รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การศึกษาโปรตีนและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ในกระถิน เมล็ดฟักทอง และเมล็ดมะขาม

โดย

อรอนงค์ กังสดาลอำไพ
สุชี สุนทรธรรม
ชิติรัตน์ ปานม่วง
แก้ว กังสดาลอำไพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท
ก 15
006448

2532

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาโปรตีน และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการใน กระถิน เมล็ดฟักทอง และเมล็ดมะขาม

โดย

รศ.ดร.อรอนงค์ กังสดาลอำไพ

อ. สุธี สุนทรธรรม

ผศ. ธิติรัตน์ ปานม่วง

รศ.ดร. แก้ว กังสดาลอำไพ

ธันวาคม 2532

I18448124 12 S.A. 2543

ชื่อโครงการวิจัย **การศึกษาโปรตีนและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกระถิน เมล็ดพักทอง และเมล็ดมะขาม**

ชื่อผู้วิจัย **รศ.ดร. อรอนงค์ กังสดาลอำไพ**
อ. สุธี สุนทรธรรม
ผศ. ธิติรัตน์ ปานม่วง
รศ.ดร. แก้ว กังสดาลอำไพ

บทคัดย่อ

โรคขาดโปรตีนและแคลอรี่เป็นปัญหาทางด้านโภชนาการที่สำคัญของประเทศไทย การศึกษานี้จึงนำใบกระถิน เมล็ดกระถิน และเมล็ดพักทอง มาแยกโปรตีนโดยการตกตะกอนด้วยความร้อน การปรับ pH และเติมแคลเซียมซัลเฟต แล้วหาปริมาณกรดอะมิโนและสารต้านโภชนาการคือ มิโมซีน ไฟเตต ทริพซินอินฮิบิทเตอร์ และฮีแมกกลูตินิน ในโปรตีนไอโซเลตที่ได้เปรียบเทียบกันในวัตถุดิบ พบว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน และการปรับ pH จะมีปริมาณโปรตีน (ไนโตรเจน x 6.25) สูงกว่าในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแคลเซียมซัลเฟต แต่ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนจะมีปริมาณสูงสุด Amino acid score ของโปรตีนไอโซเลตมีค่าสูงกว่าในวัตถุดิบ ส่วนสารต้านโภชนาการพบว่าในโปรตีนไอโซเลตจะมีน้อยกว่าในวัตถุดิบโดย ในเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทองพบเฉพาะไฟเตต ในใบกระถินและโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินพบมิโมซีน และทริพซินอินฮิบิทเตอร์ ส่วนในเมล็ดกระถินและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินพบทั้งไฟเตต มิโมซีน และทริพซินอินฮิบิทเตอร์ สำหรับฮีแมกกลูตินินพบเฉพาะในเมล็ดกระถิน แสดงว่าการแยกโปรตีนออกมานี้จะทำให้ส่วนประกอบของกรดอะมิโนดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ขณะเดียวกันสารต้านโภชนาการก็ลดลงด้วย สำหรับเมล็ดมะขามไม่สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ เนื่องจากเมล็ดมะขามมีโปรตีนต่ำและมีสารพวก Polysaccharide บางชนิดมากเป็นพิเศษ จึงจำเป็นต้องหาวิธีเฉพาะเพื่อแยกออกมาศึกษาต่อไป

Title Investigation on proteins and antinutritional factors of Laeucaena leucocephala , Cucurbita maxima seeds and Tamarindus indica seeds.

Name Assoc. Prof. Dr. Oranong Kangsadalampai

Lecturer Suthee Sunthornthum

Asst. Prof. Thitirat Panmaung

Assoc. Prof. Dr. Kaew Kangsadalampai

ABSTRACT

Protein-Calorie malnutrition is one of the important nutritional problems in Thailand. Attempts to isolated protein of Laeucaena leucocephala leaf and seed as well as of Cucurbita maxima seed were performed by heating , adjusting pH and adding calcium sulfate. Amino acid content and antinutritional factors including , phytate , trypsin inhibitor and hemagglutinin were investigated on both protein isolates and raw materials. Protein content (N x 6.25) of protein isolated by heating and adjusting pH was higher than those of protein isolated by calcium sulfate precipitation. Protein isolated by heating contained the highest content of amino acids. Amino acid scores of the protein isolate were higher than those of raw materials. Antinutritional factors in protein isolate were lower than those in raw material. Cucurbita maxima seed and its protein isolate contained only phytate. Laeucaena leucocephala leaf and its protein isolate contained mimosine and trypsin inhibitor , while Laeucaena leucocephala seed and its protein isolate contained phytate , mimosine and trypsin inhibitor. Hemagglutinin was found in Laeucaena

leucocephala seed. This study showed that the process of isolation of protein improved the amino acid content with respected to reference protein and decrease antinutritional factors. However , the method used in this study was not applicable to isolate the protein of Tamarindus indica seed because its polysaccharide content was very high.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ii
รายการตารางประกอบ	vi
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
Mimosine	3
ไฟเตต	4
Trypsin inhibitor	6
ฮีแมกกลูตินิน	7
วิธีการวิจัย	9
การเก็บตัวอย่างพืช	9
การวิเคราะห์องค์ประกอบของตัวอย่าง	9
การแยกโปรตีน	11
การวิเคราะห์หาปริมาณ Mimosine	12
การวิเคราะห์ไฟเตต	13
การวิเคราะห์ Trypsin inhibitor activity	14
การวิเคราะห์ปริมาณฮีแมกกลูตินิน	16
การวิเคราะห์กรดอะมิโน	17
ผลของการวิจัย	19
การอภิปรายผล	37
ข้อสรุป	42
เอกสารอ้างอิง	49

เลขหมู่ จส
ว15
เลขทะเบียน 006448
วัน.เดือน.ปี 20 ก.ค. 34

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพืชต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง	21
2	องค์ประกอบของพืชต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด	22
3	ปริมาณโปรตีนไอโซเลต และปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากเมล็ดพักทอง ใบกระถิน และเมล็ดกระถิน	23
4	ปริมาณสารต้านโภชนาการในเมล็ดพักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง	24
5	ปริมาณสารต้านโภชนาการในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีน-ไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน	25
6	ปริมาณสารต้านโภชนาการในเมล็ดมะขาม	26
7	ปริมาณไฟเตตต่อ 100 กรัมของโปรตีนในเมล็ดพักทอง และโปรตีน-ไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง	26
8	ปริมาณสารต้านโภชนาการต่อ 100 กรัมโปรตีนในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน	27
9	ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดพักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง	28
10	ปริมาณกรดอะมิโนในใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน	29
11	ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน	30
12	ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัมโปรตีนจากเมล็ดพักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	31
13	ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัม โปรตีนจากใบกระถิน และโปรตีน-ไอโซเลตจากใบกระถิน เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	32
14	ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัม โปรตีนจากเมล็ดกระถิน และโปรตีน-ไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	33
15	Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดพักทอง และโปรตีน-ไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง	34
16	Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในใบกระถิน และโปรตีน-	

	ไอโซเลตจากใบกระถิน	34
17	Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน	35
18	ปริมาณกรดอะมิโนในใบกระถินเปรียบเทียบกับค่าที่มีรายงานไว้	36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โปรตีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการมีสุขภาพที่ดี ปัจจุบันโรคขาดโปรตีนและแคลอรี่จัดเป็นปัญหาทางด้านโภชนาการที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศที่กำลังพัฒนาทั้งหลาย สาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคขาดโปรตีนและแคลอรี่ คือ การที่ประชาชนมีรายได้น้อย ไม่สามารถซื้ออาหารโปรตีนพวกเนื้อสัตว์มาบริโภคให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกายได้ (Tontisirin and Winichagoon, 1984) ขณะเดียวกันแหล่งอาหารโปรตีนที่มีอยู่ในพืชบางส่วนก็ถูกทิ้งไปโดยไม่ได้นำมาบริโภคทั้ง ๆ ที่แหล่งอาหารโปรตีนจากพืชนี้ก็มีอยู่ในบ้านเราพอสมควร ทั้งนี้คงเนื่องมาจากการขาดความรู้ถึงวิธีการที่จะนำเอาโปรตีนจากพืชนี้มาเป็นอาหารที่ปลอดภัยและน่ารับประทาน

แหล่งอาหารโปรตีนที่ได้จากพืชนี้มักพบมีสารต้านโภชนาการ (antinutritional factors) บางชนิดอยู่ด้วย เช่น trypsin inhibitors, hemagglutinins (lectins) phytate และ mimosine (Liener, 1962) เป็นต้น สารเหล่านี้จะรบกวนต่อการย่อยและการดูดซึมสารอาหารอื่น ๆ ในทางเดินอาหาร (Kakade and Evans, 1966) คนไทยได้ใช้ใบและเมล็ดกระถิน เมล็ดมะขาม รับประทานกันบ้างในปริมาณเล็กน้อย สำหรับกระถินก็มีการใช้ผสมอาหารสัตว์ด้วย แต่ต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด เพราะถ้าใช้มากเกินไปจะทำให้สัตว์ขนร่วง (Matsumoto et al., 1951) และเมื่อทดลองผสมในอาหารเลี้ยงหนูปรากฏว่าหนูทดลองมีอาการผิดปกติที่ตา คือตาจะมีลักษณะเป็นฝ้าขาวขุ่น ส่วนเมล็ดมะขามคั่วและเมล็ดฟักทองคั่ว พบว่าไม่มีอันตรายต่อสัตว์ทดลองและสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารผสมที่มีเมล็ดพืชนี้จะเจริญได้ดี (วรนันท์และคณะ 2524-26)

ปัจจุบันก็มีการนำใบกระถิน เมล็ดกระถิน เมล็ดมะขาม และเมล็ดฟักทองมาใช้เป็นอาหารกันบ้างแล้ว แต่ก็ยังมีปัญหาเกี่ยวกับรสชาดของอาหาร รวมทั้งสารต้านโภชนาการซึ่งมีในพืชเหล่านี้ การวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงวิธีการพื้นฐานที่จะแยกโปรตีนออกมาจากพืชเหล่านี้ พร้อมทั้งศึกษาปริมาณของสารอาหารและสารต้านโภชนาการที่มีในพืชและโปรตีนที่แยกออกมาได้จากพืชนี้

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระถิน (Leucaena leucocephala de wit)

เป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อน ในประเทศไทยชาวบ้านนิยมปลูกไว้เป็นไม้ริมรั้ว และนำยอดอ่อนและฝักอ่อนมาเป็นผักจิ้ม ใบ ยอด ฝัก และเมล็ด ใช้ผสมในอาหารสัตว์ ใบเป็นแหล่งโปรตีนและแคโรทีนจึงใช้ผสมในอาหารเลี้ยงสุกร เมล็ดเคยใช้เป็นอาหารเป็ด ไก่ แต่ถ้าบริโภคในปริมาณมาก ๆ ทุกส่วนของกระถินจะมีพิษต่อสัตว์ที่มีกระเพาะอาหารเดียว (Monogastric animals) เช่น ม้า สุกร กระต่าย และไก่ ทำให้ขนร่วง ถ้าสัตว์หยุดกินกระถินขนก็จะขึ้นมาใหม่ และยังมีรายงานว่ากระถินทำให้เป็นหมันด้วย พิษของกระถินเกิดจากมิโมซีน (Mimosine) การเติมเหล็กลงไปในอาหารสัตว์จะลดการเกิดอาการพิษได้ (The wealth of India, 1962)

ฟักทอง (Curcubita Maxima Duchesne)

เป็นไม้เลื้อยซึ่งปลูกกันในเขตร้อน ปลูกได้ง่ายและได้ผลรวดเร็วทุกส่วนของพืชนี้สามารถรับประทานได้ ยอดอ่อนและใบใช้เป็นผักสลัด ผลก็นำมาหุงต้มรับประทาน เมล็ดก็รับประทานได้ บางคนใช้เมล็ดรับประทานเพื่อขับพยาธิ ขับปัสสาวะ และเป็นยาเจริญอาหาร (The wealth of India, 1962)

มะขาม (Tamarindus indica Linn.)

เป็นไม้ยืนต้น สามารถแพร่พันธุ์ได้ง่ายด้วยเมล็ด เนื้อใช้รับประทาน ส่วนเมล็ดไม่ค่อยนำมาใช้ประโยชน์ เนื้อในของเมล็ดเคยนำมาใช้เป็นอาหารในยามขาดแคลน โดยรับประทานเดี่ยวหรือรับประทานร่วมกับแป้งชนิดอื่น เนื้อในของเมล็ดนี้แยกเปลือกออกโดยการคั่วหรือแช่น้ำ แล้วนำเนื้อในเมล็ดมาต้มหรือคั่วก่อนรับประทาน เมล็ดที่บดละเอียดใช้เป็นอาหารสัตว์ (The wealth of India, 1962)

การแยกโปรตีนจากพืช

โปรตีนจากพืชเป็นแหล่งโปรตีนที่น่าสนใจนำมาใช้ประโยชน์ แต่โปรตีนจากพืชอาจมีปัญหาในแง่กลิ่น รส สารพิษ และมีกากใยมาก ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาแยกโปรตีนออกมา

จากพืช ซึ่งพืชที่สามารถแยกโปรตีนออกมาใช้ได้ผลดีในปัจจุบันได้แก่ ถั่วเหลือง ส่วนพืชอื่นที่ได้มีการศึกษากันแล้วได้แก่ เมล็ดดอกทานตะวัน ถั่วลิสง และเมล็ดฝ้าย (Betschart and Kinsella, 1973; Manak et al. 1980; Rahma and Narasinga Rao, 1979)

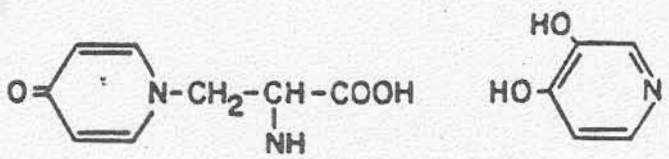
การแยกโปรตีนออกจากพืชจะทำโดยนำเอาส่วนของพืชสกัดด้วยน้ำ แล้วนำสารละลายที่ได้มาแยกโปรตีนโดยใช้

1. ความร้อน
2. เติมกรดหรือตัวทำละลาย เช่น acetone หรือ ethanol
3. เติมเกลือ เกลือที่ใช้ในการแยกโปรตีนก็คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมซัลเฟต หรือแคลเซียมคลอไรด์

นอกจากนี้ก็มีวิธีการแยกโปรตีนที่ใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากขึ้นไปอีก เช่น ใช้ ultrafiltration, ion exchange หรือ gel chromatography วิธีนี้จะใช้กับการทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น แต่ไม่เหมาะสมกับงานทั่วไป (Telek and Graham, 1983)

Mimosine

Mimosine เป็นกรดอะมิโนที่มีพิษชนิดหนึ่งพบในพืชตระกูลถั่วพวกกระถิน (Leucaena leucocephala) ทุกชนิด นอกจากนี้ก็พบ Mimosine ในใบของพืชตระกูล Mimosa (Telek and braham, 1983) สูตรโครงสร้างของ Mimosine และสารที่ได้จากการเมตาโบไลต์ แสดงในรูปที่ 1



Mimosine 3,4-Dihydroxypyridine

รูปที่ 1 โครงสร้าง Mimosine และ เมตาโบไลต์

กระถินเป็นพืชที่ขึ้นได้ทั่วไปในเขตร้อน เคยมีการใช้กระถินเป็นแหล่งของโปรตีนในอาหารสัตว์ เนื่องจากกระถินมีโปรตีนค่อนข้างสูง และปลูกได้ง่าย แต่การใช้กระถินในอาหารสัตว์ก็มีขีดจำกัดเนื่องจากใบกระถินมี Mimosine อยู่ ทำให้สัตว์เลี้ยง เช่น ม้า แกะ เป็ดไก่ ขนร่วง การเจริญเติบโตลดลง (Matsumoto et al. 1951 ; Megarrity, 1978 ; Telek and Graham, 1983) ในหนูทดลองเมื่อได้รับอาหารที่มีเมล็ดกระถินหรือ Mimosine ผสมอยู่ 10% หรือ 1% ตามลำดับ พบว่าจะไม่มีขนขึ้น (Crounse et al. 1962) การที่สัตว์ขนร่วงหรือไม่มีขนขึ้นเมื่อได้รับ Mimosine นี้ คงเนื่องจาก Mimosine และ DHP ไปยับยั้งการเติม thymidine เข้าไปในขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA ที่รากขน (Ward and Harris 1976) ในหนูทดลองถ้าให้ Mimosine ผสมในอาหารสูงกว่า 0.75% ก็พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหนูจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Matsumoto et al. 1951) ในหนูทดลองที่ให้อาหารที่มีโปรตีนจากกระถิน 4% ร่วมกับโปรตีนจาก casein 11% หลังจากเลี้ยงหนูไป 24 วัน ปรากฏว่าหนูทดลองมีอาการผิดปกติที่ตา คือตามีลักษณะเป็นฝ้าขาวขุ่น (วรนันท์ ศุภกาญจน์ และคณะ 2524-26)

สารที่ได้จากเมตาโบไลต์ของ Mimosine คือ 3-hydroxy-4- (IH) -pyridone (DHP) ก็พบว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดคอหอยพอกในวัวควาย แกะ และหนูได้ (Hegarty et al. 1979) ซึ่งในหนูทดลองก็พบว่า DHP จะไปยับยั้งการจับไอโอดีนที่ต่อมไทรอยด์ แต่ Mimosine จะไม่มีผลอันนี้

Matsumoto และคณะ (1951) พบว่า Mimosine ที่อยู่ในใบกระถินนี้สามารถถูกทำลายได้โดยความร้อน แต่ถ้าทำใบกระถินให้แห้งเร็ว ๆ ปรากฏว่า Mimosine จะไม่ถูกทำลาย ดังนั้น Matsumoto และคณะจึงแนะนำให้เก็บใบกระถินสดที่อุณหภูมิสูงกว่า 70°C เพื่อสลาย Mimosine ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 50°C Mimosine จะสลายน้อยมาก

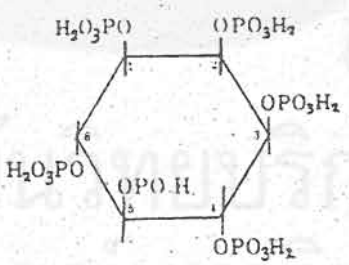
การวิเคราะห์หาปริมาณ Mimosine จะทำการสกัด Mimosine จากพืชด้วย 0.1 N Hydrochloric acid ที่ร้อน นำสารละลายที่สกัดได้มาทำให้ใส แล้วให้ mimosine เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกันเฟอร์ริกคลอไรด์ แล้ววัดความเข้มข้นของแสงที่ 535 nm. เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งวิธีนี้จะวัดทั้งปริมาณของ Mimosine และ DHP (Hegarty et al. 1964)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไฟเตต (Phytate)

ไฟเตตเป็นสารประกอบของฟอสฟอรัส (myo-inositol hexaphosphate) ในโมเลกุลของไฟเตตจะมีฟอสฟอรัส 28.2% (Boland et al. 1975) สูตรทางเคมีของไฟเตตคือ Myoinositol 1,2,3,4,5,6 -hexakis (dihydrogen phosphate) (รูปที่ 2) ไฟเตตพบในเมล็ดพืชทั่ว ๆ ไป อาจพบในรากและหัวของพืชบางชนิด ปริมาณไฟเตตในพืชขึ้นอยู่กับความแก่ของพืชขณะเก็บเกี่ยว ในเมล็ดพืชที่อ่อนจะไม่พบไฟเตต ปริมาณไฟเตตจะพบมากในธัญพืชและถั่ว ในธัญพืชจะพบว่า 60-80 % ของฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของไฟเตต (Oberleas, 1973; de Boland et al. 1978)

ไฟเตตในอาหารนี้มีความสำคัญต่อสุขภาพ เนื่องจากไฟเตตจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเกลือแร่ในอาหารหลายชนิด เช่น สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Hallberg et al. 1987 , Lonnerdal et al. 1988, Simpson et al. 1981) ทำให้การละลายของเกลือแร่เหล่านั้นลดลง ร่างกายจึงไม่สามารถจะดูดซึมเกลือแร่เหล่านี้ได้ พบว่าไฟเตตในอาหารสามารถลดการดูดซึมของเหล็กได้ถึง 90% (Brune et al. 1989)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของกรดไฟติก

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไฟเตตในอาหารจะทำให้การย่อยของอาหารพวกแป้งลดลง และมีผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นน้อย เนื่องจากแป้งไม่ถูกดูดซึม ผลของไฟเตตต่อการย่อยแป้งนี้เนื่องจากไฟเตตไปจับกับเอนไซม์ amylase (Thompson et al.

1987) ไฟเตตยังมีผลทำให้อัตราการย่อยโปรตีนช้าลงด้วย (Serraino et al. 1985; Singh and Krikorian 1982)

การวิเคราะห์ไฟเตต

เนื่องจากไม่มีสารเคมี (Reagent) ใดที่เฉพาะเจาะจงในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไฟเตต และไฟเตตเองก็ไม่มีสเปกตรัมที่ดูดกลืนแสงโดยเฉพาะ ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณไฟเตตจึงใช้วิธีซึ่งพัฒนามาจากวิธีของ Heuber และ Stadler (Oberleas, 1973) โดยใช้หลักการให้ไฟเตตเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งไม่ละลายน้ำกับเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์ริก (Ferric ion) ในสารละลายที่เป็นกรดเจือจาง ซึ่งในภาวะนี้ inositol phosphate จะตกตะกอนออกมาแต่สารพวกอนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) จะไม่ตกตะกอนออกมา (Boland et al. 1975) จากปริมาณเหล็กที่ตกตะกอนใน ferric phytate ก็สามารถคำนวณหาปริมาณไฟเตตได้โดยใช้อัตราส่วน เหล็ก 4 อะตอมต่อไฟเตต 1 โมเลกุล (Rhan and Jost, 1979)

Trypsin inhibitor (TI)

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าคุณค่าทางโภชนาการ และการย่อยของโปรตีนจากถั่วจะต่ำถ้าถั่วนั้นไม่ได้ผ่านการหุงต้มหรือผ่านความร้อน คุณค่าของโปรตีนที่ลดลงนี้ก็เนื่องจากมีสารซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ที่จะย่อยโปรตีน (Trypsin inhibitor) นั่นเอง สารที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์จะพบในถั่วเกือบทุกชนิด และยังพบในพืชอื่น ๆ เช่น ผัก พักทอง เมล็ดดอกทานตะวัน และมันสำปะหลัง เป็นต้น (Liener and Kakade, 1980)

TI ที่พบจะมีโครงสร้างแตกต่างกันโดยจะเป็น Polypeptides ของกรดอะมิโนที่เรียงลำดับต่าง ๆกัน และพบว่าพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 20,000-25,000 จะมี disulfide bond เพียง 2-3 bond จะมีความเฉพาะกับเอนไซม์ Trypsin ส่วนพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 6,000-10,000 ซึ่งมี disulfide bond มาก จะยับยั้งทั้งเอนไซม์ Trypsin และ Chymotrypsin. TI ที่มีผู้ศึกษารายละเอียดไว้แล้วก็มีชื่อแตกต่างกัน เช่น Kunitz inhibitor มี M.W. 18,000-24,000 มีกรดอะมิโน 181 ตัวเรียงตัวเป็น random coil และมี disulfide bond ระหว่างสาย 2 คู่ สามารถจะจับกับเอนไซม์ได้ในอัตราส่วน 1:1 หรือ Bowman-Birk inhibitor มี M.W.

8,000-12,000 มีกรดอะมิโน 71 ตัว มี disulfide bond 7 คู่ จึงแข็งแรงมากสามารถทนกรดและด่างได้ สารยับยั้งเอนไซม์ตัวนี้สามารถจับกับเอนไซม์ได้ในอัตราส่วน 1:2 (Liener and Kakade, 1980 ; Tan-Wilson et al. 1985)

สำหรับหน้าที่ของ TI ในพืชนั้นก็ยังไม่แน่ชัด เข้าใจว่าพืชสร้าง TI ขึ้นมาเพื่อป้องกันการสลายของโปรตีนในระหว่างที่เมล็ดพืชแก่ขึ้น และพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์นี้จะหมดไปในระหว่างการงอกของเมล็ด หรือพืชอาจจะสร้างสารยับยั้งโปรตีนขึ้นมาเพื่อป้องกันการทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์หรือแมลง ซึ่งในกรณีหลังนี้ก็พบว่า ถ้าพืชมีรอยฉีกขาดก็จะมีสารยับยั้งโปรตีนที่บริเวณฉีกขาดและเนื้อเยื่อใกล้เคียงมากขึ้น (Liener and Kakade , 1980)

ปัจจุบันมีการนำโปรตีนจากพืชโดยเฉพาะพืชในตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงมาใช้เป็นอาหารโปรตีนแทนโปรตีนจากสัตว์มากขึ้น ข้อมูลเกี่ยวกับผลของ TI ต่อร่างกายจึงเป็นข้อมูลซึ่งศึกษาผลของ TI จากถั่วเหลือง

1. กดการเจริญเติบโต สัตว์ทดลองที่กินถั่วเหลืองดิบ พบว่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งผลต่อการกดการเจริญเติบโตนี้ส่วนหนึ่งก็เนื่องจากผลของ TI ไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ทำให้โปรตีนบางส่วนโดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็น ถูกขับออกจากร่างกายโดยไม่ได้ถูกดูดซึม (Gertler, 1967; Liener,1976)

2. ตับอ่อนขยายตัวใหญ่ขึ้น ในหนูและลูกไก่ที่ได้รับถั่วเหลืองหรืออาหารที่มี TI พบว่าตับอ่อนจะมีขนาดใหญ่ขึ้น การที่ตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นนี้เข้าใจว่าคงเป็นกลไกของร่างกายที่จะสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น เพื่อชดเชยกับเอนไซม์ที่สูญเสียไปเนื่องจากผลของ TI ถ้าปริมาณ TI ในอาหารสูง พบว่าขนาดของตับอ่อนจะใหญ่ขึ้นด้วย ขนาดของตับอ่อนนี้จะกลับสู่ขนาดปกติได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มี TI ต่ำ (Rackis et al. 1979) การที่ตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง เชื่อว่าเนื่องจากการนำกรดอะมิโนที่มีกำมะถันมาใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์แทนที่จะนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อ แต่ในสุนัข สุกร และไก่ที่โตเต็มที่แล้ว ปรากฏว่า TI ไม่มีผลต่อขนาดของตับอ่อน

ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin)

ฮีแมกกลูตินินหรือเลคติน (Lectin) เป็น glycoproteins ซึ่งพบในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะพืชพวกถั่ว (Nachbar and Oppenheim, 1980) ฮีแมกกลูตินินเป็นสาร

ต้านโภชนาการ (antinutritional factor) โดยฮีแมกกลูตินินจะไปจับกับเซลล์ผิวของผนังลำไส้ ทำให้รบกวนต่อการดูดซึมสารอาหาร เช่น วิตามิน กรดอะมิโน ไขมัน และกลูโคส สัตว์ทดลองถ้าได้รับฮีแมกกลูตินินเป็นเวลานานก็จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง และอาจถึงตายในที่สุด (Liener, 1974, 1975, Pusztai et al. 1979)

ฮีแมกกลูตินินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจับกันเป็นก้อน และสามารถทั้งกระตุ้นและยับยั้งการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวในระบบทางเดินอาหารจะมีผลมากที่สุด (Jaffe, 1980 ; Jaffe and Gaede, 1959; Pusztai et al., 1979) ฮีแมกกลูตินินยังมีพิษต่อเซลล์ของผนังลำไส้ ทำให้ผนังลำไส้ของสัตว์ทดลองเป็นแผล ส่งผลให้การดูดซึมอาหารลดน้อยลง บริเวณที่เป็นแผลนี้อาจเกิดการติดเชื้อ และทำให้สัตว์ทดลองตายในที่สุด (King et al. 1980 ; Wilson et al., 1980)

การวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินินทำได้โดย ดูความสามารถของสารที่สกัดจากตัวอย่างในการทำให้เม็ดเลือดแดงจับกันเป็นก้อน โดยนำสารละลายที่สกัดได้จากพืชมาทำให้เจือจางโดย Serial dilution technique แล้วนำมาเติมเม็ดเลือดแดงซึ่งผ่านการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน แล้วดูความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารละลายตัวอย่างที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจับกันได้ (Jaffe , 1980 ; Prigent and Bourrillon, 1976)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างพืชที่จะนำมาศึกษา

พืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่

ใบ และเมล็ดกระถิน (Laeucaena leucocephala de Wit)

เมล็ดมะขาม (Tamarindus indica Linn.)

เมล็ดฟักทอง (Cucurbita maxima Duchesne)

ใบกระถิน เมล็ดฟักทอง และเมล็ดมะขาม หาซื้อจากตลาดในกรุงเทพฯ ส่วนเมล็ดกระถินนั้นใช้ฝักแก่ซึ่งเก็บจากต้นในกรุงเทพฯ สำหรับเมล็ดฟักทอง เมล็ดมะขาม และเมล็ดกระถิน จะนำมาตากแห้งแล้วเก็บในตู้เย็น เพื่อทำการศึกษาต่อไป ส่วนใบกระถินใช้ใบสดในการศึกษา

การวิเคราะห์องค์ประกอบของตัวอย่าง (Chemical Analysis) (Pearson, 1976)

พืชที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้ทำการสุ่มตัวอย่างมาเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหาร โดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารอาหารโดยทำ 3 ซ้ำสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิด

ความชื้น (Moisture) ความชื้นในตัวอย่างอาหารวิเคราะห์หาได้โดยการวัดน้ำหนักที่หายไป เมื่อนำตัวอย่างมาอบที่ 100°C จนน้ำหนักคงที่ ซึ่งดำเนินการโดย

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม (ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน) ลงใน porcelain dish ซึ่งอบแห้งที่ 105 °C
2. นำตัวอย่างไปอบที่ 100 °C จนกว่าน้ำหนักจะคงที่
3. น้ำหนักที่หายไปจะเป็นปริมาณความชื้นในตัวอย่างอาหารที่ชั่งมาแล้ว คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นในอาหาร

ไขมัน (Crude fat) ปริมาณไขมันในตัวอย่างวิเคราะห์หาได้โดยการนำตัวอย่างมาสกัดไขมันออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แล้วชั่ง

หาน้ำหนักของไขมันที่สกัดออกมาได้ ซึ่งทำการวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 3-4 กรัม ลงใน thimble

2. นำมาสกัดด้วย petroleum ether ในเครื่อง soxhlet apparatus 4-6 ชั่วโมง

3. ระเหย petroleum ether ออกไป แล้วนำสารที่เหลือมาอบที่ 100-102 °C 30 นาที

4. ชั่งหาน้ำหนักไขมันที่สกัดออกมาได้ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ไขมันในอาหาร

โปรตีน (Total nitrogen and crude protein) ไนโตรเจนวัดโดยวิธี Micro Kjeldahl แล้วคำนวณหา Crude protein โดยนำค่า total nitrogen คูณด้วย 6.25 สำหรับการหาปริมาณไนโตรเจน ดำเนินการวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างมา 0.5-5 กรัม ใส่ใน Kjeldahl digestion flask

2. เติมส่วนผสมของ Catalyst, glass beads, conc. Sulfuric acid และ Hydrogen peroxide แล้ว digest จนกระทั่งได้ส่วนผสมที่ใส

3. ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไป แล้วเติม 40% Sodium hydroxide กลั่นส่วนผสมนี้ แล้วเก็บส่วนที่กลั่นออกมาได้ (Distillate) ลงไปใน 4% boric acid

4. ติเตรตส่วนที่กลั่นออกมาได้ด้วย 0.1 N sodium hydroxide

5. ทำ Blank เช่นเดียวกัน (แต่ไม่ต้องเติมตัวอย่างลงไป)

6. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในอาหารตัวอย่างได้

เส้นใยอาหาร (Crude fiber) เส้นใยอาหาร ทำการวิเคราะห์หาได้โดยนำตัวอย่าง (ถ้าสกัดไขมันออกไปแล้วจะทำการวิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น) มาทำการย่อยด้วยกรดและด่าง ส่วนที่เหลือหลังจากการย่อยนี้ก็เป็นเส้นใยอาหาร ซึ่งการวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (หรือใช้ตัวอย่างที่เหลือจากการหาไขมันในข้อ 2) ใส่ใน beaker สำหรับหา fiber

2. เติม 200 ml 1.25% Sulfuric acid แล้วทำการ reflux 30 นาที

3. นำส่วนที่ได้มากรองและล้างจนหมดกรด

4. นำมาเติม 200 ml 1.25% Sodium Hydroxide แล้ว reflux 30 นาที

5. นำมากรอง แล้วล้างจนหมดด่างด้วยน้ำอุ่น แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์

6. นำส่วนที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 100 °C

7. ชั่งหาน้ำหนักของ crude fiber ได้

เถ้า ปริมาณเถ้าในอาหารทำการวิเคราะห์หาโดยการนำตัวอย่างมาเผาที่ 450 °C 1 ชั่วโมงหรือจนตัวอย่างกลายเป็นเถ้าสีขาวหรือเทา ซึ่งการวิเคราะห์หาดำเนินการดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 2-10 กรัม ใส่ใน porcelain crucible ซึ่งอบแห้งที่ 450 °C 15 นาที และชั่งหาน้ำหนักไว้แล้ว

2. เผาตัวอย่างด้วย bunsen burner หรือเตาไฟฟ้า จนกระทั่งตัวอย่างเป็นสีดำและไม่มีควันออกมาอีก

3. นำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้เป็นเถ้าโดยเผาในเตาเผา (furnace) 450 °C 1 ชั่วโมง (หรือจนกระทั่งตัวอย่างเป็นสีขาวหรือเทา)

4. ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่ง ก็จะคำนวณหาปริมาณเถ้าในอาหารได้

คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน 100 กรัมของตัวอย่าง หาได้โดยคิดจากการหักลบค่า ความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใยอาหาร และเถ้าออกจาก 100

การแยกโปรตีน

การแยกโปรตีนทำโดยนำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Moulinex) แบ่งมาสกัดแยกโปรตีนโดยวิธีต่อไปนี้

แยกโปรตีนโดยการปรับ pH นำตัวอย่างพืชที่บดแล้วมา 100 กรัม เติมน้ำ 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1N NaOH จนได้ pH 9 ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นครั้งคราวนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้มาปรับ pH เป็น 4 นำมาเข้า

เครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกมา นำสารละลายส่วนบนมาปรับ pH ให้เป็น 5 แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ตะกอนที่ได้รวมกันแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C (Rahma and Narasinga Rao, 1979)

แยกโปรตีนด้วยความร้อน (Telek and Graham , 1983) นำตัวอย่างพืชที่บดแล้ว 100 กรัม เติมน้ำ 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงโดยเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่กรองได้มาต้มที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 30 นาที โปรตีนก็จะตกตะกอน แยกโปรตีนออกโดยนำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ตะกอนที่ได้นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C จนแห้ง

แยกโปรตีนด้วยแคลเซียมซัลเฟต (Telek and Graham , 1983) นำตัวอย่างพืชที่บดแล้ว 100 กรัม เติมน้ำ 600 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง สารละลายที่กรองได้นำมาต้ม 3 นาที แล้วเติมแคลเซียมซัลเฟต 1 กรัม ต่อสารละลายที่กรองได้ 100 กรัม วางทิ้งไว้ 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกมานำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 70 °C

การวิเคราะห์หาปริมาณ Mimosine (Matsumoto and Sherman, 1951)

Mimosine ทำการวิเคราะห์โดยวัดการดูดกลืนแสงของ Mimosine-ferric chloride หลังจากที่ได้แยกสารที่จะรบกวนออกไปแล้วด้วยคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) โดยดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1 ชั่งตัวอย่าง 1.25 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร

2 เติม 0.1N HCl 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) นาน 1 ชั่วโมง

3 ปล่อยไว้ให้เย็นแล้วถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้ววางไว้ให้ตกตะกอน

4 ปิเปตต์สารละลายส่วนบนมา 10 มิลลิลิตรใส่ใน beaker ขนาด 150 มิลลิลิตรซึ่งมีคาร์บอนกัมมันต์อยู่ 30 มิลลิกรัม เติมน้ำจนได้ปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา แล้วต้มนาน 15 นาที

5 นำมากรองด้วย fritted-glass crucible ล้างตะกอนด้วย 0.1 N HCl 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำ 2-3 มิลลิลิตร 5 ครั้ง

6 เก็บสารละลายที่กรองได้รวมทั้งน้ำล้างใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 0.5 % Ferric chloride ใน 0.1 N HCl 4 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

7 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 nm. แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นของ mimosine จากกราฟมาตรฐาน

8 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1 ชั่ง Mimosine 0.1000 กรัม ละลายใน 0.1 N HCl ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

2 ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานมา 1,2,3,4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

3 แต่ละ flask เติม 0.1 N HCl 10 มิลลิลิตร และ 0.5% Ferric chloride 4 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 nm. ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer (Unican SP. 1800.)

การวิเคราะห์ไฟเตต (Wheelor and Ferrel, 1971; Ranhotra et al. 1974)

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดจนสามารถผ่านแร่ง # 40 ได้ ประมาณ 1-5 กรัม (ประมาณให้มีไฟเตต 5-30 มก.) ใส่ใน flask ขนาด 125 มล.

2. เติม 3% Trichloroacetic acid (TCA) 50 มล. เขย่านาน 30 นาที

3. นำตัวอย่างไป centrifuge นำสารละลายชั้นบนมาวัดปริมาตรและปิเปตต์มา 10 มล. ใส่ใน conical centrifuge tube

4. เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (มีเหล็กในรูปเฟอร์ริก 2 มก. ใน 3% Trichloroacetic acid 1 มล.) 4 มล.

5. นำสารละลายที่ได้มาต้มบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) 45 นาที (ถ้าสารละลายส่วนบนยังไม่ใสหลังจากต้มไปแล้ว 30 นาที ให้นำมาเติม 3% Sodium

sulpate ใน 3% TCA 1-2 หยด แล้วต้มต่อไป)

6. นำสารละลายมา centrifuge 10-15 นาที แล้วค่อย ๆ เทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้งไป

7. ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 3% TCA 2 ครั้ง โดยใช้ 3% TCA ครั้งละ 20-25 มล. ต้มบนเครื่องอังน้ำ 5-10 นาที แล้ว Centrifuge แล้วล้างตะกอนอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น

8. นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำ 1-2 มล. และ 1.5 N. NaOH 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำให้สารละลายทั้งหมดมีปริมาตรประมาณ 30 มล. แล้วนำไปต้มบนเครื่องอังน้ำ 30 นาที

9. นำสารละลายมา centrifuge เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งไป แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 50 มล.

10. นำตะกอนที่ได้มาเติมกรดไนตริกเข้มข้น 4 มล. ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง แล้วนำมาอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น

11. นำสารละลายที่ได้มาใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มล. แล้วเติมน้ำให้ครบ 25 มล.

12. เก็บสารละลายที่ได้ในขวด polyethylene ก่อนจะนำไปวัดหาปริมาณเหล็กด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA-650) ปริมาณเหล็กที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณไฟเตตได้โดยใช้อัตราส่วนเหล็ก 4 อะตอมต่อไฟเตต 1 โมเลกุล

วิธีวิเคราะห์ Trypsin inhibitor activity (Kakade et al. 1974)

1 การเตรียม Tris-buffer (0.05M pH 8.2)

ละลาย tris (hydroxymethylamino methane) 6.05 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) 2.94 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.2 แล้วเติมน้ำให้เป็น 1 ลิตร

2 เตรียมสารละลาย substrate BAPA

ละลาย benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPA) hydrochloride 40 มิลลิกรัม ใน dimethyl sulfoxide 1 มิลลิลิตร แล้วเติม

tris-buffer ซึ่งอุ่นที่ 37 °C ให้เป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง และขณะที่ใช้ต้องเก็บที่ 37 °C

3 สารละลาย Trypsin

ละลาย trypsin 4.0 มิลลิกรัมใน 0.001 M HCl 200 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ถ้าเก็บในตู้เย็นสามารถเก็บไว้ใช้ได้ 2-3 สัปดาห์)

4 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดมาประมาณ 1 กรัม แล้วสกัดด้วย 0.01 N NaOH 50 มิลลิลิตร 1 ชั่วโมง pH ของสารละลายแขวนนี้ควรอยู่ระหว่าง 9.5-9.8 (ถ้า pH ต่ำกว่า 8.4 จะต้องสกัดใหม่ โดยใช้สารละลาย NaOH ที่เข้มข้นมากขึ้น)

5 วิธีทำ

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ 0.4, 0.6, 1.0, 1.4 และ 1.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำให้เป็น 2.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย trypsin หลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดไปวางในเครื่องอังน้ำที่ 37 °C เติมสารละลาย BAPA ลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร จับเวลา เมื่อครบ 10 นาที นำมาเติม 30% acetic acid หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา กรองสารละลายในแต่ละหลอดด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 3) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่กรองได้ ที่ 410 nm. เปรียบเทียบ reagent blank

Reagent blank เตรียมโดยใช้สารละลาย Trypsin 2 มิลลิลิตร และน้ำ 2 มิลลิลิตร เติม 30% acetic acid 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลาย BAPA 5 มิลลิลิตร

ถ้าตัวอย่างดูดกลืนแสงที่ 410 nm. ก็ให้เตรียม Sample blank โดยปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย BAPA 5 มิลลิลิตร วางในเครื่องอังน้ำที่ 37 °C นาน 10 นาที เติม 30% acetic acid 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย trypsin 2 มิลลิลิตร

การแสดง activity ของเอนไซม์ Trypsin inhibitor activity จะวัดออกมาเป็นหน่วย trypsin units inhibited (TIU) 1 TIU มีค่าเท่ากับค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm. ที่เพิ่มขึ้น 0.01

การวิเคราะห์ปริมาณฮีแมกกลูตินิน (Chen et al., 1977)

1 การเตรียมตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาประมาณ 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6.8 20 มิลลิลิตร นำมาแช่ย่าในเครื่องแช่ย่านาน 2 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส นำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 2) สารละลายที่กรองได้นำไปทดสอบหาปริมาณฮีแมกกลูตินิน

2 การเตรียม 4% Red Blood Cell Suspension (Liener and Hill 1955)

นำเลือดคนไทยหมู่โอที่ได้รับจากสภากาชาดไทยมาเตรียมให้เป็น 4% Red blood cell suspension โดยนำเลือดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ผสมกับ Alsever's solution (เตรียมโดยละลาย glucose 2.05 กรัม ,Tri-sodium citrate 0.8 กรัม Monosodium phosphate 0.055 กรัม และ Sodium chloride 0.42 กรัม ในน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.1 โดยใช้ 10% citric acid แล้ว sterile ที่ความดัน 15 ปอนด์นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บในตู้เย็น) 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม saline solution อีก 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดน้ำยาทิ้งไป 1.0 มิลลิลิตร จะได้ Red blood cell suspension 10.0 มิลลิลิตร นำมาเติม 0.1% Trypsin solution 1.0 มิลลิลิตร แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที นำมาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 10 นาที รินน้ำใสด้านบนของเหลวทดลองทิ้งไป ล้างตะกอนด้วย saline solution ครั้งละ 5.0 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ตะกอนที่ได้คือเม็ดเลือดแดง แบ่งตะกอนมา 0.4 มิลลิลิตร เติม Phosphate buffer soline pH 7.2 ให้ได้ปริมาตรเป็น 10.0 มิลลิลิตร เม็ดเลือดแดงที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน

การวิเคราะห์หาปริมาณฮีแมกกลูตินิน

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มา 75 ไมโครลิตร ใส่ใน Microtitration multi-well plate 1 หลุม เติม PBS pH 6.8 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตต์ส่วนผสมใส่ในหลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 ของอีกแถวหนึ่งหลุมละ 50 ไมโครลิตร เติม PBS pH 6.8 อีก 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตต์ส่วนผสมที่ได้จากหลุมที่สอง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่สาม เติม PBS pH

6.8 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 3 ผสมให้เข้ากัน ปิเปตต์ส่วนผสมจากหลุมที่ 3 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 4 แล้วทำการเจือจางแบบเดียวกับข้างต้น ทำเช่นนี้จนถึงหลุมที่ 12 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างในหลุมแรกเบ็น 2 เท่าของหลุมถัดไป ทำ Blank ในทำนองเดียวกันกับข้างบน 2 หลุม แต่ใช้ PBS pH 6.8 50 ไมโครลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง ปิด plate ให้สนิทด้วย acetate plate sealers เคาะ plate เบา ๆ ที่ด้านข้างเพื่อให้ของเหลวผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง

การอ่านผลโดยการดูลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่ตกอยู่ที่ก้นหลุมจากที่วางทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง ดังนี้

ก. ถ้าเห็นเม็ดเลือดแดงรวมกันเป็นจุดหรือเป็นวงแหวนเล็ก ๆ อยู่ก้นหลุม แสดงว่าเป็น Negative ซึ่งจะเหมือนกับ Blank เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเม็ดเลือดแดงกระจายทั่วไป

ข. ถ้าเห็นเม็ดเลือดแดงแผ่เป็นแผ่นอยู่ก้นหลุม แสดงว่า Positive เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเม็ดเลือดแดงจับกันเป็นกลุ่ม

ในการคำนวณปริมาณฮีแมกกลูตินิน จะกำหนดให้หลุมที่เจือจางที่สุดที่ให้ผล Positive มีปริมาณฮีแมกกลูตินินเท่ากับ 1 Unit และหลุมที่มีความเข้มข้นถัดขึ้นไปคิดเป็น 2 Unit และ 4 Unit ตามลำดับ

การวิเคราะห์กรดอะมิโน (Moore and Stein , 1963)

1 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดให้มีปริมาณโปรตีน 100 มก. ใส่ใน Bombelroll tube ขนาด 200 มล. เติม 6 N HCl จนครบ 50 มล. ปิดให้สนิทแล้วนำไปย่อยใน autaclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 4 ช.ม. แล้วนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็น

2 นำ Hydrolyzate มา 2.5 มล. ระเหยกรดเกลืออกด้วยเครื่อง Vacuum Rotary Evaporator จนแห้ง ละลายตะกอนที่เหลือด้วย Sodium citrate buffer pH 2.2 จนครบปริมาตร 50 มล.กรอง Hydrolyzate และนำสารละลายมาวิเคราะห์หาส่วนประกอบกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino Analyzer (Hitachi Perkin Elmer)

3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Cystine ทำโดยชั่งตัวอย่างประมาณ

0.01-0.05 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มล. เติมกรด performic ที่เย็นจัด 2 มล. ผสมตัวอย่างให้เข้ากับกรด ปิด flask และตั้งทิ้งไว้ค้างคืนในที่เย็นจัด (เตรียมกรด performic โดยผสมกรด formic 9 ส่วนกับ H_2O_2 1 ส่วน ที่อุณหภูมิห้องตั้งทิ้งไว้ 1 ช.ม. แล้วเก็บไว้ในที่เย็นจัด)

ถ่ายตัวอย่างใส่ใน Bombelroll tube ขนาด 25 มล. ล้าง flask ด้วย 10 มล. 6 N HCl ปิดจุกนำไปย่อยใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 6 ช.ม. แล้วทิ้งให้เย็น

นำตัวอย่างที่ได้มาระเหยให้แห้งใน Vacuum Rotary Evaporator แล้วละลายตะกอนด้วย sodium citrate buffer pH 2.2 จนครบปริมาตร 25 มล. กรองและนำสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณของ Cystine ด้วยเครื่อง amino acid analyzer

ค่า Amino Acid Score ของกรดอะมิโนจำเป็นคำนวณได้จากส่วนประกอบของกรดอะมิโนดังนี้

$$\text{Amino Acid Score} = \frac{\text{mg of an amino acid in 1 g test protein X 100}}{\text{mg of the amino acid in 1 g reference protein}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของการวิจัย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพืชที่ใช้แต่ละตัวได้แสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตารางที่ 1 แสดงถึงองค์ประกอบของพืชในตัวอย่างที่อบแห้ง 100 กรัม ซึ่งพบว่าในตัวอย่างแห้ง 100 กรัม ใบกระถินจะมีโปรตีนสูงถึง 44.44 % ส่วนเมล็ดพักทอง เมล็ดกระถิน และเมล็ดมะขามมีโปรตีน 31.70 % , 26.64 % และ 12.88 % ตามลำดับ ส่วนไขมันจะพบสูงสุดในเมล็ดพักทองคือมีถึง 39.83 % ส่วนใบกระถินมีไขมันน้อย คือพบมีเพียง 1.96 % สำหรับเส้นใยอาหาร (crude fiber) ก็พบมากในเมล็ดพักทองคือมีถึง 21.97 % รองลงมาได้แก่ เมล็ดกระถินซึ่งมี 11.56 %

ตารางที่ 2 เป็นองค์ประกอบของพืชเมื่อคำนวณเป็นส่วนประกอบใน 100 กรัมของน้ำหนักสด ซึ่งพบว่าเมื่อเทียบส่วนในน้ำหนักตัวอย่างสดนี้ เมล็ดพักทองมีโปรตีนสูงสุด คือมีถึง 29.04 % ส่วนเมล็ดมะขามมีเพียง 1.35 % ปริมาณไขมันก็มีสูงสุดในเมล็ดพักทองคือมีถึง 36.61 % ส่วนในเมล็ดกระถิน ใบกระถิน และเมล็ดมะขามมีไขมัน 3.79 % , 0.37 และ 0.32 % ตามลำดับ จากค่าปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร และเถ้า ที่วิเคราะห์ได้เมื่อนำมาหักออกจาก 100 ก็เป็นค่าของคาร์โบไฮเดรตซึ่งพบว่าในเมล็ดกระถินมีคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 48.52%ส่วนในใบกระถิน เมล็ดมะขาม และเมล็ดพักทองมีคาร์โบไฮเดรต 7.55 % , 7.72 % และ 0.39 %ตามลำดับ

เมื่อนำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียดแล้วแยกโปรตีนออกมา โดยวิธีใช้ความร้อนหรือปรับ pH หรือใช้ตกตะกอนด้วยแคลเซียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนที่แยกออกมาได้หรือโปรตีนไอโซเลต (Protein isolate) ที่แยกจากเมล็ดพักทอง ใบกระถิน และเมล็ดกระถิน แสดงในตารางที่ 3 ส่วนการแยกโปรตีนจากเมล็ดมะขามนั้นได้พยายามแกะเปลือกออกจากเมล็ดมะขาม โดยแช่เมล็ดมะขามใน 1N HCl 2 คืน แล้วแช่น้ำอีก 1 สัปดาห์จึงสามารถแกะเปลือกออกได้ หลังจากนั้นจึงเอาเมล็ดมะขามมาบดแล้วนำมาสกัดโปรตีน เมื่อนำเมล็ดมะขามมาแช่น้ำ ปรากฏว่าสารละลายที่ได้จะเหนียวมาก ไม่สามารถแยกโปรตีนออกมาได้

สำหรับโปรตีนไอโซเลตที่แยกได้จากเมล็ดพักทอง เมล็ดกระถิน และใบกระถิน ก็ได้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลต (ตารางที่ 3)

ปริมาณสารต้านโภชนาการที่ทำการศึกษาในตัวอย่างคือ มิโมซีน (Mimosine)

ไฟเตต (Phytate) ทริพซิน อินฮิบิทเตอร์ (Trypsin inhibitor) และฮีแมกกลูตินิน ได้แสดงในตารางที่ 4 และ 5 ในเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง ตรวจไม่พบมิโมซีน ทริพซินอินฮิบิทเตอร์ และฮีแมกกลูตินิน ตรวจพบเฉพาะไฟเตต (ตารางที่ 4) ในใบกระถินและโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินตรวจพบเฉพาะมิโมซีน และทริพซินอินฮิบิทเตอร์ (ตารางที่ 5) ส่วนในเมล็ดกระถินตรวจพบสารต้านโภชนาการทั้ง 4 ชนิด แต่ในโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินตรวจไม่พบฮีแมกกลูตินิน (ตารางที่ 5) ในเมล็ดมะขามตรวจพบไฟเตต ทริพซินอินฮิบิเตอร์ และฮีแมกกลูตินิน (ตารางที่ 6)

พบว่าปริมาณไฟเตตในโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทองต่ำกว่าเมื่อวิเคราะห์ทั้งเมล็ด เมื่อคำนวณปริมาณไฟเตตใน 100 กรัมของโปรตีนที่จะได้รับจากเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทองก็พบว่าไฟเตตในเมล็ดพักทองก็สูงกว่าในโปรตีนไอโซเลต (ตารางที่ 7)

ปริมาณมิโมซีน ไฟเตต และ Trypsin inhibitor ใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนที่แยกจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน เมื่อนำมาคำนวณต่อ 100 กรัมของโปรตีน (ตารางที่ 8) ก็พบว่าสารต้านโภชนาการเหล่านี้จะมีในใบกระถิน และเมล็ดกระถินมากกว่าในโปรตีนที่แยกมาได้

ปริมาณกรดอะมิโน (เป็นมิลลิกรัมต่อกรัม) ในเมล็ดพักทอง ใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตแสดงในตารางที่ 9,10 และ 11 ตามลำดับ ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัมโปรตีนตัวอย่างจากเมล็ดพักทอง ใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตแสดงในตารางที่ 12,13 และ 14 ตามลำดับ amino acid score โดยเทียบกับค่ามาตรฐานของ FAO/WHO 1973 ค่า amino acid score ของเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง แสดงในตารางที่ 15 ตารางที่ 16 และ 17 เป็นค่า amino acid score ของใบกระถิน โปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของพืชต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

พืช	โปรตีน (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	ไฟเบอร์ (กรัม)	เถ้า (กรัม)
ใบกระถิน	44.44	1.96	7.40	6.45
เมล็ดกระถิน	26.64	4.20	11.56	3.85
เมล็ดมะขาม	12.88	3.03	7.38	3.59
เมล็ดฟักทอง	31.70	39.83	21.97	6.08

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของพืชต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

พืช	ความชื้น (%)	โปรตีน (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	ไฟเบอร์ (กรัม)	เถ้า (กรัม)	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)
ใบกระถิน	81.04	8.42	0.37	1.40	1.22	7.55
เมล็ดกระถิน	9.74	24.04	3.79	10.43	3.48	48.52
เมล็ดมะขาม	89.45	1.35	0.32	0.78	0.38	7.72
เมล็ดฟักทอง	8.07	29.14	36.61	20.20	5.59	0.39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนไอโซเลต และปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จาก เมล็ดฟักทอง ใบกระถิน และเมล็ดกระถิน

ชนิดโปรตีนไอโซเลต	ปริมาณโปรตีนไอโซเลต (กรัม/100 กรัมวัตถุดิบ)	ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลต (กรัม/100 กรัม)
เมล็ดฟักทอง		
แยกโดยความร้อน	11.13	38.20
แยกโดยปรับ pH	12.42	38.16
แยกโดย $CaSO_4$	18.06	28.00
ใบกระถิน		
แยกโดยความร้อน	5.85	53.12
แยกโดยปรับ pH	11.24	53.90
แยกโดย $CaSO_4$	22.18	17.03
เมล็ดกระถิน		
แยกโดยความร้อน	10.09	60.06
แยกโดยปรับ pH	9.93	52.54
แยกโดย $CaSO_4$	11.73	49.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ปริมาณสารต้านโภชนาการในเมล็ดฟักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทอง

	ปริมาณมิโมซีน (%)	ปริมาณไฟเตต (%)	Trypsin inhibitor (TIU* / มก.)	Hemagglutinin activity (ยูนิต/กรัม)
เมล็ดฟักทอง	-**	1.84	-**	-**
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	-	1.36	-	-
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	-	1.32	-	-
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	-	1.30	-	-

*Trypsin units inhibited

** ตรวจไม่พบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ปริมาณสารต้านโภชนาการในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน

	ปริมาณมิโมซีน (%)	ปริมาณไฟเตต (%)	Trypsin inhibitor (TIU* / กรัม)	Hemagglutinin activity (ยูนิต/กรัม)
ใบกระถิน	2.09	-**	0.48	-**
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	2.42	-	0.17	-
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	2.25	-	0.53	-
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	0.78	-	0.06	-
เมล็ดกระถิน	3.70	0.15	1.71	5728
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	3.89	0.04	0.06	-**
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	3.77	0.01	0.24	-
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	2.02	0.03	0.06	-

* Trypsin unit inhibited

** ตรวจไม่พบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ปริมาณสารต้านโภชนาการในเมล็ดมะขาม

สารต้านโภชนาการ	ปริมาณสารต้านโภชนาการ
มิโมซีน (%)	-**
ไฟเตต (%)	0.02
Trypsin inhibitor (TIU/มก.)	0.84
Hemagglutinin activity (ยูนิต/กรัม)	294,400±550

** ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 7 ปริมาณไฟเตตต่อ 100 กรัมของโปรตีนในเมล็ดพักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง

	ปริมาณไฟเตต (กรัม/100 กรัมโปรตีน)
เมล็ดพักทอง	6.31
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	3.56
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	3.46
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	4.64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ปริมาณสารต้านโภชนาการต่อ 100 กรัมโปรตีนในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถิน

	มิโมซีน (ก./100 ก.โปรตีน)	ไฟเตต (ก./100 ก.กรัม)	Trypsin inhibitor ($\times 10^6$ TIU*/100 ก.โปรตีน)
ใบกระถิน	24.82	-**	5.70
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	6.34	-	0.45
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	5.89	-	1.39
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	2.78	-	0.21
เมล็ดกระถิน	15.39	0.62	7.11
โปรตีนไอโซเลตโดยความร้อน	6.48	0.07	0.10
โปรตีนไอโซเลตโดยปรับ pH	7.17	0.02	0.46
โปรตีนไอโซเลตโดย $CaSO_4$	4.12	0.06	0.12

* Trypsin unit inhibited

** ตรวจไม่พบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดฟักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทอง

กรดอะมิโน (มก./ก.ตัวอย่าง)	เมล็ดฟักทอง	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทองโดย		
		ความร้อน	pH	$CaSO_4$
กรดอะมิโนที่จำเป็น				
Histidine	8.39	9.03	7.90	6.70
Isoleucine	8.68	16.33	14.49	11.81
Leucine	15.93	30.49	27.54	22.25
Lysine	15.34	14.16	12.57	9.71
Methionine	5.42	10.04	9.17	7.08
Cystine	3.84	5.85	6.03	3.04
Phenylalanine	10.17	20.69	18.46	15.50
Tyrosine	21.15	12.94	11.48	9.26
Threonine	6.59	11.73	10.59	8.78
Tryptophan*	-	-	-	-
Valine	11.37	20.66	18.30	14.84
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น				
Alanine	10.55	18.17	16.64	13.33
Arginine	33.88	55.84	55.10	41.02
Aspartic acid	30.62	36.78	32.47	26.10
Glutamic acid	46.80	68.56	66.38	50.30
Glycine	27.38	18.11	16.60	12.97
Proline	8.16	15.82	13.79	10.79
Serine	12.62	19.49	17.43	14.93

*ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดอะมิโนในใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน

กรดอะมิโน (มก./ก.ตัวอย่าง)	ใบกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินโดย		
		ความร้อน	pH	$CaSO_4$
กรดอะมิดนที่จำเป็น				
Histidine	5.91	11.28	8.93	3.15
Isoleucine	13.33	24.90	20.61	7.40
Leucine	21.83	43.58	35.27	12.77
Lysine	16.16	35.35	27.37	7.68
Methionine	5.69	11.39	9.32	3.38
Cystine	4.69	6.48	8.09	1.88
Phenylalanine	12.54	25.41	20.21	7.23
Tyrosine*	9.01	19.28	17.53	5.75
Threonine	11.76	23.83	18.93	6.99
Tryptophan**	-	-	-	-
Valine	17.36	30.98	25.47	9.13
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น				
Alanine	14.63	28.57	22.94	8.36
Arginine	20.34	33.82	26.75	9.67
Aspartic acid	36.79	51.01	41.63	14.92
Glutamic acid	30.28	56.98	46.18	17.11
Glycine	15.37	24.89	21.11	7.59
Proline	12.87	20.08	19.58	6.69
Serine	12.89	26.13	20.35	7.87

* ค่าโดยประมาณเนื่องจากถูกรบกวนด้วยค่ามิโมซีนในตัวอย่าง

** ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 11 ปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน

กรดอะมิโน (มก./ก.ตัวอย่าง)	เมล็ดกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินโดย ความร้อน	pH	$CaSO_4$
กรดอะมิโนที่จำเป็น				
Histidine	9.17	18.00	14.37	13.55
Isoleucine	13.80	29.62	23.73	22.16
Leucine	23.26	55.49	44.28	42.00
Lysine	20.30	37.81	27.72	27.39
Methionine	5.04	10.25	8.22	7.86
Cystine	4.90	6.83	5.70	4.78
Phenylalanine	13.93	33.33	25.67	26.17
Tyrosine**	-	~26.95	~17.23	~18.26
Threonine	10.59	22.62	17.60	17.07
Tryptophan*	-	-	-	-
Valine	14.82	32.88	25.87	24.51
กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น				
Alanine	14.66	29.87	23.95	23.30
Arginine	34.24	61.69	50.79	48.73
Aspartic acid	43.88	65.04	52.47	50.79
Glutamic acid	54.64	111.99	87.95	88.34
Glycine	16.66	29.63	23.81	22.63
Proline	13.86	32.72	23.03	24.57
Serine	14.92	32.29	23.66	24.69

* ไม่ได้วิเคราะห์

** เป็นค่าประมาณเนื่องจากถูกรบกวนด้วยปริมาณมิโมซีนในตัวอย่าง

ตารางที่ 12 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัมโปรตีนจากเมล็ดฟักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทอง เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

กรดอะมิโนจำเป็น (มก./ก.โปรตีน)	โปรตีนมาตรฐาน FAO/WHO 1973	เมล็ดฟักทอง	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทองโดย		
			ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Histidine	-	26.46	23.63	20.70	23.93
Isoleucine	40	27.37	42.75	37.97	42.18
Leucine	70	50.25	79.82	72.17	79.46
Lysine	55	48.39	37.06	32.94	34.68
Methionine	35	17.10	26.29	24.03	25.29
Cystine		12.11	15.31	15.80	10.86
Phenylalanine	60	32.08	54.16	48.38	55.36
Tyrosine		66.72	33.88	30.08	33.07
Threonine	40	20.80	30.70	27.78	31.36
Tryptophan	10	-	-	-	-
Valine	50	35.88	54.08	47.96	53.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัมโปรตีนจากใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

กรดอะมิโนจำเป็น (มก./ก.โปรตีน)	โปรตีนมาตรฐาน FAO/WHO 1973	ใบกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินโดย		
			ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Histidine		13.30	21.23	16.57	18.50
Isoleucine	40	29.98	46.88	38.24	43.45
Leucine	70	49.11	82.04	65.44	74.99
Lysine	55	36.36	66.55	50.78	45.10
Methionine	35	12.30	21.44	17.29	19.85
Cystine		10.55	12.19	15.01	11.04
Phenylalanine	60	28.22	47.84	37.50	42.45
Tyrosine		20.27	36.29	32.52	33.76
Threonine	40	26.45	44.86	35.12	41.05
Tryptophan	10	-	-	-	-
Valine	50	39.05	57.32	47.25	53.61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นใน 1 กรัมโปรตีนจากเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถิน เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

กรดอะมิโนจำเป็น (มก./ก.โปรตีน)	โปรตีนมาตรฐาน FAO/WHO 1973	เมล็ดกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินโดย		
			ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Histidine	-	9.56	29.97	27.35	27.66
Isoleucine	40	51.85	49.32	45.16	45.23
Leucine	70	87.16	92.39	84.27	85.71
Lysine	55	20.30	62.95	52.76	55.91
Methionine	35	18.88	17.07	15.65	16.07
Cystine		18.35	11.36	10.86	9.24
Phenylalanine	60	14.52	55.49	48.86	53.41
Tyrosine		-	44.87	32.79	37.26
Threonine	40	39.66	37.66	33.51	34.83
Trystophan	10	-	-	-	-
Valine	50	55.52	54.75	49.24	50.03

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดฟักทอง และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทอง

กรดอะมิโน	เมล็ดฟักทอง	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดฟักทองโดย		
		ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Isoleucine	68.43**	106.88	94.93	105.45
Leucine	71.79	114.03	103.10	113.51
Lysine	87.98	67.38*	59.89*	63.31*
Methionine + cystine	83.46	118.86	113.80	103.29
Phenylalanine + tyrosine	164.67	146.73	130.77	147.38
Threonine	52.00*	76.75**	69.45**	78.40**
Valine	71.76	108.16	95.92	106.00

* First limiting amino acid

** Second limiting amino acid

ตารางที่ 16 Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน

กรดอะมิโน	ใบกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินโดย		
		ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Isoleucine	74.95	117.22	95.60	108.63
Leucine	70.16	117.20	93.49	107.13
Lysine	66.11*	121.00	92.33	82.00*
Methionine + cystine	66.71	96.08*	92.29**	88.26**
Phenylalanine + tyrosine	80.82	104.22	116.70	127.01
Threonine	66.13**	112.15	87.80*	102.62
Valine	78.10	116.64	94.50	107.22

* First limiting amino acid

** Second limiting amino acid

ตารางที่ 17 Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลต จากเมล็ดกระถิน

กรดอะมิโน	เมล็ดกระถิน	โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินโดย		
		ความร้อน	pH	$CaSO_4$
Isoleucine	129.63	123.30	112.90	113.08
Leucine	124.51	131.99	120.39	122.44
Lysine	36.91*	114.45	95.93	101.65
Methionine + cystine	106.40	81.23*	75.74*	72.23*
Phenylalanine + tyrosine	-	167.27	136.08	151.12
Threonine	99.15**	94.15**	83.78**	87.08**
Valine	111.04	109.50	98.48	100.06

*First limiting amino acid

** Second limiting amino acid

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

061265

ตารางที่ 18 ปริมาณกรดอะมิโนในใบกระถินเปรียบเทียบกับค่าที่มีรายงานไว้*

กรดอะมิโน (มก./ก.ตัวอย่าง)	การศึกษานี้	Thailand 1978 (ตากแห้ง)	Malawi 1979 (ตากแห้ง)	Malawi 1979 (อบแห้ง)
Histidine	5.91	4.0	5.4	5.7
Isoleucine	13.33	12.4	13.7	14.1
Leucine	21.83	16.0	21.7	24.2
Lysine	16.16	12.8	17.6	16.9
Methionine	5.69	2.3	4.6	4.6
Cystine	4.69	1.6	2.0	1.6
Phenylalanine	12.54	10.7	14.8	14.2
Tyrosine	9.01	8.1	12.5	11.7
Threonine	11.76	8.7	12.1	11.9
Tryptophan	-	2.4	3.8	3.3
Valine	17.36	10.1	14.1	13.0
Alanine	14.63	-	-	-
Arginine	20.34	10.2	15.1	15.8
Aspartic acid	36.79	-	-	-
Glutamic acid	30.28	-	-	-
Glycine	15.37	10.2	13.3	13.4
Proline	12.87	-	-	-
Serine	12.89	-	-	-
Mimosine	-	14.1	25.5	14.7

*D'Mello et al. 1980

การอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารพบว่าใบกระถิน เมล็ดกระถิน และเมล็ดพักทองมีปริมาณโปรตีนสูง คือมี 44.44 % , 26.64 % และ 31.70 % ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมล็ดมะขามมีโปรตีนเพียง 12.88 % ของน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณไขมันพบว่าเมล็ดพักทองมีไขมันสูงถึง 39.83 % ในขณะที่ใบกระถิน เมล็ดมะขามและเมล็ดกระถินมีไขมันเพียง 1.96 , 3.03 และ 4.20 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ปริมาณโปรตีนและไขมันในใบกระถิน และเมล็ดพักทองนี้ใกล้เคียงกับปริมาณที่รายงานไว้ในตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม ของกองโภชนาการ กรมอนามัย 2530 คือในกระถินลดปริมาณโปรตีนและไขมันตามรายงานของกองโภชนาการ เป็น 8.4% และ 0.2% ในการวิจัยนี้พบ 8.42 % และ 0.3 % ตามลำดับ ส่วนในเมล็ดพักทองแห้งตามรายงานของกองโภชนาการประกอบด้วย โปรตีน และไขมัน 29.4 % และ 40.4 % ในการวิจัยนี้พบ 31.70 % และ 39.83 % ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารอาหารในเมล็ดกระถิน และเมล็ดมะขามไม่มีในรายงานของกองโภชนาการ

การเตรียมโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง และใบกระถินพบว่าการแยกโปรตีนโดยใช้ความร้อนจะได้ปริมาณโปรตีนไอโซเลตต่ำสุด คือได้ปริมาณโปรตีนไอโซเลตเพียง 11.13 และ 5.85 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบที่ใช้ (ตารางที่ 3) ส่วนการแยกโปรตีนโดยการปรับ pH จะได้ปริมาณโปรตีนมากกว่าการใช้ความร้อน และปริมาณโปรตีนที่แยกได้ไม่แตกต่างกัน คือในเมล็ดพักทองได้โปรตีนไอโซเลต 12.42 % ส่วนในกระถินได้โปรตีนไอโซเลต 11.24 % การใช้แคลเซียมซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนจะได้ปริมาณโปรตีนไอโซเลตเพิ่มขึ้น แต่ปรากฏว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้จะมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการใช้ความร้อนหรือการปรับ pH (ตารางที่ 3) ทั้งนี้คงเนื่องจากมีแคลเซียมซัลเฟตปะปนมาในโปรตีนไอโซเลตที่ได้ ส่วนในเมล็ดกระถินการแยกโปรตีนไอโซเลตโดยใช้ความร้อน ปรับ pH และแยกด้วยแคลเซียมซัลเฟตจะได้ปริมาณโปรตีนไอโซเลตใกล้เคียงกัน ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแคลเซียมซัลเฟตก็มีปริมาณต่ำสุดเช่นกัน Telek และ Graham (1983) ก็มีรายงานไว้ว่าโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือจะมีไนโตรเจนต่ำ

จากตารางที่ 3 เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่สามารถสกัดออกมาได้ (% recovery) ปรากฏว่าทั้ง 3 วิธีคือการสกัดโดยความร้อน การปรับ pH และใช้แคลเซียมซัลเฟต จะให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่สกัดออกมาได้ดังนี้ เมล็ดพักทองได้ 13.40 % , 14.95 % และ 15.95 % ตามลำดับ ใบกระถินได้ 7.00 , 13.63 และ 8.50 % ตามลำดับ ส่วนในเมล็ดกระถินได้ 22.75 , 19.58 และ 21.56 % ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่สกัดออกมาได้นี้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้คงเนื่องจากการบดตัวอย่างในการทดลองนี้ใช้เครื่องบดเฟฟ้าธรรมดา จึงไม่สามารถทำให้เซลล์ของพืชแตกออกได้หมด มีรายงานว่าการจะสกัดโปรตีนออกมาจากพืชให้ได้ประสิทธิภาพ ปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งก็คือต้องทำให้ผนังเซลล์ของพืชแตกออก (Betschart and Kinsella, 1973) นอกจากนี้ชนิดของพืชก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดออกมาได้ เช่น โปรตีนไอโซเลตจาก Jerusalem Artichoke ได้เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่สกัดออกมาได้ 15-27 % ของโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ (Rawate and Hill , 1985) ในขณะที่โปรตีนไอโซเลตจาก Alfalfa ได้ปริมาณโปรตีนที่สกัดออกมาได้ถึง 60 % ของปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ (Betschart and Kinsella, 1973)

สำหรับเมล็ดมะขามได้พยายามแยกโปรตีนออกมา แต่ปรากฏว่าเมื่อนำเมล็ดมะขามที่บดแล้วมาแช่น้ำ ก็จะได้สารละลายที่เหนียวและข้นมาก ถึงแม้จะเพิ่มปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัด สารละลายที่ได้ก็ยังคงเหนียวข้นมาก ไม่สามารถจะแยกโปรตีนออกมาได้ ทั้งนี้คงเนื่องจากในเมล็ดมะขามมีโปรตีนต่ำ ขณะเดียวกันก็มี Polysaccharide ที่สามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำ และให้สารละลายซึ่งเหนียวและข้นมากถึงแม้ความเข้มข้นจะต่ำ (The Wealth of India , 1962) ทำให้ไม่สามารถแยกโปรตีนออกมาได้

สารต้านโภชนาการในเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง จะพบมีไฟเตตในปริมาณค่อนข้างสูง ในเมล็ดพักทองพบมีไฟเตต 1.84 % ส่วนในโปรตีนไอโซเลตการแยกโปรตีนโดยความร้อน หรือปรับ pH หรือใช้แคลเซียมซัลเฟตพบว่าปริมาณไฟเตตจะใกล้เคียงกันคือ 1.3 % ส่วนมิโมซีน ทริพซินอินฮิบิทเตอร์ และฮีแมกกลูตินิน ตรวจไม่พบ (ตารางที่ 4) ปริมาณไฟเตตในเมล็ดพักทองและโปรตีนไอโซเลต เมื่อนำมาคำนวณเป็นปริมาณไฟเตตต่อ 100 กรัม โปรตีนก็พบว่าปริมาณไฟเตตในโปรตีนไอโซเลตน้อยกว่าในเมล็ดพักทอง คือในเมล็ดพักทองมีไฟเตต 6.31 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน ส่วนในโปรตีนไอโซเลตโดยใช้ความร้อน ปรับ pH และใช้แคลเซียมซัลเฟตมีไฟเตต 3.56 ,

3.46 และ 4.64 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบและเมล็ดกระถินตรวจพบทั้งมิโมซีน และทริพซินอินฮิบิทเตอร์ ปริมาณมิโมซีนในใบกระถินพบมี 2.09 % ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่ D`Mello และคณะได้รวบรวมไว้ (D`Mello et al. 1980) คือ 1.41-2.55 % (ตารางที่ 18) ปริมาณมิโมซีนในเมล็ดกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินสูงกว่าในใบกระถิน และโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถิน (ตารางที่ 5) ปริมาณมิโมซีนในโปรตีนไอโซเลตโดยใช้ความร้อน และปรับ pH จะใกล้เคียงกับปริมาณมิโมซีนในวัตถุดิบ และในโปรตีนไอโซเลตโดยใช้แคลเซียมซัลเฟต พบว่าปริมาณมิโมซีนจะต่ำ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่าปริมาณมิโมซีนต่อ 100 กรัมของโปรตีน ก็พบว่าปริมาณมิโมซีนในวัตถุดิบคือในใบกระถิน และเมล็ดกระถินสูงกว่าในโปรตีนไอโซเลต (ตารางที่ 8) และโปรตีนไอโซเลตโดยใช้แคลเซียมซัลเฟตจะมีปริมาณมิโมซีนต่ำสุด

ปริมาณทริพซินอินฮิบิทเตอร์ในเมล็ดกระถิน (1.71 TIU/มก.) สูงกว่าในใบกระถินซึ่งพบ 0.48 TIU/มก. (ตารางที่ 5) แต่ปริมาณที่พบในกระถินนี้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับในถั่วเหลืองซึ่งมีรายงานพบสูงถึง 72-96 TIU/มก. (Kakade et al. 1974) ปริมาณทริพซินอินฮิบิทเตอร์ในโปรตีนไอโซเลตต่ำกว่าในวัตถุดิบ ยกเว้นโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินโดยการปรับ pH พบว่าทริพซินอินฮิบิทเตอร์สูงกว่าในใบกระถิน แต่เมื่อนำมาคำนวณเป็นปริมาณทริพซินอินฮิบิทเตอร์ต่อ 100 กรัมโปรตีน ก็พบว่าปริมาณทริพซินอินฮิบิทเตอร์ในโปรตีนไอโซเลตต่ำกว่าในวัตถุดิบ (ตารางที่ 8)

จากการวิเคราะห์พบว่าใบกระถินไม่มีไฟเตต แต่ในเมล็ดกระถินพบมีไฟเตต 0.15 % ส่วนในโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินพบมีไฟเตตเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 5) ปริมาณฮีแมกกลูตินินพบในเมล็ดกระถินสูงถึง 5728 ยูนิตต่อกรัม แต่ในโปรตีนไอโซเลตตรวจไม่พบฮีแมกกลูตินิน แสดงว่าขั้นตอนในการเตรียมโปรตีนไอโซเลตสามารถทำให้ฮีแมกกลูตินินลดลงได้ มีรายงานแสดงให้เห็นว่าการหุงต้มก็สามารถทำให้ฮีแมกกลูตินินในอาหารพวกถั่วลดลงได้ (Liener , 1962)

การวิเคราะห์กรดอะมิโนได้ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางศูนย์ฯยังไม่สามารถวิเคราะห์ Tryptophan ได้ ในรายงานนี้จึงไม่มีปริมาณ Tryptophan นอกจากนี้การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย Amino acid analyzer นี้ปรากฏว่า Chromatogram ของตัวอย่างใบกระถิน เมล็ดกระถิน และโปร

ตีนไอโซเลตจากใบกระถิน และเมล็ดกระถินจะมีปริมาณมิโมซีนรบกวนปริมาณของ Tyrosine ปริมาณของ Tyrosine ที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงเป็นค่าโดยประมาณ เมื่อนำปริมาณของกรดอะมิโนในใบกระถินมาเปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนในใบกระถินซึ่ง D`Mello และคณะ (1980) รวบรวมไว้ก็พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 18)

ปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้นำมาคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมกรดอะมิโนในโปรตีน 1 กรัม เพื่อนำไปคำนวณหาค่า Amino acid score ต่อไป ปริมาณกรดอะมิโนใน 1 กรัมโปรตีนไอโซเลตจะสูงกว่าในวัตถุดิบ โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทอง (ตารางที่ 12) ใบกระถิน (ตารางที่ 13) และเมล็ดกระถิน (ตารางที่ 14) จะพบว่ากรดอะมิโนในโปรตีนไอโซเลตโดยการปรับ pH จะมีค่าต่ำกว่าในโปรตีนไอโซเลตที่ได้โดยการให้ความร้อน หรือโดยใช้แคลเซียมซัลเฟต ทั้งนี้เนื่องจากในการตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH นี้จะมีกรดนิวคลิอิค (Nucleic acid) ตกตะกอนลงมาด้วย (Telek and Graham , 1983)

จากค่า Amino acid score พบว่าในเมล็ดพักทองและใบกระถินจะมีกรดอะมิโนจำเป็นเกือบทุกตัวต่ำกว่า 100 แสดงว่าโปรตีนในเมล็ดพักทองและในใบกระถินมีคุณภาพต่ำ ส่วนในเมล็ดกระถินจะมี Lysine และ Threonine ต่ำกว่า 100 ในโปรตีนไอโซเลตพบว่าค่า Amino acid score ของกรดอะมิโนจำเป็นเกือบทุกตัวสูงกว่าในวัตถุดิบ แสดงว่าการแยกโปรตีนออกมานี้ช่วยทำให้คุณภาพของโปรตีนไอโซเลตที่ได้ดีขึ้น โปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทองมี Lysine เป็น Limiting amino acid ดังนั้นถ้านำโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดพักทองมาบริโภค หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ก็ควรจะเติม Lysine ลงไปด้วย เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไอโซเลตที่ได้ ส่วนในโปรตีนไอโซเลตจากเมล็ดกระถินโดยวิธีต่าง ๆ มี Limiting amino acid ที่ต่างกันเล็กน้อย คือ ในโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากความร้อนมี Methionine เป็น Limiting amino acid ส่วนโปรตีนไอโซเลตโดยการปรับ pH และใช้แคลเซียมซัลเฟตมี Threonine และ Lysine เป็น Limiting amino acid ตัวแรก และมี Methionine เป็น Limiting amino acid ตัวที่สอง ส่วนโปรตีนไอโซเลตจากใบกระถินพบว่ามี Methionine เป็น Limiting amino acid ตัวแรก และมี Threonine เป็น Limiting amino acid ตัวที่สอง

อย่างไรก็ตามค่า Amino acid score นี้ก็เป็นเพียงการบอกคุณภาพของโปรตีนโดยประมาณเท่านั้น เนื่องจากการที่ร่างกายจะนำโปรตีนแต่ละชนิดไปใช้ประโยชน์ได้มากน้อยเพียงไรยังขึ้นกับปัจจัยอีกหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการย่อย (Digestibility) การดูดซึม และการนำโปรตีนไปใช้ในการเสริมสร้างร่างกาย ซึ่งถ้าจะสรุปให้ได้นี้ก็จำเป็นต้องศึกษาถึงความสามารถในการย่อยโปรตีน และศึกษาผลของโปรตีนนี้ต่ออัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง และภาวะสมดุลย์ของไนโตรเจน (Nitrogen balance) ในสัตว์ทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

จากการศึกษานี้พบว่าการแยกโปรตีนออกมาจากเมล็ดพักทอง ใบกระถิน และเมล็ดกระถิน โดยการตกตะกอนโปรตีนที่สกัดออกมาจากวัตถุดิบโดยใช้ความร้อน การปรับ pH และใช้แคลเซียมซัลเฟต จะได้โปรตีนที่มีคุณภาพดีขึ้น โปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนจะมีปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนสูงกว่าโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH หรือแคลเซียมซัลเฟต ขณะเดียวกันสารต้านโภชนาการคือมิโมซีน ไฟเตต ทริพซินอินฮิบิทเตอร์ และฮีแมกกลูตินินในโปรตีนที่สกัดออกมาก็ลดลงด้วยการแยกโปรตีนออกมาจึงช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

เพื่อเป็นการยืนยันคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไอโซเลต ควรได้มีการศึกษาคุณค่าทางชีวภาพของโปรตีนไอโซเลต คือศึกษาถึงความสามารถในการย่อยของโปรตีน (Protein digestibility) และการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยนำโปรตีนไอโซเลตที่ได้ไปผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงสัตว์ทดลอง แล้วดูประสิทธิภาพของโปรตีนในการเพิ่มน้ำหนักในสัตว์ทดลอง (Protein efficiency ratio) และภาวะสมดุลย์ของไนโตรเจน (Nitrog-en balance) ต่อไป

นอกจากนี้ในเมล็ดมะขามพบว่ามีสาร Polysaccharide ซึ่งสามารถกระจายตัวในน้ำเย็นได้ดี และให้ความเหนียวสูงถึงแม้จะมีความเข้มข้นต่ำ จึงน่าสนใจที่จะแยก Polysaccharide นี้ออกมาเพื่อนำมาใช้เป็นสารช่วยแขวนลอย (Suspending agent) ในอาหารและยาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

กองโภชนาการ กรมอนามัย 2530 ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทย ในส่วนที่กินได้ 100 กรัม โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก

วรนันท์ ศุภกาญน์ , ประพาศ งั่นบุญศรี , พงศ์ธร สังข์เผือก และธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ 2524-2526 **การศึกษาคุณค่าทางชีวภาพของโปรตีนจากพืช** รายงานเสนอคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

Betschart , A.B. and Kinsella , J.E. 1973. Extractability and solubility of leaf protein. **J. Agr. Food Chem.** 21. 60-65

Boland , A.r. de , Garner , G.B. and O`Dell , B.L. 1975. Indentification and properties of "Phytate"in Cereal Grains Oilseed Products. **J. Agr. Food Chem.** 23:1186-1189

Brune M., Rossander L. and. Hallberg L. 1989. Iron absorption no intestinal adaptation to a high-phytate diet. **Am. J. Clin. Nutr.** 49:542-5

Chen , L.H. , Thacker , R.R. and Pan , S.H. 1977. Effect of germination on hemagglutinating activity of pea and bean seeds. **J. Food Sci.** 42:1666-1668

Crounse R.G. , Maxwell J.D. and Blank , H. 1962. Inhibition of growth of hair by mimosine. **Nature** 194 : 694-695

D`mello, Felix, J.P. and Fraser K.W. 1980 The composition of leaf meal from Leucaena leucocephala. Trop. Sci. 23 (1) : 75-78

FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee, Energy and protein requirement, **WHO Tech. Rep. No. 522** , Geneva , Switzerland , 1973.

Gertler , A. 1967. A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and ethanol-extracted soybean meals in chicks and rats. **J. Nutr.** 91 : 358-370.

Hallberg L. Rossander L. and Skanberg A. 1987. Phytates and the

inhibitory effect bran on iron absorption in man. **Am. J. Clin. Nutr.** 45 : 988-996.

Hegarty , M.P., Chew. P.L. , Christie G.S. , Court R.D. and Haydock, K.P. 1979. The goitrogen 3-hydroxy-4 (1H) pyridone , a ruminal metabolite from Leucaena leucocephala : Effects in mice and rats. **Aust. J. Biol. Sci.** 32 : 27-40.

Hegarty M.P. , Court R.D. and Thorme P.M. 1964. The determination of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine in biological material Aust. **J. Agric. Res.** 15 : 168:179

Jaffe , W.G. 1980. Hemagglutinins (Lectins), in **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.** 2nd ed. pp. 73-102. Academic Press. N.Y.

Jaffe , W.G. and Gaede , K. 1959. Purification of a toxic phytohemagglutinin from black bean (Phaseolus vulgaris) **Nature** 183 : 182-183

Kakade , M.L. , Rackis , J.J. , McGhee , J.E. and Puski. G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chem.** 51 : 376-382

King , T.P. , Pusztai , A. and Clarke , E.M.W. 1980. Kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectin-induced lesions in rat small intestine 1. Light microscope studies. **J. Comp. Path.** 90 : 585-595.

Liener , I.E., 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. **Amer. J. Clin. Nutr.** 15 : 281-298

Liener, I.E. 1974. Phytohemagglutinins : Their nutritional significance. **J. Agr. Food Chem.** 22 : 17-22

Liener , I.E, 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility - A review. **J. Food Sci.** 41 : 1076-1081.

Liener , I.E. and Hill , E.G. 1955. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soybean and crude soybean extract. **Arch. Biochem. Biophys.** 54 : 223-231.

Liener , I.E. and Kakade , M.L. 1980. Protease inhibitors in **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.** 2nd ed Ed. Liener , I.E. , pp. 7-69 Academic press. N.Y.

Lonnerdal Bo , Bell J.G. , Hendrickx A.G. , Burns R.A. and Keen C.L. 1988. Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. **Am. J. Clin. Nutr.** 48 : 1301-1306

Manak , L.J. , Lawhon J.T. and Lusas , E.W. 1980. Functioning potential of soy , cottonseed , and peanut protein isolates produced by industrial membrane systems. **J. Food Sci.** 45 : 236-238.

Matsumoto H. and Sherman G.D. 1951 A rapid colorimetric method for the determination of mimosine. **Arch. Biochem. Biophys.** 33 : 195-200

Matsumoto H. , Smith E.G. and Sherman , G.D. 1951. The effect of elevated temperatures on the mimosine content and toxicity of Koa Haole. **Arch. Biochem. Biophys.** 33 : 201-211.

Megarrity R.G. 1978. An automated colorimetric method for mimosine in Leucaena leaves. **J. Sci. Food Agric.** 29 : 182-186.

Moore , S. and Stein, W.H. 1963. Chromatographic determination of amino acids by use of automatic recording equipment, in

Methods in Enzymology eds. colowick , S.P. and Kaphan. N.O., Academic Press, N.Y.

Nachbar , M.S. and Oppenheim , J.D. 1980. Lectins in the United states diet : a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. **Am. J. Clin. Nutr.** 33 : 2328-2345.

Oberleas D. 1973. Phytates, in **Toxicants Occuring Naturally in Foods** 2nd ed. p.363-371 National Academy of Sciences washington D.C.

Prigent , M.J. and Bourrillon , R. 1976. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with N blood group specificity from Vicia graminia seeds. Biochem. Biophys. Acta.b 420 : 112.

Pusztai , A., Clarke , E.M.W. and King T.P. 1979. The nutritional toxicity of phaseolus vulgaris lectins. Proc. Nutr. Soc. 38 : 115-121.

Rackis , J.J. , McGhee , J.E. , Gumbmann , M.R. and Booth , A.N. 1979. Effect of soy proteins containing trypsin inhibitors in long term feeding studies in rats. J. Am. Oil Chem. Soc. 56 : 162-167.

Rahma , E.H. and Narasinga Rao. M.S. 1979. Characterization of sunflower proteins. J. Food Sci. 44 : 579-582.

Ramhotra , G.S. , Laewe R.J. and Puyat L.V. 1974 Phytic acid in soy and its hydrolysis during breadmaking. J. Food Sci. 39 :1023-1025

Rawate , P.D. and Hill, R.M. 1985. Extraction of a high- protein isolate from Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus) tops and evaluation of its nutrition potential. J. Agric. Food

Chem 33:29-31

Rham , O. de and Jost, T. 1979 Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products. J. Food Sci. 44 : 596-600.

Serraino M., Thompson L.U. Savoie L. and Parent G. 1985. Effect of phytic acid on the in vitro rate of protein digestibility of rapeseed proteins and amino acids. J. Food. Sci. 50 : 1689-1692.

Simpsom , K.M. , Mosris E.R. and Cook J.D. 1981. The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. Am. J. Clin. Nutr. 34: 1469-1478.

Singh M. , and Krikorian A.D. 1982. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. J. Agric. Food Chem. 30 : 799-780.

Tan-Wilson , A.L. , Cosgriff , S.E. , Duggan , M.C. , Obach , R. S. and Wilson , K.A. 1985. Bowman-Birk proteinase isoinhibitor complements of soybean strains. J. Agric. Food Chem. 33 : 389-393.

Telek L. and Graham H.D. 1983. Leaf Protein Concentrates. AVI Publishing Co. Inc. Westport.

Thomson L.U. , Butlon , C.L. and Jenkins , D.J. 1987. Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. Amer. J. Clin. Nutr. 46 : 467-473.

Tontisirin , K. and Winidragoon P. 1984. Malnutrition as a Social Indicator. Nutrition Problems in Thailand. Faculty of Medicine , Ramathibodi hospital & Institute of nutrition , Mahidol University.

Ward K.A. and Harris R.L.N. 1976. Inhibition of wool follicle DNA synthesis by mimosine and related 4 (1H) pyridone. Aust. J. Biol. Sci. 29 : 189-196.

The wealth of india 1962. A Dictionary of Indian raw Meterials and Industrial Products, Council of scientific and industrial research, New Delhi.

Wheeler , E.L. and Ferrel , R.E. 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. Cereal Chem. 48 : 312-320.

Wilson , A. B. , King. T.P. , Clarke , E.M.W. and Pusztai , A. 1980. Kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectin-induced lesions in rat small intestine : 2 Microbiological studies. J. Comp. Path. 90 : 597-601.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย