สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นในใบที่ได้จากแหนในประเทศไทย

นางสาวสุภาภรณ์ กรณีย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEAF PROTEIN CONCENTRATE FROM DUCKWEEDS IN THAILAND

Miss Supaporn Garanee

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นในใบที่ได้จากแหนในประเทศไทย
โดย	นางสาวสุภาภรณ์ กรณีย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศุภวิน วัชรมูล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สุภาภรณ์ กรณีย์ : สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นในใบที่ได้จากแหนในประเทศไทย (FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEAF PROTEIN CONCENTRATE FROM DUCKWEEDS IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สีหนาท ประสงค์สุข, ผศ. ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์, 67 หน้า.

โปรตีนสกัดเข้มข้นในใบ (leaf protein concentrate, LPC) เป็นโปรตีนสำคัญที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารมังสวิรัติ และอาหารเสริม ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยส่วนใหญ่ LPC ผลิตจากผักและธัญพืช เช่น ถั่วลิสง มันสำปะหลัง และผักบุ้ง ขณะที่ปริมาณรายงานการผลิตโปรตีนจากพืชน้ำมีน้อยโดยเฉพาะจากแหน (duckweed) แหนเป็นพืชน้ำที่โตเร็วและมีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์สูง ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein content, TPC) ในแหนที่พบในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor*) แหนเป็ดใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza*) และแหนแดง (*Azolla pinnata*) ด้วยวิธี Kjeldahl พบว่าไข่น้ำมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับร้อยละ 27.45±0.02 (โดยน้ำหนัก) จึงคัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำโดยการปรับ pH ระหว่าง 3-6 และอุณหภูมิระหว่าง 37-80 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำมากที่สุดที่ pH 4 และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยผลิตโปรตีนได้สูงสุดร้อยละ 69.96±0.10 (โดยน้ำหนัก) จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำพบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 69.96 (โดยน้ำหนัก), ไขมันร้อยละ 8.96 (โดยน้ำหนัก), คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.84 (โดยน้ำหนัก), ความชื้นร้อยละ 5.66 (โดยน้ำหนัก), เส้นใยร้อยละ 4.06 (โดยน้ำหนัก) และเถ้าร้อยละ 2.49 (โดยน้ำหนัก) เมื่อวิเคราะห์โลหะหนักในตัวอย่างด้วยวิธี Air-C_2H_2 Flame Atomic Absorption Spectrometry พบว่า LPC ที่ผลิตได้มีปริมาณ แมงกานีส 2.37 มิลลิกรัม/ลิตร, เหล็ก 2.29 มิลลิกรัม/ลิตร และสังกะสี 2.16 มิลลิกรัม/ลิตร จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่ในตะกอนโปรตีน พบว่ามีปริมาณกรดกลูตามิคสูงที่สุดคือร้อยละ 8.07 (โดยน้ำหนัก), กรดแอสปาติกร้อยละ 6.53 (โดยน้ำหนัก) และ ลิวซีนร้อยละ 5.87 (โดยน้ำหนัก) เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ของ LPC ที่ผลิตได้ พบว่าโปรตีนสามารถละลายน้ำที่ pH 4 ถึง 6 ได้ร้อยละ 30.49±1.39 ถึง 32.75± 2.97 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และการละลายเพิ่มขึ้นที่ pH ตั้งแต่ 7 (ร้อยละ 34.72±0.97 น้ำหนักต่อปริมาตร) และสูงสุดที่ pH 12 สำหรับสมบัติการเกิดอิมัลชันระหว่างโปรตีนกับน้ำมันเมื่อใส่ SDS พบว่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง 3 เท่าภายใน 10 นาทีหลังจากการผสมแล้ว ความเสถียรของการเกิดโฟมลดลงภายใน 10 นาทีแรกหลังจากตีโฟม และคงที่หลังจากนั้น (ร้อยละ 96.14±0.61) ส่วนค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนพบว่าความหนืดที่ (22.3±3.86 cP) จากคุณสมบัติทั้งหมดของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้ทำให้ได้ข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดอาหารในอนาคต เช่น เวย์ โปรตีน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5772254023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: DUCKWEED / LEAF PROTEIN CONCENTRATE / FUNCTIONAL PROPERTIES

SUPAPORN GARANEE: FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEAF PROTEIN CONCENTRATE FROM DUCKWEEDS IN THAILAND. ADVISOR: PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., ASST. PROF. INTHAWOOT SUPPAVORASATIT, Ph.D., 67 pp.

Leaf protein concentrate (LPC) can be utilized as ingredients of vegetarian diets, additional nutrients for human food and feed industries. Most LPC has been produced from vegetables and cereals including peanut, cassava, and morning glory, while LPC from aquatic plants were hardly found. Duckweed is an aquatic plant that grows fast and contains high amount of organic nitrogen as protein. In this research, total protein content (TPC) from 4 species of duckweed in Thailand including *Wolffia globosa*, *Lemna minor, Spirodela polyrrhiza,* and *Azolla pinnata* were determined by Kjeldahl method. The highest amount of TPC (27.45±0.02 % (w/w) dry weight of duckweed) was found in *Wolffia globosa*. The extracted protein from this duckweed was further processed into the leaf protein concentrate (LPC) by pH adjustment (pH 3-6) and thermal precipitation (37-80 °C). The highest yield of LPC (69.96±0.10 % (w/w)) was extracted by thermo-coagulation at 80 °C and pH 4. The chemical analysis of LPC components consisted of 69.96 % (w/w) protein, 8.96 % (w/w) fat, 8.84 % (w/w) carbohydrate, 5.66 % (w/w) moisture, 4.06 % (w/w) fiber, and 2.49 % (w/w) ash. Moreover, heavy metals were analyzed by Air-C_2H_2 Flame Atomic Absorption Spectrometry, and found 2.37 mg/l Mn, 2.29 mg/l Fe, and 2.16 mg/l Zn. For the analysis of protein fraction, some essential amino acids were found including 8.07 % (w/w) glutamic acid, 6.53 % (w/w) aspartic acid, and 5.87 % (w/w) leucine. Moreover, functional properties of LPC were investigated. It was found that solubility of LPC was from 30.49±1.39 to 32.75±2.97 % (w/v) under the pH range from 4 to 6, and increased significantly at pH values higher than 7 (34.72±0.97 % w/v). The maximum solubility of LPC was found at pH 12. The LPC-oil emulsion was considerated when SDS was supplemented and decreased in 3-fold within 10 minutes after mixing. Decreasing in foam stability was observed within 10 minutes and constanted at (96.14±0.61% w/v). The viscosity of LPC (22.3±3.86 cP). The results of this study are helpful for formulating the future food-supplements such as whey protein.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2017

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงผ่านไปด้วยดี ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทุกท่านดังต่อไปนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา แนวคิดต่าง ๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา แนวคิดต่าง ๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศุภวิน วัชรมูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แนวความคิดและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ ประธานกรรมการสอบที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยที่ได้เดินทางมาเป็นกรรมการภายนอกในการสอบครั้งนี้และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ขึ้น

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่าน

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ คอยดูแลเอาใจใส่ และคอยห่วงใยเสมอมา และขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูป ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช หรือ (Leaf Protein Concentrate, LPC) 4
2.2 การสกัดโปรตีน 5
2.3 รายงานการผลิต Leaf protein concentrate (LPC) จากพืชชนิดอื่น 6
2.4 โปรตีน (protein) 7
2.5 กรดอะมิโน (Amino acid) 8
2.6 แหนที่พบในประเทศไทย 8
2.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 14
2.8 โลหะหนัก (Heavy metal) 15
2.9 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นจากแหน 15
2.10 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method 16
2.11 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method 17
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 19
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย 19
3.2. สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย 20

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.3.พืชที่ใช้ในงานวิจัย 20
3.4 สถานที่ทำงานวิจัย 21
3.5. วิธีดำเนินการวิจัย.....21
3.5.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีน 21
3.5.2. หาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน.....21
3.5.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC 24
3.5.3.1. วิเคราะห์ค่าความชื้น 24
3.5.3.2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 24
3.5.3.3. วิเคราะห์ปริมาณไขมัน 25
3.5.3.4. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า.....25
3.5.3.5. วิเคราะห์ปริมาณเส้นใย 25
3.5.3.6. วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต 26
3.5.4. การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่าง 26
3.5.5. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน.....26
3.5.6. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้ 27
3.5.6.1. สมบัติการละลาย.....27
3.5.6.2. การเกิดอิมัลชัน 27
3.5.6.3. การเกิดโฟม.....27
3.5.6.4. การเกิดเจล.....28
3.5.7. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....29
4.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีน.....29
4.2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของ LPC ที่สกัดได้ 32
4.4. การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่าง 33
4.5. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน 33
4.6. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน 34
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย 39
5.1 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทย 4 ชนิด 39
5.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนและเตรียมโปรตีนจากไข่น้ำ 39
5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC 41
5.4 การตรวจสอบความเป็นพิษของตะกอนโปรตีน 42
5.5 การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน 42
5.6 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้ 42
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 44
ข้อเสนอแนะ 45
รายการอ้างอิง 46
ภาคผนวก ก. 54
ภาคผนวก ข 58
ภาคผนวก ค. 59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน และ kjeldahl factor ในอาหารต่างๆดังนี้ 18
ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ LPC ที่ภาวะต่าง ๆ ทดสอบด้วยวิธี Kjeldahl 31
ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำ 32
ตารางที่ 4 ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่าง LPC 33
ตารางที่ 5 ตรวจสอบกรดอะมิโนของตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น LPC 34
ตารางที่ 6 ข้อมูลแสดงการละลายของตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้นจากไข่น้ำ ที่ pH 2-12 35
ตารางที่ 7 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้นจากไข่น้ำที่ไม่ละลายน้ำที่ pH 2-12 36
ตารางที่ 8 ตารางแสดงการเกิดอิมัลชัน 37
ตารางที่ 9 ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโฟมที่เวลาต่าง ๆ 38
ตารางที่ 10 แสดงค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แหนเป็ดเล็ก 9

รูปที่ 2 แหนเป็ดใหญ่.....10

รูปที่ 3 ไข่น้ำ 12

รูปที่ 4 แหนแดง.....13

รูปที่ 5 ข้อมูลแสดงปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 4 ชนิด วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl.....29

รูปที่ 6เปอร์เซ็นต์การละลายของโปรตีนสกัดเข้มข้นในไข่น้ำที่ pH 2-12.....35

รูปที่ 7 โปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 650 นาโนเมตร 58

รูปที่ 8 โปรตีนมาตรฐานที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร.....58

รูปที่ 9 LPC อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 59

รูปที่ 10 LPC ทำการ freeze dry.....59

รูปที่ 11 น้ำเขียว (green juice).....60

รูปที่ 12 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น (ที่ปรับ pH 4 ความร้อน 80 องศาเซลเซียส) 61

รูปที่ 13 น้ำสีน้ำตาล (brown juice).....62

รูปที่ 14 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น (LPC) 63

รูปที่ 15 ตะกอน LPC อบแห้ง 60 องศาเซลเซียส 64

รูปที่ 16 เครื่องระเหยแบบหมุน.....64

รูปที่ 17 การสกัดไขมัน 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช หรือ (leaf protein concentrate, LPC) เป็นสารสกัดโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากใบพืช โดยการทำให้เซลล์พืชแตก เพื่อสกัดโปรตีนออกมา แยกเอากากออกจะได้ของเหลวสีเขียว (green juice) ทำการแยกส่วนของ green juice ต่อไป โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนและปรับ pH ให้เป็นภาวะกรด แยกตะกอนโปรตีนออกจะได้ LPC และเหลือ ของเหลวสีน้ำตาล (brown juice) และ LPC ที่ได้สามารถนำไปประกอบเป็นอาหารว่าง อาหารมังสวิรัติ หรือใช้เป็นอาหารเสริม เป็นแหล่งของโปรตีนและกรดอะมิโนที่ดี (Ayodeji, 2005) ส่วน ของเหลวสีน้ำตาล (brown juice) ใช้เป็นแหล่งพลังงานที่ดีสำหรับการหมัก และเลี้ยงจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น ยีสต์ เป็นต้น (Virabalin และคณะ, 1993)

แหน (duckweed) เป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็ก ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง พบง่ายในแหล่งน้ำนิ่งทั่วไป เช่น หนอง บึง หรือแอ่งที่มีน้ำท่วมขังตลอดปี มีธาตุอาหารและอินทรียวัตถุอุดมสมบูรณ์ ค่าความเป็นกรดและเบส (pH) ของน้ำค่อนข้างเป็นกลาง บางพื้นที่พบแหนจำนวนมากจนเกิดเป็นพืชน้ำที่กำจัดได้ยาก แหนขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือแตกแผ่นใบใหม่ ทำให้การเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีการศึกษาปริมาณโปรตีนในพืชและพบว่าแหนมีมาก ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาความเป็นไปได้ของแหนที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนที่บริโภคได้ เหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งต้องการโปรตีนจากพืชทดแทน หากสามารถนำแหนมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนได้ก็จะช่วยลดต้นทุนการผลิตในแง่ของวัตถุดิบลง และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชน้ำได้

ปัจจุบันโปรตีนพบด้วยกันหลายแหล่ง เช่น โปรตีนจากไข่ ปลา เนื้อสัตว์ นม และถั่ว ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ ซ่อมแซมร่างกาย และเป็นพลังงานเมื่อถึงคราวจำเป็น แต่มีผู้บริโภคบางกลุ่มที่มีอาการแพ้โปรตีนจากแหล่งดังกล่าว จึงมีการศึกษาทดลองสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช หรือ leaf protein concentrate (LPC) โดยใช้ใบพืชบางชนิดเป็นวัตถุดิบในการสกัด ซึ่งเมื่อสมัยสงครามโลกเคยมีการสกัด LPC แล้ว เนื่องจากมีปัญหาการขาดแคลนโปรตีนในมนุษย์ โดยทำให้เซลล์ใบพืชแตก เพื่อสกัดโปรตีนออกมาจากเซลล์ แยกกากออกจะได้ green juice โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนหรือปรับ pH ให้เป็นกรด แยกตะกอนโปรตีนออก จะได้ LPC และเหลือ brown juice ซึ่งเคยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากใบผักตบชวา เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเสริม และอาหารสัตว์ได้ พบว่าการสกัดใบผักตบชวามีปริมาณโปรตีน 22

เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักแห้ง (Virabalin และคณะ, 1993) และสกัดโปรตีนจากแห้วทรงกระเทียมได้สูงถึง 56 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (Pandey และ Srivastava, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถสกัดโปรตีนจากแหนได้สูงถึง 61 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (Fasakin, 1999) เนื่องจาก LPC มีคุณค่าทางอาหารสูง คือ มีโปรตีนสูง มีไขมันไม่อิ่มตัว และธาตุอาหารที่สำคัญหลายชนิด เหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งต้องการโปรตีนจากพืชทดแทนที่สนใจนั่นก็คือแหน ซึ่งแหนเป็นพืชลอยน้ำที่มีขนาดเล็กที่สุด พบง่ายในแหล่งน้ำนิ่งทั่วไป มีธาตุอาหารและอินทรียวัตถุอุดมสมบูรณ์ ซึ่งพบในพื้นที่เขตร้อนเจริญเติบโตอย่างมากโดยเฉพาะรอบสระน้ำ บึง เป็นพืชน้ำที่พบง่าย โตเร็ว (Liu และคณะ, 2015) จึงมีความสนใจในการสกัด LPC จากแหนแทน เนื่องจากแหนมีการเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว (Ge และคณะ, 2012) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแหนมาสกัดโปรตีนที่บริโภคได้ ช่วยลดต้นทุนการผลิตในแง่ของวัตถุดิบลง (Xu และ Shen, 2011) เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชน้ำได้อย่างดี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการสกัดโปรตีนจากแหนบางชนิดในประเทศไทย ต้องเป็นแหนที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ปริมาณโปรตีนสูง เช่น แหนเป็ดเล็ก แหนเป็ดใหญ่ แหนแดง และไข่น้ำ เป็นต้น นำมาเลี้ยงในโรงเรือนโดยควบคุมปัจจัยการเลี้ยง คือ น้ำ อายุ การเก็บเกี่ยว และความเป็นพิษ โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้ และเลือกชนิดของแหนที่มีปริมาณโปรตีนสูงในการสกัดและหาภาวะที่เหมาะสมโดยแปรผันค่า pH และอุณหภูมิ จากนั้นนำตะกอนโปรตีนที่ได้ (LPC) มาวิเคราะห์องค์ประกอบ เช่น ความชื้น ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า ปริมาณเส้นใย และปริมาณคาร์โบไฮเดรต และการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้ เช่น สมบัติการละลาย การเกิดโฟม การเกิดเจล และการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น ซึ่งการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ดังกล่าวทำให้สามารถทราบได้ว่าโปรตีนที่สกัดได้ น่าจะเหมาะสมสำหรับนำไปเป็นส่วนประกอบในอาหาร หรือใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additives) ในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดที่เหมาะสม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นในใบที่ได้จากแหนในประเทศไทย

ขั้นตอนการทดลอง

1. ศึกษาเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีนของแหน 4 ชนิด
3. หาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน
4. วิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC

5. การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่าง
6. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่สกัดได้
7. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้
8. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้

มีข้อมูลสำหรับการนำโปรตีนเข้มข้นที่ได้จากแหนไปเป็นส่วนผสมที่เหมาะสมกับชนิดอาหารในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช หรือ (Leaf Protein Concentrate, LPC)

Leaf Protein Concentrate (LPC) สามารถนำไปประกอบเป็นอาหารว่าง อาหารมังสวิรัติ หรือใช้เป็นอาหารเสริม (Carlsson, 1985) เนื่องจาก LPC มีคุณค่าทางอาหารสูง คือ มีโปรตีนสูง มีไขมันไม่อิ่มตัว มีรงควัตถุที่สำคัญ เช่น แคโรทีน แซนโทฟิลล์ มีแป้ง และธาตุอาหารที่สำคัญหลายชนิด เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น โปรตีนที่ได้จาก LPC นี้ สามารถใช้เป็นอาหารเสริมกับโปรตีนจากธัญพืช ได้เช่นเดียวกับโปรตีนจากนม และยังสามารถนำ LPC ไปใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น หมู ลูกวัว ไก่ เป็ด ปลา เป็นต้น

โปรตีนเข้มข้นจากใบผักตบชวา (WHLPC) สามารถใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม การศึกษานี้เป็นความพยายามที่จะใช้ประโยชน์จากธรรมชาติในผักตบชวาเพื่อควบคุมการใช้จ่ายที่สิ้นเปลือง โปรตีนเข้มข้นจากใบผักตบชวา (WHLPC) ใช้เป็นอาหารเสริม มันมีแนวโน้มที่จะมีคุณค่าทางโภชนาการเพราะปริมาณโปรตีนสูงและปริมาณของไขมันไม่อิ่มตัว carotenes, xanthophylls แป้ง และแร่ธาตุ เช่น เหล็ก แคลเซียมและฟอสฟอรัส (Kateregga และ Sterner, 2007)

มันสำปะหลังและลูเซิร์น (พืชตระกูลถั่วที่มีฝัก) เป็นแหล่งโปรตีนที่เป็นประโยชน์สำหรับมนุษย์ แต่ปริมาณเส้นใยสูงรวมทั้งสารต่อต้านพิษอื่นๆ เช่น ไฟเตต ไซยาไนด์ และ แทนนิน เป็นความท้าทายที่สำคัญ (Ayodeji, 2005) การขาดแคลนโปรตีนของสัตว์และต้นทุนการผลิตอาหารสูง รวมถึงการเติบโตของประชากรอย่างรวดเร็วจำเป็นต้องหาแหล่งโปรตีนทางเลือก เช่น โปรตีนเข้มข้นจากใบผักตบชวา (Ogunlade และคณะ, 1988) มีรายงานว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงสำหรับอาหารสัตว์ (Igbinosun and Talabi, 1982) เมื่อเร็วๆนี้ สารที่สกัดจากพืชได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านการเกษตร การแพทย์และเภสัชกรรม (Ncube และคณะ, 2008)

เป็นที่ยอมรับกันดีว่าเด็ก ๆ ในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาเป็นสถานที่ที่ขาดแคลนโปรตีนมีผลกระทบต่อสภาพจิตใจ และมีความต้านทานต่อโรคต่ำ (Oke, 1972) เนื่องจากแหล่งโปรตีนที่สำคัญ เช่น เนื้อสัตว์ และปลา มีราคาแพง แหล่งโปรตีนที่ถูกกว่าจะมีผลกระทบสำคัญต่อคุณภาพชีวิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 การสกัดโปรตีน

Leaf protein concentrate (LPC) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์พืช โดยปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ทำให้เซลล์แตก แยกเอากากออก จะได้ green juice จากนั้นปรับ green juice ด้วย 1N HCl และ 1N NaOH โดยให้มีภาวะที่เป็นกรด หลังจากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge จะได้ตะกอน LPC และเหลือ brown juice ประกอบด้วยน้ำตาล กรดอะมิโน และธาตุอาหารบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน สามารถนำมาใช้ทำปุ๋ยหมักและเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ เป็นต้น ส่วนกากที่เหลือนำมาเป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย เป็นต้น จะให้คุณค่าทางอาหาร เพราะกระเพาะของสัตว์เหล่านี้สามารถย่อยได้ (Carlsson, 1989) นอกจากนี้กากยังมาทำก๊าซชีวภาพ อุตสาหกรรมกระดาษและเส้นใย เป็นวัสดุสำหรับเพาะเห็ด ทำปุ๋ย เป็นต้น จากที่ได้กล่าวมาการสกัด LPC ล้วนได้ประโยชน์จากส่วนต่างๆมากมาย ที่สำคัญยังลดต้นทุนการผลิตของวัตถุดิบที่ใช้และได้แหล่งอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าประโยชน์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคตได้เป็นอย่างดียิ่ง

Virabalin และคณะ (1993) นำใบพืชทั้ง 16 ชนิด ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl เมื่อทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอนแล้ว จึงเลือกพืชที่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง หาง่าย พบได้ตามพื้นที่ทั่วไป มาสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช โดยพืชที่เลือกได้แก่ ผักตบชวา นำพืชน้ำที่ได้มาล้างและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำน้ำกลั่นปรับ pH 8.5 มาปั่นกับใบผักตบชวาที่เตรียมไว้โดยมีอัตราส่วน 1:3 (ของแข็ง:ของเหลว) ปั่นเป็นเวลา 3 นาที นำผ้าขาวบางมากรอง และแยกส่วนน้ำไว้ ทิ้งกาก จากนั้นน้ำส่วนที่เป็นน้ำสีเขียวมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,465 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสมาเติมกรด 1N HCl จนได้ pH 4 และความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที โปรตีนที่ให้ความร้อน นำมาปั่นเหวี่ยง 23,500 g เป็นเวลา 3 นาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว ตะกอนที่ได้คือ LPC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในการรับประทานใบพืชหรือผัก คนและสัตว์กระเพาะเดี่ยว (non-ruminant) เช่น ไก่ หมู ปลา ไม่มีกลไกสำหรับย่อยผนังเซลล์พืชเพื่อทำให้เซลล์แตก จึงได้รับสารอาหารโปรตีนน้อยมาก ในขณะที่สัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) เช่น โค กระบือ มีวิธีการสำหรับย่อยผนังเซลล์พืช โดยมีจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารช่วยย่อย จึงได้รับสารอาหารโปรตีนมาก ดังนั้น ถ้าจะใช้ประโยชน์จากโปรตีนในใบพืช สำหรับเป็นอาหารคนและสัตว์กระเพาะเดี่ยว จำเป็นต้องทำการสกัดโปรตีนออกมาจากใบพืช โดยการทำให้เซลล์ใบแตกออก ด้วยวิธีทางกลหรือเคมี (Byers, 1983)

การสกัดโปรตีนโดยใช้สารสกัดต่างกัน ซึ่งทั่วไปโปรตีนละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง ที่ pH ต่างกัน จะมีผลต่อปริมาณผลผลิตที่ได้ โดยทั่วไปโปรตีนละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง ที่ pH สูง จะมีผลทำให้โปรตีนจากใบพืชละลายได้มากขึ้น และคลอโรพลาสต์แตกได้มากขึ้น แต่ถ้าใช้ pH สูงเกินไป

เช่นที่ pH 9.5 ถึงจะได้ปริมาณโปรตีนที่สูง แต่โปรตีนบางส่วนอาจถูกทำลาย และสูญเสียสมบัติการใช้ประโยชน์และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษขึ้นได้ (Kinsella, 1976)

2.3 รายงานการผลิต Leaf protein concentrate (LPC) จากพืชชนิดอื่น

นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศได้เริ่มสนใจในการนำเอาโปรตีนจากใบพืชมาใช้ประโยชน์ Norman Pirie แห่งประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1940 ได้แนะนำว่าโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช หรือ Leaf Protein Concentrate (LPC) สามารถนำมาแก้ปัญหาขาดแคลนโปรตีนในอาหารของมนุษย์ เมื่อสงครามโลกครั้งที่ 2 สงบลง ความสนใจเรื่องโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชก็ลดลง เพราะโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชมีสีเขียวและกลิ่นคล้ายหญ้าผู้คนจึงไม่ค่อยยอมรับ หลังจากนั้นมีผู้ริเริ่มหันมาสนใจโปรตีนเข้มข้นจากพืช โดยมุ่งเน้นไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันมีการปรับปรุงกระบวนการจนถึงขั้นสามารถสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ให้มีคุณภาพสูง พืชที่นิยมใช้ คือยาสูบ เนื่องจากมีใบขนาดใหญ่ และเป็นพืชอาหารที่สำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นถั่วเหลือง ปริมาณโปรตีนที่ยาสูบผลิตได้จำนวนมาก ต้นยาสูบที่นิยมใช้คือ *Nicotiana tabacum* ปัจจุบันยาสูบมีปลูกทั่วโลก แหล่งปลูกรายใหญ่ของโลกคือ จีน และสหรัฐอเมริกา

Kohler นักวิทยาศาสตร์ ของ United State Department of Agriculture (USDA) แห่งสหรัฐอเมริกาได้ทำการดัดแปลง กระบวนการ LPI เพื่อนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนจากใบอัลฟัลฟาโดยเรียก กระบวนการโปร-ซาน เพื่อนำโปรตีนที่ได้มาเป็นอาหารสัตว์ วิธีการผลิตทำได้โดยการนำเอาอัลฟัลฟามาใช้แอมโมเนีย น้ำ แล้วบดให้ได้น้ำเขียว จากนั้นนำมาให้ความร้อนจนโปรตีนตกตะกอน ทำให้แห้งจะได้โปร-ซานสีเขียว ประกอบด้วย โปรตีน 57 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 9 เปอร์เซ็นต์ และรงควัตถุแซนโทฟิลล์ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รงควัตถุนี้เป็นส่วนสำคัญในการให้สีเหลืองของเนื้อไก่ และไข่ไก่ในอาหารสัตว์

การทดลองเพื่อหาปริมาณโปรตีนจาก มันสำปะหลัง (*Manihot esculanta*) สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) ต้นป่าช้าหมอง ป่าเฮ่วหมอง หนานเฉาเหว่ย (*Vernonia amygdalina*) แคฝรั่ง (*Gliricidia maculate*) โพศรี (*Hura crepetans*) เป็นต้น การสกัด (green juice) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ถึง อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ปริมาณโปรตีนถูกตรวจสอบด้วยวิธี Kjeldahl พืชเหล่านี้พบในแอฟริกาเขตร้อน เป็นวัชพืชที่สร้างความรำคาญในสถานที่ต่างๆ จึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ (Tangka, 2003)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 โปรตีน (protein)

โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยปกติแล้วโปรตีนจะมีธาตุที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับคาร์โบไฮเดรตและไขมัน แต่ในโปรตีนจะมีองค์ประกอบของธาตุที่เพิ่มเข้ามาคือไนโตรเจน และซัลเฟอร์

โปรตีนประกอบด้วย โพลีเพปไทด์สายเดี่ยวหรือหลายสาย ที่ทำหน้าที่ต่างๆ กัน ดังนั้นพอลิเพปไทด์สายยาวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ จึงต้องมีการขดตัว (folding) ให้มีรูปร่างต่างๆ เพื่อทำหน้าที่ให้เหมาะสม โครงสร้างของโปรตีน แบ่งออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure)

เป็นโปรตีนที่มีรูปโครงสร้างเป็นเส้นตรงได้จากการสังเคราะห์ใหม่ ๆ และจะนำไปเปลี่ยนเป็นรูปโครงสร้างขั้นต่อไป โปรตีนแต่ละชนิดจะมีกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบที่แตกต่างกันและมีการเรียงลำดับที่แตกต่างกันด้วย

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

เป็นสายพอลิเพปไทด์จะมีการม้วนตัว (folding) เป็นรูปแบบที่ซ้ำกันและสม่ำเสมอทำให้เกิดลักษณะที่เป็นเกลียว (helix) หรือเป็นแผ่น (pleated sheet) ที่เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลและหมู่อะมิโนในสายของโพลีเพปไทด์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure)

เป็นโครงสร้าง 3 มิติ ของสายพอลิเพปไทด์ ที่เกิดจากการม้วนพับเข้าหากันของโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้ได้โครงสร้างที่เสถียรขึ้นและทำหน้าที่ได้ (native form) แต่ละบริเวณที่เกิดการม้วนพับนี้เรียกว่า domains ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยสายพอลิเพปไทด์

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)

โปรตีนหลายชนิดโดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักอณูสูงๆ มักจะมีการจับกลุ่มกันเองของสายพอลิเพปไทด์มากกว่า 1 สาย ด้วยnoncovalent bonds (เช่น salt bridges, H-bond, Van der Waals, hydrophobic) เป็น oligomers หรือ multisubunits ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสถียรขึ้นเป็นโครงสร้างลำดับที่สี่ และทำให้โปรตีนทำงาน (function) ได้ในสิ่งมีชีวิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 กรดอะมิโน (Amino acid)

โปรตีนมีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาวในพอลิเพปไทด์ที่ต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ กรดอะมิโนเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีนหรือโมโนเมอร์ของโปรตีน พบว่าส่วนใหญ่โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด (Klaus, 1994) โดยที่ทุกกรดอะมิโนประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และออกซิเจนเป็นหลัก

นอกจากนี้สามารถจำแนกกรดอะมิโนตามความจำเป็นแก่ร่างกาย คือ กรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย และกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นแก่ร่างกาย

1. กรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย (essential amino acid) หมายถึง กรดอะมิโนที่ร่างกายสังเคราะห์ไม่ได้ หรือสังเคราะห์ได้แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร กรดอะมิโนเหล่านี้ประกอบด้วย 10 ชนิด ได้แก่ ไลซีน (Lysine, Lys) เมทิโอนีน (Methionine, Met) ทริปโทเฟน (Tryptophan, Trp) เทรโอนีน (Threonine, Thr) ไอโซลิวซีน (Isoleucine, Ile) ลิวซีน (Leucine, Leu) เฟนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe) ฮีสทีดีน (Histidine, His) อาร์จีนีน (Arginine, Arg) และวาลีน (Valine, Val)

2. กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นแก่ร่างกาย (nonessential amino acid) หมายถึง กรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย ไม่จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ประกอบด้วย 10 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (Glycine, Ala) กรดกลูตามิค (Glutamic, acid, Gln) กรดแอสปาติก (Aspartic acid, Asp) ซีสเตอีน (Cysteine, Cys) เซอรีน (Serine, Ser) อะลานีน (Alanine, Ala) ไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) โปรลีน (Proline, Pro) กลูตามีน (Glutamine, Gln) และแอสปาราจีน (Asparagine, Asn)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6 แหนที่พบในประเทศไทย

แหน (duckweed) เป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็ก เจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้ดีในน้ำนิ่ง เช่น หนอง บึง หรือแหล่งน้ำทั่วไป ที่มีธาตุอาหารและอินทรียวัตถุที่อุดมสมบูรณ์ ค่าความเป็นกรดและเบส (pH) ของน้ำค่อนข้างเป็นกลาง (เต็ม สมิตินันทน์, 2552) จัดอยู่ใน วงศ์ Lemnaceae มี 3 สกุล ได้แก่

1. สกุล Lemna มี 3 ชนิด คือ *Lemna minor* L. เรียก แหนเป็ดเล็ก, *Lemna perpusilla* Torr., *Lemna trisulca* L.
2. สกุล Spirodela มี 1 ชนิด คือ *Spirodela polyrrhiza* L. Schleid. เรียก แหนเป็ดใหญ่

3. สกุล Wolffia มี 1 ชนิด คือ *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas เรียก ไข่น้ำหรือผำ

วงศ์ Azollaceae มี 1 สกุล ได้แก่

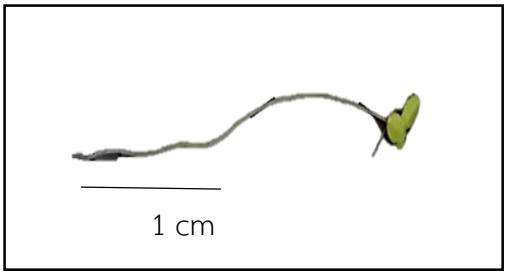
4. Azolla มี 1 ชนิด คือ *Azolla pinnata* R.Br. (แหนแดงเพียงชนิดเดียวที่พบในไทย)

แหนเป็นพืชที่ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง ใบมีรูปรีเป็นเกล็ดประมาณ 0.2 เซนติเมตร สีเขียวเป็นมันวาว อยู่เดี่ยวๆ หรือเชื่อมติดกันเป็นกระจุก 2-4 ใบ ใต้ใบมีรากฝอยเล็กๆ ดอกออกเป็นช่อเกิดอยู่ในช่องตรงขอบใบและมีเยื่อบางล้อมรอบช่อดอกไว้ แหนขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือแตกแผ่นใบใหม่ ทำให้เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor* L.) จัดเป็นพืชน้ำที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีโปรตีนประมาณ 20-40% ไขประมาณ 4-6 % เป็นพืชน้ำที่มีกรดไขมันอิสระอยู่อย่างสมบูรณ์ นิยมนำไปตากแห้งทำเป็นปุ๋ย เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์หรือผสมในอาหารสัตว์ อาหารของปลาเป็ด และสุกร เป็นต้น เนื่องจากแหนเป็ดเล็กเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมนำแหนเป็ดเล็กมาใช้เป็นอาหารโปรตีนราคาถูก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

อนุกรมวิธานของ แหนเป็ดเล็ก



รูปที่ **1 แหนเป็ดเล็ก**

Kingdom Plantae

Phylum Magnoliophyta

Class Liliopsida

Order Alismatales

Family Lemnaceae

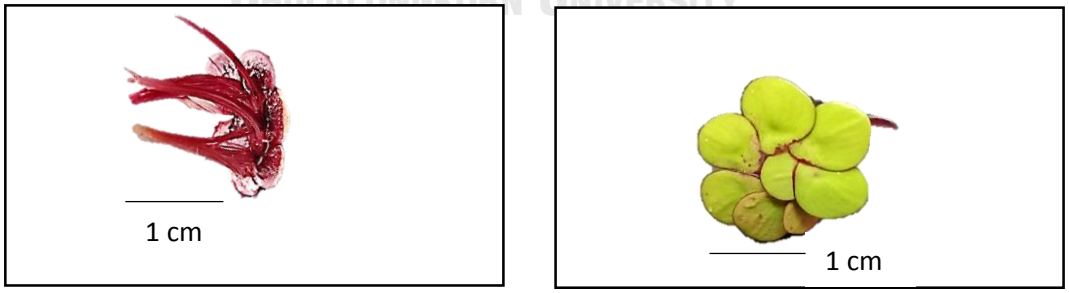
Genus *Lemna*

Species *Lemna minor*

แหนเป็ดใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleid) เป็นพืชลอยน้ำขนาดเล็ก ลักษณะเป็นแผ่นใบลอยตัวเป็นอิสระรวมกลุ่มกันอยู่บนผิวน้ำ รูปร่างลักษณะคล้ายแหนเป็ดเล็กแต่มีขนาดใหญ่กว่า ประกอบด้วยใบรูปร่างค่อนข้างกลม มีรากเป็นเส้นเดียว 7-16 เส้น ใบจะเชื่อมกันเป็นกระจุก 2-5 ใบ สีเขียวเป็นมัน ด้านล่างมักเป็นสีเขียวน้ำตาลแดงหรือสีม่วง กว้าง 2-8 มิลลิเมตร ยาว 3-12 มิลลิเมตร เส้นใบ 7-12 เส้น ดอกออกเป็นช่อเกิดในถุงด้านข้างประกอบด้วยดอกเพศผู้ 2 ดอก ดอกเพศเมีย 1 ดอก มีขนาดเล็กมาก พบในแหล่งน้ำจืดทั่วไป เช่น หนอง บึง เป็นต้น ใช้เป็นอาหารเลี้ยงปลาและเป็ด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>อนุกรมวิธานของ แหนเป็ดใหญ่</u>



รูปที่ **2 แหนเป็ดใหญ่**

Kingdom Plantae

Phylum Magnoliophyta

Class Liliopsida

Order Alismatales

Family Lemnaceae

Genus *Spirodela*

Species *Spirodela polyrrhiza* L. Schleid

ไข่น้ำ หรือผำ หรือไข่แหน (*Wolffia globosa* L.) จัดเป็นพืชมีดอกที่มีขนาดเล็กที่สุด จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae ลอยอยู่บนผิวน้ำเป็นกลุ่มล้วนๆ หรือลอยปะปนอยู่กับพืชอื่น มีรูปร่างรี ค่อนข้างกลม มีขนาดยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่ละต้นมีสีเขียว ไม่มีราก ไม่มีใบ ประกอบด้วยเซลล์ชนิดพาเรงคิมาเป็นส่วนใหญ่ มีช่องอากาศแทรกอยู่ระหว่างเซลล์และช่วยให้ลอยตัวอยู่ในน้ำได้ ไม่มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่นำน้ำและอาหาร มีช่องให้อากาศเข้าออกได้อยู่ทางบนของต้น กระจายอยู่ในประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรป ทวีปแอฟริกากลาง ทวีปเอเชีย

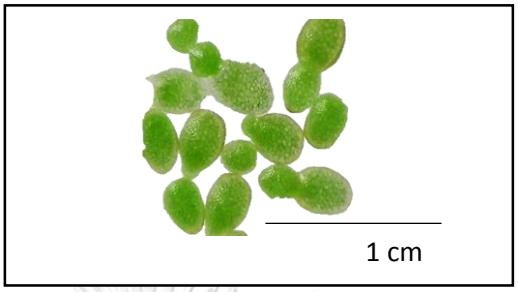
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ไข่น้ำเป็นพืชน้ำขนาดเล็ก มีการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว สามารถนำมาเลี้ยงไว้ในพื้นที่ขนาดเล็กได้ เป็นอาหารของสัตว์น้ำและสัตว์ปีกหลายชนิด นอกจากนี้ประชากรในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นำไข่น้ำมาประกอบอาหาร ไข่น้ำมีสารพิษต้านฤทธิ์สารอาหาร จึงต้องนำไข่น้ำมาทำให้สุกก่อนรับประทาน และมีแคลเซียมและเบต้า-แคโรทีนสูงมากด้วย (เบญจภรณ์ บุณยพุกณะ, 2542)

ไข่น้ำเจริญเติบโตได้เฉพาะแหล่งน้ำนิ่งที่สะอาด ช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำและเป็นอาหารของสัตว์น้ำด้วย ประเทศที่พบไข่น้ำ ไทย อินโดนีเซีย ลาว รวมถึงทวีปยุโรปและทวีปอเมริกาด้วย ถูกนำมาทำเป็นอาหาร ไข่เจียวผำ อ่อม ยำหรือส้มตำ กลิ่นจะมีกลิ่นคาว เคี้ยวกรุบ เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีไม่แพ้ถั่วเหลือง คือมีโปรตีนประมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักแห้ง โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิด ยกเว้นเมทไทโอนีน ซึ่งกรดอะมิโนคือหน่วยย่อยของโปรตีน สามารถช่วยซ่อมแซมส่วนสึกหรอใน

ร่างกาย มีแคลเซียมช่วยให้กระดูกแข็งแรง ธาตุเหล็กช่วยป้องกันภาวะโลหิตจาง เบตาแคโรทีนช่วยต้านอนุมูลอิสระและบำรุงสายตา และมีเส้นใยอาหารที่ดีต่อระบบย่อยอาหาร

<u>อนุกรมวิธานของ ไข่น้ำหรือผำ</u>



*รูปที่ **3 ไข่น้ำ***

Kingdom Plantae

Phylum Magnoliophyta

Class Liliopsida

Order Alismatales

Family Lemnaceae

Genus *Wolffia*

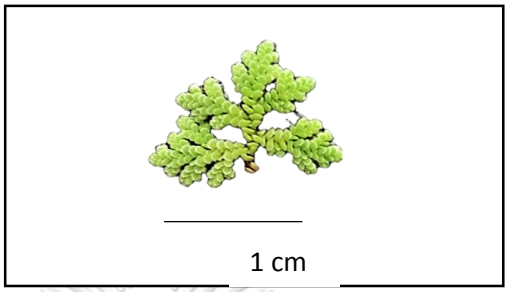
Species *Wolffia globosa*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แหนแดง (*Azolla pinnata* R.Br.) จัดเป็นพืชน้ำพวกเฟิร์น พบว่าเจริญเติบโตอยู่บนผิวน้ำในเขตร้อนทั่วไป มีอยู่ด้วยกัน 7 ชนิด ในประเทศไทยมีอยู่เพียงชนิดเดียว คือ *Azolla pinnata* เป็นแหล่งทรัพยากรที่ใช้ไม่หมดและเป็นแหนที่มีโปรตีนสูง ลักษณะเป็นเฟิร์นน้ำขนาดเล็ก ลอยอยู่บนผิวน้ำ ต้นแก่ที่ได้รับแสงเต็มที่จะเป็นสีแดงคล้ำ ต้นอ่อนหรือต้นได้รับแสงไม่เต็มที่จะเป็นสีเขียว แตกกิ่งแบบขนนก รากเป็นรากพิเศษ ยาวอยู่ทางด้านใต้ของลำต้น ทั้งต้นและกิ่งมีใบขนาดเล็กปกคลุมเรียงสลับซ้อนกัน ใบแต่ละใบแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่ากัน ด้านบนสีเขียวหรือสีแดง ด้านล่างอยู่ใต้น้ำ ไม่ค่อยมีสีในใบของแหนแดง มีโพรงขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นที่อาศัยของ Anabenae ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งได้รับสารอาหารจากแหนแดง ส่วนแหนแดงจะได้ไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนของ Anabenae องค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ โปรตีน ไขมัน และเซลลูโลส แร่ธาตุ แหนแดงสามารถมีชีวิต

อยู่ได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 5-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และพีเอชที่ 4.0-5.5 ความลึกที่ 10 เซนติเมตร (ณัฐสิมา โทขันธ์, 2553)

<u>อนุกรมวิธานของ แหนแดง</u>



รูปที่ 4 แหนแดง

Kingdom Plantae

Phylum Pteridophyta

Class Pteridopsida

Order Salviniales

Family Azollaceae

Genus *Azolla*

Species *Azolla pinnata* R.Br.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แหนเป็ดเล็กเป็นแหล่งอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ สามารถเป็นแหล่งอาหารเสริมที่ดี แหนเป็นพืชน้ำที่ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วง 15-20 ปี พืชน้ำนี้อยู่ในวงศ์ Lemnaceae มีการกระจายทั่วโลก (Culley et al., 1981) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงในระยะเวลาอันสั้นในแหล่งน้ำที่อุดมไปด้วยธาตุอาหารต่างๆ มีแนวโน้มใช้แหนเป็ดที่ผลิตได้นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์โดยการผสมในอาหารของสัตว์เศรษฐกิจได้แก่ ไก่ เป็ด หมู วัว และแกะ แสดงให้เห็นว่าสัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารปกติ (Mbagwu and Adeniji, 1988)

สายพันธุ์ *Wolffia arrhiza* ที่เน้นอัตราการเติบโตสูง สายพันธุ์นี้ค่อนข้างหาได้ยากในประเทศไทย (Landolt, 1986) สนใจ 3 ตัวอย่างของแหนในตลาดสำหรับการบริโภคของมนุษย์จาก

ภาคเหนือในปี 2016 และระบุว่าทั้งหมดนี้เป็น *W. globosa* ซึ่งสอดคล้องกับ (Landolt และ Kandeler, 1987) ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ *W. globosa* (Khai Nam) ใช้เป็นอาหารของคนในไทย ลาว พม่า อินเดีย บังคลาเทศ และปากีสถาน ดังนั้นแหนที่อุดมไปด้วยโปรตีนจะนำมาทำอาหารเสริมที่สมบูรณ์แบบสำหรับอาหารหลักที่เป็นข้าวในประเทศ นอกจากนี้แหนอาจเพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหารมังสวิรัติ เนื่องจากได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นในประเทศที่พัฒนาแล้ว (Bhanthumnavin และ Mcgarry, 1971)

2.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

เป็นวิธีวิเคราะห์คุณภาพอาหาร เป็นวิธีการที่ได้ผลรวดเร็ว และน่าเชื่อถือ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คือ ความชื้น (moisture) โปรตีน (crude protein) ไขมัน (ether extract) เส้นใย (crude fiber) เถ้า (ash) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นต้น (AOAC, 2005)

การวิเคราะห์หาความชื้น โดยวิธีการอบให้แห้ง เป็นการหาน้ำหนักของน้ำที่หายไปโดยใช้ความร้อนในการระเหยน้ำออกไป

การวิเคราะห์หาโปรตีน ปริมาณโปรตีนในอาหารคำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งวิเคราะห์ตามวิธีของ Kjeldahl method

การวิเคราะห์ไขมัน ปริมาณไขมันในอาหารสัตว์สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ ether เป็นตัวสกัดสารที่ได้จากการสกัดนี้ ภายหลังที่ได้ระเหย ether ออกไปแล้ว เรียกว่า ether extract

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การวิเคราะห์หาเส้นใย ทำได้โดยนำอาหารที่สกัดไขมันออกแล้ว มาย่อยด้วยกรดและด่างอย่างเจือจาง เพื่อย่อยเอาพวกสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น แป้ง น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตบางอย่างที่ถูกย่อยออกไป ส่วนของสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่และไม่ถูกย่อย เมื่อนำไปอบให้แห้ง ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปเผาเหมือนกับวิธีหาเถ้า น้ำหนักที่หายไป คือเส้นใย (crude fiber)

การวิเคราะห์หาเถ้า ปริมาณเถ้าทั้งหมดคือส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่เหลือหลังจากสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้สลายตัวไป

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต มักไม่ใช้การวิเคราะห์ แต่สามารถได้โดยเอาเปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบทั้ง 5 อย่างข้างต้น มาลบออกจาก 100 ส่วนที่เหลือ คือ เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต

2.8 โลหะหนัก (Heavy metal)

ทดสอบด้วยเครื่องอะตอมมิกแอปซอบชั่นสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุในสารตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมเป็นสารละลายแล้ว สามารถวิเคราะห์หาธาตุปริมาณน้อยๆได้ในระดับ ส่วนในล้านส่วน (ppm) การวิเคราะห์อาศัยหลักการโดยการให้ความร้อน หรือ ปฏิกิริยาเคมีที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดอะตอมอิสระของธาตุในสภาวะที่เป็นแก๊ส แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะตัวของธาตุ ซึ่งค่าความเข้มของคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนไปจะแปรผันตามปริมาณของธาตุในตัวอย่าง

การวิเคราะห์โลหะหนักของโปรตีนเข้มข้นจากใบผักตบชวาโดยใช้ Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) สมาคมสาธารณสุขอเมริกา (APHA, 1995) ในการวิเคราะห์สำหรับโลหะหนักต่อไปนี้ แคดเมียม (Cd), โครเมียม (Cr), ตะกั่ว (Pb), แพลทินัม (Pt) แพลเลเดียม (Pd), ดีบุก (Sn), เมอร์คิวรี่ (Hg), เหล็ก (Fe), แมงกานิส (Mn), ทองแดง (Cu), สังกะสี (Zn), นิกเกิล (Ni) และ โคบอลต์ (Co) เป็นต้น (Adeyemi และ Osubor, 2016)

2.9 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดเข้มข้นจากแหน

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (functional properties of protein) เป็นสมบัติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำไปใช้งานในอาหาร เช่น การละลาย การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม การเกิดเจล เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.9.1 การละลาย

สมบัติการละลายหรือการจับกับน้ำ (water binding หรือ water holding capacity) โปรตีนเป็นพอลิเพปไทด์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน (amino acid) ในโมเลกุลของกรดอะมิโน มีหมู่ R ที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ หมู่ R แทน โซ่ข้างหรือหมู่ฟังก์ชันที่มีความเฉพาะของกรดอะมิโนแต่ละตัว ดังนั้นการจับกับน้ำของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณ และลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ การแขวนลอยในน้ำ และการตกตะกอนของโปรตีนมีความสำคัญในการแยกโปรตีนออกจากสารละลายเพื่อความหนืด การเกิดเจล ปัจจัยที่มีผลต่อการแขวนลอยและการตกตะกอน ได้แก่ การปรับค่า pH ให้เท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่โปรตีนมีประจุบวกและประจุลบเท่ากัน

2.9.2 การเกิดอิมัลชัน

เป็นการกระจายในลักษณะหยดเล็กของของเหลวชนิดหนึ่งในของเหลวอีกชนิดที่มีปริมาณมากกว่าและทั้ง 2 ชนิดที่ไม่สามารถละลายหรือรวมกันเป็นเนื้อเดียวกันได้ โปรตีนช่วยให้อิมัลชันคงตัวด้วยการลดแรงตึงผิวของของเหลว ช่วยป้องกันไม่ให้แยกตัวเป็นชั้นซึ่งโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ในสายพอลิเพปไทด์ โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมัน

2.9.3 การเกิดโฟม

เป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว หรือของแข็ง เกิดจาการตีหรือปั่นอย่างรุนแรง โฟมเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว หรือของแข็ง โดยมีฟิล์มบางๆ ล้อมรอบอากาศไว้เกิดจากการตีหรือปั่น (beating or whipping) อย่างรุนแรง ทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ (protein denaturation) เกิดการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน เกิดเป็นฟิล์มและจับกับน้ำซึ่งอยู่รอบๆได้ การเกิดโฟมเกิดได้ดีโปรตีนต้องมีความยืดหยุ่นสูง และสามารถเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆและแข็งตัวที่สามารถกักเก็บอากาศได้ โปรตีนที่มีความหยืดหยุ่นที่สามารถเกิดโฟมได้

2.9.4 การเกิดเจล

เป็นโครงสร้างแบบสามมิติ ที่กักเก็บน้ำไว้ภายในโครงสร้าง ทำให้มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง (semi- solid) มีความหนืดสูงหรือมีเนื้อสัมผัสยืดหยุ่น เป็นของผสมที่มีลักษณะกึ่งแข็งคล้ายวุ้น โปรตีนรวมกับน้ำเป็นเจล (gel) ซึ่งเป็นโครงสร้างตาข่ายจับกับน้ำได้ดี มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง ยืดหยุ่น โปรตีนที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ทำให้เกิดเจล ได้แก่ เจลาติน (gelatin)

2.10 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry เป็นการทดลองในภาวะเบส ซึ่งคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) จะเข้าจับกับโปรตีน เมื่อเติมสารละลายสีเหลืองของ Folin – phenol reagent หรือเรียก Folin – Ciocalteu reagent (phosphor-molybdic-phosphotungstic) สารนี้จะเข้าจับกับสารเชิงซ้อนของโปรตีนกับคอปเปอร์ ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า สามารถหาปริมาณโปรตีนที่มีปริมาณน้อยตั้งแต่ 5 ไมโครกรัม และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเพราะอัลบูมินเป็นโปรตีนที่พบมาก (Dawson, 1984)

2.11 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method

เป็นการวิเคราะห์โปรตีนในอาหาร โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง วิธีนี้พัฒนาโดย Dane Johan Kjeldahl เป็นชาวเดนมาร์ก ในช่วงปี ค.ศ. 1800 เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนอย่างแพร่หลายมาก มีความแม่นยำ สามารถใช้ได้กับอาหารหลากหลายชนิดรวมทั้งพวกอาหารสัตว์ด้วย หลักการคือ การย่อยสลายโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบใน amono group การย่อยสลายโปรตีน จะปลดปล่อยไนโตรเจนออกมา และถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การย่อยตัวอย่าง (digestion) ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ไนโตรเจนในตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงโดยมีสารเร่งปฏิกิริยา เช่น $CuSO_4$, Se, $HgSO_4$ เป็นต้น

2. การกลั่นแอมโมเนีย (distillation) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ มาทำปฏิกิริยากับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จากการย่อยตัวอย่างแล้ว จะได้ก๊าซแอมโมเนียซึ่งจับก๊าซนี้ได้ด้วยสารละลายบอริก

3. การไทเทรตเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (titration) เป็นการนำสารละลายกรดบอริก ซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

4. การคำนวณ นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก ที่ใช้ในการไทเทรตไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนแล้วคูณกับ Kjeldahl factor ในอาหารต่างๆ เช่น ค่า factor ของพืชอาหารสัตว์จะเท่ากับ 6.25

การตรวจสอบปริมาณโปรตีน Total Protein Content (TPC) ด้วยวิธี Kjeldahl ถูกใช้เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์สำหรับอาหารคนและอาหารสัตว์ (Marco et al., 2002)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน และ Kjeldahl factor ในอาหารต่างๆดังนี้

อาหาร	% ไนโตรเจน	Kjeldahl factor
พืชอาหารสัตว์ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์	16	6.25
ถั่วเหลือง	17.51	5.71
ถั่วลิสง	18.32	5.46
เมล็ดข้าว	16.81	5.95
น้ำนม และผลิตภัณฑ์นม	15.68	6.38
ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง	17.15	5.83
รำข้าวสาลี	15.85	6.31
เมล็ดพืชน้ำมัน (ทานตะวัน ฝ้าย)	18.87	5.30
จมูกข้าวสาลี, corn gluten	17.24	5.80

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท/ประเทศ
1.เครื่องปั่นน้ำผลไม้ รุ่น MX-900M	พานาโซนิค แมนูแฟคเจอริ่ง/มาเลเซีย
2.อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Nickel electro LTD./England
3.เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Rotofix32	Hettich/Germany
4.ตู้อบความร้อน (hot air oven)	Memmert/Gernany
5.เตาเผาเถ้า (muffle furnace)	Fisher Scientific/UK
6.เครื่อง pH meter รุ่น PP-50	Sartorius/Germany
7.เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/Germany
8.เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/USA
9.เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศแบบหมุน	Tokyo Rikakikai Co.,Ltd/japan
10.เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer)	Unico/USA
11.เครื่องผสมสารละลาย (vortex)	Omni/USA
12.เครื่องวัดสี	Konica Minolta/Japan
13.เครื่องวัดความหนืด	Fungilab/Germany
14.เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (soxhlet extraction) รุ่น s-166	
15.โกร่งบดสาร (mortar and pestle)	
16.ถ้วยสำหรับเผาตัวอย่าง (crucible)	
17.เครื่องการทำแห้งแบบแช่เหยือกแข็ง (freeze dry)	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2. สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

สารเคมี	**บริษัท/ประเทศ**
1.Hydrochoric acid (HCl)	Ajax/Australia
2.Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax/Australia
3.Ethanol 95% (C_2H_5OH)	องค์การสุรากร สรรพสามิต/ประเทศไทย
4.Sulfuric acid (H_2SO_4)	J.T.Baker/USA
5.น้ำมันถั่วเหลือง 100%	บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน)
6.Petroleum ether	
7.monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4)	Sigma aldrich/USA,Germany
8.Sodium phosphate dibasic heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Sigma aldrich/USA,Germany
9.Bovine serum albumin (BSA)	Sigma aldrich/ USA
10.Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent	Loba chemie / India
11.Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$)	Ajax Finechem/Australia
12.Sodium Carbonate (Na_2CO_3)	J.T. Baker chemical co. /Phillipsburg (USA)
13.Copper (II) sulphate ($CuSO_4.5H_2O$)	Ajax Finechem/Australia
14.Sodium dodecyl sulfate ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)	Biochemical

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3.พืชที่ใช้ในงานวิจัย

พืชที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor* L.) แหนเป็ดใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleid) แหนแดง (*Azolla pinnata* R. Br.) และ ไข่น้ำ (*Wolffia globosa* L.) ซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างที่ขึ้นอยู่บริเวณแหล่งน้ำเดียวกัน บริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร ช่วงระยะเวลาที่เก็บเป็นช่วงฤดูร้อนแล้วนำมาเลี้ยง 2 รอบจากนั้นนำมาขยายพันธุ์ต่อเป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.4 สถานที่ทำงานวิจัย

1. หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5. วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาแต่ละขั้นตอน ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง โดยศึกษาดังต่อไปนี้

3.5.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีน

3.5.1.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทย

เพื่อดูความเหมาะสมขั้นต้นว่า ในแหนมีปริมาณโปรตีนที่มากพอจะนำมาสกัดโปรตีนหรือไม่ โดยเปรียบเทียบแหนที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 4 ชนิด ที่อยู่ในบริเวณแหล่งน้ำเดียวกัน และศึกษาตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

เก็บตัวอย่างแหนนำมาเลี้ยงในโรงเรือนโดยใช้น้ำประปาที่ผ่านการเอาคลอรีนออกแล้วโดยการใส่น้ำในกะละมังพลาสติกแล้วทิ้งไว้ 3 วัน สภาพอากาศอยู่ในที่โล่งแจ้งมีแสงผ่านเหมือนกัน และเลี้ยงแหนทั้ง 4 ชนิดเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อควบคุมน้ำ สภาพอากาศ และอายุ ได้แก่ แหนเป็ดเล็ก แหนเป็ดใหญ่ ไข่น้ำ และแหนแดง เป็นต้น จากนั้นชั่งน้ำหนักสดตัวอย่างแหนแล้วอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบ 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม มาบดให้ละเอียด วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทยทั้ง 4 ชนิด เพื่อดูความเหมาะสมแล้วเลือกแหน 1 ชนิด มาสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (LPC) ต่อไป

3.5.2. หาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

3.5.2.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วย pH และความร้อน

พืชแต่ละชนิดมีลักษณะการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนและ pH ต่างกันไปสำหรับไข่น้ำนั้นยังไม่มีรายงานว่ามีการตกตะกอนด้วย pH และความร้อนรูปแบบใด จึงต้องทำการศึกษาเพื่อดูว่าโปรตีนที่สกัดได้จากไข่น้ำสามารถตกตะกอนด้วย pH และความร้อนได้หรือไม่ และตกตะกอนที่ pH และอุณหภูมิใด จึงมีการศึกษาดังต่อไปนี้

เก็บตัวอย่างไข่น้ำ ชั่งน้ำหนักสด 200 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 600 ml (1:3 น้ำหนักต่อปริมาตร) ปั่นในเครื่องปั่นน้ำผลไม้เป็นเวลา 3 นาที กรองและบีบผ่านผ้าขาวบาง ให้ได้ filtered juice แยกเอากากออกไป นำ filtered juice ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอากากที่อาจตกค้างอยู่จากการกรองออกไป จากนั้นนำ green juice ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปรับ pH ที่เป็นกรด ได้แก่ pH 3, pH 4, pH 5 และ pH 6 ด้วย 1.0 N HCl และ 1.0 N NaOH และแปรอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส, 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ออกแบบการทดลองแบบ factorial 4 ปัจจัย x 4 ปัจจัย (ทำการทดลอง pH และอุณหภูมิควบคู่กันไป) จากนั้นนำ green juice มาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำตะกอน LPC ที่ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้และหาภาวะที่เหมาะสมของ pH และ อุณหภูมิความร้อนที่เหมาะสมที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชั่งไข่น้ำสด 200 กรัม เติมน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร

อัตราส่วน 1:3 (w/v)

ปั่นในเครื่องปั่นเป็นเวลา 3 นาที

กรองผ่านผ้าขาวบาง

filtered juice

ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

ของเหลวสีเขียว (green juice)

ปรับ pH 3, 4, 5 และ 6 และ อุณหภูมิ 37, 50, 60 และ 80 องศาเซลเซียส

ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

6,000 rpm, เป็นเวลา 5 นาที

โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (LPC) และเหลือของเหลวสีน้ำตาล (brown juice)

Kjeldahl method

3.5.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC

การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC โดยเลือกจาก LPC ตามภาวะที่เหมาะสม นั่นคือ pH 4 อุณหภูมิ 80 ±2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3.1. วิเคราะห์ค่าความชื้น

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ใน petri dish (ก่อนใช้ petri dish อบให้น้ำหนักคงที่) อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100± 5 ºC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำ petri dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ในโถดูดความชื้น เพื่อทิ้งไว้ให้เย็นลง นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{(น้ำหนักตัวอย่างเปียก – น้ำหนักตัวอย่างแห้ง)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเปียก}} \times 100$$

3.5.3.2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask เติม catalyst 7 กรัม (เตรียมจาก K_2SO_4 95 กรัม: $CuSO_4.5H_2O$) 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมDI water 50 มิลลิลิตรและเติม 32% NaOH ลงใน Kjeldahl flask แล้วนำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 50 มิลลิลิตร 4% boric acid และหยด mixed indicator 2-3 หยด ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ condenser อยู่ใต้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 150 มิลลิลิตร (ดูจาก scale ของ Erlenmeyer flask) นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water จากนั้นไตเตรตสารที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) (AOAC, 2005)

$$\frac{\% \text{ ไนโตรเจน (แห้ง)} = \% \text{ ไนโตรเจน (เปียก)} \times 100}{(100\text{-}\% \text{ ความชื้น})}$$

% โปรตีน = %ไนโตรเจน x factor (factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.5.3.3. วิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใน thimble บรรจุในเครื่อง soxlect system เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลม (ก่อนใช้ขวดก้นกลมอบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่) จากนั้นทำการสกัดไขมันด้วยเครื่อง soxlect system 5 หยด/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิดเครื่อง กลั่นเก็บปิโตรเลียมอีเทอร์ ออกจากส่วนไขมันที่สกัดได้ด้วยเครื่อง evaporator อบขวดก้นกลมที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมจนน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณไขมัน (AOAC, 2005)

$$\%\text{ปริมาณไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.5.3.4. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในถ้วย crucible (ก่อนใช้อบ crucible อบให้น้ำหนักคงที่) นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในเตาเผาความร้อนสูง เมื่อเผาเสร็จปิดเครื่องรอจนกว่าอุณหภูมิลดลงประมาณ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณเถ้า (AOAC, 2005)

$$\%\text{ ปริมาณเถ้า} = \frac{\text{(น้ำหนักถ้วย+ตัวอย่างหลังเผา)-น้ำหนักถ้วย}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.5.3.5. วิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ที่สกัดไขมันออกแล้ว ใส่ในบีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติม 1.25 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้มใช้เวลา 30 นาที กรองส่วนผสมผ่านกระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า เบอร์ 41 ซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอนล้างส่วนที่ติดกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนจนหมดความเป็นกรด แล้วล้างส่วนที่ติดบนกระดาษกรองลงในบีกเกอร์ ด้วย1.25 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นต้มใช้เวลา 30 นาที กรองส่วนผสมด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม แล้วล้างด้วยน้ำร้อน จนหมดความเป็นด่าง จากนั้นล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอร์ 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำตัวอย่างพร้อมกระดาษกรองใส่ใน crucible สำหรับหาเถ้า ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้

เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปเผาตามวิธีหาเถ้า และคำนวณปริมาณเส้นใย (AOAC, 2005)

$$\%\text{ปริมาณเส้นใย} = \frac{(\text{น้ำหนักหลังอบ} - \text{น้ำหนักก่อนอบ})}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

3.5.3.6. วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

คำนวณจากการนำผลรวมองค์ประกอบอื่นคือ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเส้นใย ในรูปของเปอร์เซ็นต์ ไปหักลบจากองค์ประกอบรวมทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ จะได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตตามที่ต้องการ

% คาร์โบไฮเดรต= 100% - (%ความชื้น+% โปรตีน+% ไขมัน+% เถ้า+% เส้นใย)

3.5.4. การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่าง

3.5.4.1. การตรวจสอบโลหะหนักของตะกอนโปรตีน

ตรวจโลหะหนัก ได้แก่ Cd (แคดเมียม), Pb (ตะกั่ว), Zn (สังกะสี), Cr (โครเมียม), Cu (ทองแดง), Mn (แมงกานีส), Ni (นิกเกิล) และ Fe (เหล็ก) เป็นต้น ด้วยวิธีวิเคราะห์ Air-C_2H_2 Flame Atomic Absorption Spectrometry ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer *Varian Model AA280FS* โดยของเหลวถูกดูดเข้าสู่เปลวไฟ ความร้อนทำให้ละอองของแก๊สผสมของเหลว กลายเป็นละอองของแก๊สผสมของแข็งกลายเป็นแก๊ส และเกิดโมเลกุลของสารตัวอย่างตามลำดับ เมื่อโมเลกุลได้รับความร้อนที่เหมาะสมโมเลกุลจะแตกตัวเป็นอะตอมอิสระ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของอะตอมแต่ละธาตุ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5.5. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน

3.5.5.1. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน

การตรวจสอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในตะกอนโปรตีน โดยใช้ Sigma เป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ระบบ waters alliance 2695 กับความร้อน ทดสอบแบบ Total amino acid โดยใช้วิธีทดสอบ In-house method (HPLC-precolumn-AccQ●Tag) โดยใช้เครื่องตรวจจับ Jasco

FP2020 fluorescence detector (EX:250, EM: 395 nm) ด้วยคอลัมน์ Hypersil Gold column C18 (4.6*150mm, 3um) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.5.6. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้

3.5.6.1. สมบัติการละลาย

ละลายโปรตีน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ต่างๆ ที่อยู่ในช่วง pH 2-12 ด้วย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง vortex เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากแล้ววัดปริมาณโปรตีนส่วนที่ละลายด้วยวิธี Lowry method โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร คำนวณ % การละลายเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนสูงสุดที่สามารถละลายได้

3.5.6.2. การเกิดอิมัลชัน

เตรียมตัวอย่างโปรตีน 0.5 กรัมใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 10 มิลลิลิตร ทำการผสมโดยเครื่องปั่นให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายอิมัลชันจากก้นหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ที่เวลา 0 นาทีและ 10 นาที) มาใส่ใน 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตรเพื่อทำลายสภาพโปรตีนให้เกิดเป็นสารแขวนลอย จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.5.6.3. การเกิดโฟม

ตัวอย่าง 0.5 กรัม ละลายใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วัดปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นทำการผสมโดยเครื่องปั่นให้เข้ากัน เทใส่กระบอกตวงเพื่อวัดปริมาตรโฟมในกระบอกตวงหลังจากการผสม โดยจับเวลาที่ 0 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที และ 20 นาที บันทึกผล

3.5.6.4. การเกิดเจล

ตัวอย่าง 0.5 กรัม ละลายใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ที่ความเข้มข้น 2 , 4, 6, 8 และ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำให้เย็นทันทีที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความหนืด (Brookfield viscometer, Model DV-II) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้หัววัดแบบ R2

3.5.7. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.5.5.1. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD

นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละการทดลองโดยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System.

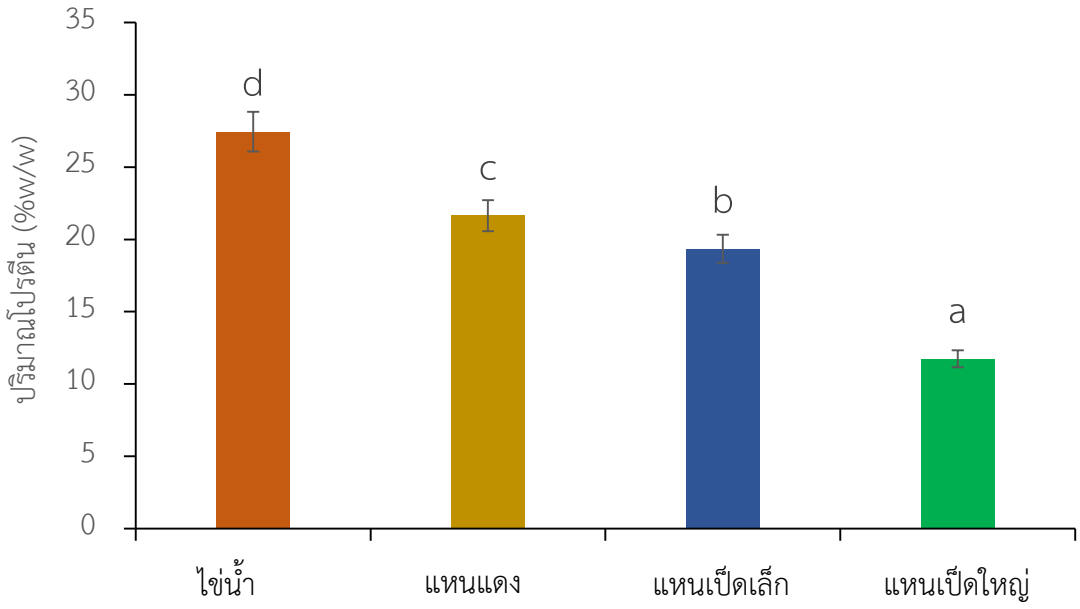
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีน

4.1.1. การเก็บตัวอย่างแหนและศึกษาปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทย

การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในการเก็บตัวอย่างของแหนทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ แหนเป็ดเล็ก แหนเป็ดใหญ่ แหนแดง และไข่น้ำ จากบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร และนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl พบว่าแหนแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน รูปที่ 5 แหนที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 27.45±0.02 (โดยน้ำหนัก) แหนแดง (*Azolla pinnaata*) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21.64±0.03 (โดยน้ำหนัก) แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor)* มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 19.35±0.47 (โดยน้ำหนัก) และแหนเป็ดใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza*) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 11.75±0.07 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ



รูปที่ 5 ข้อมูลแสดงปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทยทั้งหมด 4 ชนิด วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl

4.2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

4.2.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วย pH และความร้อน

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วย pH และความร้อน การแยกโปรตีนที่สกัดได้โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย pH ที่เป็นกรด ได้แก่ pH 3, pH 4, pH 5 และ pH 6 โดยการปรับ pH ของ green juice ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (NaOH) 1 นอร์มอล และความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37 องศาเซลเซียส 50 องศาเซลเซียส 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าการตกตะกอนโปรตีนที่ pH และความร้อนที่ต่างกัน จะให้ผลที่ได้ของโปรตีนแตกต่างกันด้วย จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธี Kjeldahl โดยทดสอบจากโปรตีนสกัดเข้มข้นของไข่น้ำ อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัดโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำที่เลือกมา 1 ชนิด โดยผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส และ pH ที่ 4 ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือร้อยละ 69.96±0.10 (โดยน้ำหนัก) ตารางที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ LPC ที่ภาวะต่าง ๆ ทดสอบด้วยวิธี Kjeldahl

ปัจจัย		ปริมาณโปรตีนทั้งหมดร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าที่แสดงเป็นกรด-เบส (pH)	
37	3	66.27 ± 0.18^{fg}
	4	67.99 ± 0.52^{h}
	5	65.64 ± 0.61^{f}
	6	54.63 ± 0.28^{a}
50	3	69.85 ± 0.47^{j}
	4	66.49 ± 0.57^{g}
	5	67.83 ± 0.59^{h}
	6	59.07 ± 0.55^{c}
60	3	69.56 ± 0.27^{ij}
	4	68.82 ± 0.26^{i}
	5	64.17 ± 0.31^{e}
	6	58.22 ± 0.19^{b}
80	3	62.01 ± 0.53^{d}
	4	69.96 ± 0.10^{j}
	5	61.98 ± 0.84^{d}
	6	61.92 ± 0.11^{d}

จากตาราง แต่ละค่าหมายถึงค่าเฉลี่ย ± SD ของ LPC ที่ภาวะต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนของ LPC ที่สกัดได้

นำ LPC ที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสม (pH 4 และอุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส) มาวิเคราะห์องค์ประกอบ ได้แก่ ความชื้น (moisture) ปริมาณโปรตีน (crude protein) ปริมาณไขมัน (crude fat) ปริมาณเถ้า (ash) ปริมาณเส้นใย (crude fiber) และปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โดยใช้ตัวอย่าง LPC ปริมาณ 2 กรัมของน้ำหนักแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตลอดการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนในไข่น้ำสูงถึงร้อยละ 69.96 (โดยน้ำหนัก), ไขมันร้อยละ 8.96 (โดยน้ำหนัก), คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.84 (โดยน้ำหนัก), ความชื้นร้อยละ 5.66 (โดยน้ำหนัก), เส้นใยร้อยละ 4.06 (โดยน้ำหนัก) และ เถ้าร้อยละ 2.49 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำ

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
ความชื้น	5.66±0.11
ปริมาณโปรตีน	69.96±0.10
เถ้า	2.49±0.14
ไขมัน	8.96±0.47
เส้นใย	4.06±0.25
คาร์โบไฮเดรต	8.87

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสกัดเข้มข้นจากไข่น้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ pH 4 ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4. การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่าง

การตรวจสอบโลหะหนักในตัวอย่างโดยตรวจสอบโลหะหนักทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม (Cd), ตะกั่ว (Pb), สังกะสี (Zn), โครเมียม (Cr), ทองแดง (Cu), แมงกานีส (Mn), นิกเกิล (Ni) และเหล็ก (Fe) เป็นต้น โดยวิธีวิเคราะห์ Air-C_2H_2 Flame Atomic Absorption Spectrometry ด้วยเครื่องมือ Atomic Absorption Spectrophotometer *Varian Model AA280FS*

ตารางที่ 4 ปริมาณโลหะหนักในตัวอย่าง LPC

ธาตุ	**ปริมาณธาตุ (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
แคดเมียม (Cd)	0.012
ตะกั่ว (Pb)	<0.05
สังกะสี (Zn)	2.16
โครเมียม (Cr)	<0.05
ทองแดง (Cu)	0.365
แมงกานีส (Mn)	2.37
นิกเกิล (Ni)	<0.05
เหล็ก (Fe)	2.29

4.5. การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน

การตรวจสอบกรดอะมิโนของตะกอนโปรตีน LPC ของไข่น้ำตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 4 จากนั้นนำตะกอนโปรตีนจากไข่น้ำที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบแบบ Total Amino acid โดยใช้วิธี In house method วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้คือ กรดกลูตามิคมีปริมาณสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.07 (โดยน้ำหนัก), กรดแอสปาติกร้อยละ 6.53 (โดยน้ำหนัก) และ ลิวซีนร้อยละ 5.87 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ดังตารางที่ 5 และกรดอะมิโนบางตัวจะเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม 80 องศาเซลเซียส จึงเพียงพอสำหรับการตกตะกอนของ LPC

ตารางที่ 5 ตรวจสอบกรดอะมิโนของตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น LPC

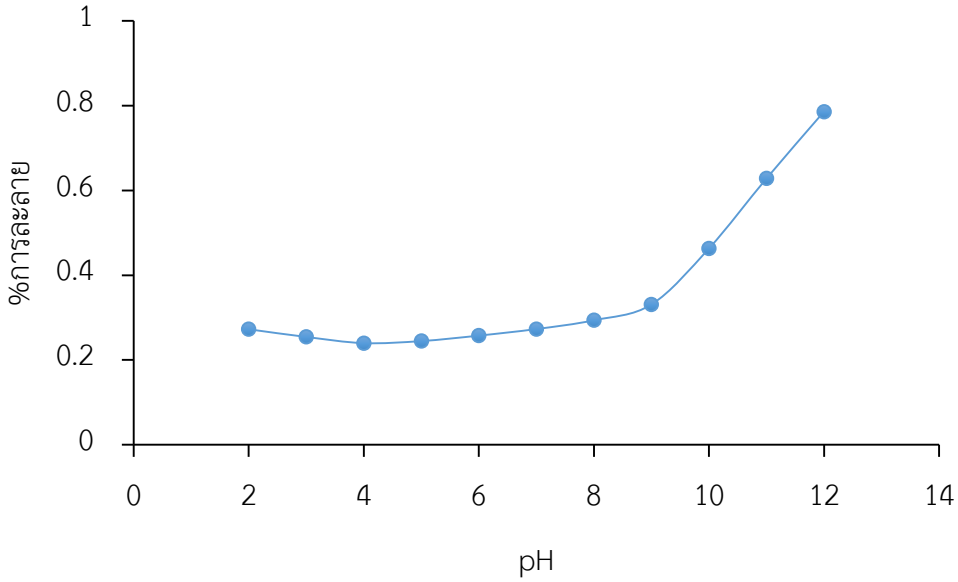
กรดอะมิโน	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
กรดแอสปาติก (Aspartic acid, Asp)	6.53
เซอรีน (Serine, Ser)	2.77
กรดกลูตามิค (Glutamic acid, Gln)	8.07
ไกลซีน (Glycine, Ala)	3.51
ฮีสทีดีน (Histidine, His)	1.48
อาร์จีนีน (Arginine, Arg)	4.51
เทรโอนีน (Threonine, Thr)	3.06
อะลานีน (Alanine, Ala)	4.32
โปรลีน (Proline, Pro)	3.10
ไทโรซีน (Tyrosine, Tyr)	2.43
วาลีน (Valine, Val)	3.74
ไลซีน (Lysine, Lys)	4.69
ไอโซลิวซีน (Isoleucine, Ile)	2.84
ลิวซีน (Leucine, Leu)	5.87
เฟนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe)	3.40

4.6. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6.1. สมบัติการละลาย

ละลายโปรตีนด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ต่างๆ ที่อยู่ในช่วง pH 2-12 แล้ววัดปริมาณโปรตีนส่วนที่ละลายด้วยวิธี Lowry โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การละลายเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนสูงสุดที่สามารถละลายได้ และส่วนที่เป็นตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ นำมากรองใส่กระดาษกรอง อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ของ LPC ที่ผลิตได้ พบว่าโปรตีน สามารถละลายน้ำที่ pH 4 ถึง pH 6 ได้ร้อยละ 30.49±1.39 ถึง 32.75±2.97 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และการละลายเพิ่มขึ้นที่ pH ตั้งแต่ 7 (ร้อยละ 34.72±0.97 น้ำหนักต่อปริมาตร) และสูงสุดที่ pH 12 ในสภาวะด่างแก่ ดังตารางที่ 6 ดังนั้นตะกอนโปรตีนเข้มข้นที่สกัดจากไข่น้ำจะละลายได้ดีในช่วงที่เป็นภาวะด่างแก่ แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่จะนำมาทำการทดลองด้วยเพราะพืชแต่ละชนิดมีการละลายที่แตกต่างกัน



รูปที่ 6 เปอร์เซ็นต์การละลายของโปรตีนสกัดเข้มข้นในไข่น้ำที่ pH 2-12

ตารางที่ 6 ข้อมูลแสดงการละลายของตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้นจากไข่น้ำ ที่ pH 2-12

ค่าที่แสดงเป็นกรด-เบส (pH)	เปอร์เซ็นต์การละลายของโปรตีน (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2	34.66±1.10
3	32.35±0.89
4	30.49±1.39
5	31.11±1.24
6	32.75±2.97
7	34.72±0.97
8	37.36±3.96
9	42.10±4.58
10	58.92±5.43
11	79.92±1.23
12	100±3.92

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 7 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้นจากไข่น้ำที่ไม่ละลายน้ำที่ pH 2-12

ค่าที่แสดงเป็นกรด-เบส (pH)	เปอร์เซ็นต์ตะกอนโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2	73.26±1.10
3	76.32±0.89
4	74.86±1.39
5	74.62±1.24
6	74.18±2.97
7	75.86±0.97
8	66.03±3.96
9	61.00±4.58
10	51.80±5.43
11	37.13±1.23
12	38.00±3.92

ข้อมูลแสดงตะกอนโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้ตะกอนโปรตีนที่อบแห้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6.2. การเกิดอิมัลชัน

เตรียมตัวอย่างโปรตีน (freeze dry) 0.5 กรัมใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 10 มิลลิลิตร ทำการผสม จากนั้นดูดสารละลายอิมัลชันปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ที่เวลา 0 นาทีและ 10 นาที) มาใส่ใน 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตรเพื่อทำลายสภาพโปรตีนให้เกิดเป็นสารแขวนลอย จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร สำหรับสมบัติการเกิดอิมัลชันระหว่างโปรตีนกับน้ำมันเมื่อใส่ SDS พบว่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง 3 เท่าภายในเวลา 10 นาทีหลังจากการผสมแล้ว และมีการแยกชั้นระหว่างโปรตีนและน้ำมัน ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตารางแสดงการเกิดอิมัลชัน

เวลา	ดัชนีการออกฤทธิ์ของอิมัลชัน	ดัชนีความเสถียรของอิมัลชัน
หลัง homogenized ทันที	0.1712±0.01	-
ใส่ SDS (0 min)	0.1045±0.00	16.35±0.85
ใส่ SDS (10 min)	0.0309±0.00	55.25±2.96

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเกิดอิมัลชันของ LPC ไข่น้ำที่ผ่านการ freeze dry

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6.3. การเกิดโฟม

ตัวอย่างที่ผ่านการทำ freeze dry แล้วมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วัดปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นทำการผสมโดยเครื่องปั่น แล้ววัดปริมาณโฟมหลังจากการผสม โดยจับเวลาที่ 0 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที และ 20 นาที พบว่าความเสถียรของการเกิดโฟมลดลงภายใน 10 นาทีแรกหลังจากตีโฟม และคงที่หลังจากนั้น (ร้อยละ 96.14±0.61) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโฟมที่เวลาต่าง ๆ

เวลา	เปอร์เซ็นต์ความเสถียรของโฟม
0 นาที	100 ± 0.01^{c}
5 นาที	97.43 ± 0.62^{b}
10 นาที	96.14 ± 0.61^{a}
15 นาที	96.14 ± 0.61^{a}
20 นาที	96.14 ± 0.61^{a}

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเกิดโฟมของ LPC ไข่น้ำที่ผ่านการ freeze dry

4.6.4. การเกิดเจล

ตัวอย่าง (freeze dry) ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7 ที่ความเข้มข้น 2 , 4, 6, 8 และ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นทันทีที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าความหนืด (Brookfield viscometer, Model DV-II) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้หัววัดแบบ R2 และทำการวัดสีของตัวอย่าง พบว่าการทดสอบค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้น 10 น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าค่าความหนืดที่ 22.3±3.86 cP ถ้าความเข้มข้นยิ่งมากค่าความหนืดจะสูงขึ้นตามไปด้วย ตารางที่ 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 10 แสดงค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร)	ค่าความหนืด (cP)
2	11.73±0.51
4	14.40±3.10
6	16.1±3.00
8	18.96±2.61
10	22.3±3.86

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความหนืดของ LPC ไข่น้ำที่ผ่านการ freeze dry

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแหนที่พบในประเทศไทย 4 ชนิด

การเลือกพืชที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนควรคำนึงถึงว่าเป็นพืชที่พบง่าย โตเร็ว และไม่ค่อยมีคนนิยมนำมารับประทานโดยตรง รวมทั้งพืชชนิดนี้ต้องมีปริมาณโปรตีนสูง ช่วยลดต้นทุนการผลิตคือแหนสามารถเก็บได้เองในแหล่งน้ำธรรมชาติและพบในจำนวนที่มาก สำหรับงานวิจัยนี้ใช้แหนที่พบในประเทศไทย 4 ชนิดที่ขึ้นอยู่บริเวณเดียวกัน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในแหน เพื่อเปรียบเทียบดูว่าแหนที่ใช้เหมาะที่จะนำมาสกัดโปรตีนเพื่อผลิตเป็น LPC โดยใช้แหนที่เก็บและนำมาเลี้ยงเพื่อควบคุมการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆในน้ำ

จากผลการทดลองการศึกษาปริมาณโปรตีนของแหนทั้ง 4 ชนิดนี้ พบว่าแหนแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยพืชที่นำมาสกัดโปรตีนควรมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง (Nagy และคณะ 1978) และไม่ใช่พืชเศรษฐกิจ แหนที่ถูกเลือกใช้สกัดโปรตีนคือ ไข่น้ำ เพราะไข่น้ำเป็นพืชน้ำที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ซึ่งพบถึง 27.45 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของแหน ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหนอีก 3 ชนิด เจริญเติบโตเร็ว พบง่าย อยู่ตามแหล่งน้ำสะอาด มีปริมาณโปรตีนสูง และคุ้มค่ากับการลงทุนและเพิ่มผลผลิตให้กับพืชน้ำได้

พืชน้ำนอกจากแหนที่พบในประเทศไทย ทั้ง 4 ชนิดที่นำมาศึกษาแล้ว ยังมีพืชน้ำอีกหลายชนิดที่มีปริมาณโปรตีนสูง ได้แก่ ผักบุ้ง บัวหลวง โสน ผักตบชวา เป็นต้น (Virabalin และคณะ, 1993) แต่พืชน้ำเหล่านี้เป็นพืชทางเศรษฐกิจจึงไม่คุ้มค่าต่อการนำมาผลิต LPC ในขณะที่แหนพบได้ตามแหล่งน้ำขัง หนอง บึง หรือแหล่งน้ำโดยทั่วไป จะเห็นได้ว่าแหนมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการเตรียมเป็น LPC ต่อไป แต่ที่เลือกไข่น้ำ เพราะเลือกจากปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุดในขั้นต้น ในอนาคตแหนอีก 3 ชนิด ก็น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ได้เช่นกันเพราะมีประมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง

5.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนและเตรียมโปรตีนจากไข่น้ำ

ในการสกัดโปรตีนเข้มข้น LPC ในขณะที่สกัดโปรตีนโดยปั่นใบพืชให้เซลล์แตก ต้องปรับน้ำกลั่นที่ pH 8.5 เพื่อให้เซลล์พืชแตกดีขึ้น จากรายงาน pH มีผลต่อการสกัดโปรตีนเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากจึงเลือกใช้ที่ pH นี้ (Virabalin และคณะ, 1993)

การใช้กรดช่วยในการตกตะกอนโปรตีนก่อนใช้ความร้อน ไม่เพียงแต่ช่วยให้โปรตีนตกตะกอนเท่านั้น แต่ช่วยให้ได้ตะกอนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และตกตะกอนโปรตีนเร็วยิ่งขึ้น (Datta, 1966)

นอกจากนี้กรดยังช่วยกำจัดเอาสารพวกอัลคาลอยด์หรือสารอื่นๆที่ปนเปื้อนออกไปจาก LPC ด้วย (Pirie, 1971) งานวิจัยนี้ใช้ pH ที่เป็นภาวะกรด โดยใช้ pH 3, pH 4, pH5 และ pH 6 จากการศึกษา pH 6 โปรตีนจะตกตะกอนน้อยสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ pH 3, pH 4, pH5 และพบว่าที่ pH 4 โปรตีนตกตะกอนมากที่สุด เนื่องจากที่ pH 4 ใกล้เคียงกับค่า isoelectric point (pI) ที่จุด pI โมเลกุลของโปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของโปรตีน เป็นผลให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีมากกว่า โปรตีนจึงจับตัวกันและตกตะกอนออกมา ในการศึกษานี้จึงเลือกการตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4

ไข่น้ำยังไม่มีรายงานว่า มีการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนรูปแบบใด จึงได้ศึกษาและพบว่าโปรตีนที่สกัดจากไข่น้ำจะตกตะกอนเมื่อให้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส การตกตะกอนของโปรตีนด้วยความร้อนมีผลทำให้แรงยึดเหนี่ยวของโมเลกุลต่อโมเลกุลน้ำลดน้อยลง โปรตีนจะละลายน้ำได้น้อยลง จนกระทั่งถึงจุดที่ไม่ละลายน้ำอย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการตกตะกอนของโปรตีน การตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณ protein yield ที่สูงกว่าอุณหภูมิอื่นๆ แต่มีรายงานการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่า protein yield ที่ได้ไม่แตกต่างกัน และอาจทำให้กรดอะมิโนบางตัวถูกทำลายไปหรือประโยชน์ที่ได้รับลดน้อยลง การใช้ความร้อนในการตกตะกอนโปรตีนนี้ทำให้ได้ตะกอนโปรตีนขนาดใหญ่ และแยกออกมาง่าย (Pirie, 1971) และความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส ยังช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายโปรตีน ในการศึกษานี้จึงเลือกการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่ดีที่สุด แหนจากแหล่งหลาย ๆ แหล่งจะมีโปรตีนเข้มข้นที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารอาหารของแหล่งน้ำจะต่างกันจึงทำให้ค่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากแหนแตกต่างกันไปด้วย

การศึกษาในงานวิจัยฉบับนี้ ได้สกัดโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำจนได้ green juice ที่ได้จากการทดลองซึ่งแยกเอากากออกแล้ว มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเขียว จากการศึกษานี้เราได้ทำการทดลองโดยให้ pH ควบคู่ไปกับอุณหภูมิความร้อนต่างๆ เพื่อเราจะได้ทราบว่า ที่ pH และความร้อนที่อุณหภูมิใดเหมาะสมที่สุดโดยเลือกจากปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุด และได้ตะกอนโปรตีนมาก เพื่อเพียงพอสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ เมื่อปรับ pH ในภาวะกรดที่ pH 4 ตั้งทิ้งไว้สักพักตะกอนโปรตีนบางส่วนเริ่มจับตัวกันเหมือนวุ้น และตกตะกอนลงมามากกว่า pH 3, pH 5 และ pH 6 ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น และเมื่อนำน้ำเขียวที่ปรับ pH ที่ภาวะกรดแล้วมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37 องศาเซลเซียส, 50 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge จะพบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นที่ก้นหลอด พบว่าที่ pH 4 และอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส ตะกอนโปรตีนตกตะกอนดีกว่าภาวะอื่นๆ จะเห็นน้ำสีน้ำตาล มีสีใสขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และนำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปอบแห้งและนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl พบว่าจากการทดลอง pH 4 และอุณหภูมิความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณโปรตีนมากสุด พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงถึง 69.96 เปอร์เซ็นต์ของตะกอนโปรตีนแห้ง และการตกตะกอนโปรตีนมากสุด จึงเป็นภาวะที่เหมาะสำหรับการสกัดโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำ และเพียงพอสำหรับนำไปเป็นประโยชน์สำหรับประชากรที่ขาดแคลนหรือแพ้โปรตีนจากเนื้อสัตว์ ปลา นม ถั่วได้ นอกจากจะเป็นส่วนผสมในอาหารคน ยังสามารถใช้ในเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ได้ ลดต้นทุนการผลิตและยังเพิ่มมูลค่าของพืชน้ำเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเหมาะกับการนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารที่เน้นคุณภาพโภชนาการทางด้านโปรตีนสูง และไข่น้ำเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก หาง่าย สามารถเพิ่มมูลค่าของพืชน้ำได้เป็นอย่างดี

5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC

การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC ที่ได้จากภาวะที่เหมาะสม คือ pH 4 และอุณหภูมิความร้อนที่ 80±2 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่เหมาะสม เพราะมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 69.96 เปอร์เซ็นต์ของตะกอนโปรตีนแห้ง เพื่อนำมาตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร สำหรับเป็นแหล่งข้อมูลที่จะนำไปใช้ในการเป็นส่วนผสมของอาหารในอนาคต โดยคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสกัดเข้มข้นของไข่น้ำมีการศึกษาดังนี้ คือ ศึกษาความชื้น ปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต พบว่า ความชื้นเท่ากับ 5.66 % น้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีนสูงถึง 69.96% ของน้ำหนักแห้ง เถ้า 2.49% ของน้ำหนักแห้ง ไขมัน 8.96% ของน้ำหนักแห้ง เส้นใย 4.06 % ของน้ำหนักแห้ง และ คาร์โบไฮเดรต 8.84% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าตะกอนโปรตีนที่สกัดได้จากไข่น้ำมีคุณค่าทางอาหารสูงคือมีปริมาณโปรตีนสูงเหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ ถั่ว ธัญพืช หรือประชากรที่ขาดแคลนสารอาหารพวกโปรตีน และประชากรที่มีการเพิ่มขึ้นจำนวนมาก และยังพบว่าไขมันมีปริมาณค่อนข้างน้อยเหมาะสำหรับคนที่มีน้ำหนักมาก เส้นใยที่ค่อนข้างต่ำเพื่อที่ระบบย่อยภายในร่างกายจะได้ทำงานไม่หนักจนเกินไป โดยการสกัดโปรตีนเข้มข้นนอกจากจะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ เพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ข้อมูลที่ได้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับอาหารคนและสัตว์ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4 การตรวจสอบความเป็นพิษของตะกอนโปรตีน

การตรวจสอบความเป็นพิษในไข่น้ำที่ใช้สกัด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับกำจัดออกในอนาคต เพราะไข่น้ำที่ใช้มาจากแหล่งน้ำ จึงมีการตรวจสอบว่าแหล่งน้ำที่เป็นที่อาศัยของไข่น้ำที่นำมาใช้สกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชมีการปนเปื้อนของโลหะหนักใดบ้าง และจากการตรวจสอบพบว่า มีโลหะหนักประเภท แคดเมียม (Cd), ตะกั่ว (Pb), สังกะสี (Zn), โครเมียม (Cr), ทองแดง (Cu), แมงกานีส (Mn), นิกเกิล (Ni) และ เหล็ก (Fe) เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแหล่งน้ำที่พบไข่น้ำตามธรรมชาติในธรรมชาติเป็นแหล่งน้ำที่สะอาด

5.5 การตรวจสอบกรดอะมิโนของโปรตีน

Leaf protein concentrate (LPC) ของไข่น้ำที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นและไม่จำเป็นหลายชนิด โดยเฉพาะ glutamic acid มีปริมาณ 8.07 มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม, Aspartic มีปริมาณ 6.53 มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม และ Leucine มีปริมาณ 5.87 มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ตะกอนโปรตีนเข้มข้นที่สกัดจากไข่น้ำมีปริมาณกรดอะมิโนที่ดี ซึ่ง glutamic acid เป็นกรดอะมิโนที่ช่วยเพิ่มไอคิว ช่วยควบคุมโรคติดสุราเรื้อรัง ช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น บรรเทาอาการอ่อนเพลีย ซึมเศร้า จะพบมากในถั่วชนิดต่างๆ บล็อกโคลี่ และเมล็ดธัญพืชต่างๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าคุณค่าของโปรตีนสกัดเข้มข้นมีประโยชน์มาก เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกมากเมื่อเทียบกับผักสีเขียวชนิดอื่น และมีกรดอะมิโนอีกหลายตัวที่มีประโยชน์มากในร่างกายของมนุษย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.6 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้

LPC ที่ได้จำเป็นต้องทำให้แห้งสนิท และไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของรา (Pirie, 1971) จากการศึกษาทำให้ LPC แห้งโดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และโดยการทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying พบว่า ปริมาณโปรตีนใน LPC ที่ได้จากการทำให้แห้งทั้ง 2 วิธีนี้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไม่ได้มีผลทำให้คุณค่าทางโภชนาลดลง และพบว่า การทำให้แห้งแบบ freeze drying มีลักษณะเป็นผง อ่อนนุ่มกว่า สีน้ำตาลอ่อนกว่า น่ารับประทาน และสามารถนำไปละลายน้ำได้ แต่วิธีนี้ทำให้เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง LPC ที่ผ่านการอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะแข็งกระด้าง สีดำคล้ำ ละลายน้ำได้ไม่ค่อยดี ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้ในการนำไปประกอบอาหาร ถ้าต้องการให้ LPC ที่ผ่านการอบในตู้อบ มีสีน้ำตาลให้นำไปบดให้ละเอียด ลักษณะคล้ายกับ LPC ที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying และวิธีที่เหมาะสมคือ นำ LPC ทำให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

และบดให้เป็นผงละเอียด แต่จะไม่ค่อยละลายน้ำที่ภาวะที่เป็นกรด แต่จะละลายได้ในภาวะที่เป็นด่าง แก่ (Lu and Kinsella, 1972) แต่จะเป็นที่ pH ใดขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย

จากการทดลองการละลายโดยใช้ตัวอย่าง LPC ที่อบ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณมากแล้วสามารถทดสอบแบบโปรตีนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ จึงเลือกใช้ตัวอย่างที่ผ่านการอบด้วยตู้อบ โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่ 2-12 พบว่า การละลายจะละลายไม่ค่อยดีในช่วงที่ในภาวะกรด ที่ค่าความเป็นกรด-เบสที่ (pH) 4-6 และจะเริ่มมีการละลายดีขึ้นที่ค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในภาวะด่าง ที่ 7 ขึ้นไป ละลายดีมากในภาวะด่างสูงๆ สามารถเป็นข้อมูลในการนำตะกอนโปรตีนไปใช้ในอาหารที่เหมาะสม

การทำเป็นอิมัลชัน ใช้ตัวอย่าง LPC ที่ freeze dry เพราะต้องใช้ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ จะพบว่าโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำ ช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้แยกเป็นชั้น ช่วยลดแรงตึงผิวของของเหลว ซึ่งโปรตีนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ซึ่งสายพอลิเพปไทด์จะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำและหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมัน จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร พบว่าการเกิดอิมัลชัน พบว่าดัชนีการออกฤทธิ์ของอิมัลชันเมื่อทิ้งไว้ค่าจะลดลงแต่ค่าความเสถียรจะเพิ่มขึ้น

การเกิดโฟมเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว หรือของแข็ง โดยมีฟิมล์บางๆ ล้อมรอบอากาศไว้ เกิดจากการตี หรือการปั่นอย่างรุนแรง อาหารที่พบว่ามีโฟมมากได้แก่ วิปครีม ส่วนอาหารที่ไม่เกิดโฟมได้แก่ น้ำผลไม้ สามารถที่จะเลือกวัตถุดิบให้เหมาะกับอาหาร จากการทดลองนี้ใช้ตัวอย่าง LPC ที่ freeze dry เพราะต้องใช้ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ จะจับเวลาที่ 0 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที และ 20 นาที พบว่าโฟมเปอร์เซ็นต์ความเสถียรจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ ในการผสมอย่างรุนแรงในช่วงแรกของโปรตีนในแหนจะเห็นโฟมชัดเจนแต่ทิ้งไว้ โฟมจะเริ่มหายไป แต่สำหรับโปรตีนในไข่น้ำนี้จะไม่ค่อยมีโฟมอยู่แล้วน่าจะเหมาะกับอาหารประเภทน้ำผลไม้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเกิดเจลมีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง ยืดหยุ่น เช่น เยลลี่ โดยใช้ตัวอย่าง LPC ที่ freeze dry เพราะต้องใช้ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ พบว่าการทดสอบค่าความหนืดพบว่ายิ่งความเข้มข้นมากๆค่าความหนืดจะสูงขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้น 10 น้ำหนักต่อปริมาตร พบค่าความหนืดถึง 22 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ทราบค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนเข้มข้นจากไข่น้ำที่สกัดได้ การทดลองทั้งหมดนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดอาหารในอนาคต แต่ถ้าเทียบความหนืดกับอาหารพวกเยลลี่จะมีน้อยมาก เวลานำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารอาจจะต้องเพิ่มพวกเจลาตินเพื่อให้เกิดความยืดหยุ่นที่ดีขึ้น

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

แหนที่พบในประเทศไทยพบด้วยกันทั้งหมด 6 ชนิด 4 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ แหนเป็ดเล็ก พบด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor*) (*Lemna perpusilla*) และ (*Lemna trisulca*) ไข่น้ำ ได้แก่ (*Wolffia globosa*) แหนเป็ดใหญ่ ได้แก่ (*Spirodela polyrrhiza*) แหนแดง (*Azolla pinnata*) เป็นต้น เลือกแหนมาทำการทดลอง 4 ชนิด คือ แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor*) ไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) แหนเป็ดใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza*) และแหนแดง (*Azolla pinnata*) แหนอีก 2 ชนิดในสายพันธุ์แหนเป็ดเล็กเป็นแหนที่พบค่อนข้างยากในบริเวณแหล่งน้ำเดียวกัน

การสกัดโปรตีนและเตรียมโปรตีนจากใบพืช (Leaf protein concentrate หรือ LPC) ของไข่น้ำ โดยศึกษาไข่น้ำเทียบกับแหนอีก 3 ชนิดในประเทศไทย ที่เก็บแหล่งน้ำบริเวณเดียวกัน พบว่าแหนมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมี 2 ชนิด ได้แก่ ไข่น้ำ และ แหนแดง ส่วนแหนที่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ได้แก่แหนเป็ดเล็กและแหนเป็ดใหญ่ สามารถเลือกชนิดพืชน้ำในขั้นต้นได้ว่าพืชน้ำชนิดใดเหมาะสม

เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากไข่น้ำพร้อมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC ที่เตรียมจากภาวะที่เหมาะสม พบว่า ไข่น้ำมีความเหมาะสมที่จะมาเตรียม LPC ไข่น้ำเป็นพืชน้ำที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีปริมาณโปรตีนมากพอสมควร และพบง่ายตามแหล่งน้ำนิ่งทั่วไป ไข่น้ำที่สกัดโปรตีนสามารถตกตะกอนได้ โดยให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิน้อยกว่านี้ตะกอนที่ได้อาจไม่เพียงพอต่อการผลิตและนำไปใช้เป็นโปรตีนทางเลือกในอนาคตได้

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียม LPC ในไข่น้ำ นำมาสกัดเพื่อทำให้เซลล์พืชแตกออกมาโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัด ในอัตราส่วน 1:3 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อให้โปรตีนถูกปล่อยออกมานอกเซลล์และละลายอยู่ในสารสกัด จากนั้นกรองกากออก จะได้ green juice นำสารละลายโปรตีนมาปรับ pH ที่ 4 และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะทำให้ตกตะกอนโปรตีนมากขึ้น และความร้อนยังช่วยกำจัดพวกจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ จากนั้นแยกโปรตีนออกจะได้ตะกอนโปรตีน LPC นำมาทำให้แห้งเพื่อเก็บรักษาได้นานๆ โดยอบที่ตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบดเป็นผงละเอียด

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ LPC จากไข่น้ำที่เตรียมภาวะที่เหมาะสม พบว่า LPC ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 69.96 (โดยน้ำหนัก) ไขมันร้อยละ 8.96 (โดยน้ำหนัก) เส้นใยร้อยละ

4.06 (โดยน้ำหนัก) เถ้าร้อยละ 2.49 (โดยน้ำหนัก) ความชื้นร้อยละ 5.66 (โดยน้ำหนัก) และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.84 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่อยู่ในตะกอนโปรตีน ทำการตรวจสอบแบบ Total Amino acid โดยใช้วิธี In house method พบว่ามีกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด เช่น ปริมาณกรดกลูตามิคสูงที่สุดคือร้อยละ 8.07 (โดยน้ำหนัก) กรดแอสปาติกร้อยละ 6.53 (โดยน้ำหนัก) และลิวซีนร้อยละ 5.87 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ซึ่งกรดกลูตามิคส่งผลให้อาหารอร่อย

เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ของ LPC ที่ผลิตได้ โดยจะศึกษาการละลาย สมบัติการเกิดอิมัลชัน การเกิดโฟม และการเกิดเจล (ค่าความหนืด) พบว่าโปรตีนสามรถละลายน้ำที่ pH 4 ถึง 6 ได้ร้อยละ 30.49±1.39 ถึง 32.75±2.97 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และการละลายเพิ่มขึ้นที่ pH ตั้งแต่ 7ที่ร้อยละ (34.72±0.97 น้ำหนักต่อปริมาตร) และสูงสุดที่ pH 12 สำหรับสมบัติการเกิดอิมัลชันระหว่างโปรตีนกับน้ำมันเมื่อใส่ SDS พบว่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง 3 เท่าภายใน 10 นาที หลังจากการผสมแล้วความเสถียรของการเกิดโฟมลดลงภายใน 10 นาทีแรกหลังจากตีโฟม และคงที่หลังจากนั้น (ร้อยละ 96.14±0.61) ส่วนค่าความหนืดของตะกอนโปรตีนพบว่าความหนืดที่ (22.3±3.86 cP) จากคุณสมบัติทั้งหมดของโปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้ทำให้ได้ข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดอาหารในอนาคต เช่น เวย์ โปรตีน

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้แหนทั้ง 4 ชนิดที่พบในประเทศไทยแล้วเลือกมา 1 ชนิดเพื่อทำการสกัด LPC ควรจะเพิ่มพืชน้ำชนิดอื่นที่หลากหลายด้วย เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตในแง่ของวัตถุดิบลง

2. ข้อมูลที่ศึกษาเป็นส่วนหนึ่งของการวิจัย ควรจะทำการศึกษาข้อมูลอื่นอีก เพื่อให้ชัดเจนและเหมาะสมที่ไม่เป็นอันตรายกับผู้บริโภค

3. อนาคตถ้ามีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนในพืชในการนำไปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร หรือเป็นส่วนผสมในอาหารควรจะเลือกในอาหารที่เหมาะสมกับตัววัตถุดิบของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Adeyemi, O. and Osubor, C. C. 2016. Assessment of nutritional quality of water hyacinth leaf protein concentrate. *The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42*(3), 269-272. doi:10.1016/j.ejar.2016.08.002

Ajibola, C. F., Malomo, S. A., Fagbemi, T. N. and Aluko, R. E. 2016. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (Sphenostylis stenocarpa) albumin, globulin and protein concentrate. *Food Hydrocolloids, 56*, 189-200. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.013

Akin, Z. and Ozcan, T. 2017. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. *Food Science and Technology, 86*, 25-30. doi:10.1016/j.lwt.2017.07.025

Aletor, O., Oshodi, A. A. and Ipinmoroti, K. 2002. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chemistry, 78*, 63-68.

Allam, A., Tawfik, A., Negm, A., Yoshimura, C. and Fleifle, A. 2015. Treatment of Drainage Water Containing Pharmaceuticals Using Duckweed (Lemna gibba). *Energy Procedia, 74*, 973-980. doi:10.1016/j.egypro.2015.07.734

Appenroth, K. J., Sree, K. S., Bohm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M. and Jahreis, G. 2017. Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry, 217*, 266-273. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.116

Baciak, M., Sikorski, L., Piotrowicz-Cieslak, A. I. and Adomas, B. 2016. Content of biogenic amines in Lemna minor (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline. *Aquatic Toxicology, 180*, 95-102. doi:10.1016/j.aquatox.2016.09.007

Banerjee, S. 2014. Dewatering fibrous sludge with soy protein. *Process Biochemistry, 49*(1), 120-123. doi:10.1016/j.procbio.2013.09.002

Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H. and Ghorbel, D. 2016. Effect of pH on the functional properties of Arthrospira (Spirulina) platensis protein isolate. *Food Chemistry, 194*, 1056-1063. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.133

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Bullerwell, C. N., Collins, S. A., Lall, S. P. and Anderson, D. M. 2016. Growth performance, proximate and histological analysis of rainbow trout fed diets containing Camelina sativa seeds, meal (high-oil and solvent-extracted) and oil. *Aquaculture, 452*, 342-350. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.008

Ceschin, S., Leacche, I., Pascucci, S. and Abati, S. 2016. Morphological study of Lemna minuta Kunth, an alien species often mistaken for the native L. minor L. (Araceae). *Aquatic Botany, 131*, 51-56. doi:10.1016/j.aquabot.2016.01.005

Cheng, J. J. and Stomp, A.-M. 2009. Growing Duckweed to Recover Nutrients from Wastewaters and for Production of Fuel Ethanol and Animal Feed. *CLEAN - Soil, Air, Water, 37*(1), 17-26. doi:10.1002/clen.200800210

Chivandi, E., Mukonowenzou, N. and Berliner, D. 2016. The coastal red-milkwood (Mimusops caffra) seed: Proximate, mineral, amino acid and fatty acid composition. *South African Journal of Botany, 102*, 137-141. doi:10.1016/j.sajb.2015.06.016

Coda, R., Varis, J., Verni, M., Rizzello, C. G. and Katina, K. 2017. Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition. *LWT - Food Science and Technology, 82*, 296-302. doi:10.1016/j.lwt.2017.04.062

Dawson, J. M. and Heatlie, P. L. 1984. Lowry Method of Protein Quantification: Evidence for Photosensitivity. *Analytical Biochemistry, 140*, 391-393.

Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Xie, M. 2018. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids, 76*, 131-140. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.01.003

Duan, P., Chang, Z., Xu, Y., Bai, X., Wang, F. and Zhang, L. 2013. Hydrothermal processing of duckweed: effect of reaction conditions on product distribution and composition. *Bioresour Technol, 135*, 710-719. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.106

El-Adawy, T. A. 1997. Effect of sesame seed protein supplementation on the nutritional, physical, chemical and sensory properties of wheat flour bread. *Food Chemistry, 59*, 7-14.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Föste, M., Elgeti, D., Brunner, A.-K., Jekle, M. and Becker, T. 2015. Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing, 96*, 20-26. doi:10.1016/j.fbp.2015.06.003

Gaur, R. Z. and Suthar, S. 2017. Nutrient scaling of duckweed (Spirodela polyrhiza) biomass in urban wastewater and its utility in anaerobic co-digestion. *Process Safety and Environmental Protection, 107*, 138-146. doi:10.1016/j.psep.2017.02.005

Ge, X., Zhang, N., Phillips, G. C. and Xu, J. 2012. Growing Lemna minor in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresourse Technology, 124*, 485-488. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.050

Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H. and Besbes, S. 2015. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. *Journal of Food Engineering, 165*, 179-188. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021

Huang, M., Fang, Y., Xiao, Y., Sun, J., Jin, Y., Tao, X., Zhao, H. 2014. Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (Landoltia punctata) under nutrient starvation. *Industrial Crops and Products, 59*, 299-308. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.029

Jia, Z., Zheng, M., Tao, F., Chen, W., Huang, G. and Jiang, J. 2016. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT - Food Science and Technology, 66*, 305-310. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.054

Kalita, P., Mukhopadhyay, P. K. and Mukherjee, A. K. 2007. Evaluation of the nutritional quality of four unexplored aquatic weeds from northeast India for the formulation of cost-effective fish feeds. *Food Chemistry, 103*(1), 204-209. doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.007

Kamizake, N. K. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. V. and Zaia, D. A. M. 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis, 16*(4), 507-516. doi:10.1016/s0889-1575(03)00004-8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Kariyawasam, T. I., Godakumbura, P. I., Prashantha, M. A. B. and Premakumara, G. A. S. 2016. Proximate Composition, Calorie Content and Heavy Metals (As, Cd, Pb) of Selected Sri Lankan Traditional Rice (Oryza Sativa L.) Varieties. *Procedia Food Science, 6*, 253-256. doi:10.1016/j.profoo.2016.02.036

Kunarayakul, S., Thaiphanit, S., Anprung, P. and Suppavorasatit, I. 2018. Optimization of coconut protein deamidation using protein-glutaminase and its effect on solubility, emulsification, and foaming properties of the proteins. *Food Hydrocolloids, 79*, 197-207. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.12.031

Lawal, O. S. 2005. Functionality of native and succinylated Lablab bean (Lablab purpureus) protein concentrate. *Food Hydrocolloids, 19*(1), 63-72. doi:10.1016/j.foodhyd.2004.04.015

Lindeboom, N. and Wanasundara, P. K. J. P. D. 2007. Interference of phenolic compounds in Brassica napus, Brassica rapa and Sinapis alba seed extracts with the Lowry protein assay. *Food Chemistry, 104*(1), 30-38. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.067

Liu, C., Dai, Z. and Sun, H. 2017. Potential of duckweed (Lemna minor) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. *Journal of Environmental Management, 187*, 497-503. doi:10.1016/j.jenvman.2016.11.006

Liu, G., Wright, M. M., Zhao, Q. and Brown, R. C. 2015. Catalytic fast pyrolysis of duckweed: Effects of pyrolysis parameters and optimization of aromatic production. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 112*, 29-36. doi:10.1016/j.jaap.2015.02.026

Ma, M. M. and Mu, T. H. (2016). Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. *Food Chemistry, 194*, 237-246. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.095

Manitchotpisit, P., Leathers, T. D., Peterson, S. W., Kurtzman, C. P., Li, X. L., Eveleigh, D. E., Punnapayak, H. 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of Aureobasidium pullulans. *Mycological Research, 113*(Pt 10), 1107-1120. doi:10.1016/j.mycres.2009.07.008

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Mbagwu, I. G. and Adeniji, H. A. 1988. The nutritional content of duckweed (Lemna paucicostata hegelm.) in the kainji lake area, nigeria. *Aquatic Botany, 29*, 357-366.

Nam, K. H., Kim, D. Y., Pack, I. S., Park, J. H., Seo, J. S., Choi, Y. D., Kim, C. G. (2016). Comparative analysis of chemical compositions between non-transgenic soybean seeds and those from plants over-expressing AtJMT, the gene for jasmonic acid carboxyl methyltransferase. *Food Chemistry, 196*, 236-241. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.046

Ngugi, C. C., Oyoo-Okoth, E., Manyala, J. O., Fitzsimmons, K. and Kimotho, A. 2017. Characterization of the nutritional quality of amaranth leaf protein concentrates and suitability of fish meal replacement in Nile tilapia feeds. *Aquaculture Reports, 5*, 62-69. doi:10.1016/j.aqrep.2017.01.003

Olvera-Novoa, M. A., Campos, G. S., Sabido, G. M. and Martinez Palacios, C. A. 1990. The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (Oreochromis mossambicus). *Aquaculture, 90*, 291-302.

Pandey, V. N. and Srivastava, A. K. 1991. Yield and nutritional quality of leaf protein concentrate from Eleocharis dulcis (Burm. f.) Hensch. *Aquatic Botany, 41*, 369-374.

Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Marijanovic Rajcic, M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B. and Pavlica, M. 2011. Duckweed Lemna minor as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 74*(2), 182-187. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.06.011

Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. 2003. Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chemistry, 83*(2), 219-225. doi:10.1016/s0308-8146(03)00068-2

Rippner, D. A., Green, P. G., Young, T. M. and Parikh, S. J. 2018. Dissolved organic matter reduces CuO nanoparticle toxicity to duckweed in simulated natural systems. *Environmental Pollution, 234*, 692-698. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.014

Shammout, M. a. W. and Zakaria, H. 2015. Water lentils (duckweed) in Jordan irrigation ponds as a natural water bioremediation agent and protein source for broilers. *Ecological Engineering, 83*, 71-77. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.05.041

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Sharma, D. N. and Singh, A. K. 1980. The evaluation of leaf-protein quality in three aquatic plants. *Aquatic Botany, 8*, 279-284.

Shen, N., Wang, Q., Zhu, J., Qin, Y., Liao, S., Li, Y., Huang, R. 2016. Succinic acid production from duckweed (Landoltia punctata) hydrolysate by batch fermentation of Actinobacillus succinogenes GXAS137. *Bioresourse Technology, 211*, 307-312. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.036

Shilpashree, B. G., Arora, S., Chawla, P. and Tomar, S. K. 2015. Effect of succinylation on physicochemical and functional properties of milk protein concentrate. *Food Research International, 72*, 223-230. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.008

Souza, D., Sbardelotto, A. F., Ziegler, D. R., Marczak, L. D. and Tessaro, I. C. 2016. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chemistry, 191*, 36-44. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.032

Tamayo Tenorio, A., Boom, R. M. and van der Goot, A. J. 2017. Understanding leaf membrane protein extraction to develop a food-grade process. *Food Chemistry, 217*, 234-243. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.093

Tangka, J. K. 2003. Analysis of the Thermal Energy Requirements for the Extraction of Leaf Protein Concentrate from some Green Plants. *Biosystems Engineering, 86*(4), 473-479. doi:10.1016/j.biosystemseng.2003.08.014

Upadhyay, R. and Panda, S. K. 2010. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed Spirodela polyrhiza L. *J Hazardous Mater, 175*(1-3), 1081-1084. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.016

Virabalin, R., Kositsup, B. and Punnapayak, H. 1993. Leaf protein concentrate from water hyacinth. *Aquatic Plant Management, 31*, 207-209.

Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S. and Gill, B. S. 2015. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolates. *Food Research International, 76*, 11-18. doi:10.1016/j.foodres.2014.08.027

Xiao, Y., Fang, Y., Jin, Y., Zhang, G. and Zhao, H. 2013. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Industrial Crops and Products, 48*, 183-190. doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.017

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Yadav, D., Barbora, L., Bora, D., Mitra, S., Rangan, L. and Mahanta, P. 2017. An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation, 119*, 253-259. doi:10.1016/j.ibiod.2016.09.007

Yao, Y., Zhang, M., Tian, Y., Zhao, M., Zhang, B., Zhao, M., Yin, B. 2017. Duckweed (Spirodela polyrhiza) as green manure for increasing yield and reducing nitrogen loss in rice production. *Field Crops Research, 214*, 273-282. doi:10.1016/j.fcr.2017.09.021

Yu, L., Yu, C., Zhu, M., Cao, Y., Yang, H., Zhang, X., Zhou, G. 2015. Structural analysis of galactoarabinan from duckweed. *Carbohydrate Polymers, 117*, 807-812. doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.044

Zhang, S., Chen, T., Li, W., Dong, Q. and Xiong, Y. 2016. Physicochemical properties and combustion behavior of duckweed during wet torrefaction. *Bioresourse Technology, 218*, 1157-1162. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.086

Zhang, W., Ding, L., Grimi, N., Jaffrin, M. Y. and Tang, B. 2017. Application of UF-RDM (Ultafiltration Rotating Disk Membrane) module for separation and concentration of leaf protein from alfalfa juice: Optimization of operation conditions. *Separation and Purification Technology, 175*, 365-375. doi:10.1016/j.seppur.2016.11.059

Zhang, W., Grimi, N., Jaffrin, M. Y. and Ding, L. 2015. Leaf protein concentration of alfalfa juice by membrane technology. *Journal of Membrane Science, 489*, 183-193. doi:10.1016/j.memsci.2015.03.092

Zhao, Z., Shi, H., Kang, X., Liu, C., Chen, L., Liang, X. and Jin, L. 2017. Inter- and intra-specific competition of duckweed under multiple heavy metal contaminated water. *Aquatic Toxicology, 192*, 216-223. doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.023

Zhao, Z., Shi, H., Liu, Y., Zhao, H., Su, H., Wang, M. and Zhao, Y. 2014. The influence of duckweed species diversity on biomass productivity and nutrient removal efficiency in swine wastewater. *Bioresourse Technology, 167*, 383-389. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.031

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติม Catalyst 7 กรัม (เตรียมจาก 95 กรัม K_2SO_4 : 5 กรัม $CuSO_45H_2O$)
3. เติม 15 มิลลิลิตร กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติม 50 มิลลิลิตร DI water
6. เติม 32% NaOH ลงใน Kjeldahl flask
7. นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 50 มิลลิลิตร 4 % Boric acid และหยด 2-3 หยด Mixed indicator ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ Condenser อยู่ใต้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask
8. กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 150 มิลลิลิตร (ดูจาก scale ของ Erlenmeyer flask) นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water
9. นำมาทำการ titrate สารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เปอร์เซ็นต์ โปรตีน = %ไนโตรเจน x factor

หมายเหตุ factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

สารเคมี

1. สาร A คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSo_4$ $5H_2O$) ปริมาณ 0.01 กรัม
2. สาร B โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) ปริมาณ0.02 กรัม
3. สาร C โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาณ 1 กรัม
4. สาร D โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณ 0.2 กรัม
5. นำสาร A+B ละลายน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และ นำสาร C+D ละลายน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร ก่อนทำการทดลองทำสารละลายทั้งหมดมาผสมกันจนได้สารละลาย 100 มิลลิลิตร (สารละลาย E)
6. เตรียม Folin ciocalteu reagent มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:1) ก่อนใช้

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสาร A สาร B สาร C และสาร D ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้
2. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลอง
3. ดูดสารละลาย E จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. ดูดสารละลาย Folin ciocalteu reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสม แล้วผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมสารก่อนทำการวัด
5. นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA)

1. ละลายสาร BSA 2 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2. เจือจางสารละลาย BSA ให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลาย BSA ที่เตรียมไว้มาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร (100 ไมโครลิตร)
4. ดูดสารละลาย E จำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. ดูดสารละลาย Folin ciocalteu reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมแล้วผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมสารก่อนทำการวัด
6. นำสารละลาย BSA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับเป็นโปรตีนมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M phosphate buffer)

1. สารละลาย A : สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (monobasic sodium phosphate) ละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ($Na_2HPO_4,7H_2O$) 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
3. ผสมสารละลาย A (39 มิลลิลิตร) และ B (61 มิลลิลิตร) จะได้ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่ 7 ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เตรียมสารละลาย 1 นอร์มอล

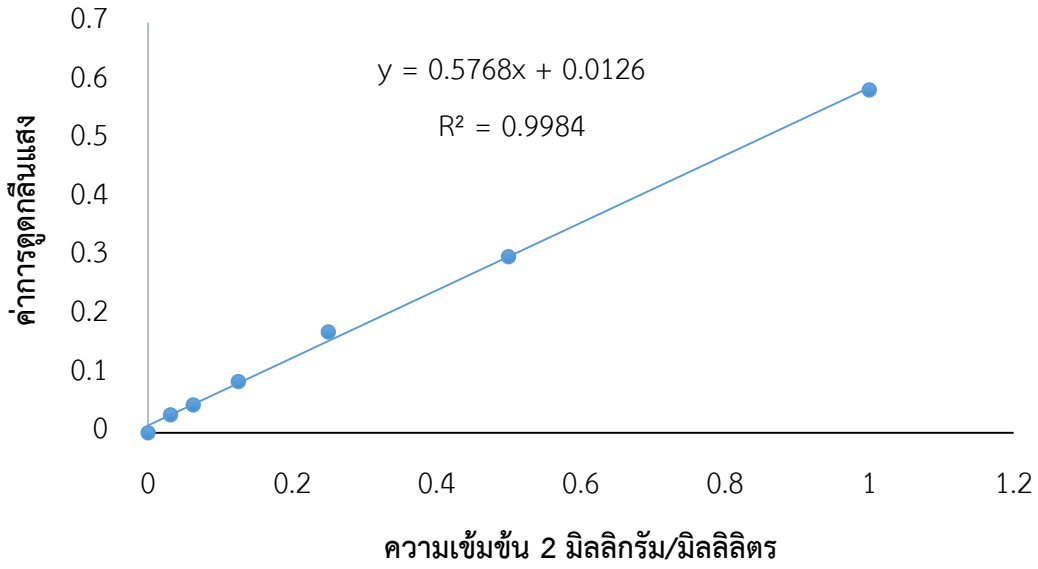
เตรียมสารกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปริมาณ 8.5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เตรียมสารละลาย 1 นอร์มอล

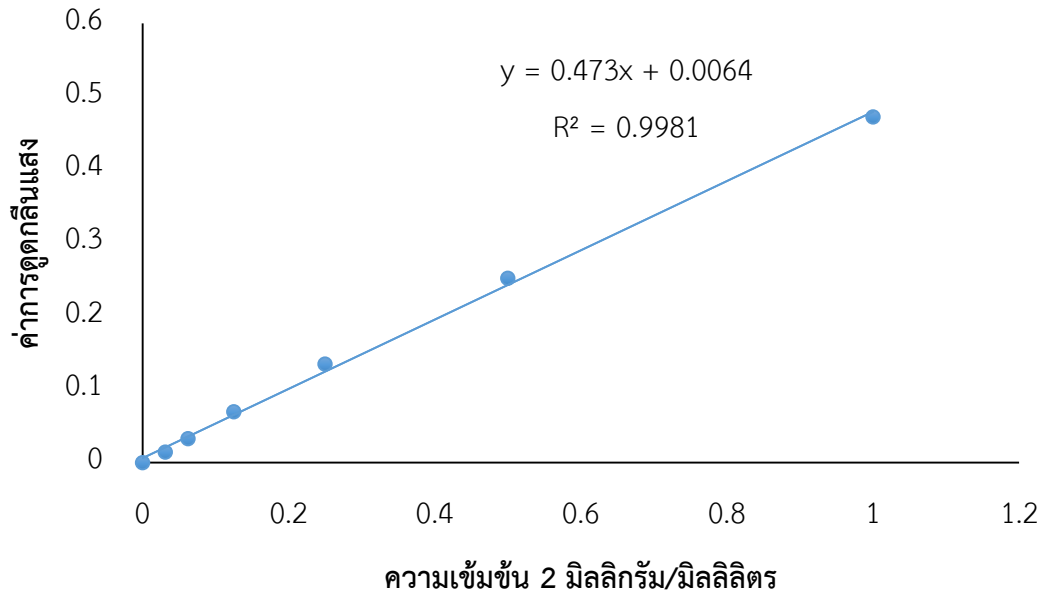
ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข



รูปที่ 7 โปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 650 นาโนเมตร

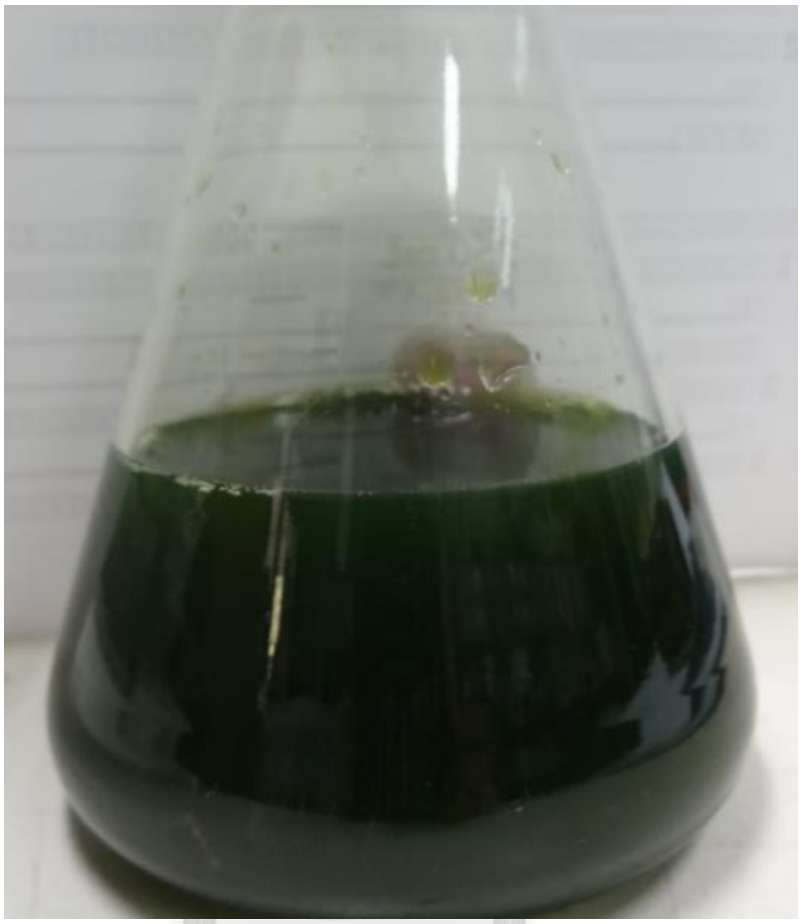


รูปที่ 8 โปรตีนมาตรฐานที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค.

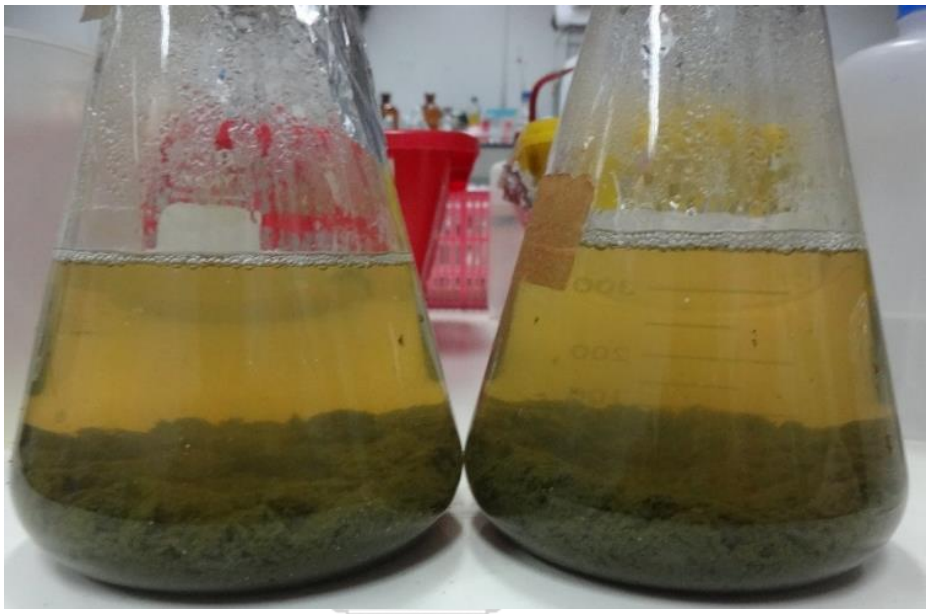
รูปที่ 9 LPC อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปที่ 10 LPC ทำการ freeze dry



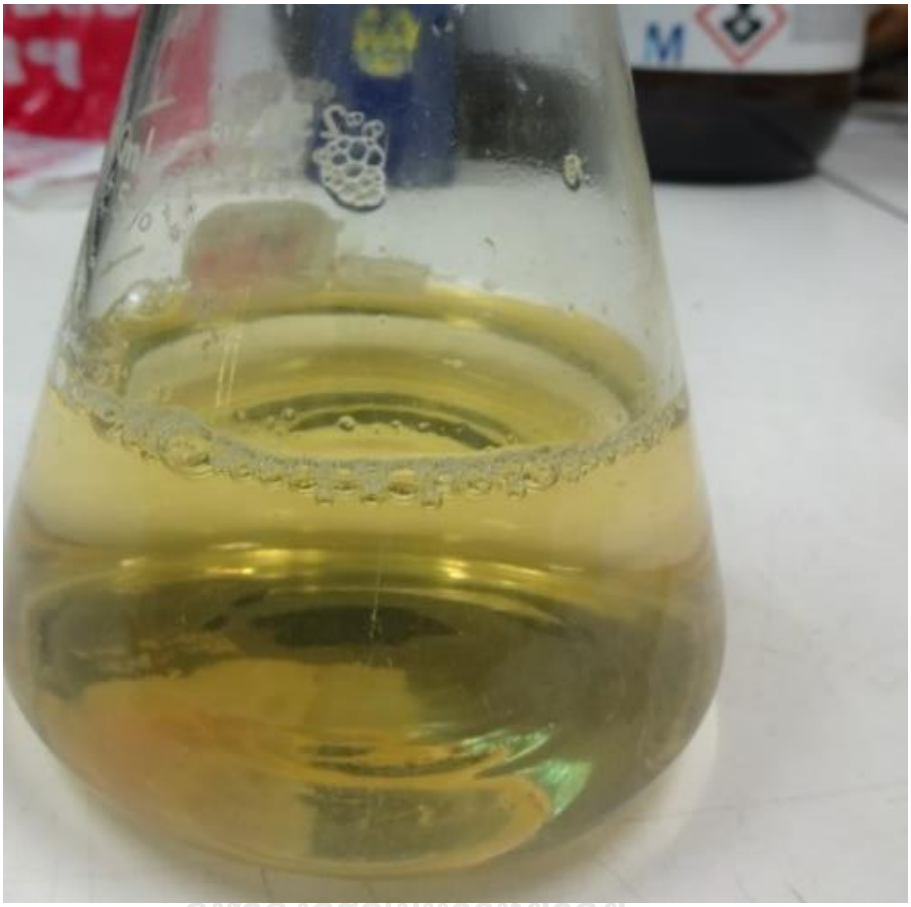
รูปที่ 11 น้ำเขียว (green juice)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



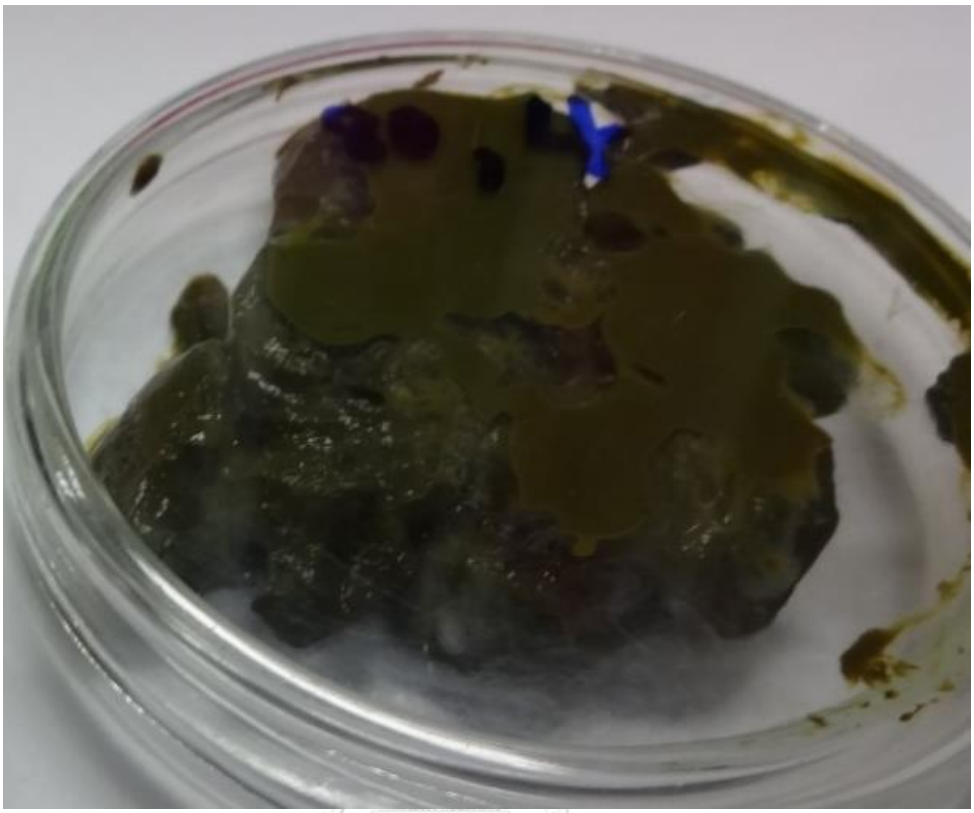
รูปที่ 12 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น (ที่ปรับ pH 4 ความร้อน 80 องศาเซลเซียส)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



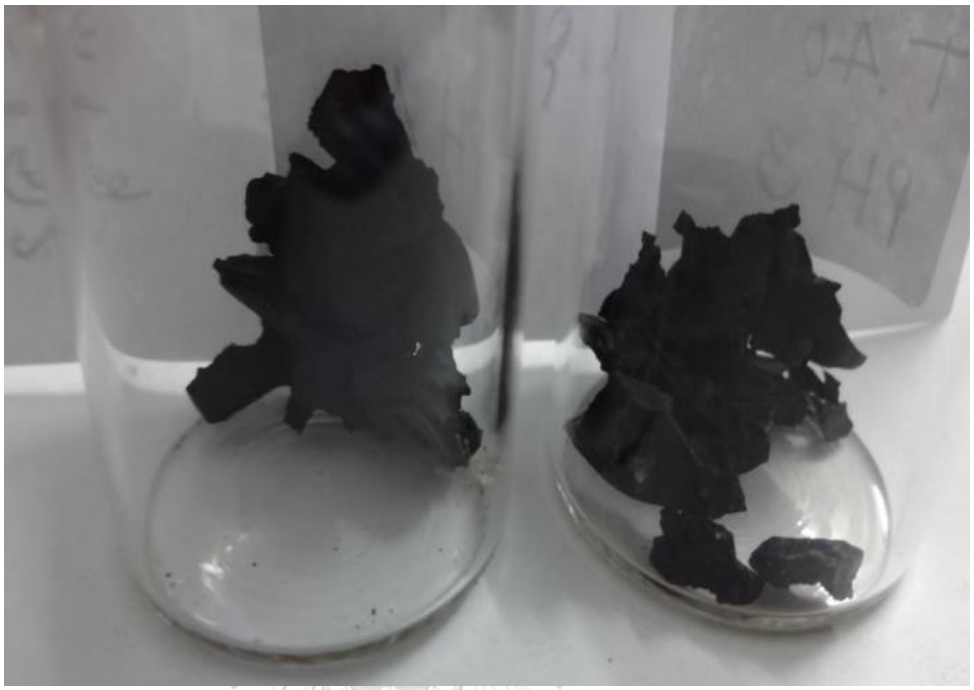
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 13 น้ำสีน้ำตาล (brown juice)



รูปที่ 14 ตะกอนโปรตีนสกัดเข้มข้น (LPC)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 15 ตะกอน LPC อบแห้ง 60 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูป 16 เครื่องระเหยสารแบบหมุน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูป 17 การสกัดไขมัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อนางสาวสุภาภรณ์ กรณีย์ เลขประจำตัว 5772254023 นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร ระดับปริญญาตรี ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม จบปีการศึกษา 2556 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาปี พ.ศ. 2560

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University