บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัย

1. การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวาและใบพืชน้ำอื่น 17 ชนิด

การสกัดโปรตีนจากใบพืช จะต้องวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบ โดยเฉพาะปริมาณโปรตีน (Gopal and Sharma, 1981) พืชที่จะใช้สำหรับเตรียม LPC ควรจะเป็นพืชที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การเลือกชนิดพืชเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาประการหนึ่งด้วย เพื่อลดต้นทุนการผลิต (Gerloff et al., 1965)

ในการศึกษานี้ เก็บตัวอย่างผักตบชวาและพืชน้ำอื่น 17 ชนิด ที่ขึ้นอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำเดียวกัน ยกเว้นกระถินไทยที่เป็นพืชบก ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในใบ เพื่อเปรียบเทียบดูว่า ผักตบชวามีปริมาณโปรตีนในใบมากน้อยเพียงใด ในการที่จะนำมาใช้สกัดโปรตีนและเตรียมเป็น LPC โดยใช้กระถินไทยเป็นพืชเปรียบเทียบเนื่องจากกระถินไทยเป็นพืชที่นิยมใช้เป็นอาหารโปรตีนสำหรับสัตว์ จึงเลือกใช้เป็นพืชเปรียบเทียบกับผักตบชวาและพืชน้ำอื่นทั้งหมด สำหรับใบผักตบชวาที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้ใบที่ 1 ถึง 5 ของแต่ละต้น เพื่อให้ได้ใบที่สมบูรณ์และมีอายุใกล้เคียงกัน จะได้มีความสม่ำเสมอตลอดการทดลอง

จากผลการศึกษาปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวาและใบพืชน้ำอื่น 17 ชนิด พบว่า ใบพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไป กระถินไทยมีปริมาณโปรตีนในใบ 26.81 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ผักบุ้งเป็นพืชชนิดเดียวที่มีปริมาณโปรตีนในใบสูงกว่ากระถิน คือ 29.36 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพืชทั้งหมด ส่วนพืชน้ำอื่นมีปริมาณโปรตีนในใบต่ำกว่ากระถิน แต่มีพืช 8 ชนิดที่มีปริมาณโปรตีนในใบสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ได้แก่ บัวหลวง โสน จอก ผักเป็ดน้ำ ผักตบชวา สาหร่ายหางกระรอก ไมยราพยักษ์ และไข่น้ำ เรียงตามปริมาณโปรตีนจากมากไปน้อย ตามลำดับ ซึ่ง Byers (1961) (อ้างถึงใน Nagy et al., 1978) กล่าวไว้ว่า พืชที่จะนำมาใช้เตรียม LPC ควรจะมีปริมาณโปรตีนในใบสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง พืชน้ำที่จะนำมาใช้เตรียม LPC น่าจะเป็นพืชที่มีใบลอยอยู่เหนือน้ำ เช่น ผักบุ้ง บัวหลวง โสน ไมยราพยักษ์ ผักเป็ดน้ำ ผักตบชวา เพราะใบของพืชเหล่านี้น่าจะสะอาดกว่าใบพืชที่อยู่ปริ่มน้ำ เช่น จอก ไข่น้ำ หรือใบพืชที่อยู่ใต้น้ำ เช่น สาหร่ายหางกระรอก ซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในน้ำ รวมทั้งไข่พยาธิ

อย่างไรก็ตาม แม้ผักบุ้งจะมีปริมาณโปรตีนในใบสูงที่สุด แต่เป็นพืชที่ต้องปลูกดูแลรักษาเพื่อที่จะนำมารับประทานเป็นผัก จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงไม่คุ้มค่าถ้าจะนำมาใช้เตรียมเป็น LPC ในขณะที่ผักตบชวา เป็นวัชพืชน้ำที่เจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์เร็วมาก จนก่อให้เกิดปัญหาต่างๆแก่แหล่งน้ำ เช่น ทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน กีดขวางการสัญจรทางน้ำ เป็นต้น รัฐต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากเพื่อจะควบคุมและกำจัดผักตบชวา แต่ผักตบชวาที่ถูกเก็บเกี่ยวขึ้นมา ไม่ค่อยถูกนำมาใช้ประโยชน์มากนัก ทั้ง ๆ ที่ผักตบชวามีความเหมาะสมที่จะเก็บเกี่ยวมาใช้ประโยชน์ได้มาก นอกจากผักตบชวาจะมีปริมาณมากมายในแหล่งน้ำ และพบหาได้ง่ายแล้ว ยังมีปริมาณโปรตีนในใบสูงถึง 22.61 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง ใกล้เคียงกับที่ Meksongsee (1983) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในใบผักตบชวาได้ 24.9 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ Meksongsee (1983) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนก้านใบ ส่วนใบและก้านใบของผักตบชวารวมกันได้ 11.3 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ส่วนแผ่นใบจะมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดเช่นเดียวกันกับที่ทิพย์วัลย์ คำเหมือง และคณะ (2530) วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของผักตบชวาและรายงานว่า โปรตีนในส่วนใบมีปริมาณมากกว่าในส่วนก้านใบ และราก คือมีโปรตีนในส่วนใบ 13.81 ถึง 19.63 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ในส่วนก้านใบ 6.50 ถึง 10.75 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และในส่วนราก 4.69 ถึง 7.12 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าใบผักตบชวามีความเหมาะสมขั้นต้นที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการเตรียมเป็น LPC ต่อไป อย่างไรก็ตาม พืชน้ำอื่น ๆในการศึกษานี้ที่มีปริมาณโปรตีนในใบสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ก็น่าจะมีการนำไปศึกษาในการเตรียมเป็น LPC ด้วย

2. การศึกษาการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากใบผักตบชวา

2.1 การศึกษารูปแบบในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน

ผักตบชวาเป็นพืชที่ยังไม่มีรายงานว่า มีการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนในรูปแบบใด จึงได้ศึกษาและพบว่า โปรตีนที่สกัดจากใบผักตบชวาจะตกตะกอนเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 และ 82 องศาเซลเซียส การตกตะกอนด้วยความร้อนนี้ ความร้อนจะไปมีผลทำให้แรงยึดเหนี่ยวของโมเลกุลโปรตีนต่อโมเลกุลน้ำลดน้อยลง โปรตีนจะละลายน้ำได้น้อยลง จนกระทั่งถึงจุดที่ไม่ละลายอย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการตกตะกอน โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะทำให้โปรตีนที่มี temperature stability ต่ำกว่าเสียสภาพธรรมชาติก่อน ส่วนโปรตีนที่มี temperature stability สูงกว่าจะยังคงสภาพธรรมชาติ และละลายอยู่ในสารละลาย เมื่อเพิ่มความร้อนเป็นอุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส โปรตีนที่มี temperature stability สูง จะเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้สามารถแยกโปรตีนต่างชนิดกันออกจากกันที่อุณหภูมิต่างกันได้ (Lehninger, 1977) green juice ที่ได้จากการปั่นในพืชซึ่งเติมน้ำและแยกเอากากออก จะมี

soluble protein ละลายอยู่ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะมีรงควัตถุและไขมันตกตะกอนลงมาปนกับ green protein ด้วย เมื่อแยกเอา green protein ออก จะเหลือ brown juice นำ brown juice มาให้ความร้อนที่ 64 องศาเซลเซียส จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ถ้าให้ความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส white protein จะตกตะกอนแต่เห็นตะกอนไม่ชัด ถ้าเติมเอธิลอัลกอฮอล์หรืออะซีโตนลงไปใน brown juice ตะกอนจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากเอธิลอัลกอฮอล์หรืออะซีโตนมีค่า dielectric constant น้อยกว่าน้ำ มีผลทำให้ความสามารถของการละลายในน้ำลดลง ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเป็นผลให้โปรตีนตกตะกอน (Lehninger, 1977)

การที่โปรตีนที่สกัดจากใบผักตบชวาตกตะกอน เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 82 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า ผักตบชวาเป็นพืชที่มีลักษณะการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนแบบ type II เพราะถ้าเป็นพืช type I จะตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องให้ความร้อน พืช type III จะตกตะกอนโปรตีนเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 64 องศาเซลเซียส และ 82 องศาเซลเซียส ส่วนพืช type IV จะไม่ตกตะกอนโปรตีน ไม่ว่าจะให้ความร้อนที่อุณหภูมิใดก็ตาม

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนและเตรียม LPC จากใบผักตบชวา

2.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน

การที่โปรตีนที่สกัดได้จากใบผักตบชวา สามารถตกตะกอนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 82 องศาเซลเซียส ได้โปรตีน 2 ชนิด ซึ่งเป็น fractionated LPC คือ green LPC และ white LPC ซึ่งมีประโยชน์มาก สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับคนได้ (Nagy, et al., 1978) ส่วนของ white LPC ที่ได้จากการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส จะไม่มีรงควัตถุปนอยู่ เนื่องจากถูกแยกออกไปอยู่ใน green LPC ที่ 55 องศาเซลเซียส แต่ white LPC ที่ได้มีปริมาณน้อยมาก คือน้อยกว่า green LPC ถึง 12 เท่า นอกจากนี้ ในการเตรียม white LPC ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คืออัลกอฮอล์หรืออะซีโตนในปริมาณมากช่วยในการตกตะกอน ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ไม่คุ้มค่ากับผลผลิตที่ได้ Telek และ Martin (1983) ทำการศึกษาและพบเช่นกันว่า การเตรียม white LPC จาก sorghum-sudan ไม่สามารถแยก white protein โดยใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว ต้องใช้อะซีโตนหรือเอธิลอัลกอฮอล์ ช่วยในการตกตะกอนโปรตีนด้วย นอกเหนือจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส แต่ก็ได้ white protein จำนวนน้อยมาก

ในขณะที่การเตรียม unfractionated LPC ซึ่งเป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียสทีเดียวแก่ green juice โดยไม่ได้แยกเอาตะกอนโปรตีนที่ 55 องศาเซลเซียสออกก่อน LPC ที่ได้จะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า green LPC แม้จะน้อยกว่า white LPC แต่เมื่อคิดเป็น protein yield unfractionated LPC จะมี protein yield มากที่สุด การเตรียม LPC แบบนี้ยังใช้เวลาน้อยกว่า เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการเตรียม fractionated LPC ด้วย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับที่ Chakrabarti(1985) ศึกษาการเตรียม LPC จากพืช 4 ชนิด คือ Allmania nodiflora , Mustard, Cabbage และ Hybrid napier และพบว่า การเตรียม unfractionated LPC ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสให้ protein yield สูงกว่า green LPC ที่ได้จากการตกตะกอนที่ 55 องศาเซลเซียส Woodham(1983) รายงานไว้ว่า การเตรียม LPC โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส ไม่ได้ทำให้ protein yield ลดลง โดยศึกษาในข้าวหลายชนิด ทำการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับที่ 80 องศาเซลเซียส พบว่า protein yield ที่ได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การใช้ความร้อนในการตกตะกอนโปรตีนนี้ ทำให้ได้ตะกอนขนาดใหญ่ และแยกออกง่าย (Pirie, 1971) และความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส ช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในสารละลายโปรตีน ในการศึกษานี้ จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.2 การศึกษาชนิดของสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

ในการสกัดโปรตีน โดยการปั่นให้เซลล์ใบพืชแตกออก จำเป็นต้องเติมสารสกัดลงไปด้วย เพื่อช่วยให้โปรตีนที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ละลายได้ดีขึ้น (Datta, 1966) จากผลการศึกษาพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (วัด pH ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้ 10.0) ให้ protein yield ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และให้ protein yield สูงกว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (วัด pH ของสารละลายได้ 6.0) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Datta (1966) ศึกษาการเตรียม LPC จากใบผักตบชวาพบว่าการสกัดโปรตีนโดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จะสกัดโปรตีนได้ดีกว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ Datta (1966) ไม่ได้วัด pH ของสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน จากผลการศึกษานี้ แม้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจะมีความเข้มข้นต่างกัน แต่ pH เท่ากัน ทำให้ protein yield ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ก็ให้ protein yield ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ให้ protein yield น้อยที่สุด โดยทั่วไป ถ้าความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 0.3 โมลาร์จะทำให้

เกิด salting out (Lehninger, 1977) ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (เข้มข้น 0.68 โมลาร์) มากพอที่ไอออนของเกลือจะแย่งโมเลกุลน้ำจากโปรตีน จนถึงสภาวะที่ปฏิกริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำเหลือน้อยกว่าปฏิกริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนจะจับตัวกันและตกตะกอนออกมาบางส่วน (Lehninger,1977) ตะกอนโปรตีนจะถูกกากดักจับเอาไว้ ทำให้ green juice ที่ได้มีโปรตีนเหลืออยู่น้อย เมื่อตกตะกอนโปรตีนจึงได้ protein yield น้อย ส่วนของกากที่ดักตะกอนโปรตีนไว้นี้ สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ (Heath, 1978)

ส่วนการใช้น้ำกลั่นที่ปรับ pH เป็น 6.5, 8.5 และ 10.5 เป็นสารสกัดในการสกัดโปรตีนพบว่าให้ protein yield แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ pH 8.5 ให้ protein yield มากที่สุด ที่ pH 10.5 ให้ protein yield รองลงมา ที่ pH 6.5 ให้ protein yield น้อยที่สุด แสดงว่า pH มีผลต่อการสกัดโปรตีน นอกเหนือจากชนิดของสารที่ใช้สกัด การใช้น้ำกลั่นที่ปรับเป็น pH 8.5 ให้ protein yield ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 , 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษานี้ จึงเลือกใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัดในการสกัดโปรตีน สำหรับการทดลองขั้นต่อไป เพราะเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำให้ได้ LPC ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าที่จะใช้โซเดียมคาร์บอเนต ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับวุฒิชัย นาครักษา (2526) ที่สกัดโปรตีนจากถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 1 โดยเปรียบเทียบชนิดของสารสกัดที่ใช้ ได้แก่ น้ำ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 นอร์แมล และสารละลายโซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 0.025 นอร์แมล พบว่าสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 นอร์แมล และน้ำสามารถสกัดโปรตีนออกจากถั่วเขียวได้มากที่สุด

2.2.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

ในขณะที่สกัดโปรตีนโดยปั่นใบผักให้เซลล์แตก จะมีกรดอินทรีย์ถูกปล่อยออกมาจากแวคิวโอลที่ถูกทำให้แตก ทำให้สารละลายเป็นกรดมากขึ้น และ pH ของสารละลายลดลง ทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลง (Betschart and Kinsella, 1973) ในช่วงระหว่างการสกัดโปรตีน จึงปรับ pH ให้คงที่ จากผลการศึกษาพบว่า การสกัดโปรตีนที่ pH 4 green juice ที่ได้จากการกรองซึ่งแยกเอากากออกแล้ว มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเขียวอ่อน เมื่อนำมาตกตะกอนโปรตีนโดยให้ความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส ไม่เห็นตะกอนเกิดขึ้น นำไปเหวี่ยงแยกตะกอน ได้ตะกอนน้อยมาก ไม่สามารถจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากที่ pH 4 ใกล้เคียงกับค่า isoelectric point(pI) ของโปรตีน ในขณะที่สกัดโปรตีนออกมาจากเซลล์ใบ โปรตีนออกมาอยู่ในน้ำกลั่นที่มี pH 4 จะตกตะกอนและปนอยู่ในกาก เมื่อกรอง ตะกอน

โปรตีนจะถูกกากดักจับเอาไว้ green juice ที่ได้จากการกรองจึงไม่มีโปรตีนละลายอยู่ เมื่อนำ green juice ไปให้ความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส จึงไม่มีการตกตะกอนโปรตีน

แต่ถ้าสกัดโปรตีนที่ pH สูงขึ้น โดยเฉพาะเป็นด่างมาก จะได้ protein yield สูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนละลายดีที่ pH เป็นด่าง (Lu and Kinsella, 1972) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับที่ Samson (1971) (อ้างถึงใน Lu and Kinsella, 1972) สกัดโปรตีนจากมะพร้าวด้วยสารสกัด และพบว่า ที่ pH สูง (เป็นด่างมาก) โปรตีนจะละลายได้มาก แต่จะเป็นที่ pH ใดขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย ดังเช่น Gheyassudin et al. (1970) (อ้างถึงใน Lu and Kinsella, 1972) สกัดโปรตีนจากเมล็ดทานตะวัน พบว่า ที่ pH 10 จะสกัดโปรตีนดีที่สุด Mehrotra et al.(1979) (อ้างถึงใน Srivastava and Singh, 1985) สกัดโปรตีนจากใบ Chenopodium album พบว่า เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัดที่ pH 7.7 จะสกัดโปรตีนดีที่สุด ในการศึกษานี้ ที่ pH 8.5, 9.0 และ 10.0 ให้ protein yield สูงที่สุด จึงเลือกสกัดโปรตีนที่ pH 8.5 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด

การใช้กรดช่วยในการตกตะกอนโปรตีนก่อนใช้ความร้อน ไม่เพียงแต่ช่วยให้โปรตีนตกตะกอนเท่านั้น แต่ช่วยให้ได้ตะกอนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และตกตะกอนเร็วขึ้น (Datta, 1966) นอกจากนี้ กรดยังช่วยกำจัดเอาสารพวกอัลคาลอยด์ หรือสารอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนออกไปจาก LPC ด้วย (Pirie, 1971)

จากการศึกษานี้พบว่า ที่ pH 2 โปรตีนตกตะกอนน้อยที่สุด คือละลายมากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ pH 3, 4 และ 5 ที่ pH 3 และ 5 โปรตีนตกตะกอนมากขึ้น ที่ pH 4 โปรตีนจะตกตะกอนมากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Makino และ Kayama (1985) ที่ศึกษาการเตรียม LPC จาก Trifolium repens พบว่า โปรตีนจะตกตะกอนมากที่สุดที่ pH 4 และจะตกตะกอนน้อยที่ pH 2 เนื่องจากที่ pH 4 ใกล้เคียงกับค่า pI ส่วนที่ pH 2 จะมีโปรตีนบางชนิดที่ละลาย การศึกษาของ Lu และ Kinsella (1972) ซึ่งทำการสกัดโปรตีนจาก alfalfa พบว่า โปรตีนละลายน้อยที่สุดในช่วง pH 3.5-4.5 โปรตีนจะมีการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อ pH มากกว่า 4.5 การศึกษาของ Betschart และ Kinsella (1973) ที่ทำการสกัดโปรตีนจากใบของ alfalfa, cowpea, peanut และ soybean พบว่าในช่วง pH 3.7-4.2 จะสกัดโปรตีนได้น้อยที่สุด ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับค่า pI ที่จุด pI โมเลกุลของโปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง เป็นผลให้แรง

ดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีมากกว่า โปรตีนจึงจับตัวกันและตกตะกอนออกมา ในการศึกษานี้จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2.5 การทำ LPC ให้บริสุทธิ์มากขึ้น

unfractionated LPC ที่เตรียมได้จากการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส จะมีรงควัตถุต่าง ๆ ปนอยู่ด้วย เช่น คลอโรฟิลล์ ทำให้ไม่ค่อยเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นอาหาร เช่น LPC ที่เตรียมจาก Sesbania grandiflora ที่ศึกษาโดย Mohan and Srivastava (1985) ในการเตรียม LPC จึงควรแยกเอารงควัตถุออก ในการศึกษานี้ใช้เอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์และอะซีโตน เป็นตัวทำละลายในการล้าง LPC เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่น พบว่า การใช้เอธิลอัลกอฮอล์และอะซีโตนเป็นตัวทำละลายในการล้าง LPC ทำให้ LPC มีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทำให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้น้ำกลั่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Datta (1966) ที่ศึกษาในผักตบชวา และยังทำให้ LPC มีสีอ่อนลง น่ารับประทาน เนื่องจากเอธิลอัลกอฮอล์และอะซีโตนไปช่วยล้างเอารงควัตถุและไขมันบางส่วนออก (Tasaki, 1985) ทั้งเอธิลอัลกอฮอล์และอะซีโตนจึงเป็นตัวทำละลายที่ดีที่จะใช้ล้างสีและกลิ่นออกจาก LPC แต่ถ้าใช้อะซีโตนล้าง LPC จะต้องใช้เอธิลอัลกอฮอล์ล้างอะซีโตนออกอีก การใช้เอธิลอัลกอฮอล์ล้าง LPC ช่วยทำให้ LPC แห้งง่ายขึ้น ช่วยทำให้ความสามารถในการถูกย่อย (digestibility) ของ LPC ดีขึ้น และช่วยล้างสารพิษออก เช่น สาร chlorophyllide และ pheophorbide ซึ่งเป็นสารประกอบที่สลายมาจากคลอโรฟิลล์ และเป็นสารที่มีพิษต่อสัตว์ (Tasaki, 1985) นอกจากนี้ เอธิลอัลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่ราคาถูกกว่าอะซีโตน ในการศึกษานี้ จึงเลือกใช้เอธิลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายในการล้างตะกอนโปรตีน สำหรับการทดลองขั้นต่อไป เพื่อทำให้ LPC มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

2.2.6 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ LPC แห้ง

LPC ที่เตรียมได้จำเป็นต้องทำแห้งเพราะจะเก็บรักษาได้ง่าย และขนส่งได้สะดวก นอกจากนี้ LPC แห้งมีความชื้นน้อย ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา (Pirie, 1971) จากการศึกษาการทำ LPC แห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และโดยการทำ freeze drying พบว่า ปริมาณโปรตีนใน LPC ที่ได้จากการทำแห้งด้วย 2 วิธีนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง Pirie (1971) กล่าวไว้ว่า การทำ LPC แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิน้อยกว่า 80 องศาเซลเซียส ไม่ได้มีผลทำให้คุณค่าทางโภชนาการของ LPC ลดลง ในการศึกษานี้ พบว่า LPC ที่ทำแห้งโดยวิธี freeze drying มีลักษณะเป็นผง อ่อนนุ่มกว่า สี

น้ำตาลอ่อนกว่า น่ารับประทาน แต่วิธีทำแห้งแบบนี้ ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก LPC ที่ผ่านการอบในตู้อบ มีลักษณะแข็งกระด้าง สีดำคล้ำ ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประกอบอาหาร ถ้าต้องการหลีกเลี่ยงปัญหาการที่ LPC มีลักษณะแข็ง สีดำ สามารถแก้ปัญหาได้โดยนำ LPC ไปบดจะได้เป็นผงสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายกับ LPC ที่ผ่านวิธีการทำ freeze drying (Arkcoll and Holden, 1973) ในการศึกษานี้ จึงเลือกวิธีการทำให้ LPC แห้ง โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบด LPC ให้ละเอียด

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของ LPC ที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสม ที่ผ่านการล้างด้วยเอธิลอัลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่นและ LPC ที่สกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet พบว่า LPC ที่ล้างด้วยเอธิลอัลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น แต่ปริมาณไขมันลดลง เมื่อเทียบกับ LPC ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น และถ้านำ LPC ที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสม มาสกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet LPC จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นอีก เนื่องจากเอธิลอัลกอฮอล์จะไปล้างเอารงควัตถุต่าง ๆ เช่น คลอโรฟิลล์ และสารที่ละลายในไขมันออกจาก LPC ทำให้ LPC มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ปริมาณโปรตีนจึงสูงขึ้น เช่นเดียวกันกับ LPC ที่สกัดไขมันออก สอดคล้องกับที่ Saito and Ohshima (1959) (อ้างถึงใน Tasaki, 1985) รายงานไว้ว่า เอธิลอัลกอฮอล์ จะช่วยล้างเอารงควัตถุและไขมันออกจาก LPC ของ red clover ทำให้มีความบริสุทธิ์ของโปรตีนใน LPC มากขึ้น และสอดคล้องกับที่ Galoppini and Fiolentini (1985) พบว่า ถ้าปริมาณไขมันใน LPC ลดลง จะทำให้เปอร์เซนต์โปรตีนสูงขึ้น LPC ที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสมนี้ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรท 35.54 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง เถ้า 5.02 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และเส้นใย 0.97 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ไม่แตกต่างจาก LPC ที่ล้างด้วยน้ำกลั่นและที่สกัดไขมันออก ปริมาณเถ้าและเส้นใยใน LPC นี้ อยู่ในช่วงที่ Galoppini และ Fiorentini (1985) เสนอไว้สำหรับ LPC ที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับคน คือควรจะมีเถ้าในปริมาณ 2 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และเส้นใยในปริมาณ 0.5 ถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

LPC ของผักตบชวาที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสมนี้ มีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด โดยเฉพาะลูซีนมี 5.06 กรัมต่อน้ำหนัก LPC 100 กรัม และเฟนิลอะลานีนมี 3.39 กรัมต่อน้ำหนัก LPC 100 กรัม ซึ่งมากกว่าที่ FAO (1965) กำหนดไว้เป็นมาตรฐานสำหรับ LPC ดังนั้น LPC ที่เตรียมจากใบผักตบชวา น่าจะเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารที่ขาดกรดอะมิโนประเภทนี้ และน่าจะใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญต่อไปได้