญของเชื้อราคล้ายกับการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง

ข้อได้เปรียบของการหมักในอาหารเหลวคือ เชื้อราสามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง การส่งถ่ายมวล ความร้อนและก๊าซได้ดีกว่าแบบการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความชื้นและปริมาณเชื้อ ได้ง่าย ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อราสั้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบอาหารแข็ง

ข้อเสียเปรียบคือ กระบวนการหมักในอาหารเหลวจะเกิดของเสียจากกระบวนการมากตามปริมาตรของเหลวที่ใช้ และหากเป็นการหมักแบบต่อเนื่องจะมีของเสียเพิ่มขึ้นมาก มีการใช้พลังงานสูงเนื่องจากการหมักชนิดนี้ต้องมีการกวน และเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลวจะขึ้นกับค่า pH เช่นเดียวกับการหมักแบบอาหารแข็ง แต่จะมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับอากาศเพิ่มขึ้นมาได้แก่ การให้อากาศ การกวน การควบคุมออกซิเจน และการป้องกันฟอง

2.3 เชื้อราที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.3.1 *Aspergillus niger*

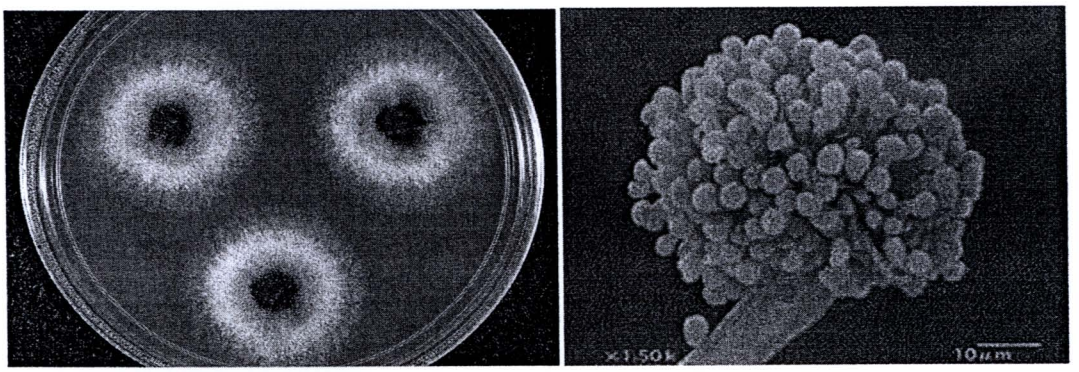
Aspergillus niger เป็นเชื้อราสร้างเส้นใยในกลุ่ม ascomycete ดังแสดงในรูปที่ 2.8 พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งยังพบได้ในมนุษย์เป็น opportunistic infections *A. niger* เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางจากการเป็นต้นแบบกระบวนการผลิตกรดมะนาว เชื้อราชนิดนี้มีการสร้าง hydrolytic และ oxidative enzymes ซึ่งจะย่อยสลายสารประเภท lignocelluloses ของพืช ซึ่งเอนไซม์จาก *A. niger* มีความสำคัญในอุตสาหกรรมชีวภาพเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ *A. niger* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการวิจัยที่ศึกษาการผลิตโปรตีนของเซลล์ยูคารีโอต เนื่องจากปัจจัยต่างๆในสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกดหรือเหนี่ยวนำในการผลิตเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นในสิ่งแวดล้อม หรือพัฒนากลไกการหมักและการควบคุมทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (Baker, 2006)

รูปที่ 2.8 ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus niger* บนอาหาร Czapekdox agar และภายใต้ Scanning electron microscope

ที่มา: http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/aspergillus12.html และ http://www.eurobloodsubstitutes.com/euroProject.htm

2.3.2 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae เป็นที่รู้จักในการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยวและสาเก *A. oryzae* เป็นเชื้อราสร้างเส้นใยในกลุ่ม ascomycete ดังแสดงในรูปที่ 2.9 เชื้อราชนิดนี้ไม่ก่อโรคในพืชและสัตว์ *A.oryzae* สามารถผลิตสารสำคัญในอุตสาหกรรมได้แก่ เอนไซม์ α-amylase



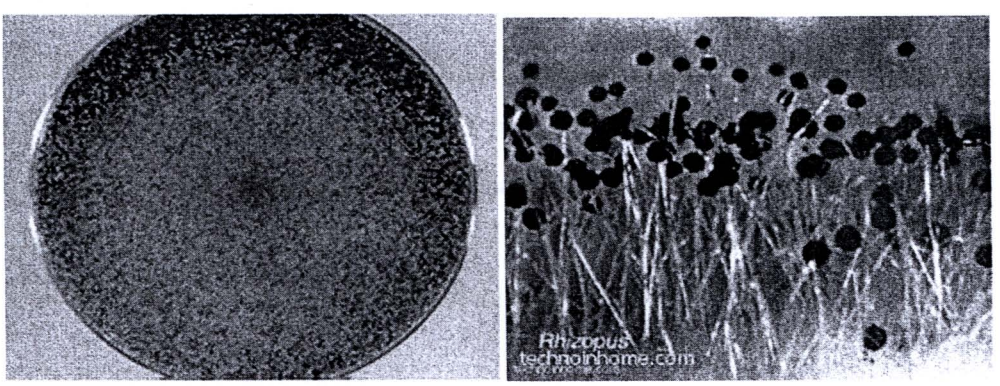
รูปที่ 2.9 ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus oryzae* บนอาหาร Czapekdox agar และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ที่มา: http://byebyemold.com/mold_glossary.php และ

http://www.nrib.go.jp/English/annai/introduce/microorganism.htm

2.3.3 *Rhizopus oligosporus*

Rhizopus oligosporus เป็นเชื้อราในคลาส zygomycetes กลุ่ม mucoraceae ซึ่งถูกใช้สำหรับผลิตเทมเป้ ลักษณะของโคโลนีจะมีเส้นใยพองฟูสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.10 เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิต antibiotic ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* เป็นต้น



รูปที่ 2.10 ลักษณะโคโลนีของ *Rhizopus oligosporus* บนอาหารและภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

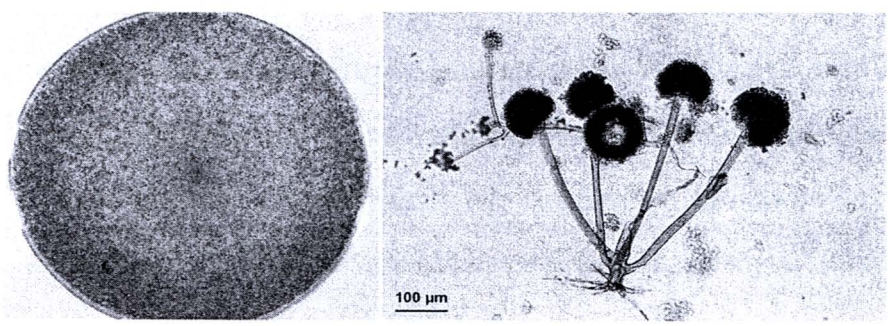
ที่มา: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/ และ

http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php?tbl=tblwb1 0 &gid=3 &id=2 7 &PHPSE

SSID=c13acbf8fb637547a9d04b9a56dad05a

2.3.4 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae (หรือ *R. arrhizus*) (รูปที่ 2.11) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น เชื้อราชนิดนี้สามารถแยกได้จากอาหาร ดิน เศษพืชและมูลสัตว์ *R. oryzae* ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในประเทศอินโดนีเซีย จีนและญี่ปุ่น



รูปที่ 2.11 ลักษณะโคโลนีของ *Rhizopus oryzae* บนอาหาร Sabouraud's dextrose agar และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ที่มา: http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/rhizopus1.html และ http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/rhizopus2.html

2.4 การเจริญเติบโตของพืช

การเจริญเติบโต (growth) ของพืช เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เริ่มจากไซโกตที่มีเพียงเซลล์เดียวเจริญเติบโตเป็นพืชที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก การเจริญเติบโตของพืชประกอบด้วยการแบ่งตัว (division) การขยายขนาดของเซลล์ (enlargement) และการเพิ่มจำนวน (differentiation) เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์กลายเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อและพัฒนาเป็นส่วนต่างๆ เพื่อทำหน้าที่แตกต่างกันไปซึ่งทั้งหมดนี้เกี่ยวข้องกับปัจจัยควบคุมที่หลากหลาย

