

## บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ

- 3.1.1 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 3.1.2 หลอดทดลอง (Tube)
- 3.1.3 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.4 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.1.6 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 3.1.7 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)
- 3.1.8 แท่งแก้วคนสารละลาย (Stirring rod)
- 3.1.9 แท่งแก้วดูดและหยดสารละลาย (Dropper)
- 3.1.10 ปิเปตแก้ว (Glass pipette)
- 3.1.11 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร
- 3.1.12 Tips สำหรับปริมาตร 20, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร
- 3.1.13 ถังเพาะปลูกพืชขนาด 14.5 x 20.5 x 7 เซนติเมตร
- 3.1.14 กระจกพลาสติกขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ความสูง 12 เซนติเมตร
- 3.1.15 กระดาษกรอง (Paper filter)
- 3.1.16 แผ่นกรอง (Membrane filter: Pore size 0.2 และ 0.45  $\mu\text{m}$ ) (Schleicher & Schuell, Germany)
- 3.1.17 คิวเวท (Cuvette)
- 3.1.18 ถ้วยอลูมิเนียม (Aluminium can)
- 3.1.19 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Crucible)
- 3.1.20 ตู้ดูดควัน (Hood)
- 3.1.21 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.1.22 เวอร์เนียแคลิเปอร์ (Vernier calipers)
- 3.1.23 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Consort Model C830, Turnhout, Belgium)
- 3.1.24 เครื่องชั่งอย่างหาบตนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, Denver Instrument Model TB4002, Colorado, USA)

- 3.1.25 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Balance, AND Model GF-300, Tokyo, Japan)
- 3.1.26 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, Mettler Toledo Model AB 204-S, Greifensee, Switzerland)
- 3.1.27 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer, Vortex-Genie-2, New York, USA)
- 3.1.28 อ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker, MD900 – N, Schwabach, Germany)
- 3.1.29 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Hettich, Universal 320/320R, Tuttlingen, Germany)
- 3.1.30 ตู้อบ (Hot air oven, Heraeus Model D-63450, Hanau, Germany)
- 3.1.31 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Perkin Elmer, Lambda EZ 201, Massachusetts, U.S.A.)
- 3.1.32 เครื่องทำแห้งสุญญากาศ (Vacuum oven, Isotemp, 282A, California, USA)
- 3.1.33 เครื่อง HPLC (Shimadzu, LC20AB, Kyoto, Japan)
- 3.1.34 เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extractor, Buchi Model 810, Flawil, Switzerland)
- 3.1.35 เครื่องย่อยโปรตีน (Digestion unit, Buchi Model K-424, Flawil, Switzerland)
- 3.1.36 เครื่องกลั่นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Distillation unit, VELP Scientifica, Model UDK 132, Milano, Italy)
- 3.1.37 เตาเผา (Muffle furnace, Carbolite Model CWF1200, London, England)
- 3.1.38 เครื่องวัดสี HunterLab (Ultrascan XE/IX7, Hunter Association Laboratory, USA)

## 3.2 สารเคมีและวัตถุดิบ

- 3.2.1 กากเมล็ดสับคั่วสกัดน้ำมันออกโดยใช้วิธี screw press ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ลัดดา จำกัด
- 3.2.2 เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus oligosporus* เก็บบน Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4°C (จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี)
- 3.2.3 โปรตีนสกัดทางการค้า (Bio Life M80; Protein hydrolysate spray dried powder 80% w/w, Suboneyo Chemicals Pharmaceuticals, Maharashtra, India) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ลัดดา จำกัด
- 3.2.4 ปู๋ยูเรีย (46-0-0) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ลัดดา จำกัด
- 3.2.5 เมล็ดคั่ว ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ลัดดา จำกัด
- 3.2.6 เมล็ดพันธุ์พริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ (บริษัท เจียใต้ จำกัด)

- 3.2.7 Acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.8 Acetonitrile HPLC grade (Fisher scientific, Charnwood, UK)
- 3.2.9 Blood erythrocyte suspension (clinag, Bangkok, Thailand)
- 3.2.10 Boric acid (Univar, Sydney, Australia)
- 3.2.11 Bovine serum albumin (Fluka, Switzerland)
- 3.2.12 Casein (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.13 Copper sulfate;  $\text{CuSO}_4$  (Ajax Finechem, Taren Point, Australia)
- 3.2.14 Ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.15 Ethyl acetate (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.16 Ferric chloride;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Fisher Chemicals, Leics, UK)
- 3.2.17 Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba, Rodano, Italy)
- 3.2.18 Glucosamine (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.19 Hydrochloric acid (BDH, Bristol, England)
- 3.2.20 Methanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.21 Methyl red (Fluka, Switzerland)
- 3.2.22 Methylene blue (Fluka, Switzerland)
- 3.2.23 N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide; BAPNA (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.24 *p*-dimethyl amino benzaldehyde (Ajax Finechem, Taren Point, Australia)
- 3.2.25 *p*-anisaldehyde (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.26 Potassium sulfate;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Ajax Finechem, Taren Point, Australia)
- 3.2.27 Potato dextrose broth (Lab-scan, Ireland)
- 3.2.28 Sodium chloride;  $\text{NaCl}$  (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.29 Sodium phytate (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.30 Sodium hydroxide;  $\text{NaOH}$  (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.31 Sodium carbonate;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Ajax Finechem, Taren Point, Australia)
- 3.2.32 Sulfosalicylic acid (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.33 Sulfuric acid (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.2.34 Trichloroacetic acid; TCA (Sigma, Steinheim, Germany)
- 3.2.35 Trypsin enzyme (Sigma, Steinheim, Germany)

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

- 3.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสบู่ดำ (ภาคผนวก ก)
- 3.3.1.1 การวิเคราะห์ค่า pH (AOAC, 1995)
- 3.3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)
- 3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjedahl method and Lowry method; AOAC, 1995)
- 3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995)
- 3.3.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (AOAC, 1995)
- 3.3.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995)

### 3.3.2 การศึกษาสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ

- 3.3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำ (Saetae and Suntornsuk, 2010b)

ชั่งกากเมล็ดสบู่ดำ 1 กรัม ลงใน flask เติม 90% ethanol 3 ml เขย่าด้วยเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 5 นาที จากนั้นกรองสารละลายด้วยเครื่อง vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใสใน beaker และดูดส่วนกากเมล็ดสบู่ดำที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง ผ่านการสกัดตามขั้นตอนการเติม 90% ethanol เขย่าด้วยเครื่อง shaker และกรองสารละลายอีก 3 ครั้ง เก็บสารละลายส่วนใสทั้งหมดรวมกัน ระเหย ethanol จากสารละลายส่วนใส ด้วยเครื่อง vacuum oven จนกระทั่งเหลือ residue เป็นของแข็งติดกัน beaker เติม methanol 5 ml ลงใน beaker ใช้แท่งแก้วคนให้ของแข็งละลาย นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ reverse phase column chromatography (inertsil<sup>®</sup> ODS-3, 4.6×250 nm) mobile phase คือ acetonitrile: H<sub>2</sub>O (80:20) สารมาตรฐานคือ phorbol 12-myristate 13-acetate วิเคราะห์ที่สภาวะอัตราการไหล 1.3 ml ต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดที่ 254 และ 280 nm และใช้ปริมาตรในการฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ 20  $\mu$ L

- 3.3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำ (Vaintraub and Lapteva, 1988)

ชั่งกากเมล็ดสบู่ดำ 0.5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 ml และเติม 2.4% HCl ปริมาตร 10 ml เขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยเครื่อง vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใส นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 3 ml เติม Wade reagent ปริมาตร 1 ml วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm นำค่าที่ได้หาปริมาณ phytic acid จากกราฟ

มาตรฐาน ทำกราฟมาตรฐานของ phytic acid โดยใช้สารละลาย phytic acid ที่ความเข้มข้น 0-50  $\mu\text{g/ml}$  นำสารละลายความเข้มข้นต่างๆ 3 ml เติม Wade reagent ปริมาตร 1 ml และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm และความเข้มข้นของ phytic acid การคำนวณปริมาณ phytic acid ในหน่วย mg/g dry sample  $\Delta\text{OD } 500 = \text{ค่า OD ที่ความเข้มข้น phytic acid } 0 \mu\text{g/ml} - \text{ค่า OD } 500 \text{ ของ phytic acid ตัวอย่าง}$

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

### 3.3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ trypsin inhibitor ในกากเมล็ดสบู่ดำ (Liu and Markakis, 1989)

ชั่งตัวอย่างหนัก 2 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่น 25 ml เขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Tris buffer solution ปริมาตร 25 ml และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที กรองสารละลายด้วยเครื่อง vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใส นำสารละลายส่วนใสที่ได้ (extract solution) ที่แยกได้ไปวิเคราะห์หา Trypsin inhibitor เตรียมตัวอย่างตามตารางที่ 3.1 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm คำนวณปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ trypsin แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ trypsin ที่ถูกยับยั้ง (Trypsin inhibitor unit: TIU) ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่าง (TIU/g dry sample) ดังนี้

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

เมื่อ A = Absorbance ที่วัดได้

ตารางที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ Trypsin inhibitor

ขั้นตอน	สารละลาย	ปริมาณ (ml)			
		Control		Sample	
		A	b	c	d
1	น้ำกลั่น	1	1	0.7	0.7
2	BAPNA	2	2	2	2
3	ส่วนใสจากการสกัด	-	-	0.3	0.3
4	เอนไซม์ trypsin	-	0.5	-	0.5
อุ่นหลอดทดลองใน water bath ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที					
5	30% Acetic acid	0.5	0.5	0.5	0.5
6	เอนไซม์ trypsin	0.5	-	0.5	-
ปริมาตรรวม		4	4	4	4

#### 3.3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ lectin ในกากเมล็ดสับดูดำ (Gordon and Marquardt, 1974)

ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ลงใน flask เติม 0.85% NaCl 10 ml เขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารสกัดกรองด้วย vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ เตรียมสารละลายเลือดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ lectin โดยเตรียม blood erythrocyte suspension โดยล้างด้วย phosphate-buffered saline นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างๆ นาน 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งไป ด้วย Pasteur pipette ล้างตัวอย่างเลือดซ้ำ 3 ครั้ง เจือจางตัวอย่างเลือดที่ล้างให้ได้ 1% ของเลือด วิเคราะห์ปริมาณ lectin โดยหยดสารสกัด 50  $\mu$ l ลงบน microtitration plate และทำ serial dilution อัตราส่วน 1:2 ด้วย normal saline บ่ม plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บันทึกอัตราส่วนที่น้อยที่สุดของเลือดต่อ normal saline ที่ทำให้เลือดเกิดการตกตะกอน

#### 3.3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณ saponin ในกากเมล็ดสับดูดำ (Thiborg et al., 1994)

บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างหนัก 0.5 กรัม ลงใน flask เติม 80% aqueous methanol 20 ml เขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ข้ามคืนด้วยเครื่องเขย่ากรองสารละลายด้วยเครื่อง vacuum pump โดยใช้กระดาษกรอง whatman no.1 เก็บสารละลายส่วนใส ล้างตะกอนด้วย 80% aqueous methanol 5 ml 3 ครั้ง จากนั้นกรองสารละลายและเก็บสารละลายส่วนใส ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 25 ml ด้วย 80% aqueous

methanol นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ saponin ด้วยวิธี spectrophotometric method โดยดูดสารสกัด 2 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A และ B (ภาคผนวก ค.) อย่างละ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที เพื่อให้เกิดสี จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย spectrophotometer ความยาวคลื่น 430 nm ใช้ ethyl acetate 2 ml เป็น reagent blank ใช้ diosgenin เป็นสารมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆของ diosgenin ใน 80% aqueous methanol แสดงผลเป็นค่า diosgenin equivalent

### 3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อรา

เชื้อรา 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ในศึกษาได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* โดยทำการเลี้ยงเชื้อรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่บรรจุในขวดแบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 7 วัน ทำ spore suspension โดยใช้ normal saline ที่ผสม 0.1% Tween 80 นับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer

### 3.3.4 การหมักกากเมล็ดสับุดำแบบ solid state fermentation

ซังกากเมล็ดสับุดำ 10 กรัม บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ปรับความชื้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่น ปิดจุกด้วยสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติม 1 ml ของ spore suspension ( $1 \times 10^6$  spore/ml) คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 7 เพื่อวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.3.6

### 3.3.5 การหมักกากเมล็ดสับุดำแบบ Submerged fermentation

ซังกากเมล็ดสับุดำ 10 กรัม บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่น 100 ml ปิดจุกด้วยสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติม 1 ml ของ spore suspension ( $1 \times 10^6$  spore/ml) คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 30°C ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 และวันที่ 7 เพื่อวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.3.6

### 3.3.6 การวิเคราะห์กากเมล็ดสับุดำหลังการหมักด้วยเชื้อรา

เก็บตัวอย่างกากเมล็ดสับุดำหมักด้วยเชื้อราแบบอาหารเหลวของวันที่ 0 และวันที่ 7 มาทำการแยกตะกอนออกโดยการ centrifuge ที่ความเร็ว 7,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นของแข็งนำมาอบแห้งด้วยเครื่อง vacuum oven ที่ 55°C

สำหรับตัวอย่างกากเมล็ดสับดูดำหมักแบบอาหารแห้งนำมาอบแห้งด้วยเครื่อง vacuum oven ที่ 55°C เช่นเดียวกับตัวอย่างจากการหมักแบบอาหารเหลวเพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

### 3.3.6.1 การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อรา

นำกากเมล็ดสับดูดำก่อนและหลังการหมักอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นวิเคราะห์การเจริญด้วยการวัดปริมาณกลูโคซามีน (ภาคผนวก ค)

### 3.3.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสับดูดำ ใช้วิธีการตามหัวข้อ

3.3.1

### 3.3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณ phorbol ester ใช้วิธีการตามหัวข้อ 3.3.2.1

### 3.3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ phytic acid, trypsin inhibitor, lectin และ saponin ใช้วิธีการตามหัวข้อ 3.3.2.2 ถึง 3.3.2.5

## 3.3.7 การเตรียมน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำ

### 3.3.7.1 น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำจากการหมักแบบอาหารเหลว

เก็บตัวอย่างของเหลวหลังการหมักกากเมล็ดสับดูดำครบ 7 วัน มาทำการแยกตะกอนออกโดยการ centrifuge ที่ความเร็ว 7,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อทำวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.3.8

### 3.3.7.2 น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำจากการหมักแบบอาหารแข็ง

เก็บตัวอย่างหลังการหมักกากเมล็ดสับดูดำครบ 7 วัน โดยกวนกากเมล็ดสับดูดำให้ทั่วกันทั้งพลาสติก ก่อนตักออกมาชั่ง 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 ml เขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาทำการแยกตะกอนออกโดยการ centrifuge ที่ความเร็ว 7,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อทำวิเคราะห์ตามหัวข้อ 3.3.8

## 3.3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค)

### 3.3.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951)

### 3.3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน โดยวิธี TNBS (Adler-Nissen, 1979)

### 3.3.8.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ในน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำ

### 3.3.8.3.1 Protease (Adler-Nissen, 1993)

ปิเปตตัวอย่างส่วนโปรตีน 1 ml ลงในหลอดทดลองเติม 1% Casein ลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ 5% TCA ลงไป 3 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย 1 ml เติมน้ำ 0.4N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5 ml ลงไป จากนั้นจึงเติมสารละลาย Folin 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 nm สำหรับ Blank ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ใช้น้ำกลั่นแทนส่วนโปรตีนที่เป็นเอนไซม์สำหรับโปรตีนที่มีอยู่ในส่วนอื่น ซึ่งไม่ได้จากการย่อยจากเอนไซม์โปรตีนนั้น หาได้จากการนำส่วนโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นก็ทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง (เรียกเป็น Control) กำหนดกิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานไทโรซีน โดยกิจกรรมเอนไซม์โปรตีน 1 หน่วยหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนให้ได้กรดอะมิโนอิสระไทโรซีน ในอัตราเท่ากับ ไทโรซีน 1  $\mu\text{g/ml}$  ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

### 3.3.8.3.2 Phytase (Maria et. al., 2003)

ปิเปตตัวอย่างส่วนโปรตีน 150  $\mu\text{l}$  ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ substrate 600  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำ 5% TCA ปริมาตร 750  $\mu\text{l}$  และทำให้เกิดสีด้วย colour reagent ปริมาตร 750  $\mu\text{l}$  นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้เกิด 1 nmol ของ phosphate อิสระต่อ นาทีในสภาวะทดลอง

### 3.3.8.3.3 Esterase (Sebastien et. al., 2009)

ปิเปตตัวอย่างส่วนโปรตีน 30  $\mu\text{l}$  ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 0.1 M Tris – HCl buffer pH 7 ปริมาตร 60  $\mu\text{l}$  เติมน้ำกลั่นปริมาตร 305  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำ 20 mM *p*NP – acetate substrate ปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 nm ทำเทียบกับ control โดยต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที และใช้น้ำกลั่นเป็น blank ใช้ *p*-nitrophenol เป็นสารมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสหมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้เกิด 1 nmol ของ *p*-nitrophenol ต่อ นาทีในสภาวะทดลอง

### 3.3.9 การศึกษาจลนศาสตร์ของการหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วยเชื้อรา

คัดเลือกเชื้อรา 1 สายพันธุ์จากทั้ง 4 สายพันธุ์และวิธีการหมักที่เหมาะสมในการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสับดูดำมากที่สุด เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการหมักกากเมล็ดสับดูดำ โดยชั่งกากเมล็ดสับดูดำ 10 กรัม บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นตามสภาวะการหมัก ปิดจุกด้วยสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำ 1 ml ของ spore suspension ( $1 \times 10^6$  spore/ml) คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 30°C เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารพิษ สารต้านคุณค่าทางโภชนาการและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

### 3.3.10 การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำ

#### 3.3.10.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ดพริก

ศึกษาการงอกของเมล็ดพริก โดยใช้พริกยักษ์ สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ (California Wonder pepper; *Capsicum annuum*) ทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำหมักแบบอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 30  $\mu\text{g/ml}$  เปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (30 ไมโครกรัมอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำที่ไม่มีจุลินทรีย์ (30 ไมโครกรัมอะมิโนต่อมิลลิลิตร) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 8 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้น้ำกลั่น (Water) เป็นชุดควบคุม  
 ชุดการทดลองที่ 2 ใช้น้ำกลั่น (Water) เป็นชุดควบคุม  
 ชุดการทดลองที่ 3 ใช้น้ำกลั่น (Water) เป็นชุดควบคุม  
 ชุดการทดลองที่ 4 ใช้น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำที่ไม่มีจุลินทรีย์ (Control) เป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่ 5 ใช้น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วย *Aspergillus niger*

ชุดการทดลองที่ 6 ใช้น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วย *Aspergillus oryzae*

ชุดการทดลองที่ 7 ใช้น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วย *Rhizopus oryzae*

ชุดการทดลองที่ 8 ใช้น้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วย *Rhizopus oligosporus*

ทั้งนี้แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด รดเมล็ดพริกด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำและชุดควบคุมปริมาตร 30 ml ในวันแรก จากนั้นรดเมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 5 ml ทุกวันจนครบ 14 วัน บันทึกผลการศึกษาดังวิธี ISTA (ISTA, 1999) ดังนี้

### 3.3.10.1.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด (Germination percentage)

นำเมล็ดพันธุ์พริกมาเพาะด้วยวิธี Top of Blotter โดยนำกระดาษเพาะเมล็ด 4 ชั้น วางไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 14.5x20.5x7 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นวางเมล็ดลงบนกระดาษเพาะเมล็ดจำนวน 100 เมล็ดต่อกล่องและใส่น้ำหมักกากเมล็ดสบู่น้ำหรือชุดควบคุม ปริมาตร 30 ml ในวันแรก ปิดฝากล่องแล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) โดยมีการให้แสงตามธรรมชาติ ทำการรดด้วยน้ำกลั่น 5 ml จนครบ 14 วัน ตรวจนับจำนวนต้นกล้าปกติในวันที่ 14 เปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

### 3.3.10.1.2 เปอร์เซ็นต์การแทงราก (Radicle emergence percentage)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 3.3.10.1.1 ตรวจนับจำนวนเมล็ดที่แทงราก จนสังเกตเห็นว่ารากยาวออกมาประมาณ 1 มิลลิเมตร มีลักษณะเป็นจุดสีขาว จนถึงวันที่ 14 หลังการเพาะเมล็ดและเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การแทงราก

### 3.3.10.1.3 อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate : SGR)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 3.3.10.1 แต่ไม่มีการให้แสงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นบันทึกจำนวนต้นกล้าปกติ และนำเฉพาะต้นกล้าปกติมาตัดใบเลี้ยงออกแล้วนำส่วนที่เหลือไปอบน้ำหนักแห้งของต้นกล้าหลังอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$SGR = \frac{DW_{growth}}{No.growth}$$

โดย SGR = อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า, DW growth = น้ำหนักแห้งของต้นกล้าปกติ และ No. growth = จำนวนต้นกล้าปกติ

### 3.3.10.1.4 ดัชนีการงอก (Germination index : GI)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 3.3.10.1 ตรวจนับจำนวนต้นกล้าปกติทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$GI = \sum \left( \frac{N}{D} \right)$$

โดย GI = ดัชนีการงอก, N = จำนวนต้นกล้าปกติในวันที่ D และ D = จำนวนวันหลังเพาะเมล็ด

### 3.3.10.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นคะน้า

ศึกษาการเร่งการเจริญเติบโตของต้นพืช โดยใช้คะน้า (*Chinese kale; Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey) ทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำหมักแบบอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 30  $\mu\text{g/ml}$  เปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (30 ไมโครกรัมอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำที่ไม่มีจุลินทรีย์ (30 ไมโครกรัมอะมิโนต่อมิลลิลิตร) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 8 ชุดการทดลอง เช่นเดียวกับการทดสอบเมล็ดพริก

เตรียมกล้าคะน้าด้วยการเพาะเมล็ดคะน้าในกระบะเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกกล้าคะน้าและปลูกลงในกระถาง กระถางละ 3 ต้น แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 5 ซ้ำ รดน้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 100 ml ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 15 และรดวันละครั้งในช่วงเช้า ตั้งแต่ วันที่ 16 จนครบ 55 วัน ทั้งนี้รดด้วยตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสับดูดำกับชุดควบคุมทุกๆ 7 วัน ได้แก่ วันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 และวันที่ 49 ปริมาตร 30 ml เมื่อครบระยะเวลา 55 วัน ทำการตัดผลผลิตทำการบันทึกผลการเจริญด้วยการวัดความสูงลำต้น (Height) ขนาดลำต้น (diameter) น้ำหนักสด (WW) น้ำหนักแห้ง (DW) และวัดสีของใบ ในการวัดสีของใบจะสุ่มใบคะน้าจากแต่ละกระถางที่ทำการทดสอบกระถางละ 3 ใบ (1 ใบที่สมบูรณ์ที่สุดจาก 1 ต้น และเลือกใบที่มีขนาดมากกว่า 2 นิ้วขึ้นไป) วัดสีด้วยเครื่อง color meter โดยใช้โหมด RSIN ในการวิเคราะห์

### 3.3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS