ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม โดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000)

วัสดุอุปกรณ์

1. ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl Apparatus)
2. เครื่องย่อย (Digestion Apparatus)
3. เครื่องกลั่น (Distallation)
4. ขาตั้งและบิวเรตสำหรับไทเทรตสารละลาย
5. ขวดรูปชมพู่ขนาด (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวงขนาด 25, 100 และ 300 มิลลิลิตร
7. น้ำกลั่น
8. บีกเกอร์
9. glass bead or boiling chip
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. Conc. Sulfuric acid
2. Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)
3. Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้ Sodium hydroxide 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. Hydrochloric เข้มข้น 0.1 N
5. Boric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ
6. Indicator เตรียมโดยใช้ (mixed indicator: methylred 0.1 กรัม: bromocresol green 0.1 กรัม ใน ethanol 100 ml)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม (ควรมีโปรตีนประมาณ 5 กรัม) ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mixed catalyst: $CuSO_4$ 0.1 กรัม, $NaSO_4$ 2 กรัม และ conc.H_2SO_4 25 กรัม

<u>การย่อย (Digestion)</u>

Prince of Songkla University Pattani Campus

2. ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆจนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

<u>การกลั่น (Distillation)</u>

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10-15 ml นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น

4. เติม 40% NaOH 40-50 ml

5. นำ receiving flask ที่มี 4% boric acid อยู่ 20-25 ml และเติม indicator รียบร้อยแล้วมารองรับสารละลายที่กลั่นได้

6. กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 ml

7. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู

8. ทำ blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

9. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

การคำนวณ

การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีนี้ ควรทำตัวอย่างไว้ตรวจสอบ เรียกว่า Blank (โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง)

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\times N\times 1.4\times F}{W_t}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

W_t คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือ ค่าแฟคเตอร์

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วย soxhlet (AOAC, 2000)

วัสดุอุปกรณ์

1. Soxhlet apparatus
2. หลอดใส่ตัวอย่าง
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า

Prince of Songkla University Pattani Campus

5. เครื่องชั่งไฟฟ้า

6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

วิธีวิเคราะห์

1. ใส่ขวดกลมสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมัน ประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน

5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด

7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_2 \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น โดยวิธี Air Oven Method (A.O.A.C., 2000)

วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)
2. ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium can) สำหรับหาความชื้น
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105±5 องศาเซลเซียส เวลา 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ใส่ลงในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงชั่งน้ำหนัก

2. กระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนัก นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง

4. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบและกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\% \text{ ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 2000)

วัสดุอุปกรณ์

1. Crucible
2. Muffle furnace (เตาเผา)
3. Hot plate
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีวิเคราะห์

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2. กระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_1)

3. ชั่งตัวอย่าง อย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน

4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4 จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_2)

6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{S}$$

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบระดับการย่อยโปรตีน (DH) ด้วยวิธีการวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระด้วยการทำปฏิกิริยากับ TNBS (Benjakul and Morrissey, 1997)

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดแก้ว
2. แท่งแก้วคน
3. เครื่องชั่ง
4. ไมโครปิเปต
5. บีกเกอร์
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
7. หลอดหยด
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. Vortex
10. Hot plate

สารเคมี

1. 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid (TNBS)
2. Sodium sulfite
3. *L*- 2 – Amino – 4 – methyl pentanoic acid (*L*-leucine)

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (125 ไมโครลิตร) เติม phosphate buffer เข้มข้น 0.2 M (pH 8.2) จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และเติม 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย TNBS เข้มข้นร้อยละ 0.01 เขย่าให้เข้ากัน
2. ตั้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ในที่มืด)
3. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Sodium sulfite เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm
5. คำนวณปริมาณ α -amino acid ที่ได้อยู่ในรูปของ L-leucine
6. จากนั้นคำนวณระดับ DH โดยใช้สูตร (Benjakul and Morrissey, 1997)

Prince of Songkla University Pattani Campus

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \times 100$$

L_t = ปริมาณ α - amino acid ที่เวลา t

L_0 = ปริมาณ α - amino acid เริ่มต้น

L_{max} = ปริมาณ α - amino acid หลังจากย่อยโปรตีนด้วย 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Slinkard and Singleton. 1977)

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดแก้ว
2. แท่งแก้วคน
3. เครื่องชั่ง
4. ไมโครปิเปต
5. บีกเกอร์
6. Shaker incubator
7. หลอดหยด
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 5
10. Vortex
11. Evaporator

สารเคมี

1. Folin and Ciocalteu Phenol Reagent
2. Sodium carbonate (Na_2CO_3)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่อง Shaker incubator ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในที่มืด

2. กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 5 นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3. ตัวอย่างที่ได้ 20 µl ผสมกับสารละลาย Folin – Ciocalteu ความเข้มข้น 2N ปริมาตร 100 µl และปรับปริมาตรเป็น 1600 µl ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาทีในที่มืดที่

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. วัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV – Visible spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดจะแสดงเป็นค่าของกรดแกลลิคเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

2. การวิเคราะห์แทนนิน (ดัดแปลงจาก Mondor *et al.,* 2009)

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดแก้ว
2. แท่งแก้วคน
3. เครื่องชั่ง
4. ไมโครปิเปต
5. บีกเกอร์
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
7. กระจกป้องกันความร้อน
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. Vortex
10. Hot plate

สารเคมี

1. Acetone
2. *n*-butanol
3. HCl
4. Ammoniumsulfate ferric

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมร้อยละ 70 (v/v) ของอะซีโตนปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วย สารละลาย *n*-butanol-HCl (95:5,v/v) จำนวน 3 มิลลิลิตร

2. เติม 0.1 มิลลิลิตร ferric reagent (ร้อยละ 2 ของ ammoniumsulfate ferric ใน 2 N HCl) ปิดปากหลอดด้วยกระจกป้องกันความร้อน

3. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนใส

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

1. สมบัติการละลาย (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.,* 1951)

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดแก้ว
2. แท่งแก้วคน
3. เครื่องชั่ง
4. ขวดปรับปริมาตร
5. บีกเกอร์
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
7. หลอดหยด
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. Vortex
10. Centrifuge
11. Centrifuge tube
12. pH meter

สารเคมี

1. HCl
2. NaOH
3. Bovine serum albumin

วิธีวิเคราะห์

1. ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต จำนวน 10 มิลลิกรัมโปรตีน ละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water; DI) จำนวน 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH นำสารละลายกวนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

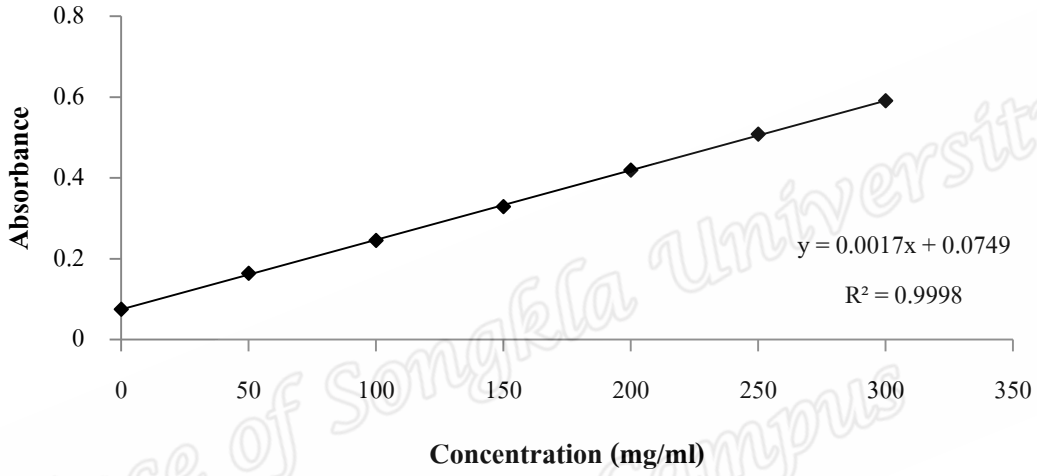
2. ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับสารละลายก่อนหน้านี้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 *g* เป็นเวลา 15 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในส่วนใส ด้วยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951) โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น Standard และปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ได้หลังจากละลายตัวอย่างใน 0.5 N NaOH

4. คำนวณความสามารถในการละลายจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

Solubility (%) = (ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด) × 100



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

Standard Protein

2. สมบัติการเกิดฟอง (ดัดแปลงจาก Shahidi *et al*., 1995)

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. Homogenizer
5. กระบอกตวง
6. ไม้รรทัด

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีวิเคราะห์

2.1 การตรวจสอบ Foaming Capacity

2.1.1 เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ3.0 (กรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้เกิดฟองโดยใช้ Homogenizer ที่ความเร็ว 16,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทลงในกระบอกตวงปริมาตร 250 มิลลิลิตร ตรวจวัดปริมาตรฟองทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่า FE (Foam expansion) ดังสมการ

$$FE\ (\%\ volume\ increase) = (V_1/V_0) \times 100$$

เมื่อ V_1 คือ ปริมาตรฟองทั้งหมด

เมื่อ V_0 คือ ปริมาตรสารละลายเริ่มต้นก่อนตีปั่นให้เกิดฟอง

2.2 การตรวจสอบ Foam Stability

2.2.1 ตรวจสอบความคงตัวของฟอง โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับการหาค่า FE แต่บันทึกปริมาตรของสารละลายทั้งหมดหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 0.5, 5, 10 และ 60 นาที คำนวณค่า FS ดังนี้

$$FS\ (\%) = (V_t / V_0) \times 100$$

เมื่อ V_t คือ ปริมาตรหลังการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ณ เวลาต่างๆ

เมื่อ V_0 คือ ปริมาตรทั้งหมดหลังจากตีปั่น (ที่เวลา 0 นาที)

3. สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella, 1978)

วิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตถั่วหรั่ง โดยวิเคราะห์ หาค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นจากค่า EAI และวิเคราะห์ความเสถียรของอิมัลชั่นที่เกิดขึ้นจากค่า ESI

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต
5. Homogenizer
6. Vortex mixer
7. Spectrophotometer

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปรตีนปริมาตร 6 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 0.10, 0.25 ,0.50 และ 1.0 (กรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 20,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2. จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายปริมาตร 50 μL ที่นาที ที่ 0 และ10 นำมาเจือจาง 100 ด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A_{500} จากนั้นคำนาณค่า EAI และ ESI ดังนี้

$$EAI\ (m^2/g) = (2\times 2.303\times A_{500}\times DF)/l\O C$$

A_{500} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

DF = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชั่นเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

l = light path length (เมตร)

Ø = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชั่น

C = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

ค่า ESI คำนวณได้จาก

$$ESI\ (นาที) = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

A_0 = ค่าความขุ่น

Δt = ระยะเวลาที่ผ่านไป (นาที)

ΔA = ค่าความขุ่นที่เปลี่ยนไป $A_0 - A_{10}$

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. สมบัติการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อน ดัดแปลงจาก (La-ongdaq *et al*.,2011 และ Keawmanee *et al*., 2011)

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. Vortex mixer

สารเคมี

1. Na-phosphate buffer pH 7.0
2. NaCl

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายโปรตีนโดยนำตัวอย่างโปรตีนผง 1 กรัม ผสมในสารละลาย 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.0 ที่มีปริมาณเกลือ NaCl เข้มข้นแตกต่างกัน (0, 25, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์)
2. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยใช้น้ำเย็น ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm

Prince of Songkla University Pattani Campus

ภาคผนวก จ

วิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรเสตจากถั่วหรั่งโดยมีวิธีในการตรวจสอบดังนี้

1. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS radical scavenging activity (Re *et al*., 1998)

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต
5. Vortex mixer
6. Spectrophotometer

สารเคมี

1. 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt (ABTS)
2. Potassium persulfate
3. Methanol

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียม Stock solution ที่มีส่วนผสมของสารละลาย ABTS เข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate เข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ ผสม Stock solution ทั้งสองด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บสารละลายผสมในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2. นำสารละลายที่ได้มาเจือจางโดยใช้ Methanol ในอัตราส่วน (1:50 ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลาย ABTS ที่ใช้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

3. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 2850 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer (เตรียม Blank โดยผสมสารตัวอย่างเหมือนข้างต้นแต่เปลี่ยนมาเติมน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง) คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยร้อยละ (% Radical-scavenging activity)

Prince of Songkla University Pattani Campus

Radical-scavenging activity (%) = [(B-A)/B] × 100

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

2. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity (Shimada *et al*., 1992)

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต
5. Vortex mixer
6. Spectrophotometer

สารเคมี

1. 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl (DPPH)
2. Ethanol

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

2. ผสมสารละลายให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมห้องโดยวางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-1800 spectrophotometer คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยร้อยละ (% Radical-scavenging activity)

Radical-scavenging activity (%) = [(B-A)/B] × 100

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Metal ions chelating activity (Decker and Welch 1990)

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้วคน
2. เครื่องชั่ง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต
5. Vortex mixer
6. Spectrophotometer

สารเคมี

1. Ferrous chloride
2. 3-(2-Pyrydyl) – 5,6 – diphenyl- 1,2,4 – triazine - 4′,4′′, disulfonic acid sodium saltอ (Ferrozine)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Ferrous chloride ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ferrozine ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรจากนั้นคำนวณค่ากิจกรรม Chelating activity ในหน่วยร้อยละ (% Chelating activity)

$$\text{Chelating activity (\%)} = [(B-A)/B] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

ภาคผนวก ฉ

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

Prince of Songkla University Pattani Campus

แบบฟอร์มการทดสอบทางประสาทสัมผัส

โดยวิธี Hedonic scale

ผลิตภัณฑ์ชาเขียวเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่.....เวลา……..

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้แล้วให้คะแนนระดับคุณลักษณะต่าง ๆ ของตัวอย่าง โดยให้คะแนน 0-9 ซึ่งมีความหมายดังนี้

9 ชอบมากที่สุด
8 ชอบมาก
7 ชอบปานกลาง
6 ชอบเล็กน้อย
5 เฉย ๆ
4 ไม่ชอบเล็กน้อย
3 ไม่ชอบปานกลาง
2 ไม่ชอบมาก
1 ไม่ชอบมากที่สุด

ลักษณะตัวอย่างที่ทดสอบ	ระดับคะแนนความชอบ		
	รหัส……	รหัส……..	รหัส……..
สี (สีของน้ำชา)			
กลิ่น			
รสชาติ			
เนื้อสัมผัส (ความเป็นตะกอน)			
ระดับความขม			
ระดับความชอบโดยรวม			

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

ขอบคุณค่ะ

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

โดยวิธี Scoring test

ผลิตภัณฑ์ชาเขียวเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต

Prince of Songkla University Pattani Campus

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่.....เวลา……..

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้ จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนน “คุณลักษณะของแต่ละปัจจัย” ของตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกท่านมากที่สุด และกลั้วปากระหว่างทดสอบตัวอย่างทุกตรั้งก่อนเริ่มชิมตัวอย่างใหม่

รายละเอียดการให้คะแนน

1. **ความใสของของน้ำชา**

   1 = ขุ่นมาก 2 = ขุ่นเล็กน้อย 3 = ใสเล็กน้อย 4 = ใสปานกลาง 5 = ใสมาก

2. **ระดับความขม**

   1 = ขมมาก 2 = ขมปานกลางน้อย 3 = ขมน้อย 4 = ขมเล็กน้อย 5 = ไม่ขมเลย

3. **ลักษณะเนื้อสัมผัส (ความเป็นตะกอน)**

   1 = มีตะกอนมาก 2 = มีตะกอนปานกลาง 3 = มีตะกอนน้อย 4 = มีตะกอนเล็กน้อย5 = ไม่มีตะกอนเลย

ลักษณะตัวอย่างที่ทดสอบ	ระดับคะแนน		
	รหัส……	รหัส……	รหัส……..
ความใสของน้ำชา			
ระดับความขม			
เนื้อสัมผัส (ความเป็นตะกอน)			

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

ขอบคุณค่ะ

Prince of Songkla University Pattani Campus