หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการทดลอง

ก. พืชที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบ

พืชที่ใช้ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบ เป็นพืชน้ำทั้งหมด ยกเว้นกระถินไทยซึ่งเป็นพืชบกชนิดเดียวที่นำมาใช้เปรียบเทียบ เนื่องจากกระถินไทย เป็นพืชที่ใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนในอาหารสัตว์ เก็บตัวอย่างพืชทั้งหมดจากบริเวณคลองทวีวัฒนา เขตทนอง-แขม กรุงเทพฯ ตัวอย่างพืช ได้แก่

1.	กระถินไทย	Leucaena leucocephala de Wit
2.	ไข่น้ำ	Wolffia globosa Hartog & Plas
3.	จอก	Pistia stratiotes Linn.
4.	ดีปลีน้ำ	Potamogeton malanus Miquel
5.	ธูปฤาษี	Thypha angustifolia Linn.
6.	บัวหลวง	Nelumbo nucifera Gaertn
7.	ผักตบชวา	Eichhornia crassipes (Mart.) Solms
8.	ผักบุ้ง	Ipomoea aquatica Forsk.
9.	ผักเบี้ดน้ำ	Alternanthera philoxeroides (Mart.) Griseb.
10.	ไมยราพยักษ์	Mimosa pigra Linn.
11.	ลำเอียก	Coix aquatica Roxb.
12.	โสน	Sesbania javanica Miq.
13.	สาหร่ายพุงชะโด	Ceratophyllum demersum Linn.
14.	สาหร่ายไฟ	Chara zeylanica Kl. ex Wild
15.	สาหร่ายหางกระรอก	Hydrilla verticillata Presl
16.	แห้วกรงกระเทียม	Eleocharis dulcis (Burm. f.) Henschel
17.	เอื้องเพ็ดม้า	Polygonum tomentosum Wild
18.	หญ้าขน	Brachiaria mutica Stapf

หมายเหตุ : ชื่อวิทยาศาสตร์ อ้างจาก เต็ม สมิตินันท์ (2530)

ข. **พืชที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและเตรียมโปรตีนเข้มข้น(LPC)**

พืชที่ใช้ในการสกัดโปรตีน และเตรียม LPC คือ

1. ผักตบชวา (Eichhornia crassipes (Mart.) Solms)

เก็บใบผักตบชวาจากแหล่งน้ำบ่อเดียวกัน ที่อยู่ในบริเวณระหว่างคณะรัฐศาสตร์และคณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดการทดลอง ตัวอย่างใบผักตบชวาที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้ใบที่ 1 ถึง 5 ของแต่ละต้น นับจากใบอ่อนที่ม้วนตัวอยู่ออกไป

<u>อุปกรณ์</u>

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
2. เครื่องเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge) ของ Sorvall
3. ตู้อบ (hot air oven)
4. Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit และ Gerhardt Vapodest I สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
5. Soxtherm Automatic รุ่น S-166 สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
6. Crude fiber digestion apparatus ของ Gerhardt รุ่น RF-16/6 สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย
7. Muffle Furnace สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเถ้า
8. Freeze Dryer ของ Virtis รุ่น 255 RC

<u>สารเคมี</u>

ใช้สารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) ดังนี้

1. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC**
   - 1.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 1,2 และ 4 เปอร์เซ็นต์
   - 1.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1,2 และ 4 เปอร์เซ็นต์
   - 1.3 กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1.0 นอร์แมล
   - 1.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.0 นอร์แมล
   - 1.5 เอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
   - 1.6 อะซีโตน

2. **สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน**

2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

2.2 กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.1 นอร์แมล

2.3 Kjeltabs ซึ่งเป็นส่วนผสมของโปแตสเซียมซัลเฟตและซีลีเนียม

2.4 กรดบอริก เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

2.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

2.6 อินดิเคเตอร์ ซึ่งเป็นส่วนผสมของ เมธิลเรด และ เมธิลบลู

3. **สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไขมัน**

3.1 ปิโตรเลียมอีเธอร์

4. **สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เส้นใย**

4.1 กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.255 นอร์แมล

4.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.310 นอร์แมล

4.3 เอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

<u>สถานที่ทำการวิจัย</u>

1. **การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวาและใบพืชน้ำอื่น 17 ชนิด**

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในใบพืชทั้ง 18 ชนิด ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์พืชและปุ๋ย ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพของดิน กองวิเคราะห์ดิน กรมพัฒนาที่ดิน บางเขน กรุงเทพฯ

2. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากใบผักตบชวา**

สกัดโปรตีนและเตรียม LPC ที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาของพืช และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **การทำให้ LPC แห้งโดยวิธีการ freeze drying**

ใช้เครื่อง freeze dryer ของศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC**

วิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC ที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาแต่ละขั้นตอน ทำการทดลอง จำนวน 6 ซ้ำ โดยศึกษาดังต่อไปนี้

1. การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวาและใบพืชน้ำ 17 ชนิด

เพื่อดูความเหมาะสมขั้นต้นว่า ในใบผักตบชวามีปริมาณโปรตีนมากพอ ที่จะนำมาสกัดโปรตีนหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับพืชน้ำ 17 ชนิด ที่ขึ้นอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำเดียวกัน ศึกษาตามขั้นตอนดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างผักตบชวาและพืชน้ำ 17 ชนิด ได้แก่ กระถิน หญ้าขน โสนไมยราพยักษ์ จอก ไข่น้ำ ผักบุ้ง ผักเป็ดน้ำ บัวหลวง แห้วทรงกระเทียม ธูปฤาษี เอื้องเพ็ดม้า ลำเอียก ดีปลีน้ำ สาหร่ายไฟ สาหร่ายหางกระรอก และสาหร่ายพุงชะโด โดยเก็บตัวอย่างแต่ละชนิดจาก 3 บริเวณของแหล่งน้ำ และเก็บตัวอย่างทั้งหมดภายในวันเดียวกัน

1.2 นำตัวอย่างพืชมาแยกเอาส่วนใบ ทำความสะอาด ชั่งน้ำหนักสด นำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ใช้เวลาอบประมาณ 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง

1.3 นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว มาบดให้ละเอียด

1.4 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในใบ

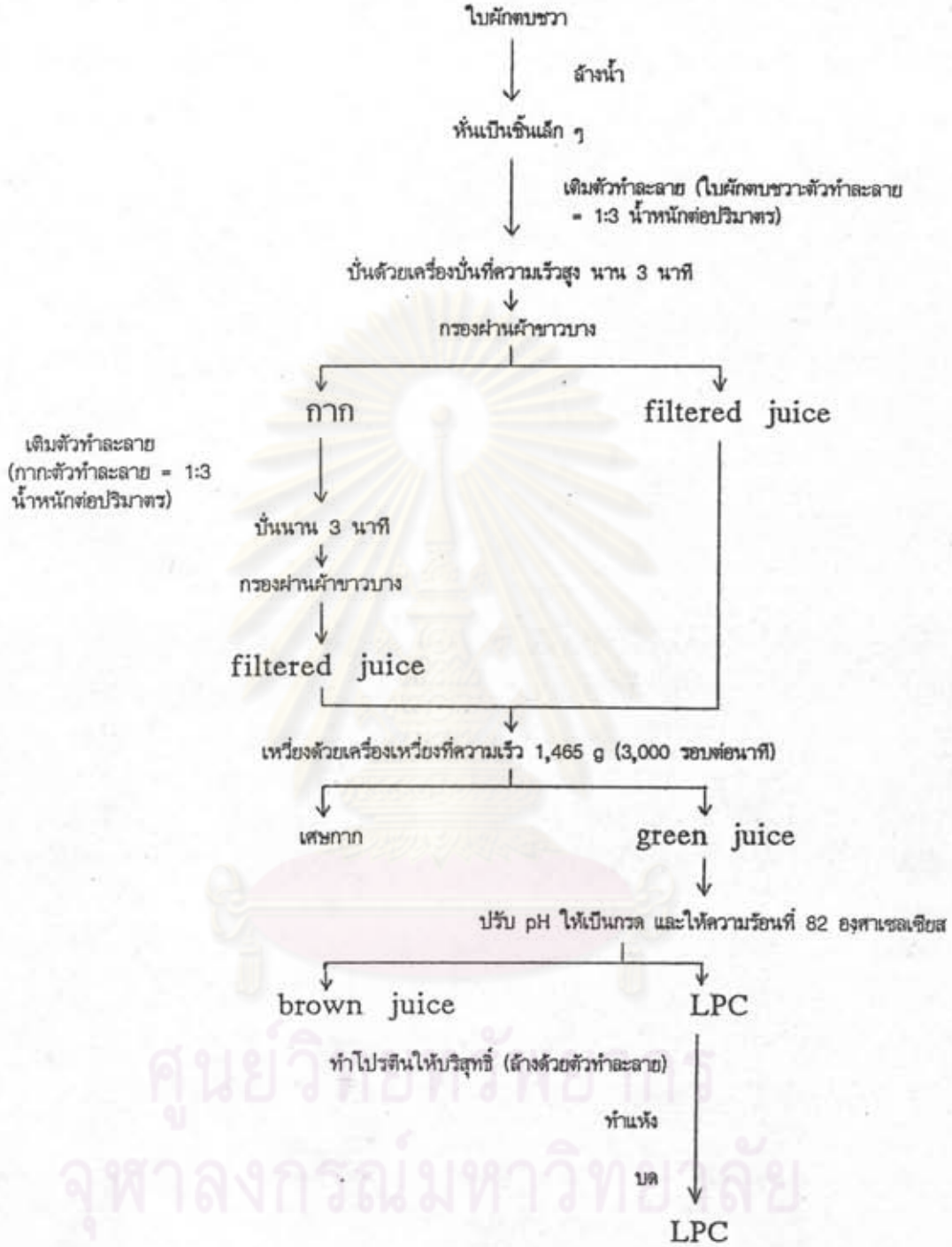
1.5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวากับใบพืชน้ำอื่น 17 ชนิด เพื่อดูความเหมาะสมในการที่จะนำใบผักตบชวามาสกัดโปรตีนต่อไป

2. การศึกษาการสกัดโปรตีนและเตรียมโปรตีนเข้มข้น (LPC) จากใบผักตบชวา

ในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากใบ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ การสกัดโปรตีน การแยกโปรตีนที่สกัดได้ การล้าง และการทำแห้ง ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

ได้ทำการศึกษา เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน และเตรียม LPC ในแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

ภาพที่ 1 แผนผังการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 การศึกษารูปแบบในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน (heat coagulation) ตามวิธีของ Telek และ Martin (1983)

พืชแต่ละชนิดมีลักษณะการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนต่างกันไป สำหรับผักตบชวานั้นยังไม่มีรายงานว่ามีการตกตะกอนด้วยความร้อนในรูปแบบใด จึงต้องทำการศึกษาเพื่อดูว่าโปรตีนที่สกัดได้จากใบผักตบชวาสามารถตกตะกอนโดยการใช้ความร้อนได้หรือไม่ และตกตะกอนที่อุณหภูมิใด ขั้นตอนการศึกษาแสดงในแผนภาพที่ 2 มีรายละเอียดของการศึกษาดังนี้

2.1.1 เก็บตัวอย่างใบผักตบชวา นำมาทำความสะอาด และหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.1.2 ชั่งน้ำหนักสดของใบ 200 กรัม เติมน้ำกลั่นเย็น อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง นาน 3 นาที

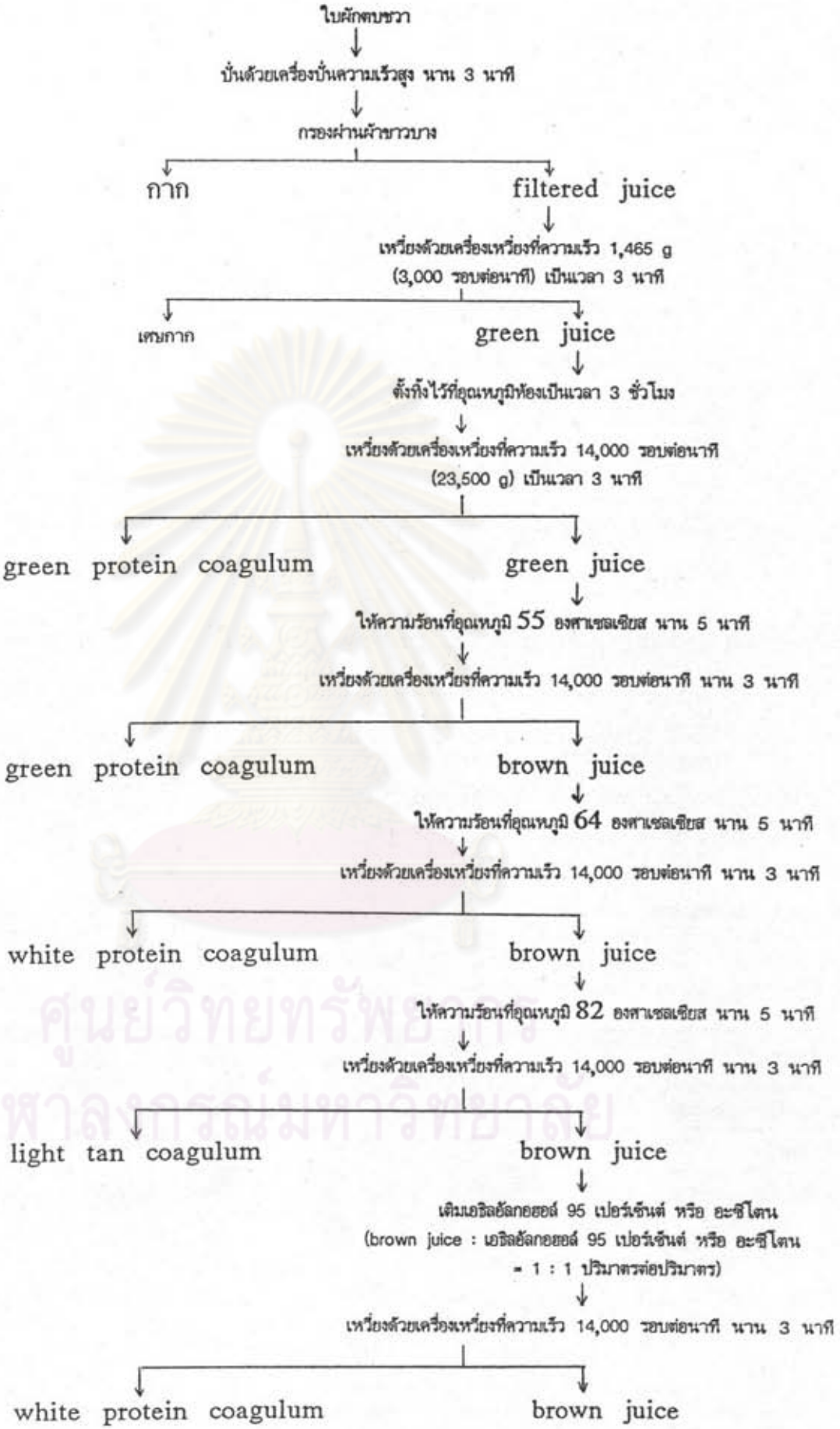
2.1.3 กรองและบีบผ่านผ้าขาวบาง ให้ได้ filtered juice แยกเอากากออกไป นำ filtered juice ไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1,465 g) นาน 3 นาที เพื่อแยกเอาเศษกากที่ยังอาจตกค้างอยู่จากการกรองออกไป

2.1.4 ตั้ง green juice ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูว่ามีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (23,500 g) นาน 3 นาที ถ้ามีตะกอนแยกตะกอนออก นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC 2.057 (1984)

2.1.5 นำ green juice ไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิของ green juice ให้อยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงว่ามีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ถ้ามีตะกอน แยกตะกอนออกไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1.6 นำ brown juice ไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิของ brown juice ให้อยู่ที่ 64 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงว่ามีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ถ้ามีตะกอน แยกตะกอนออกไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1.7 นำ brown juice ไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิของ brown juice ให้อยู่ที่ 82 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงว่ามีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ เติมอะซีโตนหรือเอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ลงไปใน brown juice ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงว่ามีตะกอนเกิดขึ้น


ใบผักตบชวา
ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง นาน 3 นาที
กรองผ่านผ้าขาวบาง
กาก
filtered juice
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,465 g
(3,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 3 นาที
เศษกาก
green juice
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที
(23,500 g) เป็นเวลา 3 นาที
green protein coagulum
green juice
ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
green protein coagulum
brown juice
ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
white protein coagulum
brown juice
ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
light tan coagulum
brown juice
เติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ หรือ อะซิโตน
(brown juice : เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ หรือ อะซิโตน
= 1 : 1 ปริมาตรต่อปริมาตร)
เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
white protein coagulum
brown juice

หรือไม่ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ถ้ามีตะกอน แยกตะกอนไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1.8 จำแนกว่าผักตบชวามีลักษณะการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนในรูปแบบใดโดยดูว่ามีการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิใดบ้าง ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	type			
	I	II	III	IV
อุณหภูมิห้อง	✓	-	-	-
55	-	✓	✓	-
64	-	-	✓	-
82	-	✓	✓	-

✓ หมายถึง ตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมินั้น

- หมายถึง ไม่ตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมินั้น

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากใบผักตบชวา

2.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน

เมื่อทราบรูปแบบในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนจากข้อ 2.1 แล้ว จะใช้ความร้อนระดับนั้นในการตกตะกอนโปรตีนหลังจากที่สกัดโปรตีนแล้ว สำหรับการทดลองขั้นต่อ ๆไป และได้ศึกษาเพื่อเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.2.1.1 เก็บตัวอย่างใบผักตบชวา ล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.2.1.2 ชั่งน้ำหนักใบสด 100 กรัม สกัดโปรตีน โดยเติมน้ำกลั่นแช่เย็น อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง นาน 3 นาที กรองและบีบผ่านผ้าขาวบางให้ได้ filtered juice แยกเอากากออก เติมน้ำกลั่นแช่เย็น 300 มิลลิลิตร ลงในกาก ปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง นาน 3 นาที กรองและบีบผ่านผ้าขาวบางให้ได้ filtered juice เช่นเดียวกับครั้งแรก นำ filtered juice ที่ได้รวมกัน นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อแยกเอาเศษกากที่ตกค้างอยู่ออกไป

2.2.1.3 ตกตะกอนโปรตีน โดยนำ green juice มาให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เปรียบเทียบกัน 2 กรณี คือ ให้ความร้อนแก่ green juice ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที แยกเอาตะกอนโปรตีนออก นำ brown juice ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมอะซีโตนลงไปใน brown juice ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที แยกเอาตะกอนโปรตีน ส่วนอีกกรณีหนึ่ง คือ ให้ความร้อนแก่ green juice ที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที แยกเอาตะกอนโปรตีน

2.2.1.4 ล้างตะกอนโปรตีน โดยกระจายตะกอนโปรตีนในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ค่อย ๆ เทน้ำกลั่นที่ใช้ล้างออก ล้างตะกอนโปรตีน 2 ครั้ง

2.2.1.5 นำตะกอนโปรตีนที่ล้างแล้ว ไปทำให้แห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง

2.2.1.6 นำตะกอนโปรตีนที่แห้งแล้วไปบดให้ละเอียด และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

2.2.1.7 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างกันใน 2 กรณี และคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.2 การศึกษาชนิดของสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

เพื่อศึกษาชนิดของสารสกัดที่ใช้ในการสกัดโปรตีน โดยใช้น้ำกลั่นที่ปรับ pH เป็น 6.5, 8.5 และ 10.5 เปรียบเทียบกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น

1 ,2 และ 4 เปอร์เซนต์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยศึกษาตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.2.2.1 เก็บตัวอย่างใบผักตบชวา ล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.2.2.2 ชั่งน้ำหนักใบสด 100 กรัม สกัดโปรตีนจากใบ โดยเติมสารที่ใช้สกัด 300 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง นาน 3 นาที กรองและบีบผ่านผ้าขาวบางให้ได้ filtered juice แยกเอากากออก เติมน้ำกลั่นแช่เย็น 300 มิลลิลิตรลงในกาก ปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง นาน 3 นาที กรองและบีบผ่านผ้าขาวบางให้ได้ filtered juice เช่นเดียวกับครั้งแรก เอากากออก นำ filtered juice ที่ได้รวมกันนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อแยกเอาเศษกากที่ตกค้างออกไป

2.2.2.3 ตกตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ด้วยความร้อน โดยให้ความร้อนแก่ green juice ที่อุณหภูมิที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.2.1 และแยกเอาตะกอนโปรตีน

2.2.2.4 ล้างตะกอนโปรตีนที่แยกได้ โดยกระจายตะกอนโปรตีนในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ค่อย ๆ เทน้ำกลั่นที่ใช้ล้างออก ล้างตะกอนโปรตีน 2 ครั้ง

2.2.2.5 นำตะกอนโปรตีนที่ล้างแล้ว ไปทำให้แห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง

2.2.2.6 นำเอาตะกอนโปรตีนที่อบแห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

2.2.2.7 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ได้จากการสกัดโปรตีนด้วยการใช้สารสกัดต่างกัน และคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

เมื่อเลือกสารสกัดที่ใช้ในการสกัดโปรตีน จากข้อ 2.2.2 แล้ว ได้ศึกษาเพื่อเลือก pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน โดยศึกษาที่ pH 4, 5, 6, 7, 8, 8.5, 9 และ 10 ปรับ pH เป็นกรดโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับ pH เป็นด่าง โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ศึกษาตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 ยกเว้นขั้นตอนการสกัดโปรตีน ทำการทดลองโดย หลังจากที่ปั่นใบพืชให้แตกแล้ว ปรับ pH ให้คงที่ ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ระหว่างนี้ปรับ pH ให้คงเดิมทุก 5 นาที กรองและบีบผ่าน

ผ้าขาวบางให้ได้ filtered juice แยกเอากากออก เติมสารที่ใช้สกัดลงในกาก ปรับ pH และปั่นเช่นเดียวกับใบ นำ filtered juice ที่ได้ทั้งหมดรวมกัน จากนั้นทำการแยกโปรตีนใน green juice และเตรียมเป็น LPC เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ได้จากการสกัดโปรตีนที่ pH ต่างกัน และคัดเลือก pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตะกอนโปรตีนด้วยกรด

นอกเหนือจากการตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนแล้ว ได้ศึกษาการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดก่อนที่จะตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน โดยศึกษาที่ pH 2, 3, 4 และ 5 ปรับ pH โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์แมล ทำการศึกษาโดยนำตัวอย่างใบผักตบชวามาสกัดโปรตีน ตามสภาวะที่คัดเลือกในข้อ 2.2.3 จากนั้น ทำการแยกโปรตีนที่สกัดได้ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยการปรับ pH ของ green juice ให้เป็นกรดตาม pH ที่ต้องการศึกษา และนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนตามวิธีการที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.2.1 เตรียมเป็น LPC เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ได้จากการสกัดโปรตีนที่ pH ต่างกัน และคัดเลือก pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.5 การทำ LPC ให้บริสุทธิ์มากขึ้น (Partial Purification)

ตะกอนโปรตีนที่ได้ มีสารอื่น ๆ นอกเหนือจากโปรตีน เช่น รงควัตถุ ไขมัน ปนอยู่ด้วย จึงศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่จะใช้ในการล้างตะกอนโปรตีนเอาสารอื่นออกไปบางส่วน เพื่อให้ LPC ที่ได้มีความบริสุทธิ์ของโปรตีนมากยิ่งขึ้น โดยใช้เอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และอะซีโตน เป็นตัวทำละลายในการล้างตะกอนโปรตีน เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่น ทำการศึกษาโดยสกัดโปรตีน แยกโปรตีน และเตรียมเป็น LPC ตามสภาวะที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.2.4 ยกเว้นขั้นตอนการล้างตะกอนโปรตีนเพื่อทำให้ LPC บริสุทธิ์ขึ้น ทำการศึกษาโดย ล้างตะกอนโปรตีนที่แยกได้ โดยกระจายตะกอนโปรตีนในตัวทำละลายที่ศึกษาปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ค่อย ๆ เทตัวทำละลายที่ใช้ล้างออก ล้างตะกอนโปรตีน 3 ครั้ง นำตะกอนโปรตีนที่ล้างแล้ว ไปทำแห้ง วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ผ่านการล้างด้วยตัวทำละลายต่างกัน และคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการล้าง LPC สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.6 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ LPC แห้ง

LPC ที่เตรียมได้ ต้องทำให้แห้งเพื่อให้เก็บไว้ได้นาน ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการทำแห้ง โดยอบในตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับวิธีการ freeze drying ทำการศึกษาโดย นำใบผักตบชวามาสกัดโปรตีน แยกโปรตีน และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ตามสภาวะที่คัดเลือกในข้อ 2.2.5 นำ LPC ไปทำให้แห้งโดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักแห้งคงที่ นานประมาณ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการทำแห้งโดยวิธีการ freeze drying นำเอาตะกอนโปรตีนที่แห้งแล้วไปบดให้ละเอียด และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีน (LPC) ที่ทำให้แห้งด้วยวิธีการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กับวิธีการ freeze drying และคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ LPC แห้ง

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC

ทำการเตรียม LPC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้คัดเลือกไว้ และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เปรียบเทียบกับ LPC ที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสมแต่ล้างด้วยน้ำกลั่น และ LPC ที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสมแต่สกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet วิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ

3.1 ปริมาณโปรตีน (AOAC 2.057 (1984))

3.2 ปริมาณไขมัน (AOAC 14.0089 (1984))

3.3 ปริมาณเถ้า (AOAC 7.009 (1984))

3.4 ปริมาณเส้นใย (AOAC 7.006 (1984))

3.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรท

3.6 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

(ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ก)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลในแต่ละการทดลอง ที่ได้จากการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 6 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดทดลองโดยวิธี DMRT (Duncan Multiple Range Test) และ LSD (Least Significant Difference Test) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1985)