บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

- เมล็ดถั่วหรั่งจากตลาดสด จ.ปัตตานี เป็นพันธุ์สงขลา 1 ลักษณะเมล็ดมีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีแดง และเป็นถั่วหรั่งที่ทำการเพาะปลูกในพื้นที่จังหวัดปัตตานีในช่วงระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2554
- น้ำกลั่น (Distilled water)
- น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)
- ชาเขียวพร้อมดื่ม (Unif Green tea) รสต้นตำหรับ (บริษัท ยูนิ-เพรสซิเดนท์ (ประเทศไทย จำกัด)
- น้ำมันถั่วเหลือง ยี่ห้อกุ๊ก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

3.1.2 เอนไซม์

- เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) ในรูปสารละลาย (Liquid in form) (Sigma Aldrich, ประเทศเดนมาร์ก) เป็น Endoprotease ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformis* มี กิจกรรมเท่ากับ 2.4 AU/g (Anson units per gram) สภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาคือ pH 8.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Jamdar *et al*., 2010) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme) ในรูปเม็ด (Granule in form) (Novozymes (China) Biotechnology Co., Ltd, ประเทศจีน) เป็น Protease/Peptidase complex สามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง Endoprotease และ Exoprotease เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* มีกิจกรรมเท่ากับ 500 MG ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Novozymes, 2000)

3.1.3 สารเคมี

- Trichloromethane; $CHCl_3$ (Labscan Asia ประเทศไทย)
- Methyl alcohol; CH_3OH (J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Sodium hydroxide; NaOH (Labscan Asia ประเทศไทย)
- Hydrochloric acid; HCl (J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid; TNBS (Sigma ประเทศเยอรมัน)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- Sodium sulfite; Na_2SO_3 (Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย)
- *L*- 2 – Amino – 4 – methyl pentanoic acid; *L*-leucine (HIMEDIA ประเทศอินเดีย)
- Bovine serum albumin; BSA (Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลน)
- Sodium lauryl sulphate; SDS (LOBAL Chemie ประเทศอินเดีย)
- Sodium chloride; NaCl (Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย)
- 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt; ABTS (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- Potassium persulfate; $K_2S_2O_8$ (Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย)
- (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Tolox (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl; DPPH (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- Ethyl alcohol; C_2H_5OH (Merck Finechem ประเทศออสเตรเลีย)
- Iron (II) chloride tetrahydrate; Ferrous chloride (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- 3-(2-Pyrydyl) – 5,6 – diphenyl- 1,2,4 – triazine - 4′,4′′, disulfonic acid sodium salt; Ferrozine (Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Folin and Ciocalteu Phenol Reagent (2.0 Normal) (LOBAL Chemie ประเทศอินเดีย)

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- อุปกรณ์เตรียมตัวอย่าง เช่น เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง หลอดเซนตริฟิว บุชเชอร์ฟังเนล
- กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman paper No.4)
- โถดูดความชื้น (Dessicator)
- ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium can)
- ครูซิเบิล (Crucible)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
- แมกเนติกสเตอเรอ (Magnetic stirrer)
- ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 60 เมส

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- ตู้อบลมร้อน (Hot air dryer) บริษัทกล้วยน้ำไทเตาอบ
- ตู้เขย่า (Incubator shaker) รุ่น LSI-5002M ยี่ห้อ Daihan Lab Tech ประเทศเกาหลี
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น FD8-Cool safe Advance ยี่ห้อ Scanvac ประเทศเดนมาร์ก
- Hotplate stirrer รุ่น 002278 ยี่ห้อ Fisher scientific ประเทศสหราชอาณาจักร
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง รุ่น TE 313S-DS 310 ยี่ห้อ Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge ยี่ห้อ Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-22 ยี่ห้อ Memert ประเทศเยอรมันนี
- ตู้อบไฟฟ้า รุ่น D-6450 ยี่ห้อ Heraeus Hanau ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrometer) รุ่น Genesys 10S UV-Vis ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด ประเทศไทย
- ชุดอุปกรณ์ย่อยโปรตีน รุ่น TR ยี่ห้อ Gerhardt ประเทศเยอรมัน
- ชุดกลั่นโปรตีน รุ่น VAP1 ยี่ห้อ Gerhardt ประเทศเยอรมัน
- Soxhlet distillatory รุ่น 306 M ยี่ห้อ Gerhardt ประเทศเยอรมัน
- เครื่องบดแห้ง รุ่น Cyclotec ^{TM} 1093 ยี่ห้อ Foss ประเทศสวีเดน
- เครื่องร่อนแป้ง (Sieve shaker) รุ่น Retsch บริษัท ไซแอนติฟิคโปรโมชั่น จำกัด ประเทศไทย

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมและองค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่ง

3.3.1.1 เตรียมแป้งถั่วหรั่ง โดยนำเมล็ดถั่วหรั่งล้างน้ำให้สะอาดแล้วแช่น้ำสะอาดทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง แกะเปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงออก อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเมล็ดถั่วหรั่งที่อบแล้วบดด้วยเครื่องบดแห้งจนละเอียดเป็นผงแป้งร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 60 เมส เก็บแป้งถั่วหรั่งที่ได้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงแดดและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Lawal *et al.,* 2007)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.1.2 สกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่ง เริ่มจากนำแป้งถั่วหรั่งสกัดแยกไขมันออกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform: Methanol (อัตราส่วน 9:1) โดยผสมแป้งถั่วหรั่งกับตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำตะกอนที่ได้ไปขจัดตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง Rotary evaporater (ดัดแปลงจาก Sittiwat, 2000)

3.3.1.3 ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก โดยนำแป้งถั่วหรั่งที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนี้ ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C., 2000) ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet method (A.O.A.C., 2000) ปริมาณความชื้น ด้วยวิธี Air Oven Method (A.O.A.C., 2000) ปริมาณเยื่อใยด้วยวิธีวิเคราะห์ Crude fiber (A.O.A.C., 2000) และปริมาณเถ้าด้วยวิธี Furnace Method (A.O.A.C., 2000) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก

3.3.2 การผลิตโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น

3.3.2.1 การสกัดโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว (ปริมาณของแป้งที่ใช้สกัดแต่ละครั้งประมาณ 250 กรัม) เติมน้ำ DI ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 10 โดยใช้ 1 N ของ NaOH กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ความเร็วรอบ 9000 *g* ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4.5 ด้วย 1 N ของ HCl กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 *g* ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้ (ดัดแปลงจาก Jamdar *et al.,* 2010; Li *et al.,* 2008) ละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 10 w/v ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเท่ากับ 7 กวนสารละลายอย่างต่อเนื่อง ทำแห้งสารละลายด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FD8 Coolsafe Advance, Scanvac, Vassingerod, Denmark) เพื่อให้ได้โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นในรูปผง เรียกตัวอย่างว่าโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (Bambara groundnut protein concentrate; BPC)

3.3.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่ง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นโดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ (เอนไซม์อัลคาเลส และฟลาโวไซม์) เพื่อกำหนดระดับการย่อยสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับโปรตีนที่ย่อยสลายด้วย

เอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

3.3.3.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่เตรียมได้ โดยเตรียมเป็นสารละลายโปรตีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร จากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.3.2.2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วย 0.1 N NaOH ให้เท่ากับ 8 หรือ 7 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือฟลาโวไซม์ตามลำดับ บ่มสารละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์อัลคาเลส หรือบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยเติมเอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ ร้อยละ 1 และ 3 (w/v) บ่มสารละลายในอ่างควบคุมอุณภูมิพร้อมเขย่าสารละลายด้วยความเร็วรอบ 170 rpm เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ณ เวลา 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 และ 360 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายในน้ำร้อน อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ดัดแปลงจาก Jamda *et al.,* 2010) นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysis; DH) ด้วยวิธีการวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระโดยการทำปฏิกิริยากับ TNBS (Benjakul and Morrissey, 1997) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลาย (%) ของโปรตีนกับเวลา (นาที)

3.3.3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีน เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร โดยใช้สภาวะการย่อยสลาย (พีเอชของสารละลายและอุณหภูมิในการบ่ม) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ตามวิธีการทดลองก่อนหน้านี้ แต่เติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายในสภาวะการย่อยสลายที่กำหนดเป็นระยะเวลา 360 นาที เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายโปรตีนในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปตรวจสอบระดับการย่อยสลาย (% DH) เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 3.3.3.1 รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมฐาน 10 ($\log_{10}$) ของความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้กับระดับการย่อยสลายของโปรตีน (%) วิเคราะห์หาสมการเชิงเส้นจากกราฟความสัมพันธ์

3.3.3.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ ทำได้โดยคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องใช้สำหรับการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสมการเชิงเส้น เตรียมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตให้ได้ระดับการย่อยสลายต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 10, 20

และ 30 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ จากนั้นทำแห้งสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตในรูปผง เรียกว่า โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นไฮโดรไลเสต (Bambara groundnut protein concentrate hydrolysate; BPCH) (ดัดแปลงจาก Klompong *et al*., 2007) กำหนดให้ BPCH-A คือโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและ BPCH-F คือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

3.3.4 ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณและสมบัติของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

3.3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ BPCH-A และ BPCH-F เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อที่ 3.3.1.3 รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Dancan's New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.4.2 ศึกษาปริมาณสารต้านโภชนาการในโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต วิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเสตเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (BPC; Control) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการดังนี้

- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีของ Slinkard and Singleton (1977)
- การวิเคราะห์แทนนินตามวิธีของ Mondor *et al.* (2009)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค

3.3.4.3 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต โดยตรวจสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

- สมบัติการละลาย (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.,* 1951)
- สมบัติการเกิดฟอง (ดัดแปลงจาก Shahidi *et al*., 1995)

วิเคราะห์ค่าความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming expansion; FE) และวิเคราะห์ค่าความคงตัวของฟอง (Foam stability; FS)

- สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella, 1978)

วิเคราะห์ค่าดัชนีความสามารถในการอิมัลชัน (Emulsion ability index; EAI) และวิเคราะห์ค่าดัชนีค่าความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability index; ESI)

- สมบัติการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อน (ดัดแปลงจาก La-ongdao *et al*., 2011 และ Thammarat *et al*., 2011)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ง วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Dancan' s New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.4.4 ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS radical scavenging activity ตามวิธีของ Re *et al*. (1998)

- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity ตามวิธีของ Shimada *et al*. (1992)

- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Metal ions chelating activity ตามวิธีของ Decker and Welch (1990)

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก จ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Dancan's New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.5 การประยุกต์ใช้

เลือกโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหมาะสมที่สุด จาก BPCH-A และ BPCH-F อย่างละหนึ่งระดับการย่อยสลาย พิจารณาจากค่าการละลายและค่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ โดยพิจารณาค่าที่สูงที่สุด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาตอนที่ 3.3.5.1

3.3.5.1 การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งเป็นสารเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวโดยมีขั้นตอนในการเตรียมผลิตภัณฑ์ คือ นำผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่ม รสดั้งเดิม ยี่ห้อ ยูนิฟ เติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตผง (BPCH-A หรือ BPCH-F) ลงในผลิตภัณฑ์ชาเขียวให้มีความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กวนผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ ดังนี้

- ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันวิเคราะห์กิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่ม และผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มที่เติมโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยตรวจสอบกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS (Shimada *et al*., 1992 และ Re

Prince of Songkla University Pattani Campus

et al., 1998) และกิจกรรมการจับโลหะไอออน (Decker and Welch,1990)

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก จ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Dancan's New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

- ตรวจสอบทางด้านประสาทสัมผัส ประเมินผลทางประสาทสัมผัสโดยประเมินความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวผสมโปรตีนไฮโดรไลเสต (BPCH-A หรือ BPCH-F) แบบ 9 - point Hedonic Scaling เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวที่ไม่เติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต ใช้ผู้ชิมทั้งหมด 30 คน ผู้ชิมให้คะแนนผลิตภัณฑ์ตามความชอบในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ระดับความขม และระดับความชอบโดยรวม แบ่งระดับคะแนน เป็น 9 ระดับ ดังนี้ 9 เท่ากับ ชอบมากที่สุด 8 เท่ากับ ชอบมาก 7 เท่ากับ ชอบปานกลาง 6 เท่ากับ ชอบเล็กน้อย 5 เท่ากับ เฉยๆ 4 เท่ากับ ไม่ชอบเล็กน้อย 3 เท่ากับ ไม่ชอบปานกลาง 2 เท่ากับ ไม่ชอบมาก และ 1 เท่ากับ ไม่ชอบมากที่สุด ตัวอย่างแบบประเมินแสดงในภาคผนวก ฉ

- ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring test เพื่อให้ผู้ทดสอบประเมินความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ในด้านระดับความใส ระดับความขม และและระดับความเป็นตะกอนของผลิตภัณฑ์ ใช้ผู้ชิมทั้งหมด 30 คน โดยผู้ชิมจะให้คะแนนผลิตภัณฑ์ที่ตรงกับความรู้สึกมากที่สุด มีระดับคะแนนอยู่ 5 ระดับ คือ 1 เท่ากับแตกต่างมาก 2 เท่ากับแตกต่างปานกลาง 3 เท่ากับแตกต่างน้อย 4 เท่ากับแตกต่างเล็กน้อย และ 5 เท่ากับไม่แตกต่างเลย (Sinha *et al.,* 2007) ตัวอย่างแบบประเมินแสดงในภาคผนวก ฉ

การวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Block Design, CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Prince of Songkla University Pattani Campus