บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ใช้ใบมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) พันธุ์ห้านาที (พันธุ์มันยอดแดง) จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกที่สะดวกในการจัดหาสำหรับผู้วิจัย อายุเฉลี่ยของใบมันอยู่ในช่วง 1-5 เดือน สภาพใบคลี่สมบูรณ์และแผ่ขยายเต็มที่ สีเขียวสด ไม่เน่าเสีย (ภาคผนวก ฉ) นำมาล้างน้ำสะอาด วางให้สะเด็ดน้ำ เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-7°C เป็นเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์ ก่อนใช้นำมาตัดก้านออกแล้วใช้แผ่นใบในการทดลอง

3.2 สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์	(A.R./commercial grade)
กรดบอริก	(A.R.)
กรดซัลฟูริก	(A.R.)
กรดไฮโดรคลอริก	(L.R.)
ปิโตรเลียมอีเธอร์	(A.R.)
เอธิลแอลกอฮอล์	(A.R.)
แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	(A.R.)
โปตัสเซียมไอโอไดด์	(A.R.)
ซิลเวอร์ไนเตรต	(A.R.)
โซเดียมคลอไรด์	(L.R.)
กรดไนตริก	(A.R.)
โปตัสเซียมไธโอไซยาเนต (potassium thiocyanate)	(A.R.)
กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 50%	(A.R.)

3.3 อุปกรณ์

การผลิตโปรตีนเข้มข้น

เครื่องสับ (chopper)	(Moulinex, T71)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า (basket centrifuge) (Heraeus, Varifuge F)
ตะแกรงขนาด 50 และ 325 เมช
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Heto, DT Hetotherm CB60-VS01)
เครื่องกวนแม่เหล็ก(magnetic stirrer) (Agimetic-N, P selecta CD700243)
เครื่องหมุนเหวี่ยง(centrifuge) (Heraeus, Varifuge K)
ตู้อบช่วงอุณหภูมิ 25-70°C (Memmert, B30)
เครื่องวัด pH (HORIBA, F-21)
เครื่องทำแห้งระบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) (FTS System, TD3DOT5000 FD2055 D0000 VP190D)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 3100 กรัม (Sartorius, A200S)
เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 3 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 2000 กรัม (Sartorius, 1518)
เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 5500 กรัม (Sartorius, 1907)
ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest1, Gerhardt KT 85)
ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet Apparatus)
เตาอบวิเคราะห์ความชื้น ช่วงอุณหภูมิ 0-250 °C (WTB Binder, E53)
เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Sartorius, MA30)
เตาเผาช่วงอุณหภูมิ 500-700 °C (Heatech, 4850-1)
ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์กรดไฮโดรไซยานิก (ภาคผนวก ค)
เครื่องวัด pH (HORIBA, F-21)
เครื่องเขย่า (shaker) (New Brunswick Scientific, Model G-33)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (Hettich Zentrifugen, D-78532)
เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Agimetic-N, P selecta CD700243)
เครื่อง Hand homoginizer (Ystral, GmbH 7801 Dottingen)
เครื่องตีไข่ (AIRLUX, Model No. HA-3127)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เป็น 2 ลักษณะดังนี้

- อบแห้งใบสดที่อุณหภูมิ 75°C นาน 24 ชั่วโมง (Lu and Kinsella, 1972) บดและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังต่อไปนี้

โปรตีน (Micro Kjeldahl, factor 6.25)	(A.O.A.C. 1995 - 978.04)
ไขมัน	(A.O.A.C. 1995 - 930.09)
เส้นใยหยาบ	(A.O.A.C. 1995 - 962.09)
เถ้า	(A.O.A.C. 1995 - 930.05)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

- ชั่งน้ำหนักใบสดที่ทราบปริมาณความชื้นแล้ว ประมาณ 10 กรัม ปั่นให้ละเอียดร่วมกับน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบได้แก่

กรดไฮโดรไซยานิก (HCN)	(A.O.A.C. 1995- 915.03B)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

3.4.2 การปรับสภาพใบมันสำปะหลังด้วยความร้อน

ให้ความร้อนแก่ใบมันสำปะหลังโดยนำใบที่ตัดเป็นชิ้นแล้วแช่ในน้ำกลั่นซึ่งแปรอุณหภูมิเป็น 30-60°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แปรเวลา 0-60 นาที ตามขั้นตอนในรูปที่ 3.1

ตัดใบตามขวางกว้างประมาณ 1-1.5 ซม.
วัดปริมาณความชื้นและโปรตีน

↓

แช่น้ำกลั่น อัตราส่วนใบ : น้ำ = 1 : 10
แปรอุณหภูมิของน้ำกลั่นเป็น 30 40 50 และ 60°C
และเวลาในการแช่เป็น 0 20 40 และ 60 นาที
โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

↓

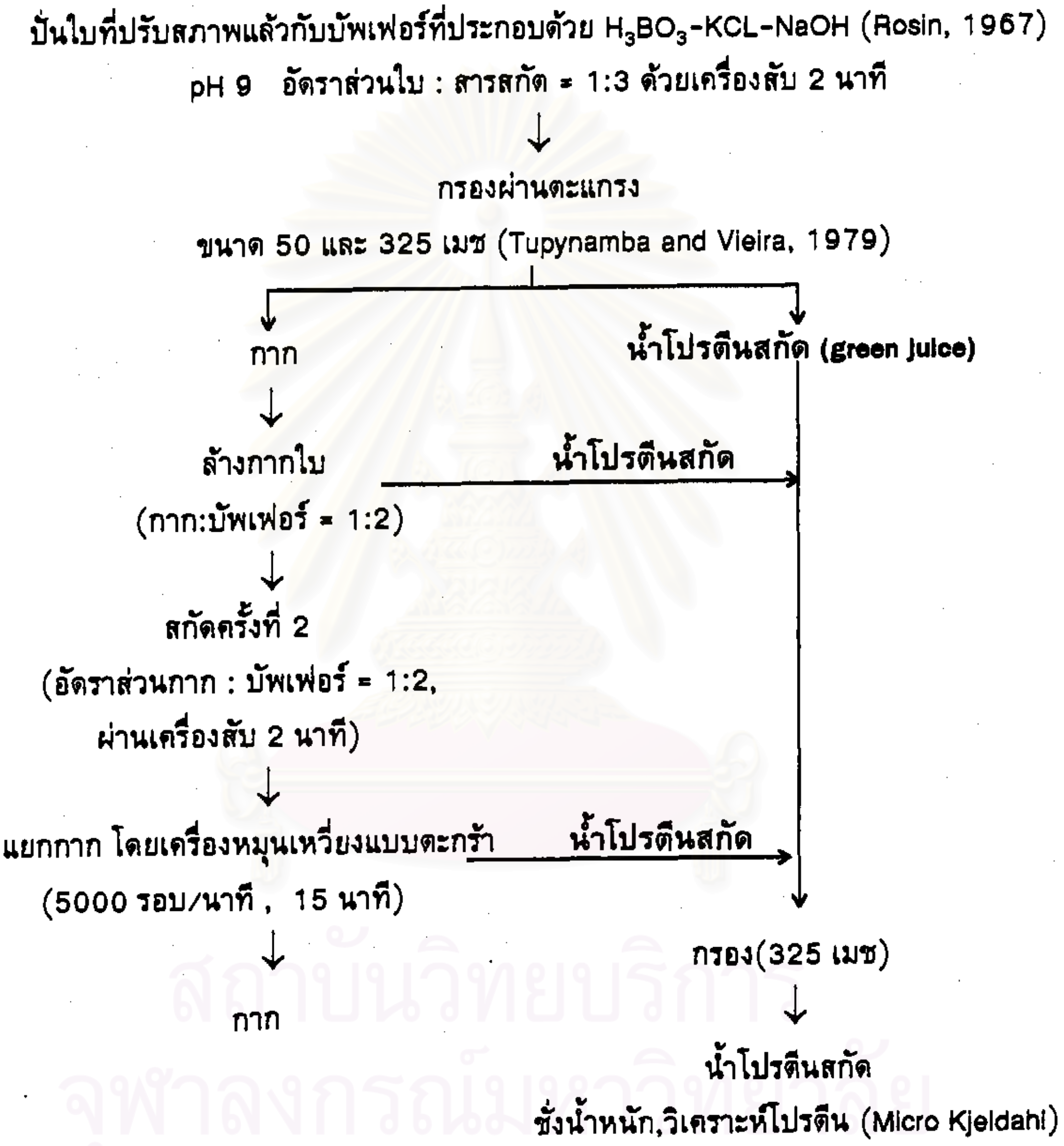
ทำให้เย็นโดยล้างน้ำที่อุณหภูมิห้อง

↓

กำจัดน้ำส่วนเกินจากการล้างด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า
5000 รอบ/นาที, 5 นาที ได้ใบที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

<u>รูปที่ 3.1</u> ขั้นตอนการปรับสภาพใบด้วยความร้อน

นำใบมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ไปสกัดให้ได้น้ำโปรตีนโดยปั่นใบมันสำปะหลังให้ละเอียดร่วมกับสารละลายบัพเฟอร์ที่มี pH 9 แยกส่วนกากออกไปเก็บส่วนน้ำโปรตีนสกัดไว้ ชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ขั้นตอนการสกัดแสดงในรูปที่ 3.2



<u>รูปที่ 3.2</u> ขั้นตอนการสกัดโปรตีน

ประเมินผลการปรับสภาพใบเพื่อเลือกภาวะที่เหมาะที่สุดที่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากค่า %protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำสกัด}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ}} \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Symmetric Factorial Design ขนาด 4 X 4 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.3 การปรับสภาพใบด้วยสารเคมี

แบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.4.3.1 การเลือกสารละลายที่ใช้แช่วัตถุดิบจากสารทั้ง 3 ชนิดได้แก่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4% โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05M และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05M เทียบกับการแช่น้ำกลั่น

การทดลองขั้นนี้ได้กำหนดชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีโดยอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยของ Kokta (1989) และ Chavan และคณะ (1979) กล่าวคือในงานวิจัยของ Kokta (1989) ได้ทดลองแช่ชิ้นส่วนเปลือกไม้ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับทำกระดาษในสารละลายหลายประเภทรวมทั้งโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชบวมและอ่อนนิ่มจนสามารถแยกเซลลูโลสออกมาได้อย่างสมบูรณ์และสะดวก แต่ความเข้มข้นสูงสุดของสารเคมีแต่ละชนิดที่ใช้ทำกระดาษคือ 4% ซึ่งสำหรับการนำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4% มาแช่ใบพบว่าลักษณะของใบจะคงสภาพปกติ และยังสามารถล้างสารละลายออกจากใบได้ง่าย สำหรับการแช่ใบในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 4% จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า pH ของสารละลายจะสูงมากถึงประมาณ 12-13 ทำให้ใบเหี่ยวและมีสีคล้ำลงมาก นอกจากนี้ยังล้างสารละลายออกจากใบได้ยากทำให้ใบเป็นเมือกลื่น ดังนั้นความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่จะนำมาเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ จึงอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยของ Chavan และคณะ (1979) ที่ได้ใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้แช่เมล็ด sorghum เพื่อปรับปรุงคุณภาพโปรตีน พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่เหมาะสมคือ 0.05M จึงได้นำสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4% โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05M และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05M มาทดลองแช่ใบมันสำปะหลังโดยพิจารณาที่ภาวะใกล้เคียงอุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาผลที่มีต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด

ขั้นตอนการปรับสภาพใบเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 แต่ใช้สารละลายทั้ง 3 ชนิดแช่ใบมันสำปะหลังโดยควบคุมอุณหภูมิสารละลายเป็น 30°C นาน 60 นาที จากนั้นนำใบที่ผ่านการแช่สารละลายแล้วไปสกัดโปรตีนตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

ประเมินผลการปรับสภาพใบเพื่อเลือกสารละลายที่เหมาะสมที่สุดที่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้นโดยพิจารณาจากค่า %protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำสกัด}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Completely Randomized Design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 4 ซ้ำ

3.4.3.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารที่เลือกได้

ปรับสภาพใบตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 แต่ใช้สารละลายที่เลือกได้จากข้อ 3.4.3.1 มาแปรความเข้มข้นในช่วงกว้าง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C นาน 60 นาที นำใบไปสกัดโปรตีนตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

ประเมินผลการปรับสภาพใบเพื่อเลือกความเข้มข้นของสารละลายช่วงที่เหมาะสม ซึ่งช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้นโดยพิจารณาจากค่า %protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำสกัด}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Completely Randomized Design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.3.3 การหาภาวะที่เหมาะสมเมื่อใช้สารละลายแปรร่วมกับอุณหภูมิและเวลา ในการปรับสภาพวัตถุดิบ

ปรับสภาพใบตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 โดยแปรความเข้มข้นสารละลายในช่วงที่เลือกได้จากข้อ 3.4.3.2 อุณหภูมิสารละลาย 30 40 และ 50°C เวลาในการแช่ 0-60 นาที แล้วนำไปสกัดโปรตีนตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

ประเมินผลการปรับสภาพใบเพื่อเลือกภาวะที่เหมาะสมที่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้นโดยพิจารณาจากค่า%protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำสกัด}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Asymmetric Factorial Design ขนาด 3 X 3 X 4 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.4 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ร่วมกับการปรับ pH ของน้ำโปรตีนสกัดจากใบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพทั้ง 2 วิธี จากข้อ 3.4.2 และ 3.4.3

แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน มีรายละเอียดดังนี้

3.4.4.1 การหา pH ที่โปรตีนในน้ำโปรตีนสกัดมีการละลายต่ำสุด

ตกตะกอนโปรตีนจากน้ำโปรตีนสกัดโดยปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากน้ำแยกส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเพื่อหาค่า %solubility ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ขั้นตอนการตกตะกอนจากวิธีของ Delaney (1977) แสดงในรูปที่3.3

น้ำโปรตีนสกัด

↓

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1N และ
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1N ให้ได้ pH 2-10

↓

กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก
(400 รอบ/นาที 30 นาที 25°C)

↓

หมุนเหวี่ยง (centrifuge) (6000 รอบ/นาที , 15 นาที)

↓ → ตะกอน

ส่วนใส

↓

กรอง (กระดาษกรอง Whatman No.2)

↓

ใช้น้ำกลั่นชะสารละลายออกจากกระดาษกรอง
แล้วปรับปริมาตรแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันเป็น 50 มล.

↓

หาปริมาณโปรตีน (Micro Kjeldahl)

<u>รูปที่ 3.3</u> ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเมินผลการปรับ pH ในการตกตะกอน เพื่อหา pH ที่โปรตีนในน้ำโปรตีนสกัดมีการละลายต่ำสุดโดยพิจารณาจากค่า % solubility ซึ่งคำนวณจาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนในส่วนใส}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในน้ำโปรตีน}} \times 100$$

3.4.4.2 การหาปริมาณกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสม เพื่อช่วยตกตะกอนร่วมกับการปรับ pH

เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ร่วมกับการปรับ pH ในการตกตะกอน โดยแปรปริมาณกลูตาราลดีไฮด์เข้มข้น 5.6M ตั้งแต่ 0-2.0% โดยปริมาตร แล้วปรับ pH ทันทีตามที่สรุปได้จากข้อ 3.4.4.1 แยกตะกอนออกมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 3.4

น้ำโปรตีนสกัด

↓

เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์เข้มข้น 5.6M แปรปริมาณเป็น

0 0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% โดยปริมาตร

↓

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1N และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1N

ให้ได้ pH ตามข้อ 3.4.4.1

↓

กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก 400 รอบ/นาที 30 นาที อุณหภูมิ 25°C

↓

เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 6000 รอบ/นาที 15 นาที อุณหภูมิ 4°C

→ ส่วนใส

↓

ตะกอน

↓

ล้างตะกอนด้วยน้ำที่มี pH ตามข้อ 3.4.4.1

↓

อบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C 24 ชั่วโมง

(Rys and Hanczakowski, 1990)

↓

บด

↓

ชั่งน้ำหนัก และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Micro Kjeldahl)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 3.4</u> ขั้นตอนการตกตะกอนโดยใช้กลูตาราลดีไฮด์ร่วมกับการปรับ pH

ประเมินผลการใช้กลูตาราลดีไฮด์ร่วมกับการปรับ pH เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโดยพิจารณาจากค่า % protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในผลิตภัณฑ์โปรตีนเข้มข้น}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำโปรตีนสกัดเริ่มต้น}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Completely Randomized Design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการผลิตโปรตีนเข้มข้นที่ประกอบด้วยการปรับสภาพใบและการตกตะกอนโปรตีนตามภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2-3.4.4

ผลิตโปรตีนเข้มข้นตามวิธีการปรับสภาพใบและการตกตะกอนจากข้อ 3.4.2 - 3.4.4 ประเมินประสิทธิภาพการผลิตโดยพิจารณาจากค่า % overall protein recovery ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในผลิตภัณฑ์โปรตีนเข้มข้น}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่มีในวัตถุดิบ}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี Completely Randomized Design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ทดลอง 4 ซ้ำ

3.4.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนเข้มข้น

ผลิตภัณฑ์โปรตีนเข้มข้นที่ใช้ในขั้นตอนนี้ผ่านการทำแห้งระบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์

- องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้แก่

โปรตีน (Micro Kjeldahl, factor 6.25)	(A.O.A.C. 1995 - 978.04)
ไขมัน	(A.O.A.C. 1995 - 930.09)

เส้นใยหยาบ (A.O.A.C. 1995 - 962.09)
เถ้า (A.O.A.C. 1995 - 930.05)
กรดไฮโดรไซยานิก (HCN) (A.O.A.C. 1995- 915.03B)
วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก)

- ปริมาณกรดอะมิโน (วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ง)

3.4.7 การวิเคราะห์สมบัติด้านการใช้งาน (functional properties) ของโปรตีนเข้มข้นจากใบมันสำปะหลัง

ผลิตโปรตีนเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 3.4.6 นำไปวิเคราะห์สมบัติด้านการใช้งานได้แก่

การละลาย (solubility) (Wang and Kinsella, 1976A)
ความหนาแน่น (bulk density) (Wang and Kinsella, 1976A)
การดูดซับน้ำ (water absorption) (Wang and Kinsella, 1976A)
การดูดซับน้ำมัน (fat absorption) (Wang and Kinsella, 1976A)
การเกิดอิมัลชัน (emulsifying activity) (Wang and Kinsella, 1976A)
เสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsion stability) (Wang and Kinsella, 1976A)
การขยายตัวของโฟม (foam expansion) (Tjahjadi, Lin and Breene, 1988)
เสถียรภาพของโฟม (foam stability) (Tjahjadi, Lin and Breene, 1988)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (วิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย