การศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบกระถิน
The study of hydrolysates Protein Production from *Leucaena leucocephala* Leaves

ธันยนันท์ ศรีพันธ์ลม[1,*],
ฐิฏิพร ชูศรี[1] และณัฏฐนิช ประทุมศรี[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนจากใบกระถินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยศึกษาระยะเวลาในการย่อยและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 (%v/v) ย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ pH 8.0 เป็นเวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) ในสัดส่วนเอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) ที่เวลา 90 นาที มีปริมาณโปรตีนสูงสุด 249.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นศึกษาการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส เปรียบเทียบ 3 วิธี คือ 1) สกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2) สกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และ 3) สกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่า การสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ การสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 275.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า มีค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของโปรตีนสกัดจากกระถินที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ร้อยละ 50) เท่ากับ 1,850 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับสารมาตรฐาน BHA (Butylatedhydroxyanisole) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 90 mg/L

คำสำคัญ: กระถิน, โปรตีนไฮโดรไลเซท, อัลคาเลส, โปรตีน, สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

In this study, the extraction of protein from the *Leucaena leucocephala* leaves by alcalase enzyme was studied. The concentration of enzyme was varied between 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 (%v/v) at 60 °C and pH 8.0 for 90, 120, 150 and 180 mins. The extracted solution was analyzed to obtain protein content by Lowry method. The maximum protein content was 249.55 µg/mL by using 0.7 (%v/v) alcalase enzyme for 90 min. The results were also compared with 1) Using heat with alcalase enzyme 2) Using base with alcalase enzyme and 3) Using alcalase enzyme only. It can be observed from the results that using base with alcalase enzyme is the most efficient in extracting protein from the *Leucaena leucocephala* leaves with the extracted protein content equaling 481.82 µg/mL. Using heat with alcalase enzyme gave the protein content only 275.29 µg/mL. In addition, the antioxidant activity of hydrolysate protein was investigated by using DPPH radical scavenging assay and IC_{50} was measured and compared to BHA (Butylatedhydroxyanisole) (standard substance). The results showed that IC_{50} of hydrolysate protein and BHA was 1,850 and 90 mg/L, respectively.

Keywords: *Leucaena leucocephala*, hydrolysate vegetable protein, alcalase, protein, antioxidant

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม 85 ถ.มาลัยแมน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

* E-mail: thanyanan.kae123@gmail.com

บทนำ

กระถินเป็นพืชริมรั้วขึ้นง่ายตายยากตัดแล้วก็แตกขึ้นมาได้อีก กระถินมีประโยชน์ตั้งแต่ยอด ฝัก ต้น ตลอดไปจนถึงราก ข้อมูลทางเภสัชวิทยาสารสกัดจากใบกระถินฉีดเข้าหลอดโลหิตสุนัขทำให้ความดันโลหิตลดลง อัตราการเต้นของหัวใจช้าลง กระตุ้นการหายใจ ฤทธิ์ลดความดันโลหิตชาวชนบทนิยมปลูกกันเป็นแนวรั้วบ้าน ใบกระถินอุดมด้วยธาตุไนโตรเจนและเกลือโพแทสเซียม นำมาหมักเป็นปุ๋ยได้ ใบ ยอด ฝักและเมล็ดอ่อนใช้เป็นอาหารของ วัว ควาย แพะ แกะ ฯลฯ (นฤมล มงคลชัยภักดิ์, ม.ป.ป.) ซึ่งในใบกระถินมีแคลเซียมสูงถึงร้อยละ 27 ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.17 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21

โปรตีนคือโครงสร้างพื้นฐานที่สำคัญที่สร้างเซลล์แต่ละเซลล์ขึ้นมา ร่างกายเราจะมีการผลัดเซลล์เก่าและสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเพื่อซ่อมแซมตัวเองอยู่ตลอดเวลา โปรตีนจึงเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายซึ่งโปรตีนเป็นสารอาหารที่ควรให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก เพราะร้อยละ 80 ของร่างกายล้วนแต่ประกอบด้วยโปรตีน ดังนั้นหากร่างกายเราขาดโปรตีนแล้วจะก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย ในแง่โภชนาการ โปรตีนเป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน โปรตีนเป็นส่วนประกอบของร่างกายที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากน้ำ โดยเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตเช่น เอนไซม์ และฮอร์โมน เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานและการดำรงชีวิต มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการเสริมสร้างเนื้อเยื่อส่วนที่สึกหรอของคนและสัตว์ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาวิจัยแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีในท้องถิ่นซึ่งกระถินเป็นพืชท้องถิ่นที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะในการผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส ทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Lowry และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay) จากสารสกัดโปรตีนจากกระถินว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ปริมาณเท่าไร ซึ่งผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อที่จะสามารถนำพืชที่ไม่ค่อยได้รับความนิยมในการบริโภคมาเพิ่มมูลค่า และผลิตเป็นอาหารเสริมที่ช่วยเพิ่มโปรตีนต่อไปในอนาคต (ฐิฏิพร ชูศรี, 2555)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถินโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดได้

วิธีการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research)

1. ตัวแปรที่ทำการศึกษา

ตัวแปรต้น: เอนไซม์อัลคาเลส

ตัวแปรตาม: ปริมาณโปรตีน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2. กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ ใบกระถินที่มีในท้องถิ่น

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

3.1 ตู้อบ (oven)
3.2 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
3.3 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)
3.4 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
3.6 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
3.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean; $\overline{X}$) ร้อยละ (percentage) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

5. วิธีดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังนี้

5.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำใบกระถินมาล้างให้สะอาด เก็บเฉพาะใบของกระถินออกมา นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ผึ่งแดดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

5.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Wang & Hesseltine, 1965)

เติมสารละลาย 1% เคซีน ลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร อุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำเอนไซม์อัลคาเลส (เจือจาง 1,000 เท่าด้วยน้ำกลั่น) 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองข้างต้น ผสมและบ่มนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย 5% TCA 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที กรองตะกอนโปรตีน นำสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมวิธีการเช่นเดียวกัน แต่เติมสารละลาย 5% TCA 3 มิลลิลิตร ลงไปในเอนไซม์อัลคาเลส 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเติมสารละลาย 1% เคซีน ลงไป 1 มิลลิลิตร

คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส จากสูตร

Units/mL คือ

$$\frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน (μg/mL)} \times \text{ค่าความเจือจาง} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด (5 mL)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกรดอะมิโนไทโรซีน (181.19 g/mole)} \times \text{เวลา (10 min)} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ลงไป (1 mL)}}$$

5.3 การศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 กรัม แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ pH 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 (%v/v) 1 มิลลิลิตร คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00075, 0.00125, 0.00175 และ 0.00225 (%v/w) ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นระยะ เมื่อครบกำหนดเวลาให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

5.4 การสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส เปรียบเทียบ 3 วิธี คือ

5.4.1 สกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

1) นำใบกระถินบดแห้ง 4 กรัม ผสมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน นำมาให้ความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

2) เติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.7 (%v/v) ลงไป 1 มิลลิลิตร คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยทำการเขย่าตัวอย่างเป็นระยะ

3) นำไปให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4) นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนของเหลวด้านบนไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

5.4.2 สกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

1) นำใบกระถินบดแห้ง 4 กรัม ผสมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน นำมาปรับ pH ให้ได้ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2) นำมาปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ (2)-(4) ในข้อ 4.1)

5.4.3 สกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 กรัม ผสมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน นำมาปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2) - 4) ในข้อ 5.4.1)

5.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ดัดแปลงจาก Lowry et al., 1951)

ปิเปตสารละลายโปรตีนที่ได้จากการสกัดมา 1.0 ไมโครลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เจือจางแล้ว 5.0 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย Alkali copper ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.6 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay)

เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่ง DPPH 0.0118 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 500 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.0600 มิลลิโมลาร์ นำไปสแกนหา λ_{max} จะได้ความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHA โดยชั่งสารมาตรฐาน BHA 0.05 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BHA แต่ละความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH 3.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้เอทานอลเป็นสารละลายแบลงค์ (blank solution) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐาน BHA เป็นสารสกัดโปรตีน จากนั้นหาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลอง และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Yamazaki, et al., 1994)

ผลการวิจัย

1. ผลการเตรียมวัตถุดิบ

น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบที่ตรียมโดยวิธีการอบใบกระถิน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักของพืชคงที่ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบ

วัตถุดิบ	น้ำหนักกระถินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักกระถินหลังอบ (กรัม)	ความชื้น (%)
ใบกระถินบดแห้ง	385.50	267.42	30.63

ผลจากความร้อนที่ใช้ในการอบเข้าไปประเหยน้ำหรือความชื้นที่อยู่ในใบกระถินออกไปจึงมีผลทำให้น้ำหนักของใบกระถินน้อยลง

2. ผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส หรือความสามารถในการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า หลอดตัวอย่างมีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหลอดควบคุมมีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสได้ 16.557 Units/mL คือ เอนไซม์อัลคาเลสปริมาตร 1 มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ดังแสดงในตารางที่ 2

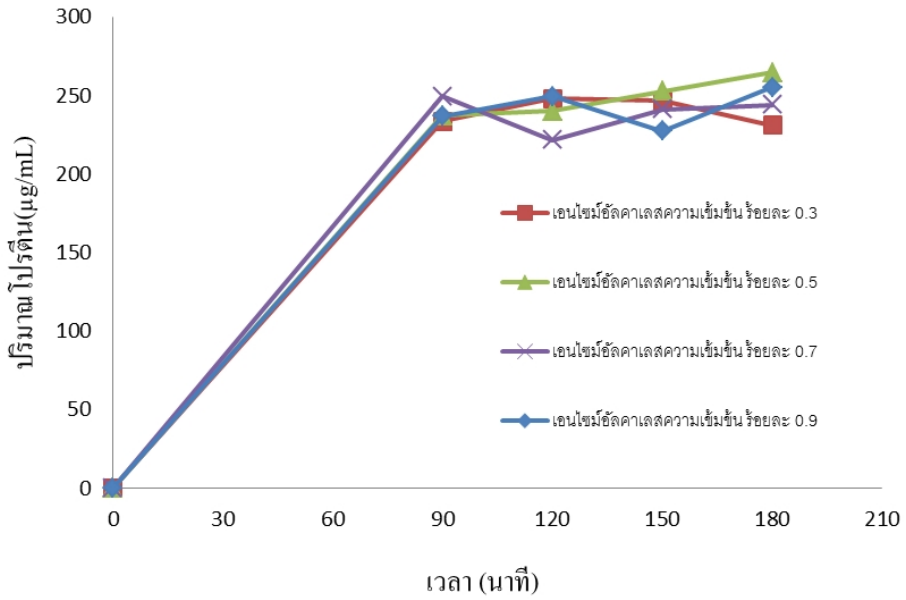
ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน

การทดลอง	ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส (Units/mL)
หลอดตัวอย่าง	12	16.557
หลอดควบคุม	6	

หมายเหตุ: 16.557 Units/mL คือ เอนไซม์อัลคาเลสปริมาตร 1 มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที

3. ผลการศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส

จากการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (%v/v) เวลาย่อยที่ 180 นาที มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 264.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.7 (%v/v) เวลาย่อยที่ 90 นาที มีปริมาณโปรตีนมากเช่นกันคือ 249.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองนี้จึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนจากใบกระถินที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที เนื่องจากที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.5 (%v/v) เวลาย่อยที่ 180 นาที เป็นเวลาที่นานเกินไป และปริมาณโปรตีนที่ได้ก็ไม่ต่างกันมากนัก ดังแสดงในรูปภาพที่ 1



รูปภาพที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยต่างๆ

4. การสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส

จากการศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน โดยใช้สภาวะความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที เปรียบเทียบ 3 วิธี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส

วิธีการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส	เอนไซม์ต่อใบกระถิน (%v/w)	เวลาในการย่อย (นาที)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
การสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	275.29
การสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	481.82
การสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	249.55

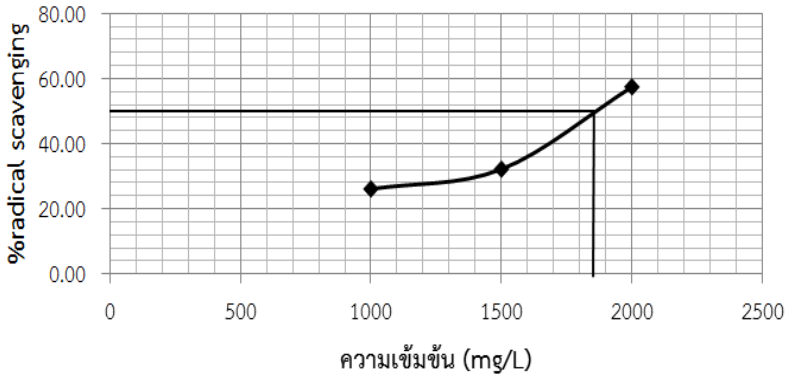
จากตารางที่ 3 พบว่า วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน เนื่องจากสารละลายเบสจะเข้าไปทำลายพันธะเพปไทด์ โดยทำให้โปรตีนมีประจุเปลี่ยนแปลงไป ทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอนออกมา และเมื่อนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้น พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส 275.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 249.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5. ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนสกัดจากใบกระถิน และสารละลายมาตรฐาน BHA ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยการคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของโปรตีนสกัดจากใบกระถิน และสารละลายมาตรฐาน BHA โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของโปรตีนสกัดจากกระถินที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ร้อยละ 50) แสดงในตารางที่ 4 และ 5 เพื่อนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} แสดงในรูปภาพที่ 2 และ 3

ตารางที่ 4 ค่า % radical scavenging และค่า IC_{50} ของโปรตีนสกัดจากใบกระถิน

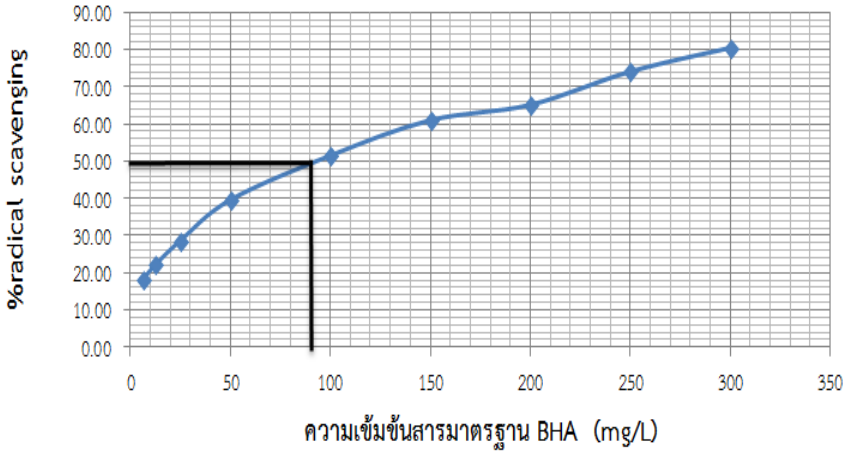
ความเข้มข้นโปรตีนสกัดจากใบกระถิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% radical scavenging	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1,000	26.09±7.03	1,850
1,500	32.17±4.20	
2,000	57.46±2.83	



รูปภาพที่ 2 ค่า IC_{50} ของโปรตีนสกัดจากใบกระถิน

ตารางที่ 5 ค่า % radical scavenging และ ค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน BHA

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน BHA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% radical scavenging	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อลิตร)
6.25	18.27±1.92	90
12.5	22.15±1.00	
25	28.63±2.47	
50	39.59±4.23	
100	51.49±1.71	
150	60.58±2.64	
200	65.11±5.31	
250	74.06±2.58	
300	80.43±3.95	



รูปภาพที่ 3 ค่า IC_{50}ของสารมาตรฐาน BHA

จากตารางที่ 4, 5 และรูปภาพที่ 2, 3 พบว่า จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนสกัดจากกระถินและสารละลายมาตรฐาน BHA เมื่อนำค่า % radical scavenging มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} ของโปรตีนสกัดจากใบกระถินและสารละลายมาตรฐาน BHA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,850 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าโปรตีนที่สกัดจากใบกระถินสามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก หรือไม่มีผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ

สรุปผลการวิจัย

จากการเตรียมวัตถุดิบ (ใบกระถิน) พบว่า น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบที่ตรียมได้ โดยน้ำหนักกระถินก่อนอบ 385.50 กรัม และน้ำหนักกระถินหลังอบ 267.42 กรัม คิดเป็นร้อยละความชื้นเท่ากับ 30.63

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า เอนไซม์อัลคาเลสปริมาตร 1 มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที และความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส สามารถสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส 275.29 และ 249.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

และจากการศึกษาต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนสกัดจากใบกระถิน พบว่าโปรตีนสกัดจากใบกระถินและสารละลายมาตรฐาน BHA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,850 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่สกัดจากใบกระถินสามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก หรือไม่มีผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับ BHA (ณัฏฐนิช ประทุมศรี, 2556)

เอกสารอ้างอิง

ฐิฏิพร ชูศรี. (2555). **ศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส.** ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

ณัฏฐนิช ประทุมศรี. (2556). **การศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบกระถิน**. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

นฤมล มงคลชัยภักดิ์. (ม.ป.ป.) **พืชผักสมุนไพรใกล้ครัว: กระถิน.** ค้นเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2554 จาก https://www.gotoknow.org/posts/243565

Wang, H.L. & Hesseltine, C.W. (1965). Studies on the extracellular proteolytic enzymes of Rhizopus oligosporus. **Canadian Journal of Microbiology**, 11 (4), 727-732.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem,** 193 (1, November), 265–275.

Yamazaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. & Sato, T. (1994). Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** 42 (8), 1663-1665.