รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตและการใช้ประโยชน์ของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำสำหรับเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

(สัญญาเลขที่ IUG5180003)

นาย วรพจน์ สุนทรสุข

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับบริษัท ลัดดา จำกัด

20 กรกฎาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัท ลัดดา จำกัดที่ให้การสนับสนุนงบประมาณสำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ช่วยให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนช่วยให้แนวทางการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ เกี่ยวกับการทดสอบการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ขอขอบคุณบริษัท ลัดดา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบ ข้อมูลทางการเกษตรและการทดสอบการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งขอขอบคุณนางสาวอรอุมา เสลานนท์ และนางสาว ดลพร แซ่แต้ ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

กากเมล็ดสบู่ดำ (*Jathopha curcas* seed cake) เป็นวัสดุทางการเกษตรที่เหลือทิ้งหลังจากการบีบอัดน้ำมันออกจากเมล็ดสบู่ดำ กากเมล็ดสบู่ดำมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง อย่างไรก็ตามกากเมล็ดสบู่ดำมีสารต้านคุณค่าทางโภชนาการหลายชนิด อาทิ Trypsin inhibitor, Phytic acid, Lectin และ Saponins รวมทั้งสารพิษ Phorbol esters ดังนั้นกากเมล็ดสบู่ดำจึงยังไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้มุ่งใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันและไม่มีมูลค่า เพื่อผลิตโปรตีนสกัดสำหรับประยุกต์ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชทางรากและใบทดแทนการนำเข้าสารประเภทนี้

งานวิจัยเริ่มจากการกำจัดสารพิษ Phorbol esters ในกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ปราศจากสารพิษด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การปรับความเป็นกรด-ด่าง การใช้ตัวทำละลายและการใช้เกลือ ทั้งนี้พบว่าการใช้สารละลายด่าง pH เท่ากับ 12 ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 ชั่วโมง เหมาะสำหรับการแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำและทำการตกตะกอนโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด (pH เท่ากับ 4 หรือ Isoelectric point) หลังจากนั้นทำการย่อยโปรตีนที่แยกได้ด้วยกรดและเอนไซม์โปรติเอส 4 ชนิด ได้แก่ Neutrase, Trypsin, Papain และ Pepsin ที่เวลาต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่า กรดและเอนไซม์ Neutrase ย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำได้ดีและรวดเร็ว สำหรับโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยกรดและเอนไซม์โปรติเอสทั้ง 4 ชนิด สามารถแสดงคุณสมบัติการเร่งการเจริญเติบโตของเมล็ดพริกด้วยค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของพืช 4 แบบคือ เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์การแทงราก อัตราการเจริญของต้นกล้า และดัชนีการงอกของเมล็ด อย่างไรก็ตามโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร ให้ค่าค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของเมล็ดพริกทั้ง 4 สูงสุดและคาดว่าเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 12-22 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติการเร่งการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น10-50 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร ให้ผลการเร่งการเจริญเติบโตของต้นคะน้าในด้านความสูงและขนาดของลำต้น น้ำหนักแห้งและน้ำหนักสด รวมทั้งค่าระดับคุณภาพของต้นคะน้าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

บทคัดย่อ

กากเมล็ดสบู่ดำเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันเมล็ดสบู่ดำและมีองค์ประกอบของโปรตีนสูง ดังนั้นกากเมล็ดสบู่ดำน่าจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยการใช้เมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสายพันธุ์หัวเรือและต้นคะน้าเป็นพืชต้นแบบ ผลการศึกษาพบว่ากากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 23.5% (w/w) การแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้สภาวะ pH 12 อุณหภูมิ 50°C นาน 3 ชั่วโมง และตกตะกอนโปรตีนด้วยการปรับกรดที่ pH 4 ทั้งนี้ pH อุณหภูมิ เวลา ปริมาณเกลือและวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยการปรับกรด Solvent, Alcohol หรือเกลือ มีผลต่อการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ สำหรับผลของระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase เอนไซม์ Papain เอนไซม์ Trypsin เอนไซม์ Papsin และกรดไฮโดรคลอริก ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่าระหว่าง 3.8 ถึง 97.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเอนไซม์ Neutrase ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ 97.3 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์พริกด้วยโปรตีนสกัด พบว่า โปรตีนสกัดจากเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ณ ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร ให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์พริกสูงสุด คือให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด 75 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การแทงราก 96 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญของต้นกล้า 4.53 และดัชนีการงอกของเมล็ด 7.84 ดังนั้นโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง สามารถใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชที่ดี ทั้งนี้คาดว่าเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 12-22 กิโลดาลตันในโปรตีนสกัดแสดงคุณสมบัติการเร่งการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าว นอกจากนี้โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น10-50 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร สามารถเร่งการเจริญเติบโตของต้นคะน้าโดยให้ความสูงและขนาดของต้นคะน้า 24-27 เซนติเมตรและ 0.4 เซนติเมตร ตามลำดับ น้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดของต้นคะน้า 0.4-0.6 กรัมและ 5.0-6.5 กรัม ตามลำดับ และค่าระดับคุณภาพของต้นคะน้า 2.4-2.7 จาก 4 ระดับ ดังนั้นจะเห็นว่าโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase สามารถเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้

Abstract

Jatropha curcas seed cake is a by-product generated from oil extraction process of *J. curcas* seed and contains high protein. It, therefore, would be served as a source of protein hydrolysate applied for plant growth stimulation. This research work was aimed at studying plant growth promotion by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from *J. curcas* seed cake using chilli (*Capsicum annuum* L.) seeds and Chinese kale as model plants. Results showed that *J. carcas* seed cake sample in this study had a protein content of 23.5% (w/w). Its protein isolation was carried out by suspending the seed cake in an alkaline solution (pH 12) at 50^{o}C for 3 hr. Protein was then precipitated under an acidic condition (pH 4) or its isoelectric point. The study also showed protein isolation from *J. curcas* seed cake was affected by pH, temperature, agitation time and salt concentration and types, including solvent and alcohol concentration. *J. curcas* protein hydrolyses were done by four proteolytic enzymes (Neutrase, Papain, Trypsin and Pepsin) and acid (HCl) for 12 hours with various degrees of hydrolysis (3.8-97.3%). Neutrase gave the highest degree of hydrolysis at 97.3%. Tested on chilli seeds, their growth was considerably stimulated by the protein hydrolysate (30 μg amino acid/ml) obtained from Neutrase digestion at 2 hours. The sample gave the maximum germination percentage, radicle emergence percentage, seeding growth rate and germination index of 75%, 96%, 4.53 and 7.84, respectively. It is expected that peptides with molecular mass of 12-22 kDa in the hydrolysate may play an important role in plant growth stimulation. In addition, the protein hydrolysate at the concentrations of 10-50 μg amino acid/ml was able to stimulate the growth of Chinese kale with their heights of 24-27 cm, their diameter of approximately 0.4 cm, their wet and dry weights of 5.0-6.5 g and 0.4-0.6 g, respectively and their quality levels of 2.4-2.7 as of 4. Therefore, the hydrolysate obtained from *J. curcas* protein digestion by Neutrase at 2 hours would be a potent plant growth promoter.

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
หน้าสรุปโครงการ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญ	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	7
วิธีการทดลอง	8
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	12
สรุปผลการทดลอง	19
ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	43

บทนำ

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Jatropha curcas* L. สบู่ดำเป็นพืชพลังงานที่น่าสนใจนอกเหนือจากปาล์ม และมะพร้าว สบู่ดำปลูกกันมากทั่วทุกภาคของประเทศ กากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันออกแล้ว มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงราว 50-62 เปอร์เซ็นต์ (Martínez-Herrera et al., 2006) ซึ่งโปรตีนที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำ ได้แก่ Albumins, Globulins, Prolamins และ Glutelins (10.8, 27.4, 0.6 และ 56.9 % ตามลำดับ) (Selje-Assmann et al., 2007) จึงน่าเป็นแหล่งของกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่เนื่องจากกากเมล็ดสบู่ดำมีสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ (Antinutritional factors) หลายชนิด อาทิ Trypsin inhibitor, Phytic acid, Lectin และ Saponin รวมทั้งสารพิษ Phorbol esters (Martínez-Herrera et al., 2006) ซึ่งเป็นสารพิษที่อันตรายต่อเซลล์จำเป็นต้องกำจัดออกก่อนนำมาใช้ประโยชน์

ปัจจุบันโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากเนื้อเยื่อหรือส่วนต่าง ๆ ของสัตว์และพืชด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส หรือกรด สามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์และอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ รวมทั้งยังใช้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์และแมลง นอกจากนี้โปรตีนสกัดยังสามารถใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoter) ซึ่งสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ หรือได้รับการสังเคราะห์ขึ้น สารนี้ไม่ใช่ธาตุอาหารของพืช แต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งอาจเป็นฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ จากการศึกษาพบว่า เปปไทด์และกรดอะมิโนหลายชนิดทั้งที่ได้จากพืชและสัตว์หรือจากการย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบธรรมชาติ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น Phytosulfokine-α, Phytosulfokine-β, L-methionine รวมถึงเปปไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองและปลา เป็นต้น (Kobayashi et al., 1999; Hasegawa et al., 2002; Hasegawa et al., 2003; Sanpa et al., 2006) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันโดยการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อผลิตโปรตีนสกัดซึ่งเป็นสารมูลค่าสูงและประยุกต์ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชทดแทนการนำเข้าสารประเภทดังกล่าว ทั้งนี้จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องจนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบรายงานการศึกษาการผลิตโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำหรือการใช้ประโยชน์จากโปรตีน/โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำทั้งในและต่างประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนและผลิตโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

3. เพื่อศึกษาผลของการใช้โปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำต่อการเจริญเติบโตของพืช

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างจากกากเมล็ดสบู่ดำ

บดตัวอย่างกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านกระบวนการบีบอัดน้ำมันและตากแห้งมาแล้วด้วยเครื่องบด ประมาณ 15 นาที จนกระทั่งตัวอย่างละเอียด

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสบู่ดำ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีของ AOAC (1995)

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยการอบด้วยเตาอบลมร้อน

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxhlet

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยการเผาด้วยเตาเผาเถ้า

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย โดยการย่อยด้วยกรดและด่าง

3. การวิเคราะห์สารต้านคุณค่าทางโภชนาการและสารพิษของกากเมล็ดสบู่ดำ

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณ Trypsin inhibitor (Liu and Markakis, 1989)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Phytic acid (Vaintraub and Lapteva, 1995)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Lectin (Gordon and Marquardt, 1974)

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Saponin (Thilborg et al., 1994)

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณ Phorbol esters (Saetae and Suntornsuk, 2010)

4. การสกัด Phorbol esters ออกจากกากเมล็ดสบู่ดำ

ชั่งกากเมล็ดสบู่ดำลงในภาชนะ เติมเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:3 (w/v) เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นกรองสารละลายด้วยเครื่อง Vacuum pump เก็บสารละลายส่วนใส และนำกากเมล็ดสบู่ดำที่เหลือจากการกรองมาผ่านการสกัดด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (Saetae and Suntornsuk, 2010) จะได้กากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการสกัด Phorbol esters ออก ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการและสารพิษของตัวอย่าง

5. การศึกษาสภาวะการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ

นำกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการสกัด Phorbol esters และอบแห้งแล้ว มาละลายน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 2-12 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ หรือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 xg นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951)

สำหรับการศึกษาผลอุณหภูมิ เวลา และปริมาณเกลือต่อการละลายโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำทำเช่นเดียวกับการทดลองขั้นต้นโดยปรับอุณหภูมิ (30-80°C) เวลา (1-15 ชม.) และปริมาณเกลือ NaCl (0-30%)

นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของเกลือ Ammonium sulfate, Acetone, Ethanol และการปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 4 (ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์) ในการตกตะกอนโปรตีนจากตัวอย่างกากเมล็ดสบู่ดำที่ปราศจาก Phorbol ester โดยนำส่วนใสที่ได้จากการแยกโปรตีนจากกากข้างต้นมาเติมสารดังกล่าว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 xg นาน 20 นาที และนำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี Lyophilization

ทำการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำภายใต้สภาวะที่ทำให้โปรตีนตกตะกอนมากที่สุดเพื่อศึกษาการย่อยโปรตีนต่อไป ทั้งนี้ทำการการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี สารต้านคุณค่าทางโภชนาการ สารพิษและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนที่ได้จากตัวอย่างกากเมล็ดสบู่ดำ

6. การศึกษาวิธีการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อผลิตเป็นโปรตีนสกัด

6.1 การใช้กรดไฮโดรคลอริก

เตรียมตัวอย่างโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ในหลอดทดลอง จากนั้นวางหลอดทดลองลงใน Water bath เพื่อย่อยสลายโปรตีน โดยทำการย่อยที่ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการย่อยแต่ละเวลา นำตัวอย่างออกจาก Water bath ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีค่าอยู่ในช่วง 6.5-7.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 xg นาน 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนสกัด

6.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส (ดัดแปลงจาก Kim et al., 2007; Pihlanto et al., 2008)

การย่อยด้วยเอนไซม์นิวเตรส (Neutrase, 0.8 U/g, จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens,* Sigma-Aldrich, Denmark)) เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin, 3.3 U/g, จาก bovine pancreas, Sigma-Addrich, Denmark) และเอนไซม์ปาเปน (Papain, 30,000 U/mg, จากมะละกอ, Merck KGaA, Germany) ทำโดยการเตรียมโปรตีนที่แยกได้ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 สำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin, 0.8-2.5 U/g, จาก porcine gastric mucosa, Merck KGaA, Germany) ทำโดยการเตรียมยโปรตีนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย Citrate phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5

สารละลายเอนไซม์นิวเตรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และสารละลายเอนไซม์ปาเปนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เตรียมในสารละลาย Phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 สำหรับสารละลายเอนไซม์เปปซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เตรียมในสารละลาย Citrate phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5

ทำการย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายเอนไซม์ที่เตรียม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนต่อเอนไซม์เท่ากับ 100:1 (v/v) และใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum temperature) ของแต่ละเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์นิวเตรสและเอนไซม์ปาเปน และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์เปปซินและเอนไซม์ทริปซิน) โดยบ่มปฏิกิริยานาน 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 xg นาน 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนสกัด

7. การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนสกัด

ทำการวิเคราะห์ระดับของการย่อย (Degree of hydrolysis) ด้วยวิธี TNBS (Adler-Nissen, 1979) ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยวิธี TNBS (Adler-Nissen, 1979)

8. การศึกษาการเจริญเติบโตของพืช (เมล็ดพริกขี้หนู) ด้วยตัวอย่างโปรตีนสกัด

ศึกษาการเจริญเติบโตของพืชด้วยโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (Bio Life M80, Suboneyo Chemicals Pharmaceuticals, Maharashtra, India) (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) โดยใช้เมล็ดพริกขี้หนูสายพันธุ์หัวเรือ (*Capsicum annuum* L.) เป็นพืชต้นแบบ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด และบันทึกผลการศึกษาตามวิธี ISTA (ISTA, 1999) ดังนี้

8.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด (Germination percentage)

เพาะเมล็ดพันธุ์พริกด้วยวิธี Top of Blotter โดยนำกระดาษเพาะเมล็ด 4 ชั้น วางไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 14.5x20.5x7 เซนติเมตร^3 จากนั้นวางเมล็ดลงบนกระดาษเพาะเมล็ดจำนวน 100 เมล็ดต่อกล่องและใส่สารละลายโปรตีนสกัด หรือชุดควบคุมปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปิดฝากล่องแล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยให้แสงตามธรรมชาติ ตรวจนับจำนวนต้นกล้า

ปกติในวันที่ 14 หลังการเพาะเมล็ดและเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด เพื่อใช้คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

8.2 เปอร์เซ็นต์การแทงราก (Radicle emergence percentage)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 8.1 ตรวจนับจำนวนเมล็ดที่แทงราก จนสังเกตได้ว่ารากยาวออกมาประมาณ 1 มิลลิเมตร มีลักษณะเป็นจุดสีขาว จนถึงวันที่ 14 หลังการเพาะเมล็ดและเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การแทงราก

8.3 อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate : SGR)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 8.1 แต่ไม่มีการให้แสงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นบันทึกจำนวนต้นกล้าปกติ และนำเฉพาะต้นกล้าปกติมาตัดใบเลี้ยงออก แล้วนำส่วนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของต้นกล้า แล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$SGR=\frac{DWgrowth}{No.growth}$$

SGR = อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า

DW growth = น้ำหนักแห้งของต้นกล้าปกติ

No.growth = จำนวนต้นกล้าปกติ

8.4 ดัชนีการงอก (Germination index : GI)

ทำการเพาะเมล็ดเช่นเดียวกับข้อ 8.1 ตรวจนับจำนวนต้นกล้าปกติทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$GI=\Sigma\left(\frac{N}{D}\right)$$

GI = ดัชนีการงอก

N = จำนวนต้นกล้าปกติในวันที่ D

D = จำนวนวันหลังเพาะเมล็ด

9. การศึกษามวลโมเลกุลของโปรตีนสกัด

ทำการศึกษามวลโมเลกุลของโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำเปรียบเทียบกับสารละลายตะกอนโปรตีนก่อนการย่อย และโปรตีนสกัดทางการค้า โดยใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากันคือ 50 ไมโครกรัม ผสมกับ [5x] Loading buffer ในอัตราส่วน 4:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และนำไปหามวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE ของ Laemmli (1970)

10. การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นคะน้าด้วยตัวอย่างโปรตีนสกัด

ทดสอบการเร่งการเจริญเติบโตของต้นพืชโดยใช้ต้นคะน้า (Chinese kale; *Brassica oleracea* L. var. alboglabra Bailey) ด้วยโปรตีนสกัดจากกากเมล็ดสบู่ดำ (ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Neutrase) ที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 10 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร ปุ๋ยยูเรีย (60 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (15 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และโปรตีนสกัดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร)

เตรียมกล้าคะน้าด้วยการเพาะเมล็ดคะน้าในกระถางเพาะเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกกล้าคะน้าและปลูกลงในกระถาง กระถางละ 2 ต้น แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 กระถาง รดน้ำทุกวัน วันละครั้งในช่วงเช้าจนครบ 40 วัน ครั้งละ 500 ml ต่อ 4x4 กระถาง (1 ชุดการทดลอง) ทั้งนี้รดด้วยตัวอย่างโปรตีนสกัดกับชุดทดลองและชุดควบคุมทุก ๆ 7 วัน ได้แก่ วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และวันที่ 35 ปริมาตร 500 ml ต่อ 4x4 กระถาง ทำการเลี้ยงในเรือนเพาะชำ อุณหภูมิปกติ เมื่อครบระยะเวลา 40 วันทำการตัดผลผลิตและบันทึกผลการเจริญด้วยการวัดความสูงลำต้น (Height) ขนาดลำต้น (Diameter) น้ำหนักสด (Wet weight) น้ำหนักแห้ง (Dry weight) และคุณภาพของต้นคะน้า

11. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้าของกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างกากเมล็ดสบู่ดำยังคงมีปริมาณโปรตีนสูง (23.5%) และมีปริมาณไขมันสูง เนื่องจากวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดสบู่ดำใช้การบีบอัดด้วย Screw press ซึ่งทำให้การสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดสบู่ดำไม่สมบูรณ์ ปริมาณโปรตีนของกากเมล็ดสบู่ดำจากการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Devappa and Swamylingappa (2008) และ Makkar et al. (2008) อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำอาจแตกต่างจากรายงานของ Makkar et al. (1998) และ Martinez-Herrera et al.

(2006) เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์สบู่ดำ ระยะการเจริญเติบโตของต้นสบู่ดำ สภาวะดิน และอากาศ รวมทั้งวิธีการในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

สำหรับปริมาณสารพิษ ได้แก่ Phorbol ester และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ ได้แก่ Trypsin inhibitor, Lectin, Phytic acid และ Saponin แสดงในตารางที่ 2 ปริมาณ Phorbol ester ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำในการศึกษานี้มีค่า 0.73 mg/g ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Devappa and Swamylingappa (2008) และ Chivandi et al. (2005) แต่ต่ำกว่าในรายงานอื่นๆ Martinez-Herrera et al. (2006) รายงานปริมาณ Phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำจากประเทศ Mexico มีค่า 3.85 mg/g นอกจากนั้น Makkar et al. (1997) รายงานปริมาณ Phorbol ester ในเมล็ดสบู่ดำอยู่ในช่วง 0.87-3.32 mg/g ขึ้นกับสายพันธุ์ของสบู่ดำ จะเห็นว่าปริมาณ Phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำขึ้นกับสายพันธุ์ของสบู่ดำ สภาวะการเลี้ยงต้นสบู่ดำ และวิธีการบีบสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดสบู่ดำ

ปริมาณ Phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่า 8.55% ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณ Phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำจากรายงานของ Makkar et al. (1998) และ Martinez-Herrera et al. (2006) แต่ปริมาณ Phytic acid มีค่าสูงกว่า เมื่อเทียบกับในกากถั่วเหลืองซึ่งมีค่าประมาณ 1.5% (Martinez-Herrera et al., 2006)

ปริมาณ Trypsin inhibitor ในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่า 7.42 TIU/g จากรายงานต่าง ๆ ปริมาณ Trypsin inhibitor ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ไม่พบเลยถึง 70 TIU/g (Chivandi et al., 2005; Devappa and Swamylingappa, 2008) โดยทั่วไปปริมาณ Trypsin inhibitor ที่พบในธัญพืชมีค่าแตกต่างกัน อาทิ ถั่วเหลืองมีปริมาณ Trypsin inhibitor 3,270 TIU/g (Stewart et al., 2003) และถั่ว Kidney มีประมาณ 8.2 TIU/g (Marzo et al., 2002)

ปริมาณ Lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่า 13.15 หน่วย/mg ซึ่งใกล้เคียงกับในรายงานของ Makkar et al. (1998) แต่ต่ำกว่าที่พบในถั่ว pea และถั่วปากอ้า (Faba bean) (37.1 และ 118.8 หน่วย/mg) ขณะที่สูงกว่าที่พบในถั่วเหลือง (3.2 หน่วย/mg) (Fernandez-Quintela et al., 1997)

ปริมาณ Saponin ในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่า 27.82 µg/g ซึ่งต่ำกว่าในรายงานของ Martinez-Herrera et al. (2006) ประมาณ 1,800 เท่า แต่ปริมาณที่พบนี้ต่ำกว่าปริมาณที่พบในกากถั่วเหลือง (Makkar et al., 1998)

องค์ประกอบทางเคมีในกากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการสกัดสารพิษ Phorbol ester ออกด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากตัวอย่างก่อนการสกัด อย่างไรก็ตามปริมาณไขมันและเยื่อใยลดลงจากเดิม เนื่องจากไขมันและเยื่อใยบางส่วนถูกสกัดและละลายในเอทานอลพร้อมกับสารพิษ Phorbol ester สำหรับปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการสกัดสารพิษ Phorbol ester แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่านอกจากเอทานอลสกัดสารพิษ Phorbol ester ออกจากกากเมล็ดสบู่ดำแล้ว เอทานอล

ยังช่วยลดปริมาณสารต้านคุณค่าทางโภชนาการทุกชนิด (Trypsin inhibitor, Phytic acid, Lectin และ Saponin) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารดังกล่าวละลายได้ดีในเอทานอล (Chivandi et al., 2004)

2. การศึกษาการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำที่สกัดสารพิษ Phorbol ester ออกแล้ว

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ ได้แก่ pH อุณหภูมิ เวลา ปริมาณเกลือและวิธีการตกตะกอนโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 1-4 และตารางที่ 3

pH มีผลต่อการสกัดโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำอย่างมากดังแสดงในรูปที่ 1 ปริมาณโปรตีนถูกสกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำน้อยที่สุดที่ pH ในช่วง 4.0-4.3 โปรตีนถูกสกัดได้มากในสภาวะ pH ที่สูงขึ้น จะเห็นว่าโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำสามารถละลายได้ดีในสภาวะเป็นเบสและที่ pH 12 ผลได้ของการสกัดโปรตีนมีค่าสูงสุด (81.7%)

อุณหภูมิมีผลต่อการสกัดโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำ (รูปที่ 2) โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโปรตีนถูกสกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำได้ดีขึ้นหรืออุณหภูมิมีผลต่อการละลายของโปรตีน จากการศึกษานี้ ผลได้ของการสกัดโปรตีนมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$) เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50°C โดยที่อุณหภูมิ 50°C มีค่าผลได้ของการสกัดโปรตีน 84.6%

ระยะเวลาของการสกัดมีผลต่อการสกัดโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำ (รูปที่ 3) เมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัด โปรตีนละลายออกจากกากเมล็ดสบู่ดำมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการสกัดมากกว่า 3 ชั่วโมง ผลได้ของการสกัดโปรตีนมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

เกลือมีผลต่อการสกัดโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำเช่นกันดังแสดงในรูปที่ 4 ปริมาณโปรตีนถูกสกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำน้อยที่สุดเมื่อไม่มีเกลือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือปริมาณโปรตีนถูกสกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำมากขึ้นจนสูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 10% อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น (มากกว่า 10%) ปริมาณโปรตีนถูกสกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำเริ่มลดลง

สำหรับการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายโปรตีนที่สกัดออกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีการต่าง ๆ (ตารางที่ 3) จะเห็นว่าการใช้ 80% Ammonium sulfate ให้ผลการตกตะกอนได้ดีที่สุด (99.1%) รองลงมาคือวิธี Isoelectric point (pH 4) และการใช้ตัวทำละลาย Ethanol และ Acetone ตามลำดับ ผลการศึกษาการแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำนี้ด้วยวิธี Isoelectric point (pH 4) ใกล้เคียงกับรายงานของ Devappa and Swamylingappa (2008) ซึ่งใช้วิธีการดังกล่าวในการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ (ghani-pressed และ dehulled defatted *Jatropha* meals) ได้ประมาณ 70-77%

ดังนั้นสภาวะการแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำที่นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การใช้ pH เท่ากับ 12 ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 3 ชั่วโมงโดยไม่เติมเกลือ NaCl เนื่องจากเกลืออาจส่งผลถึงคุณภาพของโปรตีน และการตกตะกอนโปรตีนกระทำด้วย pH เท่ากับ 4 เนื่องจากการใช้ Ammonium sulfate มีต้นทุนสูง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้าของตะกอนโปรตีนที่แยกได้จากกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในตารางที่ 4 ตะกอนโปรตีนมีปริมาณโปรตีนสูง (90%) ซึ่งมีค่าสูงกว่าในกากเมล็ดสบู่ดำประมาณ 4 เท่า ปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนในการศึกษานี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Devappa and Swamylingappa (2008) ซึ่งพบปริมาณโปรตีนในตะกอนโปรตีนมีค่าสูงประมาณ 89% อย่างไรก็ตามตะกอนโปรตีนยังคงมีไขมัน (ประมาณ 7%) เยื่อใยและเถ้าเพียงเล็กน้อย สำหรับปริมาณสารพิษ Phorbol ester และสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในตะกอนโปรตีนแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าตะกอนโปรตีนที่แยกได้ไม่มีสารพิษ Phorbol ester และ Lectin นอกจากนี้จะเห็นว่าขั้นตอนการแยกโปรตีนยังลดปริมาณ Phytic acid และ Saponin ในตะกอนโปรตีน อาจเป็นเพราะวิธีการแยกโปรตีนด้วยการปรับ pH ทำให้ Phytic acid และ Saponin บางส่วนละลายในสารละลายเบสหรือกรด อย่างไรก็ตามปริมาณ Trypsin inhibitor มีค่าสูงซึ่งคล้ายกับรายงานของ Makkar et al. (2008) เนื่องจาก Trypsin inhibitor อาจละลายและตกตะกอนได้ในสภาวะเดียวกับโปรตีนอื่นๆ ของกากเมล็ดสบู่ดำ

ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ของโปรตีนที่แยกได้จากกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงในตารางที่ 6 จะเห็นว่าปริมาณกรดอะมิโนชนิดจำเป็นทั้งหมด (Total essential amino acid) มีค่าน้อยกว่าปริมาณที่ผู้บริโภคควรที่จะได้รับซึ่งกำหนดโดย FAO/WHO (1991) แสดงถึงคุณภาพของโปรตีนที่แยกได้จากกากเมล็ดสบู่ดำอาจไม่เหมาะสำหรับเพื่อการบริโภคของมนุษย์

3. การศึกษาการย่อยโปรตีนและองค์ประกอบของโปรตีนสกัด

การใช้กรดสามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วที่สุดและดีที่สุดในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกโดยสังเกตจากผลของ Degree of hydrolysis และปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างระหว่างการย่อย (รูปที่ 5 และ 6) ในขณะที่เอนไซม์ Neutrase ย่อยโปรตีนได้รวดเร็วที่สุดและดีที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เอนไซม์ Trypsin ย่อยโปรตีนได้น้อยที่สุด (รูปที่ 5 และ 6) ในภาพรวมผลการย่อยโปรตีนด้วยกรดและเอนไซม์เป็นในทิศทางเดียวกับรายงานของ Li et al. (2005) และ Lee et al. (2001) ซึ่งใช้เอนไซม์และกรดย่อยโปรตีนที่แยกจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า Degree of hydrolysis อาจแตกต่างกันไป เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตีนและเอนไซม์/กรดที่ใช้ หรืออัตราส่วนของโปรตีนและเอนไซม์/กรดที่ใช้ทำปฏิกิริยา ชนิดของเอนไซม์/กรดที่ใช้ และสภาวะการย่อยของการทดลอง เป็นต้น

ปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะในการตัดพันธะเปปไทด์ที่ลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันโดยขึ้นกับชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งบริเวณเร่งของเอนไซม์แต่ละชนิด (Copeland, 1996) นอกจากนี้เอนไซม์ Trypsin ย่อยโปรตีนนี้ได้น้อย เนื่องจากโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณ Trypsin inhibitor เป็นองค์ประกอบอยู่ จึงอาจขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ Trypsin

ปริมาณโปรตีนในระหว่างการย่อย แสดงในรูปที่ 7 ในภาพรวมปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากการละลายของโปรตีนจาก Insoluble form เป็น Soluble form ในระหว่างการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ สำหรับการย่อยโปรตีนด้วยกรด ปริมาณโปรตีนลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากย่อยนาน 1 ชั่วโมง

4. การทดสอบผลของโปรตีนสกัดต่อการเจริญเติบโตของต้นพริก

โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ช.ม.ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริกสูงสุด (75%) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ และชุดควบคุมทั้งหมด (มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% หรือ $p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนสกัดนี้ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริกสูงกว่าโปรตีนสกัดทางการค้า (Bio Life M80) ประมาณ 2 เท่า อาจเป็นเพราะโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase มีองค์ประกอบของเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพริก

ขณะที่โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ช.ม.ให้เปอร์เซ็นต์การแทงราก (Radicle emergence) สูงสุดที่ประมาณ 96% ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และชุดควบคุมทั้งหมด (มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% หรือ $p < 0.05$) (รูปที่ 9)

โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ช.ม.ให้อัตราการเจริญของต้นกล้าสูงสุดที่ 4.53 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และชุดควบคุมทั้งหมด (มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% หรือ $p < 0.05$) โดยเฉพาะอัตราการเจริญของต้นกล้าสูงกว่าโปรตีนสกัดทางการค้าประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 10)

นอกจากนี้โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ช.ม.ให้ดัชนีการงอกของเมล็ดสูงสุด (เท่ากับ 7.84) ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ และชุดควบคุมทั้งหมด (มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% หรือ $p < 0.05$) (รูปที่ 11)

รูปที่ 12 แสดง SDS-PAGE ของแถบโปรตีนจากตัวอย่างโปรตีนสกัดด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลาการย่อยต่างๆ และชุดควบคุม จะเห็นว่าโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการย่อย (Lane ที่ 1) และโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 0

ชั่วโมง (Lane ที่ 2) มีแถบโปรตีน 2 ช่วง คือ แถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 21-32 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 79.5 และ 85 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าโปรตีนเหล่านี้เป็น Albumins, Globulins, Prolamins และ Glutelins ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเมล็ดธัญพืชและแหล่งโปรตีนทั่วไป (Selje-Assmann et al., 2007; Usman et al., 2008) ทั้งนี้โปรตีนแต่ละชนิดมีมวลโมเลกุลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีน เช่น Albumins ในเมล็ดนาปีน (Napins) ไข่ขาว และ Human plasma มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 4-70 กิโลดาลตัน (Youle and Huang, 1981; Rho and Kang, 2003) Globulins ในข้าวโอ๊ตและถั่วลันเตา มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 20-50 กิโลดาลตัน (Shewry et al., 1995) Prolamins ในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาเลย์ ข้าวสาลี และข้าวไรน์ (Rye) มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-90 กิโลดาลตัน (Shewry et al., 1995) Glutelins ในข้าวและข้าวโพด มีมวลโมเลกุลประมาณ 21-39 กิโลดาลตัน (Yamagata et al., 1982; Torrent et al., 1986) อย่างไรก็ตามโปรตีนทั้ง 2 ตัวอย่างนี้ให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 4 (เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์การแทงราก อัตราการเจริญของต้นกล้า และดัชนีการงอกของเมล็ด) ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (น้ำกลั่นและปุ๋ยยูเรีย) (รูปที่ 8-11)

สำหรับโปรตีนสกัดทางการค้า (Lane ที่ 3) เป็นเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอส มีแถบโปรตีนอยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 12-22 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนทั้งตัวอย่างนี้ให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 4 (เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์การแทงราก อัตราการเจริญของต้นกล้า และดัชนีการงอกของเมล็ด) สูงกว่าชุดควบคุมอื่น ๆ (น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย และโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) แต่ต่ำกว่าโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงและใกล้เคียงกับโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยกรดและเอนไซม์อื่น ๆ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (รูปที่ 8-11)

โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง (Lane ที่ 4) มีแถบโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 12-22 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 39.8 และ 79.5 กิโลดาลตัน ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการย่อย (Lane ที่ 1) หรือแถบโปรตีนจากโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง (Lane ที่ 2) จะเห็นว่าหลังจากโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว แถบโปรตีนมีมวลโมเลกุลเล็กลง แถบโปรตีนในช่วงมวลโมเลกุลระหว่าง 12-22 กิโลดาลตันอาจแสดงคุณสมบัติการเร่งการเจริญเติบโตของพืช ดังแสดงผลให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 4 สูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8-11)

โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 4 และ 12 ชั่วโมง (Lane ที่ 5 และ 6) มีแถบโปรตีนคล้ายกัน คือ มีแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 21 กิโลดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากแถบโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการย่อย (Lane ที่ 1) หรือแถบโปรตีนจาก

โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง (Lane ที่ 2) และแถบโปรตีนของโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง (Lane ที่ 4) ทั้งนี้เป็นผลมาจากโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์นานขึ้น เกิดเป็นโปรตีนขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามโปรตีนขนาดเล็กเหล่านี้มีความสามารถในการเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้น้อยกว่าโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 8-11)

ดังนั้นโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง น่าจะมีเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่มีผลต่อการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้เปปไทด์ หรือกรดอะมิโนเหล่านี้อาจมีความสามารถเป็น Ligand ที่มีความจำเพาะกับ Receptor ที่ส่งสัญญาณไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช หรืออาจมีคุณสมบัติคล้ายกับ Phytohormone และคุณสมบัติเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเปปไทด์ อาทิ เปปไทด์ Systemin ในใบมะเขือเทศสามารถจับกับ Membrane receptor ส่งผลให้เกิดการแสดงออกต่าง ๆ ในพืช (Pearce et al., 1991; McGurl et al., 1992) เปปไทด์ Phytosulfokine-α (PSK- α) ช่วยกระตุ้นการเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ในหน่อไม้ฝรั่ง ข้าว และแครอท (Kobayashi et al., 1999) เปปไทด์จากการย่อยสลายกากถั่วเหลืองด้วย *Bacillus circulans* HA12 สามารถเพิ่มจำนวนและความยาวของขนรากพืชโดยเฉพาะผักกาดฝรั่ง (*Brassica campestris*) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ผักกาดขาวปลี (*Brassica rapa*) ผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) และมะเขือเทศ (*Lycopersicum esculentum*) (Hasegawa et al., 2002) ซึ่งต่อมาพบว่าเปปไทด์ดังกล่าวประกอบด้วย GGIRAAPTGNER และมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 1,200 ดาลตัน (Matsumiya et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง D- และL-Methionine ช่วยเพิ่มจำนวนรากฝอยของผักกาดขาวปลี (*Brassica rapa*) (Hasegawa et al., 2003) โปรตีนสกัดซึ่งประกอบด้วยเปปไทด์ กรดอะมิโน (Glutamate และ Arginine สูง) และไฟโตฮอร์โมน (Phytohormone) ที่ได้จากการย่อยสลาย ฉarob germ ด้วยเอนไซม์โปรติเอสสามารถเร่งการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนดอก และจำนวนผลของมะเขือเทศ (Parrado et al., 2008) และโปรตีนสกัดที่ได้การย่อยเนื้อปลาเหงือกฟ้า (Bluegill) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. สามารถเพิ่มจำนวนรากฝอยของผักกาดขาวปลี (*Brassica rapa*) (Sanpa et al., 2006) สำหรับการงอกของต้นพริกและการเจริญของต้นพริกด้วยการใช้โปรตีนสกัดต่างๆและชุดควบคุมแสดงในรูปที่ 13

5. การทดสอบผลของโปรตีนสกัดต่อการเจริญเติบโตของต้นคะน้า

เมื่อนำโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่างๆทดสอบกับต้นคะน้า พบว่าโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร ให้ความสูงและค่าดัชนีคุณภาพของต้นคะน้าสูงสุด (รูปที่ 14 และ 15) ให้ขนาดของลำต้นใกล้เคียงกับโปรตีนสกัดทางการค้า (รูปที่ 16) แต่ให้น้ำหนักน้อยกว่า โปรตีนสกัดทางการค้า (รูปที่ 17-18) อย่างไรก็ตามในภาพรวมแล้วโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้น

ต่าง ๆ และชุดควบคุมยกเว้นน้ำและปุ๋ยยูเรียให้ผลการเจริญเติบโตของต้นคะน้าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

จากผลการศึกษาจะเห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีนสกัดที่ศึกษา (10-50 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) ไม่มีผลมากนักต่อการเร่งการเจริญเติบโตของต้นคะน้าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนสกัดทางการค้า ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่โปรตีนสกัดจากเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตรให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของพริกทั้ง 4 ได้ดีที่สุด อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของโปรตีนสกัดที่ใช้ศึกษาอาจน้อยเกินไปสำหรับการศึกษาต้นคะน้าในกระถางดิน หรือต้นคะน้าอาจเป็นพืชที่ตอบสนองต่อมีเปปไทด์หรือกรดอะมิโนในโปรตีนสกัดนี้ไม่ดีนัก

การเจริญเติบโตของต้นคะน้าด้วยโปรตีนสกัดและชุดควบคุมแสดงในรูปที่ 19

สรุปผลการทดลอง

กากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณโปรตีนสูงแต่ยังคงมีสารพิษ Phorbol esters อย่างไรก็ตามสารพิษนี้ถูกกำจัดโดยการสกัดกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ การแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำสามารถทำได้โดยการละลายกากเมล็ดสบู่ดำในสารละลายด่างที่ pH เท่ากับ 12 อุณหภูมิ 50°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่ pH เท่ากับ 4 (Isoelectric point)

การย่อยโปรตีนที่แยกได้จากกากเมล็ดสบู่ดำสามารถทำด้วยด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ เอนไซม์ Neutrase เอนไซม์ Papain เอนไซม์ Trypsin และเอนไซม์ Pepsin รวมถึงกรดไฮโดรคลอริก ทั้งนี้ปริมาณกรดอะมิโนและระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการย่อย โดยพบว่าเอนไซม์ Neutrase ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ 97 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

เมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสายพันธุ์หัวเรือที่ทดสอบด้วยโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเร่งการเจริญเติบโตของพริกและเพิ่มความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งต้นกล้าด้วย ทั้งนี้โปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์พริกทั้ง 4 ดัชนี (เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปอร์เซ็นต์การแทงราก อัตราการเจริญของต้นกล้า และดัชนีการงอกของเมล็ด) สูงสุด

นอกจากนี้โปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ผลการเร่งการเจริญเติบโตของต้นคะน้าได้ แต่อาจไม่ดีเท่าผลการเร่งการเจริญเติบโตของเมล็ดพริก ดังนั้นโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง น่าจะเป็นประโยชน์ต่อภาคการเกษตรและอาจทดแทนการนำเข้าสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชซึ่งได้จากการย่อยโปรตีนจากกากถั่วเหลือง

Table 1 Chemical compositions of *J. curcas* seed cake and phorbol ester-free *J. curcas* seed cake (on dry matter basis)

Composition (%, w/w)	*J. curcas* seed cake[1]	Phorbol ester-free *J. curcas* seed cake[1]
Crude fat	14.84 ± 0.52	8.64 ± 1.66
Crude fiber	11.00 ± 1.65	8.24 ± 0.26
Crude ash	7.76 ± 0.05	6.44 ± 0.16
Crude protein	23.51 ± 1.50	23.04 ± 1.04

[1] Means ± standard deviation of triplicate determinations

Table 2 Toxin and antinutritional factors in *J. curcas* seed cake and phorbol ester-free *J. curcas* seed cake (on dry matter basis)

Components	*J. curcas* seed cake[1]	Phorbol ester-free *J. curcas* seed cake[1]
Phorbol esters (mg/g)[a]	0.73 ± 0.06	ND[e]
Phytic acid (%, w/w)	8.55 ± 0.51	1.87 ± 0.11
Trypsin inhibitor (TIU[b]/g)	7.42 ± 1.64	1.12 ± 0.09
Lectin activity (HU[c]/mg protein)	13.15 ± 0.45	ND[e]
Saponin [d] (μg/g)	27.82 ± 0.68	10.04 ± 0.60

[1] Means ± standard deviation of triplicate determinations

[a] Equivalent to phorbol 12-myristate,13 acetate

[b] Trypsin inhibitor units

[c] Heamagglutinating units

[d] Diosgenin equivalent

[e] Not detected

Table 3 Effect of precipitation method on protein isolation of *J. curcas* seed cake

precipitation method	Initial protein (g)	Precipitated protein (g)	Precipitation yield (%)
Isoelectric point (pH 4)	4.61	3.27	70.8
40% acetone	4.61	2.84	61.6
40% ethanol	4.61	3.02	65.6
80% ammonium sulfate	4.61	4.57	99.1

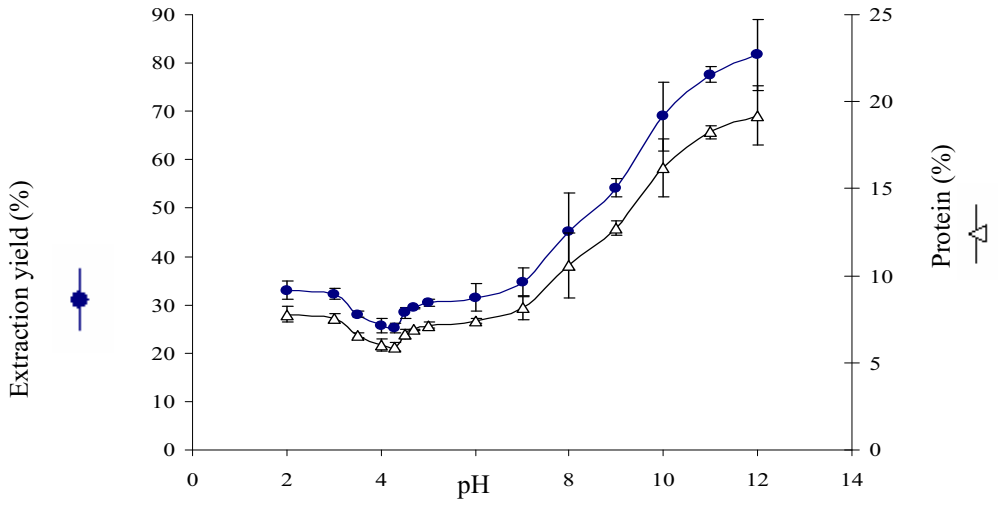


Fig. 1 Effect of pH on protein extraction from *J. curcas* seed cake

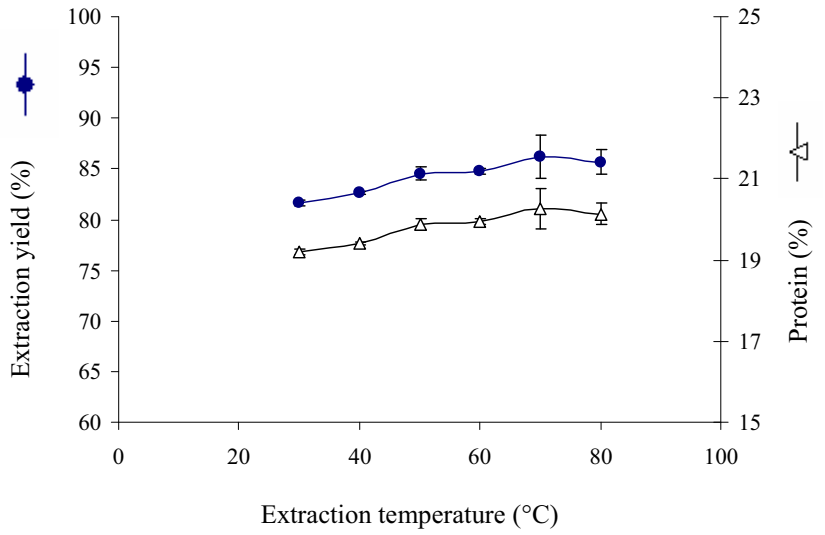


Fig. 2 Effect of temperature on protein extraction from *J. curcas* seed cake

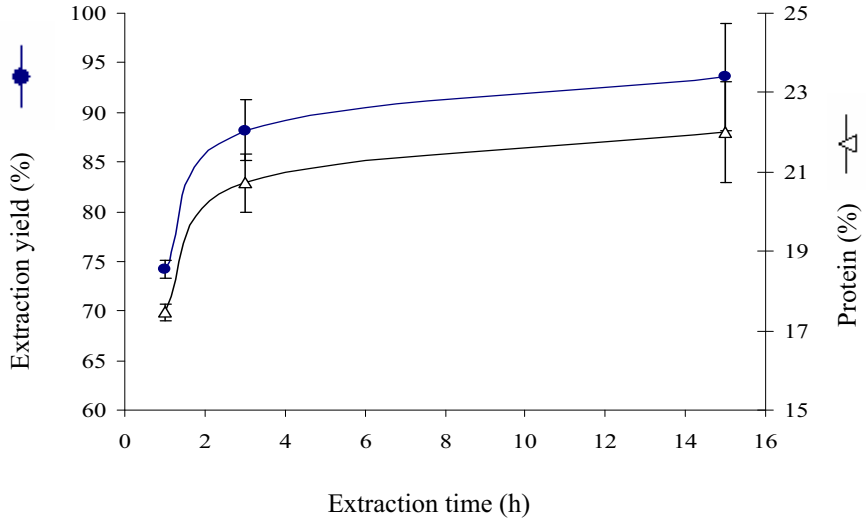


Fig. 3 Effect of extraction time on protein extraction from *J. curcas* seed cake

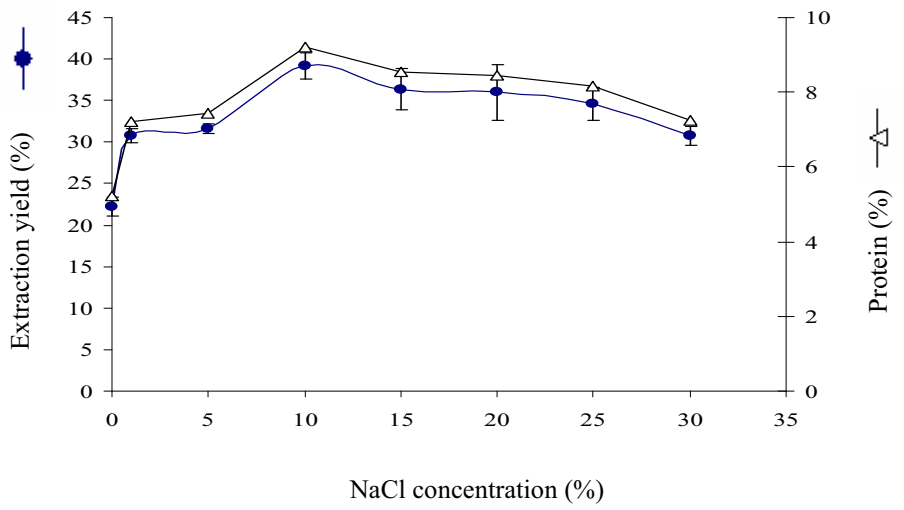


Fig. 4 Effect of salt concentration on protein extraction from *J. curcas* seed cake

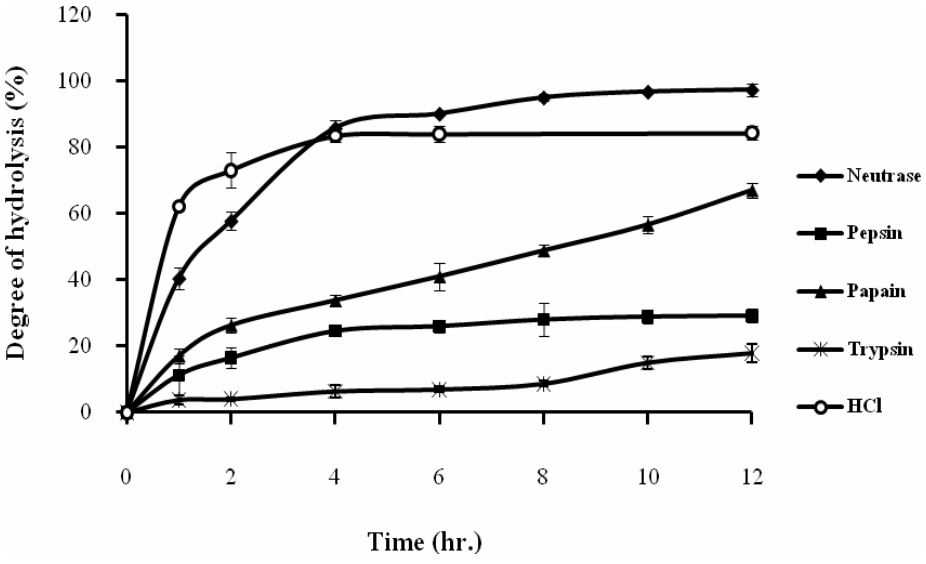


Fig. 5 Degree of hydrolysis of protein isolated from *J. curcas* seed cake by HCl and enzymatic hydrolyses

Table 4 Chemical compositions of protein isolate obtained from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake (on dry matter basis)

Composition (%, w/w)	Protein isolate[1]
Crude fat	7.15 ± 0.36
Crude fiber	0.74 ± 0.10
Crude ash	1.76 ± 0.09
Crude protein	89.02 ± 1.83

[1] Means ± standard deviation of triplicate determinations

Table 5 Toxin and antinutritional factors in protein isolate obtained from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake (on dry matter basis)

Components	Protein isolate[1]
Phorbol esters (mg/g)[a]	ND [e]
Phytic acid (%, w/w)	0.03 ± 0.00
Trypsin inhibitor (TIU[b]/g)	8.36 ± 0.03
Lectin activity (HU[c]/mg protein)	ND [e]
Saponin [d] (µg/g)	2.04 ± 0.01

[1] Means ± standard deviation of triplicate determinations

[2] ND: not detected.

[a] Equivalent to phorbol 12-myristate,13 acetate

[b] Trypsin inhibitor units

[c] Heamagglutinating units

[d] Diosgenin equivalent

[e] Not detected

Table 6 Amino acid profile of protein isolate obtained from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake (on dry matter basis)

Amino acid (g amino acid/100 g protein isolate)	Protein isolate [1]	FAO/WHO reference value[2] (g/100 g)
Essential		
Methionine	4.86	2.5[3]
Cystine	1.98	
Tyrosine	1.26	6.3[4]
Phenylalanine	2.07	
Isoleucine	1.90	2.8
Leucine	3.29	6.6
Valine	2.23	3.5
Histidine	1.05	1.9
Threonine	1.81	3.4
Lysine	1.60	5.8
Total essential amino acids	22.05	32.8
Non-essential		
Aspartic acid	4.94	
Serine	2.56	
Glutamic acid	8.73	
Glycine	2.15	
Arginine	6.45	
Alanine	2.29	
Proline	2.08	

[1] All values are means of duplicate determinations.

[2] FAO/WHO. Protein quality evaluation, Daily requirements for human adults (1991)

[3] Methionine + cystine

[4] Tyrosine + phenylalanine

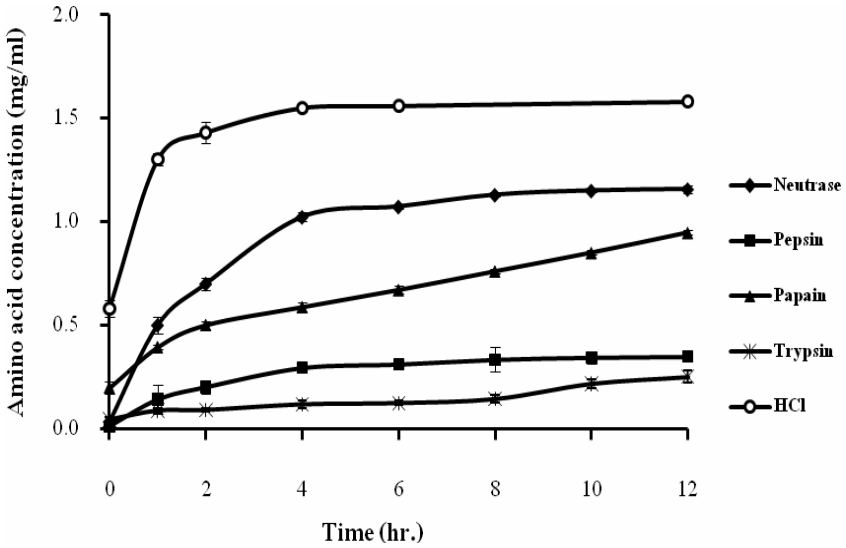


Fig. 6 Amino acid formation during acid and enzymatic hydrolyses of protein isolated from *J. curcas* seed cake

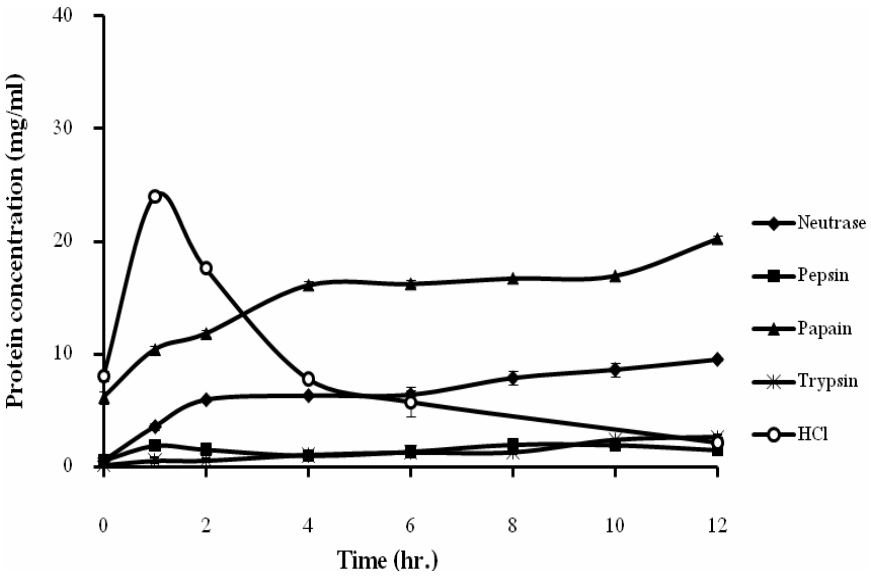


Fig. 7 Soluble protein changes during acid and enzymatic hydrolyses of protein isolated from *J. curcas* seed cake

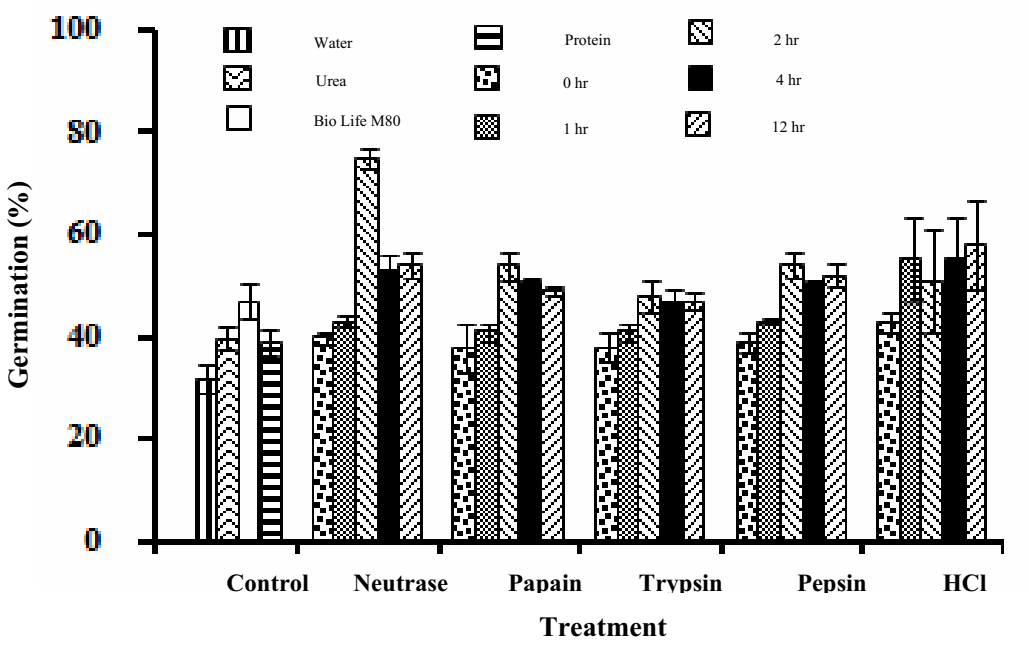


Fig. 8 Germination percentage of chilli seed tested by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls

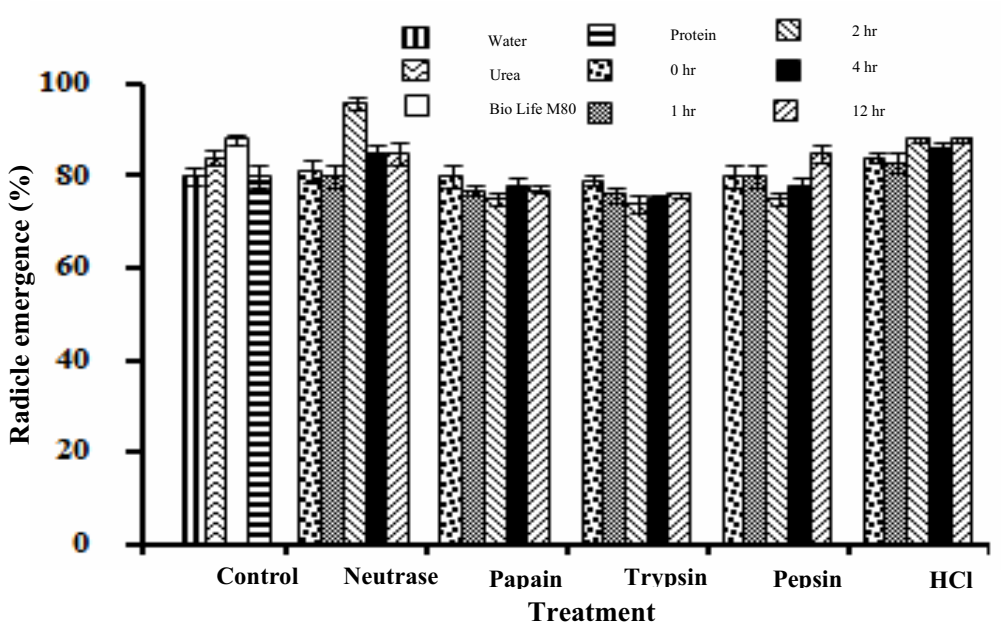


Fig. 9 Radicle emergence percentage of chilli seed tested by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls

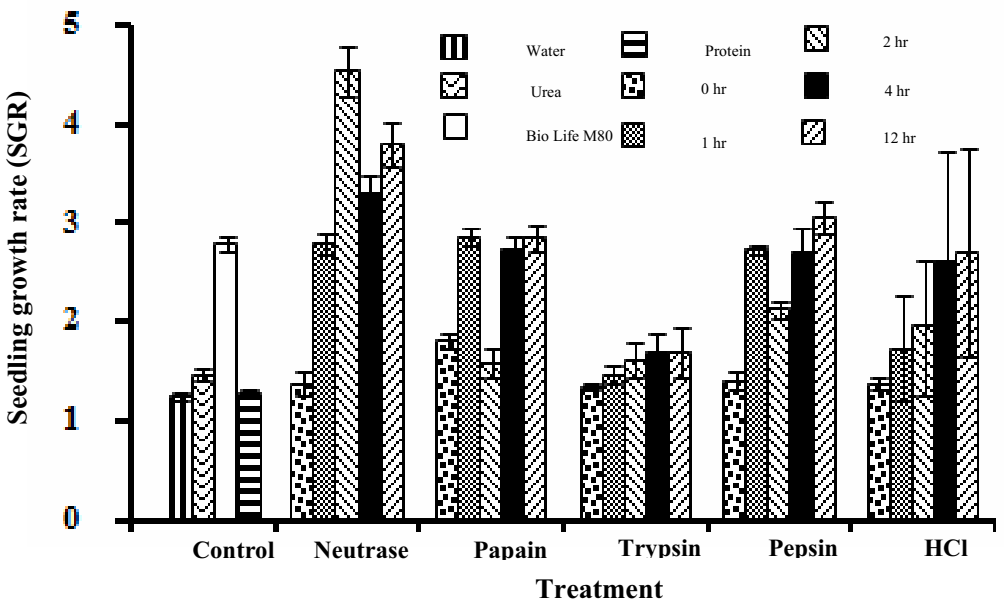


Fig. 10 Seedling growth rate of chilli seed tested by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls

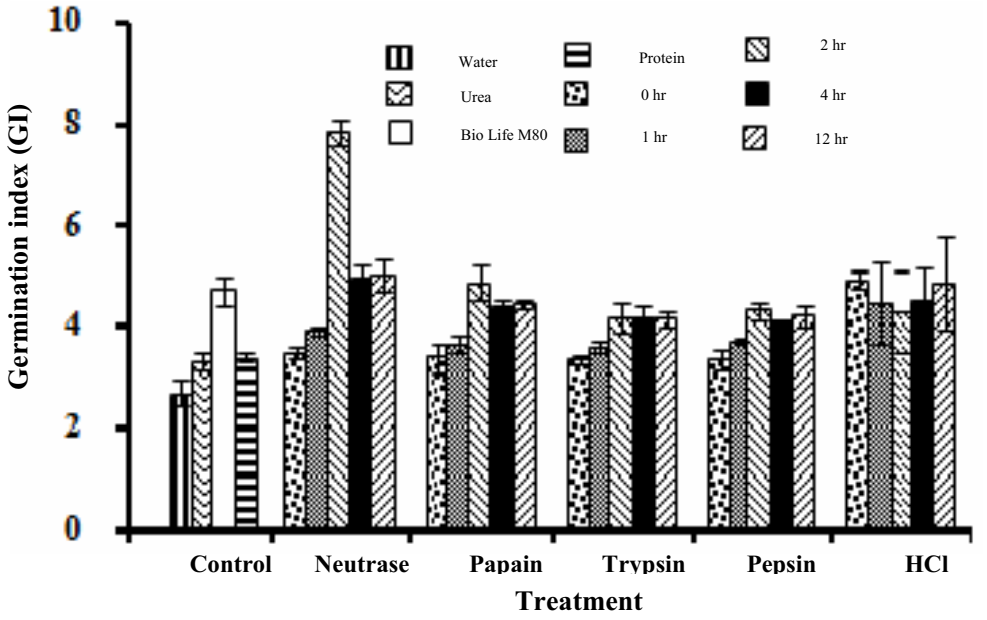


Fig. 11 Germination index of chilli seed tested by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls

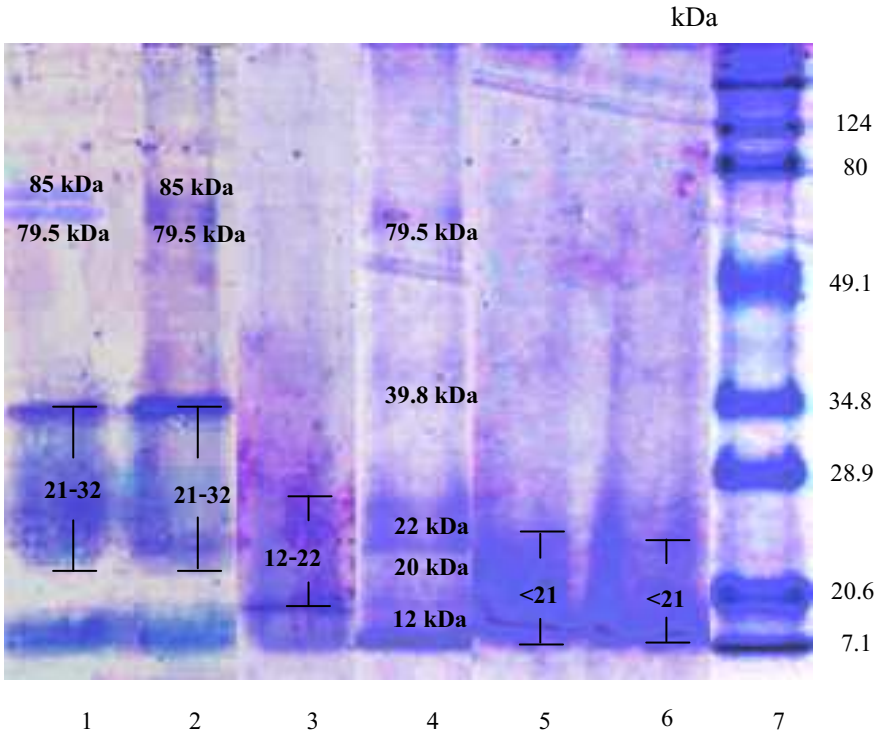


Fig. 12 SDS-PAGE of protein hydrolysates obtained from enzymatic digestion of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with Neutrase at various digestion time

Lane 1 Protein isolated from *J. curcas* seed cake without digestion (Control)

Lane 2 Protein hydrolysate obtained from Neutrase digestion of protein at 0 hr (Control)

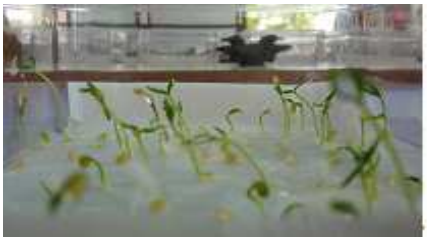
Lane 3 Commercial protein hydrolysate (Control)

Lane 4 Protein hydrolysate obtained from Neutrase digestion of protein at 2 hr

Lane 5 Protein hydrolysate obtained from Neutrase digestion of protein at 4 hr

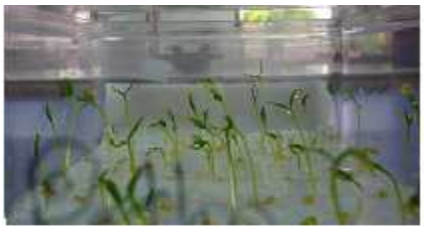
Lane 6 Protein hydrolysate obtained from Neutrase digestion of protein at 12 hr

Lane 7 Standard proteins containing Myosin (209 kDa), β-galactosidase (124 kDa), Bovine serum albumin (80 kDa), Ovalbumin (49.1 kDa), Carbonic anhydrase (34.8 kDa), Soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), Lysozyme (20.6 kDa) and Aprotinin (7.1 kDa)

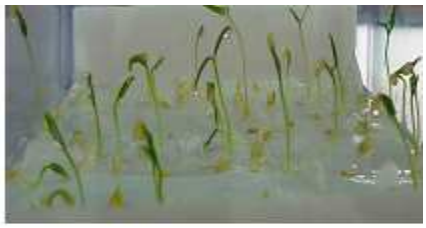


A: Water (Control)

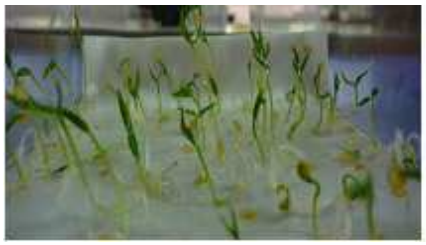
B: Urea (Control)



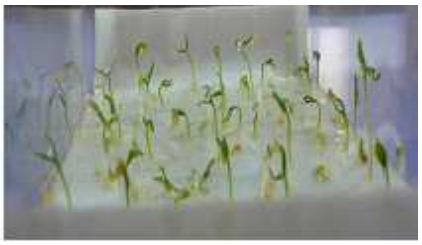
C: Bio Life M80 (Control)



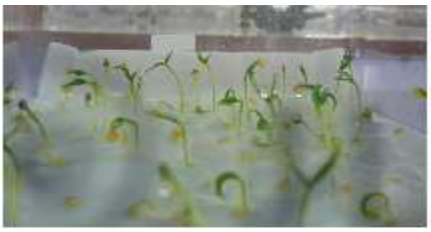
D: Protein (Control)



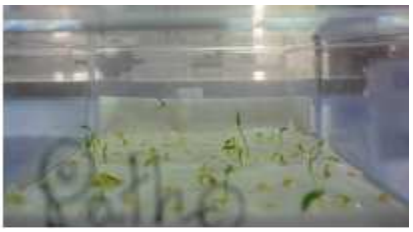
E: Neutrase 2 hr.



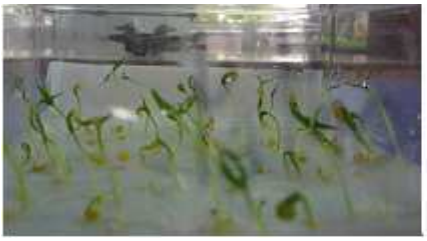
F: Papain 2 hr



G: Trypsin 2 hr



H: Pepsin 2 hr



I: HCl 2 hr

J: Phosphate buffer pH7 (Control)

Fig. 13 Growth of chilli seed at day 14 tested by protein hydrolysates obtained from enzymatic and acid hydrolyses of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (A = Water, B = Urea, C = Commercial protein hydrolysate, D = Protein without enzymatic digestion, E = Protein hydrolysate obtained by Neutrase digestion at 2 hr, F = Protein hydrolysate obtained by Papain digestion at 2 hr, G = Protein hydrolysate obtained by Trypsin digestion at 2 hr, H = Protein hydrolysate obtained by Pepsin digestion at 2 hr, I = Protein hydrolysate obtained by HCl digestion at 2 hr, J = Phosphate buffer pH 7)

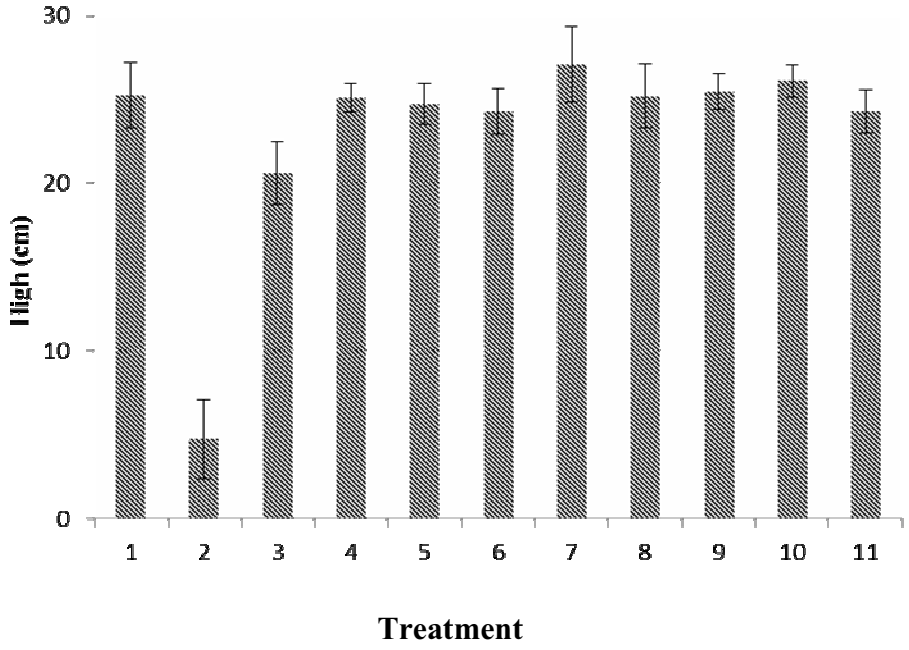


Fig. 14 Height of Chinese kale tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 μg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 μg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 μg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 μg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 μg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 μg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 μg amino acid/ml)

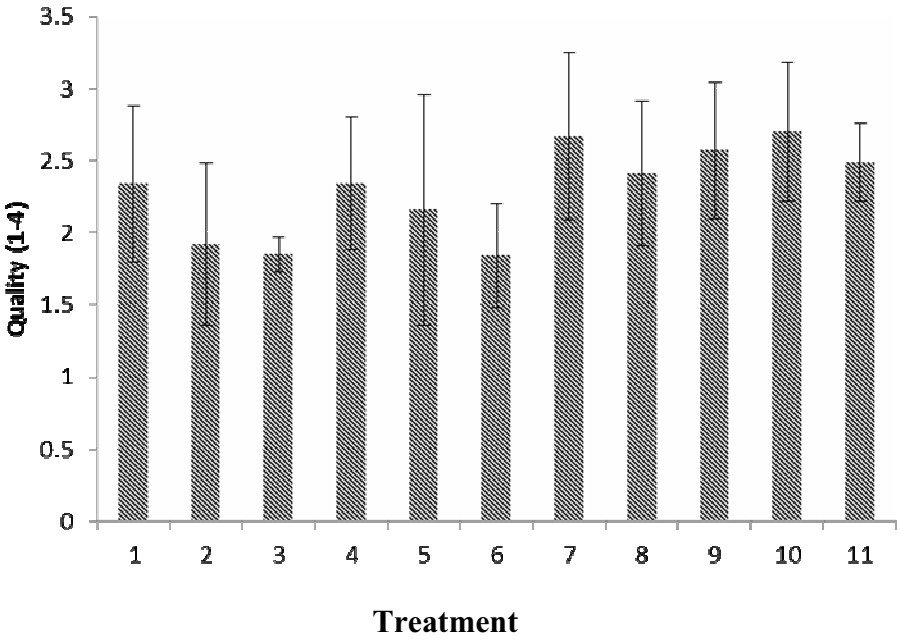


Fig. 15 Quality value/index of Chinese kale tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 µg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 µg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 µg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 µg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 µg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 µg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 µg amino acid/ml)

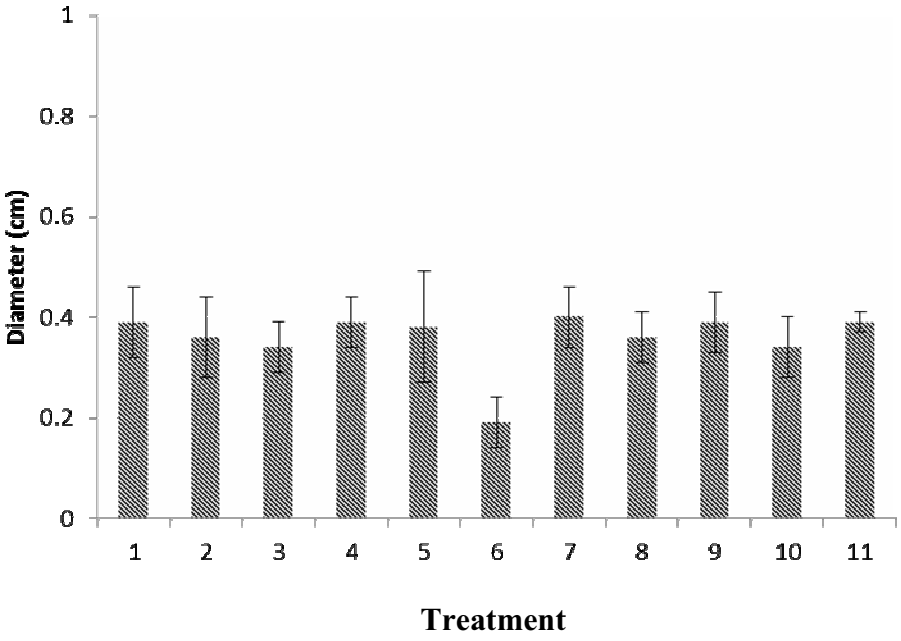


Fig. 16 Diameter of Chinese kale tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 µg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 µg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 µg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 µg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 µg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 µg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 µg amino acid/ml)

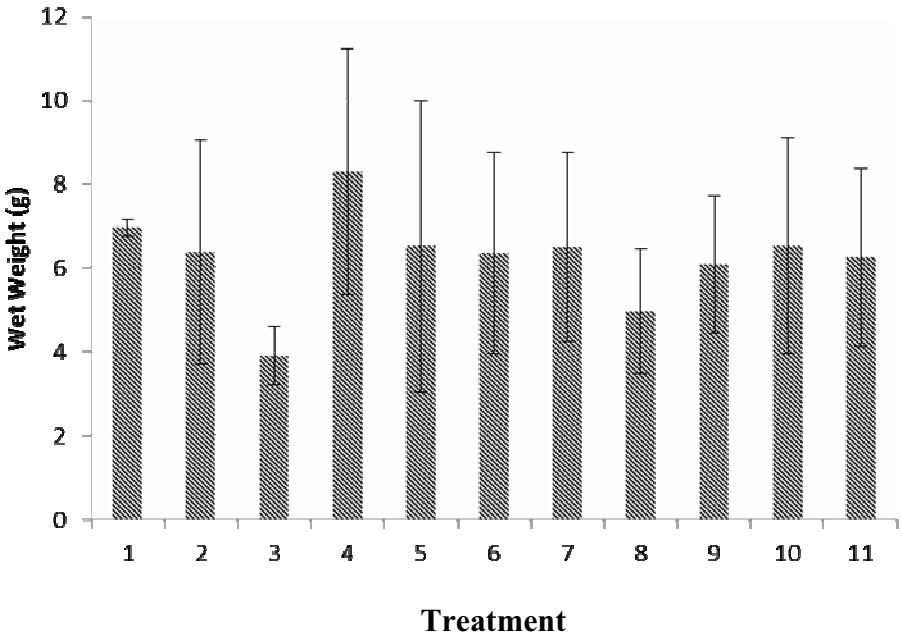


Fig. 17 Wet weight of Chinese kale tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 μg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 μg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 μg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 μg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 μg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 μg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 μg amino acid/ml)

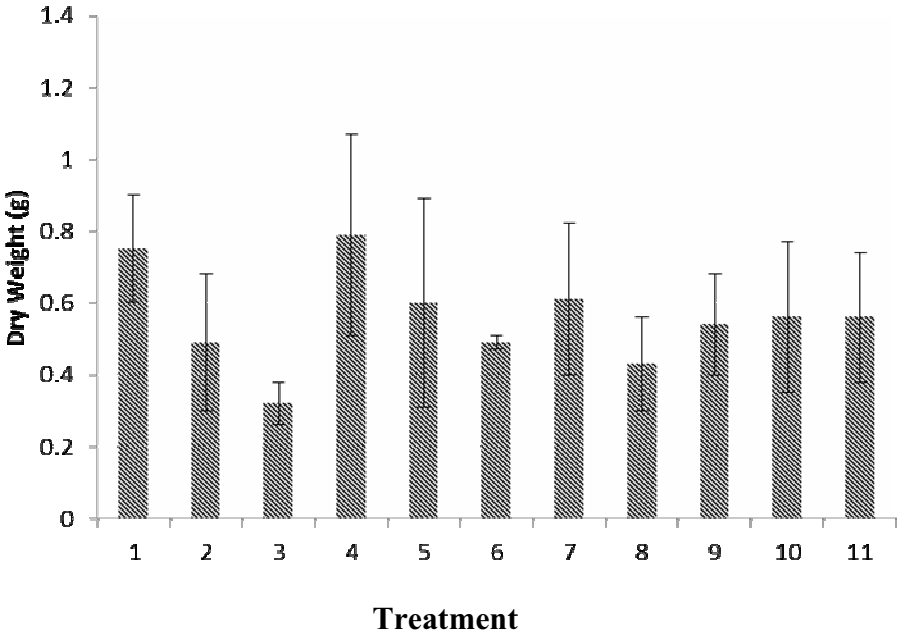


Fig. 18 Dry weight of Chinese kale tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 μg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 μg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 μg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 μg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 μg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 μg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 μg amino acid/ml)

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

Fig. 19 Growth of Chinese kale on day 40 tested by protein hydrolysates obtained from Neutrase hydrolysis of protein isolated from phorbol ester-free *J. curcas* seed cake with their controls (1= Protein without enzymatic digestion; 2 = Urea (30 mg/ml); 3 = Urea (60 mg/ml); 4 = Commercial protein hydrolysate (30 μg amino acid/ml); 5 = Commercial protein hydrolysate (15 μg amino acid/ml); 6 = Water; 7 = Protein hydrolysate at 10 μg amino acid/ml; 8 = Protein hydrolysate at 20 μg amino acid/ml; 9 = Protein hydrolysate at 30 μg amino acid/ml; 10 = Protein hydrolysate at 40 μg amino acid/ml; 11 = Protein hydrolysate at 50 μg amino acid/ml)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเปปไทด์ที่คาดว่าทำหน้าที่เร่งการเจริญเติบโตของพืชในโปรตีนสกัดโดยทำให้บริสุทธ์และศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ดังกล่าว

2. ควรศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่สูงขึ้นต่อการเจริญเติบโตของต้นคะน้าในแปลงทดลอง

3. ควรศึกษาผลของการเร่งการเจริญเติบโตของพืชสำคัญทางเศรษฐกิจต่าง ๆ อาทิ ข้าว ข้าวโพด ผัก hydroponic กล้วยไม้ และอื่น ๆด้วยโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลาอื่น ๆ และที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่ระยะเวลา และที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เนื่องจากโปรตีนสกัดเหล่านั้นอาจมีเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนที่ส่งผลต่อพืชชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน หรือพืชชนิดต่าง ๆ อาจตอบสนองต่อโปรตีนสกัดแต่ละตัวอย่างแตกต่างกัน

4. ควรศึกษาผลของการเก็บรักษาโปรตีนสกัดทั้งในรูปของผงและแบบของเหลวเข้มข้นต่อการเร่งการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่าง ๆ รวมถึงการศึกษาการ formulation ของโปรตีนสกัดทั้งในรูปของผงและแบบของเหลวเข้มข้นที่มีผลต่อการเร่งการเจริญเติบโตของพืช

5. ควรศึกษาผลของการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชสำคัญทางเศรษฐกิจต่าง ๆ เนื่องจากพบว่าโปรตีนสกัดนี้ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริก

เอกสารอ้างอิง

Adler-Nissen, J., 1979, "Dertermination of the Degree of Hydrolysis of Food Proteins Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 27, pp. 1256-1262.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th (Ed.), AOAC International, Arlington, Virginia, USA.

Chivandi, E., Kachigunda, B. and Fushai, F. A., 2005, "Comparison of the Nutrient and Antinutrient Composition of Industrially Processed Zimbabwean *Jatropha curcas* and *Glycine max* Meals", **Pakistan Journal of Biological Science**, Vol. 8, pp. 49-53.

Chivandi, E., Mtimuni J.P., Read J.S., and Makuza S.M., 2004, "Effect of Processing Method on Phorbol Esters Concentration, Total Phenolics, Trypsin Inhibitor Activity and the Proximate Composition of the Zimbabwean *Jatropha curcas* Provenance: a Potential Livestock Feed", **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Vol. 7, pp. 1001-1005.

Copeland, R.A., 1996, **Enzyme : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis**, Wiley-VCH, New York, p. 306.

Devappa, R.K. and Swamylingappa, B., 2008, "Biochemical and Nutritional Evaluation of *Jatropha* Protein Isolate Prepared by Steam Injection Heating for Reduction of Toxic and Anti-Nutritional Factors", **Journal of Science and Food Agriculture**, Vol. 88, pp. 911–919.

FAO/WHO, 1991, "Protein Quality Evaluation', **FAO Food and Nutrition Paper, no. 51.** A joint FAO/WHO expert consultation, Rome, Italy, pp. 4-66.

Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S. and Martínez, J.A. 1997, "Composition and Functional Properties of Protein Isolates Obtained from Commercial Legumes Grown in Northern Spain", **Plant Foods for Human Nutrition**, Vol. 51, pp. 331-342.

Gordon, J.A. and Marquardt, M.D., 1974, "Factors Affecting Hemagglutination by Concanavalin A and Agglutinin", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 332, pp. 136-144.

Hasegawa, N., Fukumoto, Y., Minoda, M., Plikomol, A. and Kubo, M., 2002, "Promotion of Plant and Root Growth by Soybean Meal Degradation Products", **Biotechnology Letters**, Vol. 24, pp. 1483-1486.

Hasegawa, N., Yamaji, Y., Minoda, M. and Kubo, M., 2003, "Effect of D-Methionine or L- Methionine on Root Hair of *Brassica rapa*", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 95, pp. 419-420.

ISTA, 1999, International Rules for Seed Testing, **Seed Science and Technology**, 21 Supplement.

Kim, S.B., Seo, S., Khan, M.A., Ki, K.S., Nam, M.S. and Kim, H.S., 2007, "Separation of Iron-Binding Protein from Whey through Enzymatic Hydrolysis"**, International Dairy Journal,** Vol. 17, pp. 625–631.

Kobayashi, T., Eun, C.H., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sagami, Y. and Kamada, H., 1999, "Phytosulfokine-α, a Peptidyl Plant Growth Factor, Stimulates Somatic Embryogenesis in Carrot", **Journal of Experimental Botany**, Vol. 50, pp. 1123-1128.

Laemmli, U.K., 1970, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4", **Nature**, Vol. 227, pp. 680-685.

Lee, J.Y., Lee, H.D. and Lee, C.H., 2001, "Characterization of Hydrolysates Produced by Mild Acid Treatment and Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soybean Flour", **Food Research International**, Vol. 34, pp. 217-222.

Li, G.H., Le, G.W., Liu, H. and Shi, Y.H., 2005, "Mung-bean Protein Hydrolysate Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity", **Food Science and Technology International**, Vol. 11, pp. 281-287.

Liu K. and Markakis P., 1989, "Trypsin Inhibition Assay as Related to Limited Hydrolysis of Inhibitors", **Analytical Biochemistry**, Vol.178, pp.159–165.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Pandall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", **Journal of Biological Chemistry,** Vol. 193, pp. 165-170.

Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F. and Wink, M., 1997, "Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas",* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 45, pp. 3152-3157.

Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A.O. and Becker, K., 1998, "Comparative Evaluation of Non-Toxic and Toxic Varieties of *Jatropha curcas* for Chemical Composition, Digestibility, Protein Degradability and Toxic Factors", **Food Chemistry**, Vol. 62, pp. 207-215.

Makkar, H.P.S., Francis, G. and Becker, K., 2008, "Protein Concentrate from *Jatropha curcas* Screw-Pressed Seed Cake and Toxic and Antinutritional Factors in Protein Concentrate"**, Journal of the Science of Food and Agriculture,** Vol. 88, pp. 1542-1548.

Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Davila-Ortyz, G. and Becker, K., 2006, "Chemical Composition, Toxic/Antimetabolic Constituents and Effects of Different Treatments on their Levels in Four Provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico", **Food Chemistry**, Vol. 96, pp. 80-89.

Marzo, F., Alonso, R., Urdaneta, E., Arricibita, F.J. and Ibáñez, F., 2002, "Nutritional Quality of Extruded Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and Its Effects on Growth and Skeletal Muscle Nitrogen Fractions in Rats", **Journal of Animal Science**, Vol. 80, pp. 875-879.

Matsumiya, Y., Sumiyoshi, S., Matsukura, T. and Kubo, M., 2007, "Effect on Epidermal Cell of Soybean Protein-degraded Products and Structural Determination of the Root Hair Promoting Peptide", **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 77, pp. 37-43.

McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M. and Ryan, C.A., 1992, "Structure, Expression, and Antisense Inhibition of the Systemin Precursor Gene", **Science**, Vol. 255, pp.1570–1573.

Parrado, J., Bautista, J., Romero, E.J., Garcia-Martinez, A.M., Friaza, V. and Tejada, M., 2008, "Production of a Carob Enzymatic extract: Potential Use as a Biofertilizer", **Bioresource Technology**, Vol. 99, pp. 2312-2318.

Pearce, G., Strydom, D., Jonson, S. and Ryan, C.A., 1991, "A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-inducible Proteinase Inhibitor Proteins, **Science**, Vol. 253, pp. 895–898.

Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H., 2008, "ACE-Inhibitory and Antioxidant Properties of Potato (*Solanum tuberosum*)", **Food Chemistry**, Vol.109, pp. 104-112.

Rho, S.G. and Kang, C.H., 2003, "The Factors Affecting the Backward-Transfer of Bovine Serum Albumin (BSA) from Sodium Bis (2-ethylhexyl) Sulfosuccinate (AOT) Reverse Micellar Solutions", **Korean Journal of Chemical Engineering**, Vol. 20, pp. 517-521.

Saetae, D. and Suntornsuk, W. (2010) Antifungal Activities of Ethanolic Extract from *Jatropha curcas* Seed Cake, *Journalof Microbiology and Biotechnology*, **20**, pp. 319-324.

Sanpa, S., Sumiyoshi, S., Kujira, T., Matsumiya, Y. and Kubo, M., 2006, "Isolation and Characterization of a Bluegill-Degrading Microorganism, and Analysis of the Root Hair-Promoting Effect of the Degraded Products", **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Vol. 70, pp. 340-347.

Selje-Assmann, N., Makkar, H.P.S., Hoffmann, E.M., Francis, G. and Becker, K., 2007, "Quantitative and Qualitative Analyses of Seed Storage Proteins from Toxic and Non-Toxic Varieties of *Jatropha curcas* L", **International Symposium on Energy and Protein Metabolism**, 9- 14, 2007, Vichy, France. EAAP Publication, p. 625.

Shewry, P.R., Napier, J.A. and Tatham, A.S., 1995, "Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis", **American Society of Plant Physiologists**, Vol. 7, pp. 945-956.

Stewart, O.J., Raghavan, G.S.V., Orsat, V. and Golden, K.D., 2003, "The Effect of Drying on Unsaturated Fatty Acids and Trypsin Inhibitor Activity in Soybean", **Process Biochemistry**, Vol. 39, pp. 483-489.

Thilborg, S.T., Christensen, S.B., Comett, C., Olsen, C.E. and Lemmich, E., 1994, "Molluscicidal Saponins from a Zimbabwean Strain of *Phytolacca dodecandra*", **Phytochemistry**, Vol. 36, pp.753-759.

Torrent, M., Poca, E., Campos, N., Ludevid, M.D. and Palau, V., 1986, "In Maize, Glutelin-2 and Low Molecular Weight Zeins are Synthesized by Membrane Bound Polyribosomes and Translocated into Microsomal Membranes", **Plant Molecular Biology**, Vol. 7, pp. 393-403.

Usman, L.A., Ameen, O.M., Lawal, A. and Awolola, G.V., 2008, "Effect of Alkaline Hydrolysis on the Quantity of Extractable Protein Fractions (Prolamin, Albumin, Globulin and Glutelin) in *Jatropha curcas* Seed Cake", **Journal of Food Technology**, Vol. 6, pp. 259-262.

Vaintraub, I.A. and Lapteva, N.A., 1995, "A Modified Method for the Indirect Quantitative Analysis of Phytate in Foodstuffs", **Analytical Biochemistry**, Vol. 225, pp. 206-212.

Yamagata, H., Tanaka, V. and Kasai, Z., 1982, "Biosynthesis of Storage Proteins in Developing Rice Seeds", **Plant Physiology**, Vol. 70, pp. 1094-1100.

Youle, R.J., and Huang, A.H.C., 1981, "Occurrence of Low Molecular Weight and High Cysteine Containing Albumin Storage Proteins in Oilseeds of Diverse Species, **American Journal of Botany**, Vol. 68, pp. 44-48.

ภาคผนวก

บทความที่ได้รับการเผยแพร่

1. Selanon, O. and Suntornsuk, W. 2010. *Jatropha curcas* Seed Cake: A Potential Protein Source for Producing Plant Growth Promoter. GMSTEC 2010: International Conference for a Sustainable Greater Mekong Subregion, Bangkok, 26-27 August 2010. (เอกสารแนบท้าย)

2. Selanon, O., Jitareerat, P. and Suntornsuk, W. 2009. Plant growth promotion by protein hydrolysate obtained from enzymatic digestion of protein isolated from *Jatropha curcas* seed cake. 3rd Annual meeting and presentation of recent research in tropical and sub-tropical plants, Bangkok, Thailand, 3-4 September 2009. (เอกสารแนบท้าย)

3. กระบวนการผลิตสารกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชและสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์โปรติเอส (ยื่นขอรับสิทธิบัตรในประเทศไทย เลขที่ 1001001233 วันที่ยื่นคำขอ 16 สิงหาคม 2553) (เอกสารแนบท้าย)

นักศึกษาที่จบ/ได้รับการสนับสนุนจากโครงการนี้

1. นางสาว อรอุมา เสลานนท์ จบการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา 2553

2. นางสาว ดลพร แซ่แต้ จบการศึกษาในหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา 2553

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานจากโครงการไปใช้ประโยชน์

บริษัท ลัดดา จำกัดกำลังศึกษาการใช้ประโยชน์ของโปรตีนสกัดจากการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์ Neutrase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับพืชไร่ชนิดต่าง ๆ อาทิ ข้าวและข้าวโพด โดยเก็บข้อมูลของผลการเร่งการเจริญเติบโตของพืชทั้งความสูง น้ำหนักและขนาดของลำต้น คุณภาพและความยาวของรวงข้าวและฝักข้าวโพด รวมทั้งผลผลิตของพืชต่อไร่ในแปลงทดลอง นอกจากนี้ ผศ. ดร. ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กำลังศึกษาการใช้ประโยชน์ของโปรตีนสกัดนี้เพื่อช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดพริก และอาจนำไปใช้ศึกษากับกล้วยไม้ในอนาคต

ตารางเปรียบเทียบ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผน	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ	ผลงานแล้วเสร็จ (%)
ศึกษาวิธีการผลิตและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนและผลิตโปรตีนสกัด	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบอื่น ๆ ของกากเมล็ดสบู่ดำ การศึกษาสภาวะการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ การศึกษาวิธีการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อผลิตเป็นโปรตีนสกัด	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบอื่น ๆ ของกากเมล็ดสบู่ดำ การศึกษาสภาวะการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ การศึกษาวิธีการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อผลิตเป็นโปรตีนสกัด	ทราบองค์ประกอบที่สำคัญของกากเมล็ดสบู่ดำ สามารถแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยการปรับ pH และทราบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ ผลิตโปรตีนสกัดโดยการย่อยโปรตีนที่แยกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเอนไซม์โปรติเอสและกรด	100
ศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนสกัดที่ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช	การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนสกัด	การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนสกัด	ทราบองค์ประกอบของโปรตีนสกัด	100
ศึกษาผลของการใช้โปรตีนสกัดต่อการเจริญเติบโตของพืช	การศึกษาการเจริญเติบโตของพืช	การศึกษาการเจริญเติบโตของเมล็ดพริกและต้นคะน้า	โปรตีนสกัดสามารถเร่งการเจริญเติบโตของเมล็ดพริกและต้นคะน้า	100

บทความสำหรับการเผยแพร่

กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดหนึ่งซึ่งแทบไม่มีมูลค่าและยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีสารพิษเป็นองค์ประกอบซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามกากเมล็ดสบู่ดำมีโปรตีนสูงและอาจนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์โดยอาศัยศาสตร์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ จากการศึกษาขั้นแรกพบว่าสารพิษในกากเมล็ดสบู่ดำถูกกำจัดออกโดยกระบวนการที่ไม่ซับซ้อนด้วยการใช้ตัวทำละลายที่ปลอดภัย คือเอทานอล หลังจากนั้นเมื่อกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่มีสารพิษแล้ว ทำการแยกโปรตีนออกจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยสารละลายด่าง ที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 3 ชั่วโมง และตกตะกอนโปรตีนด้วยการปรับความเป็นกรด จะได้ตะกอนของโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำ จากนั้นนำตะกอนโปรตีนไปทำแห้งซึ่งอาจนำไปใช้เพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์ หรือผ่านการย่อยสลายด้วยกรดและเอนไซม์โปรติเอส เพื่อผลิตโปรตีนสกัดที่มีคุณสมบัติในการเร่งการเจริญเติบโตของพืชและกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืช ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนสกัดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยกรดและเอนไซม์โปรติเอสสามารถเร่งการเจริญเติบโตของพริกและกระตุ้นการงอกของเมล็ดพริกได้ดี โดยโปรตีนสกัดที่ได้จากเอนไซม์ Neutrase ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริก เปอร์เซ็นต์การแทงรากของเมล็ดพริก อัตราการเจริญของต้นกล้าพริกและดัชนีการงอกของเมล็ดพริกสูงสุด รวมทั้งสามารถเร่งการเจริญเติบโตของต้นคะน้าได้ด้วย

เอกสารแนบท้าย