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด

เมล็ดเป็นส่วนของพืชที่ใช้ในการสืบพันธุ์ ประกอบด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถสร้างเป็นพืชต้นใหม่ได้ เมล็ดเป็นส่วนของพืชที่สามารถทนต่อความแห้งแล้งและภาวะขาดน้ำ สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานโดยไม่ต้องอาศัยอาหารจากภายนอก ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดประกอบด้วย น้ำ ซึ่งการดูดน้ำของเมล็ดเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการงอก อุณหภูมิ มีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการงอก ก๊าซ โดยเฉพาะออกซิเจน ซึ่งเมล็ดต้องการปริมาณก๊าซมากในกระบวนการงอก รวมไปถึงแสง สารเคมีบางชนิดและการสุกของเมล็ด มีผลต่อการงอกของเมล็ดด้วยเช่นกัน

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.4.2.1ปัจจัยภายใน เป็นตัวกำหนดระดับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช ส่วนลักษณะทางพันธุกรรมถือเป็นปัจจัยภายในของพืชเช่นกัน เนื่องจากเป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโตและการกระจายของราก ความสามารถในการเจริญเติบโตของพืชมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันอย่างใกล้ชิดกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัดส่วนระหว่างรากกับส่วนเหนือดิน (ลำต้น กิ่งและใบ) การเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบรากขึ้นอยู่กับใบ ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างอาหารและฮอร์โมน ในขณะเดียวกันการเจริญเติบโตของส่วนเหนือดินขึ้นอยู่กับรากที่ทำหน้าที่หาน้ำและธาตุอาหาร ซึ่งจะผันแปรไปตามชนิดพืชและอายุของพืช ปัจจัยภายในได้แก่ ฮอร์โมน สารเคมีภายในพืช ลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการทางสรีรวิทยา

2.4.2.2 ปัจจัยภายนอก เป็นปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ในบริเวณที่พืชขึ้น ปัจจัยภายนอกไม่ได้เปลี่ยนแปลงการเติบโตของพืชโดยตรง แต่จะส่งผลทางอ้อมต่ออัตราการเจริญเติบโตและกระบวนการทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ได้แก่ กระบวนการสังเคราะห์แสง การหายใจ การสร้างอาหาร การสังเคราะห์ฮอร์โมน การดูดน้ำและแร่ธาตุอาหาร และการขนย้ายสารอาหาร ปัจจัยภายนอกอาจแบ่งเป็น ปัจจัยที่ไม่มีชีวิต (Abiotic factors) ได้แก่ แสง น้ำ pH อุณหภูมิ ความชื้น ลม ธาตุอาหาร และมลพิษทางอากาศ ปัจจัยที่มีชีวิต (Biotic factors) ได้แก่ จุลินทรีย์ แมลง การแทะเล็มของสัตว์ และกิจกรรมของมนุษย์ สำหรับ pH มีผลต่อการดูดอาหารและน้ำโดยตรงจากใบอ่อน H^+และ OH^-มีผลต่อความสามารถในการละลายของธาตุอาหาร และมีผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในส่วนของธาตุอาหารพืชที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพืชมี 16 ธาตุ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) เป็นส่วนประกอบประมาณ 94-99.5% ของน้ำหนักสดของพืช ซึ่งธาตุเหล่านี้พืชได้รับจากอากาศและน้ำ กลุ่มที่ 2ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) ซึ่งอาจเรียกธาตุเหล่านี้ว่า ธาตุอาหารหลักหรือปุ๋ย เพราะพืชต้องการใช้มาก และดินมักจะขาดธาตุเหล่านี้ จึงมักใช้เป็นปุ๋ยสำหรับพืชไร่นาทั่วไป กลุ่มที่ 3 แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S) ซึ่งเรียกว่าธาตุรอง เพราะพืชต้องการในลำดับรองจากกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) ทองดอง (Cu) โบรอน (B) โมลิบดีนัม (Mo) และคลอรีน (Cl) ซึ่งพืชต้องการในปริมาณน้อยมากแต่ขาดไม่ได้ จึงเรียกกลุ่มนี้ว่าจุลธาตุ

2.5 สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoter) หมายถึง สารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ หรือได้รับการสังเคราะห์ขึ้น สารนี้ไม่ใช่ธาตุอาหารพืช แต่เมื่อให้สารนี้กับพืชจะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช สารนี้อาจจะเป็นฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ ปัจจุบันพบว่ามีเปปไทด์และกรดอะมิโนหลายชนิดทั้งที่ได้จากพืชและได้จากการย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบธรรมชาติ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น เปปไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองและปลา (Hasegawa et al., 2002)

2.6 การวัดการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของพืชอาจทำได้โดยการวัดสิ่งใดๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ซึ่งโดยทั่วไปนิยมวัดขนาด (size) ได้แก่ ความกว้าง ความยาว เส้นผ่านศูนย์กลาง ความสูงหรือพื้นที่ขณะที่ต้นพืชยังมีชีวิตอยู่ ปริมาตร (volume) ซึ่งสามารถวัดโดยการแทนที่น้ำหรือขนาดส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช และการวัดน้ำหนัก (weight) โดยการชั่งน้ำหนักที่ส่วนของพืชที่สนใจหรือพืชทั้งต้น สำหรับน้ำหนักสด (fresh weight) คือน้ำหนักที่ชั่งทันทีหลังจากเก็บเกี่ยว อาจมีความแปรปรวนจากสภาวะการขาดน้ำและปริมาณน้ำภายในพืช ส่วนน้ำหนักแห้ง (dry weight) หมายถึงน้ำหนักที่ชั่งหลังจากนำพืชไปอบแห้งที่เวลา 80°C เป็นเวลา 4-48 ชั่วโมง

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aderibigbe et al. (1997) ศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ พบว่าการใช้ความร้อนชื้นทำให้ trypsin inhibitor ลดลง แต่ไม่สามารถลดปริมาณ saponin และ phytic acid นอกจากนี้ความร้อนทำให้ปริมาณ in vitro protein digestibility ในกากเมล็ดสบู่ดำเพิ่มขึ้นเป็น 66-67 เปอร์เซ็นต์

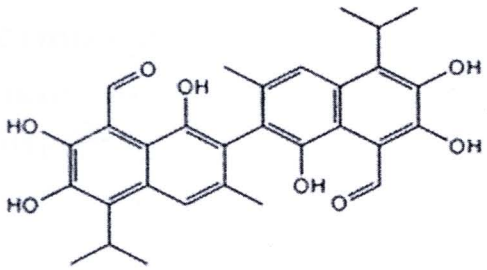
Hass et al. (2000) ศึกษาปัจจัยต่างๆ ในขั้นตอนการกลั่นน้ำมันเมล็ดสบู่ดำ ที่มีผลต่อสาร phorbol ester เพื่อทราบสภาวะที่ลดปริมาณสารพิษโดยศึกษาขั้นตอน ตั้งแต่การกำจัดกัม (degumming) การกำจัดความเป็นกรด (deacidification) การฟอกสี และการกำจัดกลิ่น ซึ่งพบว่าขั้นตอนที่สามารถกำจัดสาร phorbol ester มากที่สุด คือ การกำจัดความเป็นกรดด้วย alkalides hydroxide และการฟอกสีด้วยสารผสม Tonsil supreme 110FF กับถ่านกัมมันต์

รยากร และคณะ (2550) ได้ศึกษาความเป็นพิษและการลดพิษของน้ำมันสบู่ดำโดยการดูดซับ พบว่าในสบู่ดำมีสาร phorbol esters 5 ชนิด คิดเป็นความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนัก การดูดซับสาร phorbol esters ในน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ตัวดูดซับ 5 ชนิด คือ ถ่านกัมมันต์ แป้งฟอกสีเบอร์ 150 แป้งฟอกสีเบอร์ 200 ไคติน ไคโตแซน พบว่าแป้งฟอกสีเบอร์ 200 มีความสามารถในการดูดซับสาร phorbol esters ได้ดีที่สุด (96-98%) ที่สภาวะความเข้มข้นของแป้งฟอกสี 3.2% (โดยน้ำหนัก) ระยะเวลาในการดูดซับ 15 นาทีอัตราเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 25°C

Aregheore et al. (2003) ศึกษาการกำจัดสารพิษในกากเมล็ดสบู่ดำโดยการใช้ความร้อนและสารเคมี ได้แก่ เมทานอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับน้ำกลั่น พบว่าความร้อนสามารถยับยั้งการทำงานของ lectin ได้ แต่ไม่มีผลใดๆกับสาร phorbol ester สำหรับการใช้สารเคมีได้แก่ methanol, sodium hydroxide ร่วมกับ sodiumhypochlorite และ sodium hydroxide ร่วมกับน้ำกลั่น พบว่า sodium hydroxide ร่วมกับน้ำ สามารถกำจัด phorbol ester

Chivandiet al. (2004) ศึกษาผลของการสกัดกากเมล็ดสบู่ดำด้วยสารเคมี ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซนและเอทานอล พบว่าสาร phorbol ester สามารถละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดได้ต่างกัน โดยละลายได้ดีที่สุดในเฮกเซนและเอทานอล ดังนั้นเมื่อทำการสกัดกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเฮกเซนและเอทานอล จึงทำให้สาร phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำลดลงมาก

Ju et al. (2006) ศึกษาการลดสารพิษในเมล็ดฝ้ายคือ สาร gossypol (รูปที่ 2.12) ซึ่งเป็นสาร aromatic เชิงซ้อนคล้ายกับสาร phorbol ester โดยใช้การหมักแบบอาหารแข็ง ด้วยเชื้อราและยีสต์ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida capsuligena, Candida tropicalis, Saccharomyces cerevisae, Aspergillus terricola, Aspergillus oryzae,* และ *Aspergillus niger* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารพิษในเมล็ดฝ้ายบดลดลง ดังนี้ *Candida capsuligena* ลดสารพิษ 74% *Candida tropicalis* ลด 95% *Saccharomyces cerevisae* ลด 89% *Aspergillus terricola* ลด 83% *Aspergillus oryzae* ลด 68% และ *Aspergillus niger* ลด 85% นอกจากนี้พบว่าหลังจากการหมักปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการหมักด้วย *Aspergillus niger* มีปริมาณ crude protein เพิ่มขึ้น 22%



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของgossypol
ที่มา:http://en.wikipedia.org/wiki/Gossypol

Devappa และ Swamylingappa (2008) ใช้วิธีตกตะกอนโปรตีนของกากเมล็ดสบู่ดำแล้วนำไปทำ spray-dried พบว่าผลได้ของโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำประมาณ 70-77% และสามารถลด trypsin inhibitor 90-97% phytic acid 90% tannin 85% และ saponin 98% สำหรับ phorbol esters และ cyanogenic glucosides ลดลงอยู่ในระดับที่ไม่สามารถวัดได้

Belewu และ Sam (2010) ใช้เชื้อรา 5 สายพันธุ์ (*Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Rhizopus oligosporus, Rhizopus nigricans* และ *Trichoderma longibrachitum*) หมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน พบว่า *Aspergillus niger* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถลดสาร trypsin inhibitor, lectin, saponins, phytic acid และphorbolester ได้ดีที่สุด โดย สาร trypsin inhibitor ลดลงจาก 20.5% เหลือ 6.5% lectin ลดจาก 34.4% เหลือ 7.6 % saponins ลดจาก 2.5% เหลือ 0.1% phytic acid ลดจาก 9.1% เหลือ 2.7% และ phorbol ester ลดจาก 0.013% เหลือ 0.003%

Barros, et al. (2011) ใช้เชื้อรา white-rot fungi (*Bjerkandera adusta*, *Ganoderma resinaceum* และ *Phlebia rufa*) หมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารแข็ง 28°C เป็นเวลา 30 วัน ปริมาณ phorbol esters ลดลง 95% ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษ

Kubo, et al. (1994) ผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้เปปไทด์ กรดอะมิโนและอไมด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลือง ด้วยเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน (thermostable proteases) จาก *Bacillus circulans* และ *B. stearothermophilus* โดยทดสอบกับพืชตระกูลกระหล่ำปลี (*Brassica rapa*) พบว่ามีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 10 เท่า

Hasegawa, et al. (2002) พบว่าเปปไทด์และกรดอะมิโน จากกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส (bacterial protease) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ราก ทั้งนี้ xogenous amino acid และเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารเร่งการจริญเติบโตของพืช

Sanpa, et al. (2006) พบว่าแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp.สามารถย่อยโปรตีนจากปลาเหงือกสีน้ำเงิน (Bluegill) ที่อุณหภูมิ 50°C เกิดเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน ที่เมื่อนำไปทดสอบกับผักกาดขาวปลี (*Brassica rapa*) สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของขนรากเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

Matsumiya, et al. (2007) พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองโดยเอนไซม์โปติเอสชนิดด่าง (alkaline protease) จากแบคทีเรีย *Bacillus circulans* สามารถเพิ่มจำนวนขนรากของพืชตระกูลกระหล่ำปลี (*Brassica rapa*) โดยจำนวนเซลล์ขนราก (Trichoblasts) และ เซลล์ไร้ขน Atrichoblasts) เพิ่มขึ้นประมาณ 4.4 และ 1.9 เท่า ตามลำดับ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย