โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชผักบุ้งไทย *Ipomoea aquatic*a Forssk. และกระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Protein Extraction from *Ipomoea aquatica* Forssk. and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

ชื่อนิสิต นางสาว พิมพ์ปวีณ์ พิศาลปีติ **เลขประจำตัว** 5932133323

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชผักบุ้งไทย *Ipomoea aquatica* Forssk. และกระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

นางสาว พิมพ์ปวีณ์ พิศาลปีติ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Protein Extraction from *Ipomoea aquatica* Forssk. and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Miss Pimpawee Pisanpeeti

A Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Bachelor of Science Program in Botany Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2019

ชื่อโครงงาน	การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชผักบุ้งไทย *Ipomoea aquatic*a Forssk. และกระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit
ชื่อนิสิต	พิมพ์ปวีณ์ พิศาลปีติ
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. วิชาณี แบนคีรี
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. วิชาณี แบนคีรี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ คิดอยู่)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงาน การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบพืชผักบุ้งไทย *Ipomoea aquatic*a Forssk. และกระถิน *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

ชื่อนิสิต พิมพ์ปวีณ์ พิศาลปีติ

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. วิชาณี แบนคีรี

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการสกัดโปรตีนเข้มข้น (Leaf protein concentrate) จากใบผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatic*a Forssk.) และกระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้มากในประเทศไทย สำหรับเป็นแนวทางในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนเสริมในอาหารคนหรืออาหารสัตว์โดยได้ทำการสกัดโปรตีนจากใบพืชทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธี Acid-base extraction ที่สภาวะการสกัดที่ ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ได้แก่ 6, 7, 8 และ 9 แล้วตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีของ Lowry จากการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากใบผักบุ้งที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด (0.72±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 ให้ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (0.42±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และเมื่อสกัดโปรตีนเข้มข้นจากใบกระถินพบว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด (0.21±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 และ 7 ให้ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (0.12±0.00 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และ (0.12±0.00 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยและกระถิน พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 เป็น 85 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3 และ 4 ของใบพืชผักบุ้งไทย มีการตกตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.14±0.03 เป็น 0.19±0.04 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.08±0.01 เป็น 0.19±0.06 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะเดียวกันที่ความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 5 ของใบพืชกระถิน มีการตกตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.03±0.01 เป็น 0.11±0.04 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.06±0.02 เป็น 0.08±0.03 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

คำสำคัญ: ผักบุ้ง, กระถิน, โปรตีนสกัด

Project Title Protein Extraction from *Ipomoea aquatica* Forssk. and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Student Name Pimpawee Pisanpeeti

Major Botany

Department Botany

Advisor Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk

Co-Advisor Dr. Wichanee Bankeeree

Academic Year 2019

Abstract

This research is focused on extraction of Leaf Protein Concentrate (LPC) from the leaves of Thailand native species, water spinach *(Ipomoea aquatica* Forssk.) and river tamarind (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) founded abundantly to be supplemented protein for food and feed. LPC from the water spinach and river tamarind leaves were extracted by acid-base extraction with different pH values of 6, 7, 8 and 9. Then, the extracted products were determined by the protein content according to Lowry method, found that at pH 6, the water spinach was the highest protein yield (0.72±0.01 g/g DW). On the contrary, the extracted protein content of the water spinach at pH 9 was the lowest (0.42±0.01 g/g DW), meanwhile the extracted protein content of the river tamarind at pH 9 was the highest (0.21±0.01 g/g DW). In contrast, the extracted protein content of the river tamarind leaves at pH 6 and 7 were the lowest (0.12±0.00 g/g DW) and (0.12±0.00 g/g DW) respectively**.** The interaction analysis between temperature and pH of the protein precipitation of the water spinach and river tamarind, found that when the temperature has increased from 80 to 85 degrees Celsius at pH 3 and 4 of the Water spinach, the Protein precipitation increased from 0.14±0.03 to 0.19±0.04 g/g DW and 0.08±0.01 to 0.19±0.06 g/g DW respectively. Meanwhile, at pH 4 and 5 of the river tamarind, the protein precipitation increased from 0.03±0.01 to 0.11±0.04 g/g DW and 0.06±0.02 to 0.08±0.03 g/g DW respectively.

Keywords: Water spinach, River tamarind, Protein extraction

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ รศ.ดร. สีหนาท ประสงค์สุข และ อ.ดร. วิชาณี แบนคีรี ที่ได้ให้ความรู้ ความเมตตา และสอนวิธีการต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำ และคำปรึกษาต่าง ๆ สำหรับทำโครงงานวิทยาศาสตร์นี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อัญชลี ใจดี อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือด้วยความกรุณา และคอยให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่องของการเรียนในรั้วมหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.ศุภจิตรา ชัชวาล ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนได้มอบโอกาสที่สำคัญในการไปฝึกงานที่ Royal Botanic Gardens, Kew สหราชอาณาจักร

ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Timothy M A Utteridge และ Dr. Ruth P Clark ที่ได้ให้ความรัก ความอบอุ่น ความเป็นกันเอง และความเอ็นดู อีกทั้งยังได้มอบความรู้ และวิธีการทำงานต่าง ๆ เกี่ยวกับอนุกรมวิธานของพืช ซึ่งนับประสบการณ์อันล้ำค่า ในแบบฉบับของ Royal Botanic Gardens, Kew สหราชอาณาจักร

ขอขอบคุณ นายปวเรศ ศิวาพรนุกูล เพื่อนสนิทคนสำคัญ ที่คอยให้คำปรึกษา คอยให้การช่วยเหลือ อยู่เคียงข้าง และช่วยอธิบายเนื้อหาในทุกรายวิชาตลอดการเป็นนิสิตในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ นายสรวิชญ์ ณ หนองคาย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ อธิบาย และให้ความรู้เกี่ยวกับวิธีการต่าง ๆ ในการทำการทดลองทางวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณ นางวิลัยภรณ์ วงศ์ภักดี ที่คอยให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการหาใบพืชเพื่อมาทำการทดลองทางวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณ นายชยุต ปัญญาชัชวาล ที่คอยเป็นผู้ช่วยในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณนายมนต์ชัย พิศาลปีติ (บิดา) นางวรรณา พิศาลปีติ (มารดา) นางสาวกานดา พิศาลปีติ นายอาเดรียง โตสโซลี - นางอาภา พิศาลปีติ โตสโซลี และนางสาวทิพย์วัลย์ พิศาลปีติ (พี่สาวทั้ง 3 คน และพี่เขย) ที่คอยเป็นกำลังใจ อยู่เคียงข้าง และเป็นแรงผลักดันสำคัญที่สุดในชีวิต ให้ความรัก ความอบอุ่น ให้การช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่อง

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ฉ

กิตติกรรมประกาศ ช

สารบัญรูปภาพ ญ

สารบัญตาราง ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) 3

2.2 ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatic*a Forssk.) 5

2.3 โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช 7

2.4 การสกัดโปรตีน 12

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 13

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากใบพืช 13

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 13

3.3 วิธีการดำเนินการ 14

3.3.1 การสกัดโปรตีนจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถิน 14

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 14

3.3.3 การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด และตกตะกอนโปรตีน 15

3.3.4 การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ของการตกตะกอนโปรตีน 15

3.3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 15

บทที่ 4 ผลการทดลอง 16

4.1 การสกัดโปรตีนจากใบพืช 16

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 17

4.3 การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีน 18

4.4 การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด และตกตะกอนโปรตีน 21

บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผล 22

รายการเอกสารอ้างอิง 24

ภาคผนวก 27

ภาคผนวก ก การเจือจางสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) สำหรับกราฟโปรตีนมาตรฐาน 27

ภาคผนวก ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร 28

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 2.2.1 กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) 4

ภาพที่ 2.1.1 ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forssk.) 6

ภาพที่ 4.1.1 ใบพืชผักบุ้งไทย และกระถิน ที่ถูกสกัดโปรตีน 16

ภาพที่ 4.3.1 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชผักบุ้งไทย 19

ภาพที่ 4.3.2 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชกระถิน 20

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.3.1 องค์ประกอบทั่วไปของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้นเมื่อเทียบกับนมผง 8

ตารางที่ 2.3.2 ปริมาณวิตามินหลักของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้น และปริมาณสารอาหารที่แนะนำสำหรับเด็ก 9

ตารางที่ 2.3.3 ปริมาณแร่ธาตุหลัก และธาตุที่ต้องการน้อยของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้น และปริมาณสารอาหารที่แนะนำสำหรับเด็ก 10

ตารางที่ 2.3.4 ปริมาณโปรตีนเข้มข้นในใบพืช (% ของน้ำหนักแห้ง) ของวัชพืชน้ำที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยเทียบกับกระถิน (*L. Leucocephala*.) ที่ไม่ใช่พืชน้ำ 11

ตารางที่ 2.3.5 องค์ประกอบมวลรวมของโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (%) 12

ตารางที่ 4.2.1 ปริมาณโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยเมื่อสกัดโปรตีนในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน 17

ตารางที่ 4.2.2 ปริมาณโปรตีนของใบพืชกระถินเมื่อสกัดโปรตีนในสภาวะความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน 18

ตารางที่ 4.3.1 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชผักบุ้งไทย 19

ตารางที่ 4.3.2 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชกระถิน 20

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อมนุษย์ที่พบมากทั้งในเนื้อสัตว์และพืช โดยโปรตีนจากพืชนับเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในปัจจุบันเนื่องจากค้นพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งต่อการเจริญเติบโตและการบำรุงรักษาร่างกายของมนุษย์ (Shang, Chaplot, and Wu, 2018) ทำให้ความต้องการโปรตีนจากพืชในเชิงการค้าเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบชนิดของพืชที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าโปรตีนจากสัตว์ (Stone และคณะ, 2019) จากการรายงานของ (Angelica et al. 2016) พบว่าใบพืชเป็นแหล่งกำเนิดของโปรตีนที่สำคัญมากและเป็นทรัพยากรที่มีศักยภาพสำหรับผลิตอาหารสัตว์หรืออาหารของมนุษย์ (Zhang, Sanders, and Bruins, 2014) เนื่องจากสารสกัดจากใบพืชลูเซิร์น (*Medicago Sativa* L.) มีโปรตีนคุณภาพสูงถึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง พร้อมด้วยธาตุอาหารหลักจำนวนมาก ได้แก่ เบต้าแคโรทีน, วิตามินบี 6, วิตามินบี 9, วิตามินอี และวิตามินเค เสริมด้วย ธาตุเหล็ก แคลเซียม และแมกนีเซียม (Davys et al., 2010) รวมถึงยังถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในยาแผนโบราณ เนื่องจากส่วนประกอบของพืชมีคุณสมบัติช่วยลดน้ำตาลในเลือด (Paula et al. 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากใบผักตบชวาและการสกัดโปรตีนจากผักบุ้งเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเสริมและอาหารสัตว์ โดยพบว่ามีปริมาณโปรตีน 22.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งและ 29.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เนื่องจาก Leaf protein concentrate (LPC) มีคุณค่าทางอาหารสูง คือ มีโปรตีนสูง มีไขมันไม่อิ่มตัว และธาตุอาหารที่สำคัญหลายชนิด สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมของอาหารว่าง อาหารมังสวิรัติ หรือใช้เป็นอาหารเสริม (Virabalin, Kositsup, and Pannapayak, 1993) เหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งต้องการโปรตีนจากพืชทดแทน

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้มากในประเทศไทย เนื่องจากมีรายงานว่าผักใบเขียวเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยเส้นใย และวิตามิน เช่น แคโรทีน หรือสารตั้งต้นของวิตามินเอ วิตามินซี ไรโบเฟลวิน หรือวิตามินบี 2 กรดโฟลิก และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก และฟอสฟอรัส (Nagendra et al. 2005) เนื่องจากในประเทศไทย ผักบุ้งไทยเป็นพืชผักที่นิยมนำมารับประทานกับมื้ออาหาร อีกทั้งยังนิยมนำเป็นอาหารของสุกร (Suckcharoen, 1978) และกระถินเคยมีรายงานว่าใบอ่อน เมล็ด ดอกตูม และฝักอ่อนของกระถินนิยมทานกับสลัดหรือสำหรับเป็นอาหารต่าง ๆ ในอินโดนีเซีย อินเดีย และไทย (Imededdine et al., 2014) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำใบพืชเหล่านี้มาสกัดโปรตีนที่บริโภค

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตโปรตีนเข้มข้นจากพืชผักบุ้งไทย และกระถิน

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากพืชผักบุ้งไทย และกระถิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำโปรตีนที่สกัดได้ไปประยุกต์ใช้ต่อในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit)

กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) (ภาพที่ 2.1.1) พบได้ในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของโลก เป็นพรรณไม้ที่ต้องการอุณหภูมิที่อบอุ่นเพื่อการเจริญเติบโตที่เหมาะสม อีกทั้งเป็นพืชทนแล้งได้ยาวนานถึง 7 เดือน พืชสกุล *Leucaena* เป็นของวงศ์ Fabaceae และวงศ์ย่อย Mimosoideae ซึ่งมีประมาณ 32 ชนิด กระถินเป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกากลาง และคาบสมุทรยูคาทานของเม็กซิโก (Lim, 2012) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดกลางที่มีความสูง 4-16 เมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางฐาน 10-30 ซม. รากยาว และหยั่งรากลึก ลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง เปลือกด้านในสีแดงเข้ม กิ่งเรียบ และมีสีเทาถึงน้ำตาลเข้ม การเรียงของใบเป็นแบบสลับ ก้านใบย่อยชั้นที่สองหรือสามยาว 5-10.2 ซม. ใบย่อย 13-21 คู่ ใบรูปแถบถึงรูปขอบขนาน ลักษณะไม่สมมาตร ยาว 9-16 มม. กว้าง 2-4.5 มม. ปลายใบรีถึงแหลม โคนใบกลมถึงมน ขอบใบเรียบ ช่อดอกแบบช่อกระจุก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-21 มม. และมีจำนวนดอกย่อย 100-180 ดอกต่อช่อ ดอกมีสีครีมจนถึงขาว ฝักยาว 11–19 ซม. กว้าง 15–21 มม. และมีเมล็ด 8-18 เมล็ด มีสีน้ำตาลเข้ม (Pandey and Kumar, 2013) กระถินมีโปรตีนประมาณ 25.25 ถึง 30.81% ใบแห้งมีระดับไขมัน 6.61% และอุดมไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (Ekpenyong, 1986) และยังมีปริมาณเบต้าแคโรทีนในระดับสูง (Kale, 1987) พร้อมด้วยกรดอะมิโนที่เข้มข้น (N.A.S., 1977)

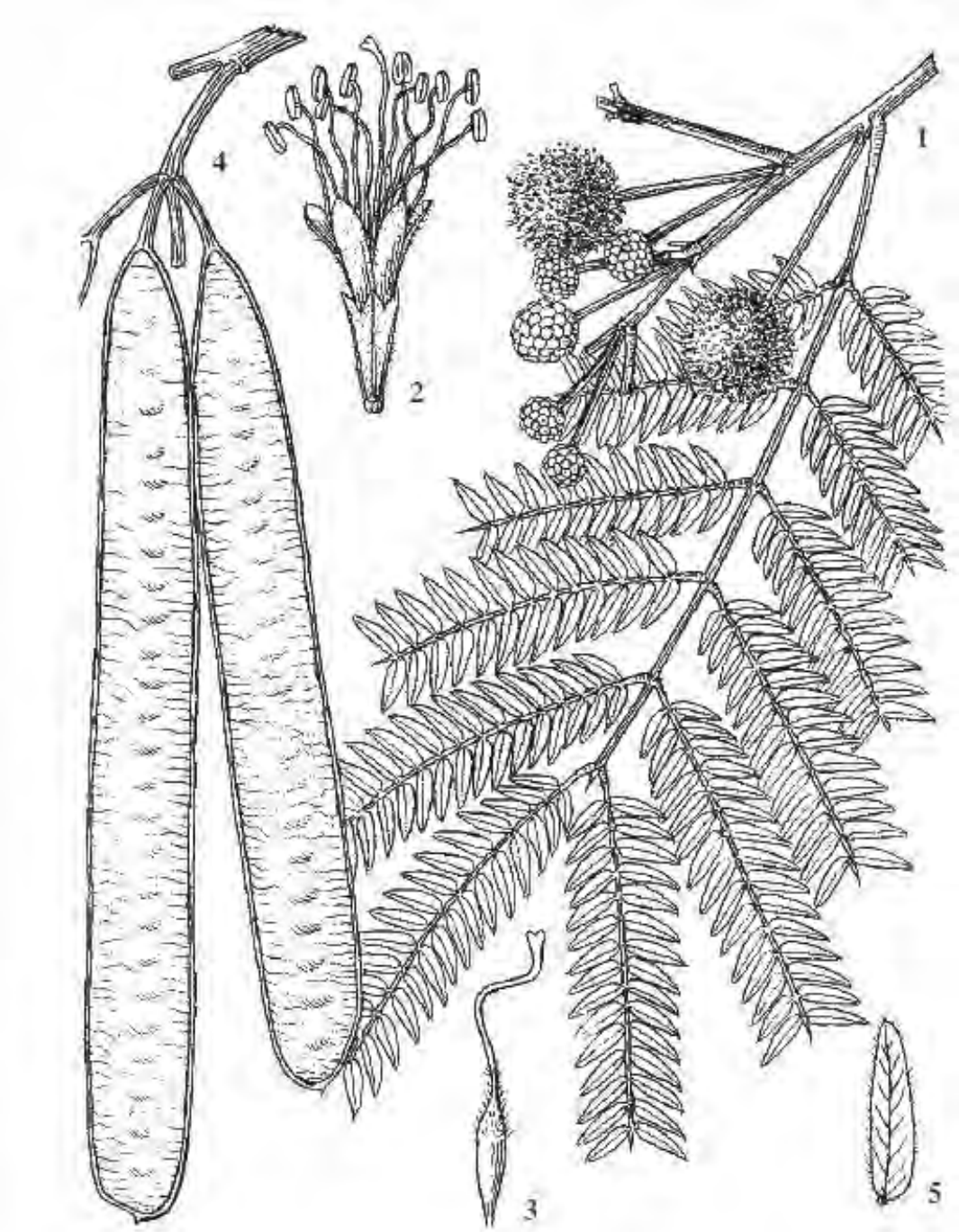
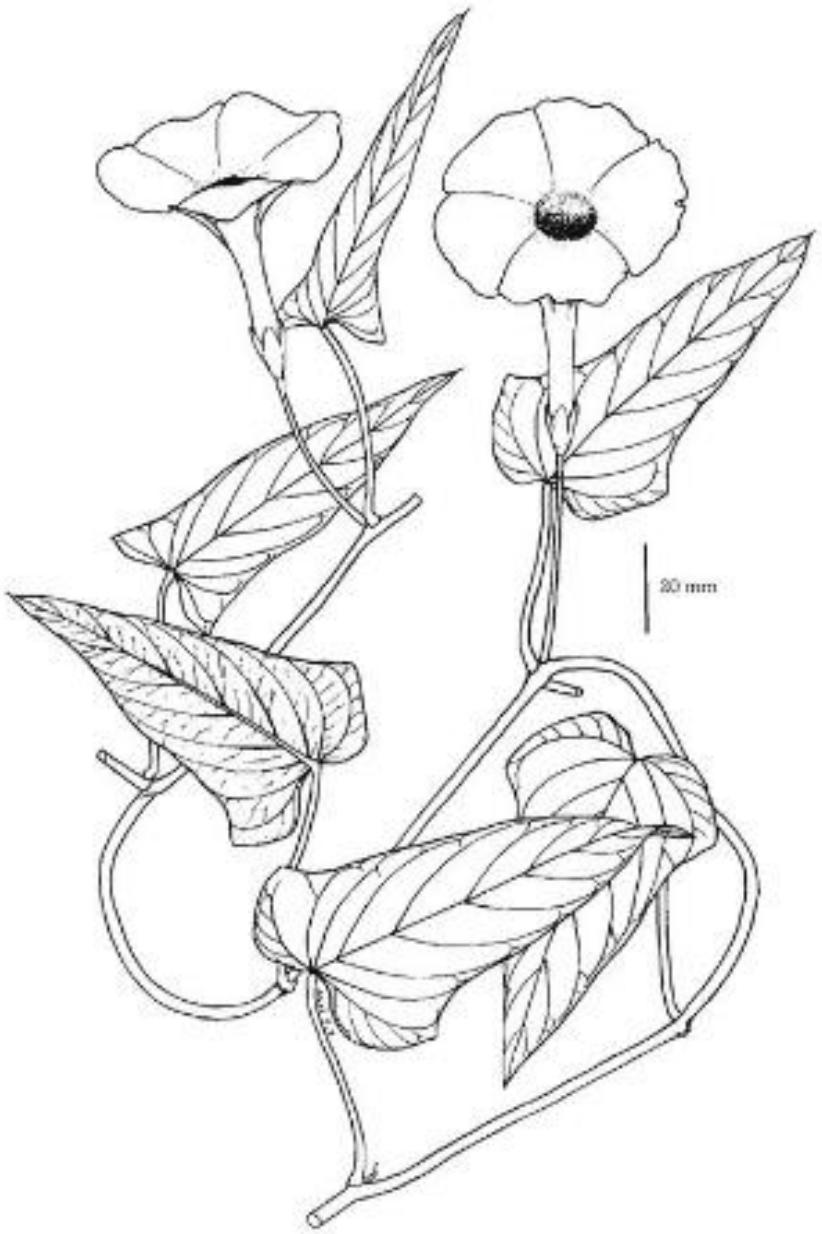


Figure 25. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit
1. flowering branch; *2*. flower; *3*. pistil; *4*. legumes; *5*. leaflet. (drawn by H. P. Yu)

ภาพที่ 2.1.1 กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit)
ที่มา : Hong Kong Herbarium

2.2 ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forssk.)

ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forssk.) (ภาพที่ 2.2.1) เป็นพืชยืนต้นที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีน้ำมาก มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน มีการเพาะปลูกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย และจีนตอนใต้ (Gothberg et al. 2002) อีกทั้งยังพบได้ทั่วไปในประเทศไทย (Virabalin, Kositsup, and Pannapayak, 1993) และเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ลำต้นยาว ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอก โคนใบรูปหัวใจ หรือรูปเงี่ยงใบหอก ใบยาว 5-15 ซม. และกว้าง 2-5 ซม. ก้านใบอาจเป็นสีเขียวอ่อน หรือสีม่วง ดอกเป็นรูปกรวย ยาว 4-7.5 ซม และกว้าง 5 ซม. ดอกเป็นสีขาวล้วน ขาว-แดงม่วง ม่วง หรือม่วงอ่อน เมล็ดเรียบสีน้ำตาล กว้าง 4 มม. (Synder, Morton, and Genung, 1981) ใบพืชผักบุ้งไทยประกอบไปด้วย ความชื้น 90 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 3 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 0.9 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 4.3 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุ 2 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 1.4 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังอุดมไปด้วยวิตามินบี 3 วิตามินบี 2 วิตามินซี และวิตามินอี (Anonymous, 1959)



ภาพที่ 2.2.1 ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forssk.)
ที่มา : Herbarium national de l'Université d'Abidjan

2.3 โปรตีนเข้มข้นจากใบพืช

LPC อาจนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารมังสวิรัติ หรืออาหารเสริม อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง และมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว แคโรทีน แซนโทฟิลล์ สตาร์ช และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น ธาตุเหล็ก แคลเซียม และฟอสฟอรัส รวมถึงอาจนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารสัตว์สำหรับสุกร ลูกวัว ไก่ และปลา (Telek and Graham, 1983) เหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ซึ่งต้องการโปรตีนจากพืชทดแทน โดยมีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าสารสกัดจากใบพืชลูเซิร์น (*Medicago sativa* L.) มีโปรตีนคุณภาพสูงถึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2.3.1) พร้อมด้วยธาตุอาหารหลักจำนวนมาก ได้แก่ เบต้าแคโรทีน วิตามินบี 6 วิตามินบี 9 วิตามินอี และวิตามินเค (ตารางที่ 2.3.2) เสริมด้วย ธาตุเหล็ก แคลเซียม และแมกนีเซียม (ตารางที่ 2.3.3) (Davys et al., 2010) รวมถึงยังถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในยาแผนโบราณ เนื่องจากส่วนประกอบของพืชมีคุณสมบัติช่วยลดน้ำตาลในเลือด (Paula et al., 2017) และมีการรายงานเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากใบพืชผักตบชวา และผักบุ้ง (ตารางที่ 2.3.4) เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเสริม และอาหารสัตว์โดยพบว่ามีปริมาณโปรตีน 22.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และ 29.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Virabalin, Kositsup, and Pannapayak, 1993) อีกทั้งยังมีรายงายเกี่ยวกับศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการ และส่วนประกอบของโปรตีนจากใบพืชที่ได้จากเฟิน (*Azolla africana*) and แหน (*Spirodela polyrhiza*) พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมของ LPC สูงถึง 71.3% และ 64.4% ตามลำดับ (Fasakin, 1999)

ตาราง 2.3.1 องค์ประกอบทั่วไปของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับนมผง

	Mean composition (%)	
	Leaf concentrate	Whole milk powder
Water	8	30
Protein	50.8	26
Lipids	10.2	26
PUFA	40.7	0.9
ω-3 PUFA	30.5	0.2
Minerals	10.6	8
Fiber	2.5	-

ตาราง 2.3.2 ปริมาณวิตามินหลักของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้น และปริมาณสารอาหารที่แนะนำสำหรับเด็ก

Vitamin	Mean content per 10 g	% of RNI for child aged 4-6 years
A (β-carotene)[a,b]	767 μg RE	170
B_1 (thiamin)[b]	0.022 mg	4
B_2 (riboflavin)[b]	0.044 mg	7
B_3 (niacin)[b]	0.042 mg	1
B_5 (pantothenate)	~0 mg	0
B_6	0.58 mg	97
B_8	1.5 μg	-
B_9 (folate)[b]	13.4 μg	7
B_{12}[b]	0.21 μg	18
C[b,c]	6 mg	20
D	~0 mg	0
E[d]	9.9 mg	198
K	0.08 mg	400

[a]เพราะว่า vitamin A อยู่ในรูปของ β-carotene จึงไม่มีความเสี่ยงในการแสดงออกของ

vitamin A : β-carotene 1000 μg เท่ากับ 167 μg ของหน่วยวัดปริมาณวิตามินเอ

[b]ถูกระบุว่าเป็นวิตามิน และแร่ธาตุที่สำคัญสำหรับผู้ที่ติดเชื้อ HIV / AIDS

[c]วิตามินซีถูกเพิ่มเติมโดย France-Luzerne ในระหว่างการผลิตสารสกัดจากใบพืชเข้มข้น

ที่ความเข้มข้น 60 mg/100 g ของสารสกัดจากใบพืชเข้มข้น

ที่มา : Bertin, 2007

ตาราง 2.3.3 ปริมาณแร่ธาตุหลัก และธาตุที่ต้องการน้อยของใบลูเซิร์นแห้งเข้มข้น และปริมาณสารอาหารที่แนะนำสำหรับเด็ก

Mineral/trace element	Mean content per 10 g	% of RNI for child aged 4-6 years
Calcium[a]	338 mg	56
Magnesium[a]	14.8 mg	20
Phosphorus	79.1 mg	-
Potassium	80.1 mg	-
Sodium	1 mg	-
Copper	0.076 mg	
Selenium[a]	0.5 μg	2
Iodine[a]	3 μg	3
Iron[a]	5.4 mg	135[b]
Zinc[a]	0.2 mg	6[c]

[a]ถูกระบุว่าเป็นวิตามิน และแร่ธาตุที่สำคัญสำหรับผู้ที่ติดเชื้อ HIV / AIDS

[b]ที่ 15% ชีวปริมาณออกฤทธิ์

[c]ชีวปริมาณออกฤทธิ์สูง

ที่มา : Bertin, 2007

ตาราง 2.3.4 ปริมาณโปรตีนเข้มข้นในใบพืช (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) ของวัชพืชน้ำที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย[1]เทียบกับกระถิน *(L. Leucocephala.)* ที่ไม่ใช่พืชน้ำ

Plant types	Protein content
Ipomoea aquatica Forssk.	29.4 ± 0.4
Nelumbo nucifera Gaertn.	25.0 ± 0.1
Sesbania javanica Miq.	25.3 ± 1.8
Pistia stratiotes Linn.	25.2 ± 1.6
Alternanthera philoxeroides (Mart.) Griseb.	24.4 ± 2.8
Eichhornia crassipes (Mart.) Solms	22.6 ± 1.4
Hydrilla verticillata Presl.	22.3 ± 1.8
Mimosa pigra Linn.	21.7 ± 2.1
Wolffia globosa (Roxb.) Hartog & Plas	20.1 ± 0.4
Polygonum tomentosum Willd.	19.8 ± 3.0
Chara zelanica	15.5 ± 0.7
Ceratophyllum demersum	14.2 ± 1.1
Brachiaria mutica (Forssk.) Stapf	14.1 ± 2.5
Potamogeton malaianus Miquel	13.7 ± 0.6
Coix aquatica Roxb.	11.7 ± 1.6
Typha angustifolia Linn.	8.3 ± 0.9
Eleocharis dulcis (Burm.f.) Henschel	4.3 ± 0.3
Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit	26.8 ± 2.6

[1]ความเข้มข้นของธาตุอาหารของน้ำในบริเวณพื้นที่ที่รวบรวมพบว่ามี 0.31 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของแอมโมเนียไนโตรเจน 0.80 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของอินทรีย์ไนโตรเจน 0.24 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของไนไตรท์ 0.38 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของไนเตรท 0.67 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของฟอสเฟต 0.01 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของเหล็กในรูปละลาย 0.012 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของทองแดง และ 0.099 หนึ่งส่วนในล้านส่วนของแมงกานีส

ที่มา : Virabalin, Kositsup, and Pannapayak, 1993

ตารางที่ 2.3.5 องค์ประกอบมวลรวมของโปรตีนเข้มข้นจากใบพืช (%)

Species of plant	Dry matter	Crude protein	Ether extract	Fibre	Ash
Carrot (*Daucus carota* L.)	94.2	22.5	2.1	4	46.7
Cucumber (*Cucumis sativus)*	93.3	48.2	10.6	2.4	12.7
Mangold (*Beta vulgaris esculenta*)	90.1	31.1	8.9	0	19.1
Pea (*Pisum sativum*)	93.3	44.3	17.3	2.3	8.1
Potato (*Solanum tuberosum*)	95.1	50.0	12.1	2.4	19.4
Tomato (*Solanum lycopersicurn*)	93.6	32.7	12.4	0.8	22.8

ที่มา : Carlsson, and Hanczakowski*, 1989

2.4 การสกัด และตกตะกอนโปรตีน (Virabalin et al., 1993)

การสกัดโปรตีนจากใบพืชเริ่มจากการล้างตัวอย่างพืชให้สะอาด และหั่นตัวอย่างพืชให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำมาปั่นจนเป็นผงละเอียด และนำผงพืชที่ปั่นละเอียดแล้วมาผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นคนให้เข้ากัน แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 4.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้อุณหภูมิเย็นลง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน แล้วนำตะกอนสุดท้ายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีกครั้งจนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ จะได้ตะกอน LPC ออกมา

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากใบพืช

อุปกรณ์	ยี่ห้อ/บริษัท
1. ตัวอย่างพืช ได้แก่ ผักบุ้งไทย และกระถิน	
2. 1.0 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์	Pine Chemical CO., LTD
3. 1.0 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก	Pine Chemical CO., LTD
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Clifton
5. เครื่องปั่น	Philips
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน	Hettich Zentrifugen
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
8. ผ้าขาวบาง	
9. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร	PYREX
10. ถาดอลูมิเนียม	
11. กระดาษฟรอยด์	DIAMOND
12. บีกเกอร์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร	PYREX
13. ช้อนคนสาร	
14. หลอดหยด	PYREX
15. น้ำกลั่น	
16. กระบอกตวง 50 มิลลิลิตร	DURAN

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

อุปกรณ์	
1. น้ำกลั่น	
2. ไมโครปิเปต	Scilogex
3. หลอดทดลอง	PYREX
4. Folin reagent	LOBA CHEMIE PVT.LTD
5. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	Opsys MR Dynex
6. Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA-ALD RICH

3.3 วิธีการดำเนินการ

3.3.1 การสกัดโปรตีนจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถิน

การสกัดโปรตีนจากใบพืชดัดแปลงจากวิธีของ Virabalin et al. (1993) เริ่มจากการล้างตัวอย่างพืชให้สะอาด และหั่นตัวอย่างพืชให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำมาปั่นจนเป็นผงละเอียด และนำผงพืชที่ปั่นละเอียดแล้วมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 ตามลำดับ จากนั้นคนให้เข้ากัน แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 7 8 และ 9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล และนำมากรองด้วยผ้าขาวบางโดยทิ้งตะกอน (residue) และเก็บส่วนน้ำ (green juice) จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3.0 4.0 และ 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้อุณหภูมิเย็นลง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นใช้หลอดหยดดูดของเหลว (brown juice) ด้านบนทิ้ง แล้วนำตะกอนสุดท้ายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีกครั้งจนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ จะได้ตะกอน LPC ออกมา

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951) โดยนำตะกอน LPC จำนวน 0.02 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) มาผสมกับสารละลาย Lowry ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าสาร และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ในที่มืดนาน 20 นาที และนำมาเติม Folin reagent ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นคำนวณปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตรของสารละลายที่เตรียมจากตัวอย่างโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ทราบความเข้มข้น (ภาคผนวก ข)

3.3.3 การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด และตกตะกอนโปรตีน

การสกัดโปรตีนจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินตามวิธีของ Virabalin et al. (1993) รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) โดยทำการวิเคราะห์สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 และนำมาตกตะกอนโปรตีนที่ความเป็นกรดด่าง 4 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัด และตกตะกอนโปรตีน

3.3.4 การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีน

การตกตะกอนโปรตีนตามวิธีของ Virabalin et al. (1993) ที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 4 โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ 85 องศาเซลเซียส กับ ความเป็นกรด-ด่าง 3, 4 และ 5 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการตกตะกอนโปรตีน

3.3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองซ้ำสาม และนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่สกัดด้วยความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกันด้วยวิธี Tukey HSD โดยโปรแกรม SPSS (SPSS Statistics 22, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) (IBM Corp., United States)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดโปรตีนจากใบพืช

จากภาพที่ 4.1.1 ภายหลังจากการสกัดโปรตีนจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถิน พบว่าได้ออกมาเป็นของเหลวสีเขียวเข้ม มีความหนืด ข้น และเมื่อวางทิ้งไว้จะเกิดการตกตะกอนของกากของพืช

ภาพที่ 4.1.1 ใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินที่ถูกสกัดโปรตีน

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินด้วยวิธี Lowry พบว่าปริมาณโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (0.72±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (0.42±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆ ของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากใบพืชผักบุ้งไทย (ตารางที่ 4.2.1)

ปริมาณโปรตีนของใบพืชกระถินที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (0.21±0.00 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของใบพืชกระถินที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 และ 7 มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดเท่ากับ 0.12±0.00 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.12±0.00 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอื่น ๆของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากใบพืชกระถิน (ตารางที่ 4.2.2)

ตารางที่ 4.2.1 ปริมาณโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยเมื่อสกัดโปรตีนในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน

ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละชีวมวลแห้ง)
6	0.72 ± 0.01^{a}	5.31 ± 0.16^{A}
7	0.61 ± 0.01^{b}	4.45 ± 0.12^{B}
8	0.52 ± 0.01^{c}	3.83 ± 0.17^{C}
9	0.42 ± 0.00^{d}	3.10 ± 0.07^{D}

*ค่ากลาง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรที่คำนวณได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำโดยอักษรยกเดียวกันหมายถึงค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.2.2 ปริมาณโปรตีนของใบพืชกระถินเมื่อสกัดโปรตีนในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน

ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละชีวมวลแห้ง)
6	0.12 ± 0.00^{c}	1.58 ± 0.00^{C}
7	0.12 ± 0.00^{c}	1.68 ± 0.01^{C}
8	0.17 ± 0.01^{b}	2.07 ± 0.05^{B}
9	0.21 ± 0.01^{a}	2.85 ± 0.07^{A}

*ค่ากลาง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรที่คำนวณได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำโดยอักษรยกเดียวกันหมายถึงค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนในใบพืชผักบุ้งไทย (ตารางที่ 4.2.1) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 พบว่ามีเปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนมากที่สุด (5.31±0.16 %) และที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 มีเปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (3.10±0.07 %) ในขณะที่เปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนในใบพืชกระถิน (ตารางที่ 4.2.2) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 และ 7 พบว่ามีเปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (1.58±0.00% และ 1.68±0.01% ตามลำดับ) และที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 มีเปอร์เซ็นของปริมาณโปรตีนมากที่สุด (2.85±0.07 %)

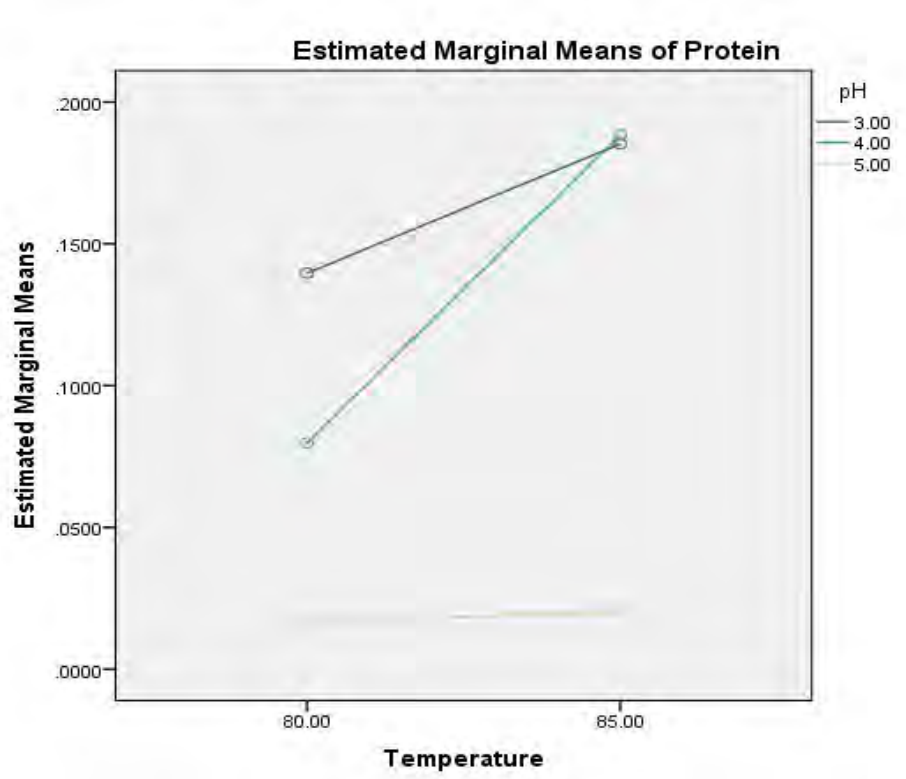
4.3 การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีน

จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทย (ตารางที่ 4.3.1 และ ภาพที่ 4.3.1) และกระถิน (ตารางที่ 4.3.2 และ ภาพที่ 4.3.2) พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีน กล่าวคือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 องศาเซลเซียส เป็น 85 องศาเซลเซียส การตกตะตอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยที่ความเป็นกรด-ด่าง 3 และ 4 มีการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกันซึ่งมีการตกตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.14±0.03 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็น 0.19±0.04 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.08±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็น 0.19±0.06 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 มีไม่มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และการตกตะตอนโปรตีนของใบพืชกระถินที่ความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 5 มีการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกันซึ่งมีการตกตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.03±0.01 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็น 0.11±0.04 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.06±0.02 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็น 0.08±0.03 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ไม่มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.3.1 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชผักบุ้งไทย

ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง)			
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	**ความเป็นกรด-ด่าง**		
	3	**4**	**5**
80	0.14±0.03[a]	0.08±0.01[c]	0.02±0.01[d]
85	0.19±0.04[b]	0.19±0.06[b]	0.02±0.00[d]

*ค่ากลาง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรที่คำนวณได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำโดยอักษรยกเดียวกันหมายถึงค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

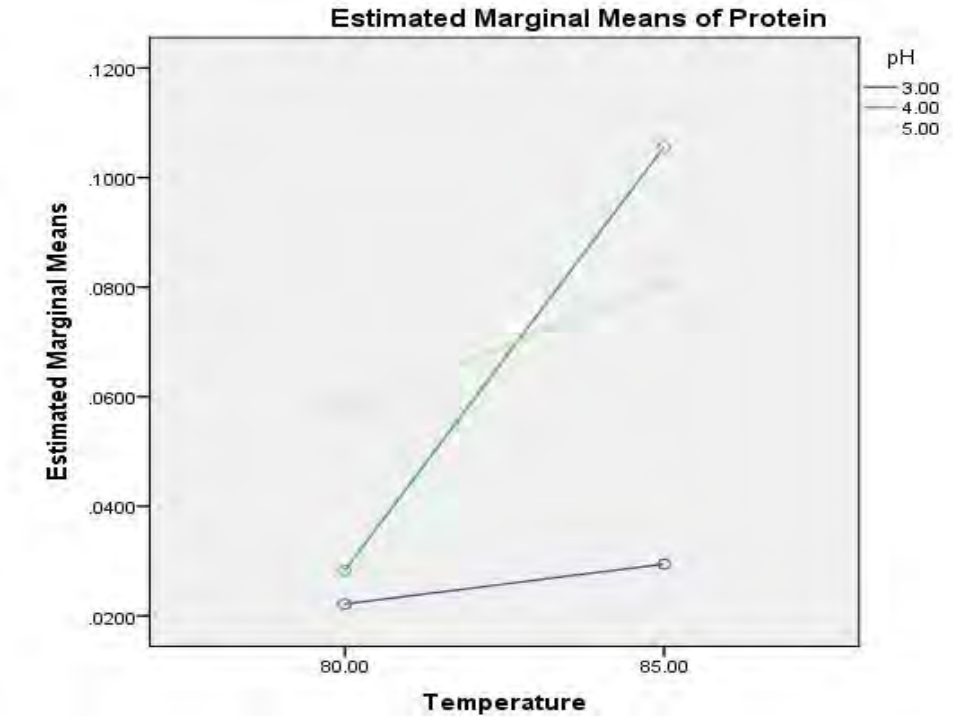


ภาพที่ 4.3.1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทย

ตารางที่ 4.3.2 ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนที่สภาวะอุณหภูมิและ ความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ ของใบพืชกระถิน

ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อกรัมชีวมวลแห้ง)			
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง		
	3	4	5
80	0.02±0.01[c]	0.03±0.01[c]	0.06±0.02[b]
85	0.03±0.01[c]	0.11±0.04[a]	0.08±0.03[a]

*ค่ากลาง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรที่คำนวณได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำโดยอักษรยกเดียวกันหมายถึงค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.3.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชกระถิน

4.4 การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด และตกตะกอนโปรตีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินด้วยวิธี Lowry พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนมากที่สุดสำหรับใบพืชผักบุ้งไทย และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนมากที่สุดสำหรับใบพืชกระถิน

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผล

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินด้วยวิธี Lowry พบว่าปริมาณโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 มีแนวโน้มของปริมาณโปรตีนในใบพืชทั้งสองชนิดนี้ไม่เหมือนกันนั้นอาจชี้ให้เห็นถึงความแปรผันของชนิดโปรตีนในใบพืชทั้งสองชนิดนี้เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเดียวกัน นอกจากปริมาณโปรตีนที่สกัดได้นั้นมีปริมาณไม่เท่ากัน และมีแนวโน้มของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในทิศทางตรงข้ามกัน กล่าวคือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทยมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชกระถินมีน้อยที่สุด และในทางตรงกันข้ามค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทยมีปริมาณน้อยที่สุด ในขณะที่ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชกระถินมีมากที่สุด ปริมาณโปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างกับการสกัดโปรตีนของพืชแต่ละชนิด กล่าวคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Benelhadj et al., 2015) เนื่องจากความสามารถในการละลายของโปรตีนนั้นมีผลมาจากการผลักกันของประจุไอออนของหมู่โซ่ข้างของโมเลกุลโปรตีนที่เปลี่ยนไปตามค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ นั้นอาจแสดงให้เห็นว่าโปรตีนในใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินมีรูปแบบความสัมพันธ์ของการสกัดโปรตีนแบบ pH-dependent (Celik, Güzel, Yildirim, 2019)

จากการวิเคราะห์การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทยที่ความเป็นกรด-ด่าง 3 และ 4 และใบพืชกระถินที่ความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 5 มีปฏิสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันนั้นคือ ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 องศาเซลเซียส เป็น 85 องศาเซลเซียส ซึ่งชี้ให้เห็นถึงสภาวะของอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนของใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ของใบพืชผักบุ้งไทยมีไม่มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับใบพืชกระถินที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ซึ่งชี้เห็นว่าสภาวะนี้อาจไม่เหมาะกับการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Carlsson, and Hanczakowski (1989) โดยสกัดจาก *Beta vulgaris esculenta* ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.5-4.0 และตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นสภาวะที่ได้ตะกอนโปรตีนมากที่สุด

เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนในหน่วยเปอร์เซ็นของโปรตีนสกัดที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 8.5 จากใบพืชน้ำชนิดอื่นๆในประเทศไทย เช่น *Nelumbo nucifera* (25.0±0.1%), *Mimosa pigra* (21.7±2.1%) และ *Chara zelanica* (15.5±0.7%) (Virabalin, Kositsup และ Pannapayak, 1993) กับปริมาณโปรตีนในหน่วยเปอร์เซ็นของโปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 (5.31±0.16 %) (ตารางที่ 4.3) และกระถินที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 (2.85±0.07 %) (ตารางที่ 4.4)

ซึ่งเป็นสภาวะที่ได้โปรตีนสกัดจากใบพืชผักบุ้งไทย และกระถินมากที่สุด นั้นพบว่ามีปริมาณโปรตีนในใบพืชน้อยกว่าพืชชนิดอื่นประมาณ 3-10 เท่า

รายการเอกสารอ้างอิง

Angelica, T.T., Gieteling, J., De Jong A.H.G., Boom, R.M., and Van der Goot, A.J. 2016. Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilization. Food Chemistry. 203 : 402-408.

Anonymous. 1959. Wealth of India, raw materials. CSIR, New Delhi. 5 : 237.

Azani, N. et al. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxon. 66 : 44-77.

Benelhadj, S., Gharrsallauoui, A., Degraeve, P., Attia, H., and Ghorbel, D. 2019. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. Food Chemistry. 194 : 1056-1063.

Bertin, E. 2007. *Composition nutritionelle detailée de l'extrait foliaire de luzerne (EFL).* Association pour la Promotion des Extraits Foliaires en nutrition, Paris.

Blanco, A., Blanton, G. 2017, Proteins. Medical Biochemistry. 21-71.

Carlsson, R., and Hanczakowski*, P. 1989. Waste green parts of plants as raw material for leaf protein concentrate production. Biological Wastes. 28 : 83-90.

Celik, M., Güzel, M., and Yildirim, M. 2019. Effect of pH on protein extraction from sour cherry kernels and functional properties of resulting protein concentrate. Journal of Food Science and Technology. 56 : 3023-3032.

Davys, M.N.G. et al. 2010. Leaf concentrate and other benefits of leaf fractionation. Combating micronutrient deficiencies: Food-based Approaches. 338-365.

Ekpenyong, T.E., 1986. Nutrient and amino acid composition of *Leucaena leucocephala* (Lava.) de Wit. Animal Feed Science and Technology. 15 : 183-187.

Fasakin, E.A. 1999. Nutrient quality of leaf protein concentrates produced from water (*Azolla africana* Desv) and duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden). Bioresource Technology. 69 : 185-187.

Gothberg, A., Greger, M., and Bengtsson, B. 2002. Accumulation of heavy metals water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in the Bangkok region, Thailand. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 : 1934-1939.

H.P. Yu, Hong Kong Herbarium. 2003. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. https:// www.herbarium.gov.hk. 10 June. 2020

Imededdine, A.N., Hassen, S., Chin, P.T., and Suad, I.A. 2014. *Leucaena* (Lam.) de Wit seed oil: Characterization and uses. Industrial Crops and Products. 52 : 582-587.

Jean ASSI YAPO. 1997. *Ipomoea aquatica* Forssk. http://www.publish.plantnet-project.org. 10 June. 2020

Kale, A.U., 1987. Nutritive value of *Leucaena leucocephala* (subabul). Ph.D thesis, Submitted to the University of Bombay, India.

Lim, T.K. 2012. *Leucaena leucocephala*. Edible medicinal and non-medicinal Plants. 2 : 754-762.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193 : 265-275.

Nagendra, K.P., Soundar, D., Gyarahally, R.S., and Somaradhya M.A. 2005. Isolation of a free radical-scavenging antioxidant from water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk). Journal of the Science of Food and Agriculture. 85 : 1461-1468.

N.A.S. 1977. (National Academy of Science). *Leucaena*: promising forage and tree crop for the tropics. National Academy of Sciences. Washington, D.C. pp : 187.

Pandey, V.C., and Kumar, A. 2013. *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant pulp and paper production. Genetic Resources and Crop Evolution. 60 : 1165-1171.

Paula, P.C. et al. 2017. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes—The Moringa oleifera case study. New Biotechnology. 39 : 99-109.

Shang, N., Chaplot, S., and Wu, J. 2018. Food proteins for health and nutrition. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2 : 301-336.

Stone, A.K., Wang, Y., Tulbek, M., and Nickerson, M.T. 2019. Plant protein ingredients. Encyclopedia of Food Chemistry. 1 : 229-234.

Suckcharoen, S. 1978. Mercury accumulation in *Ipomoea aquatica* (forsk) near a caustic soda factory in Thailand. Water, Air, and Soil Pollution. 10 : 451-455.

Synder, G.H., Morton, J.F., and Genung, W.G. 1981. Trials of *Ipomoea aquatica*, nutritious vegetable with high protein and nitrate extraction potential. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 94 : 230-235.

Telek, L. and Graham, H.D. 1983. Leaf protein concentrate. AVI Publishing Company. 844 pp.

Virabalin, R., Kositsup, B., and Pannapayak, H. 1993. Leaf protein concentrate water hyacinth. Journal of Aquatic Plant Management 31 : 207-209.

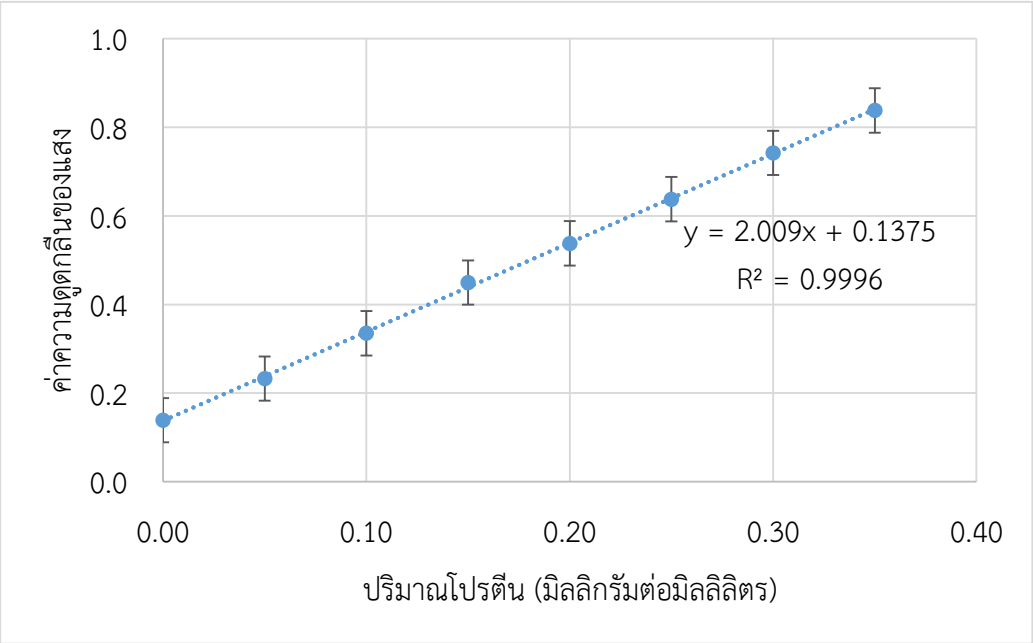
Zhang, C., Sanders P.M.J., and Bruins, M.E. 2014. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. Biomass and Bioenergy 67 : 466-472.

ภาคผนวก

การเจือจางสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (100 มก./ลิตร) สำหรับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปริมาตรน้ำกลั่น	สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน	ความเข้มข้นสุทธิ
10 มล.	0 มล.	0 มก./มล.
8 มล.	2 มล.	20 มก./มล.
6 มล.	4 มล.	40 มก./มล.
4 มล.	6 มล.	60 มก./มล.
2 มล.	8 มล.	80 มก./มล.
0 มล.	10 มล.	100 มก./มล.

ภาคผนวก ก การเจือจางสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) สำหรับกราฟโปรตีนมาตรฐาน



ภาคผนวก ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร