บทที่ 3

วัสดุ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชที่ใช้เป็นอาหารชนิดต่างๆ จากตลาด ร้านค้า หลายๆ แห่งในกรุงเทพมหานครฯ ตัวอย่างพืชที่ใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1.1 ตัวอย่างที่เป็นพืชสด จะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและปริมาณความชื้นทันทีที่ได้รับตัวอย่างมา

1.2 ตัวอย่างที่เป็นพืชแห้ง บรรจุใส่ถุงพลาสติกชนิดพอลีเอสเตอร์ (Polyester) ปิดสนิทเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและปริมาณความชื้น

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) PHM 64 Research pH meter บริษัท Radiometer

2.2 เครื่องอังน้ำ (Water Bath)

2.3 เครื่องบด (Blender MX-311 N) บริษัท National

2.4 เครื่องบดความเร็วสูง (Ultra-turrax T25) บริษัท Tank & Hunkel

2.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (NA 264, Oertling) บริษัท S & C

2.6 เครื่องกวนแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) Nuova 7 Stirer Thermolyne บริษัท Sybron Corporation พร้อมทั้งแม่เหล็ก

2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet spectrophotometer) Unicam SP 1800 บริษัท Pye Unicam

2.8 ตู้อบ (Hot air oven)

2.9 โถทำแห้ง (Desiccator)

2.10 เครื่องปั่นเขย่า (Votrex-Mixer) บริษัท Torika

2.11 เครื่องทำแห้งในขณะเยือกแข็ง (Freeze dryer) บริษัท FTS System

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 กรดเกลือเข้มข้น AR Grade ของบริษัท Merck

3.2 กรดน้ำส้ม AR Grade ของบริษัท Merck

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide pellets GR) ของบริษัท Merck

3.4 เอนไซม์ทริปซิน (Crystalline porcine trypsin Type IX) ของบริษัท Sigma

3.5 แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate) AR Grade ของบริษัท Merck

3.6 ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ AR Grade ของบริษัท BDH

3.7 ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเธน (Tris hydroxymethyl-aminomethan) AR Grade ของบริษัท Merck

3.8 เอน-เบนโซอิล-ดีแอล-อาร์จีนีน-พารา-ไนโตรอะนิลีด-ไฮโดรคลอไรด์ (N-Benzyl-DL-arginine-4-nitroanilidehydrochloride (DL-BAPA) ของบริษัท Merck

3.9 แคลเซียมซัลเฟต ไดไฮเดรต (Calcium sulphate dihydrate) AR Grade ของบริษัท Merck

4. วิธีการวิจัย

4.1 การหาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง

หาปริมาณความชื้นในตัวอย่างโดยวิธีของ A.O.A.C 1991 วิเคราะห์โดยการคำนวณหาน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมาอบในตู้อบ (Hot air oven)

ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนได้น้ำหนักคงที่ นำมาคำนวณหาปริมาณความชื้นเป็นร้อยละ ดังสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละ} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไปเมื่ออบแห้ง} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

4.2 การหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในตัวอย่าง (Liu และ Markakis, 1989)

การหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยวิธีของ Liu และ Markakis โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นได้แก่ เบนโซอิล-ดีแอล-อาร์จีนิน-พารา-ไนโตรอะนิลีด-ไฮโดรคลอไรด์ (Benzoyl-DL-arginine-p-Nitroanilide hydrochloride (BAPA)) โดยเอนไซม์ทริปซิน (Crystalline procine trypsin Type IX Sigma) ได้ผลิตภัณฑ์คือ พารา-ไนโตรอะนิลีน(p-nitroaniline) ซึ่งมีสีเหลือง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง อัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโต-มิเตอร์ (Ultraviolet spectrophotometer)

ในกรณีที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะไปจับกับเอนไซม์ทริปซินทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร จึงลดลง

4.2.1 การเตรียมสารเคมี

4.2.1.1 ทรีสบัฟเฟอร์ (Tris buffer) ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) เมทิลลามีน (Tris (hydroxymethyl) methylamine) 6.05 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 2 โมเลกุลของน้ำ ($CaCl_2.2H_2O$) 2.94 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.2 ด้วยกรดเกลือแล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำ

4.2.1.2 สารละลายตัวถูกย่อย (Substrate solution)

ละลายเบนโซอิล-ดีแอล-อาร์จินีน-พารา-ไนโตรอะนิลีด ไฮโดรคลอไรด์ (Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride (BAPA)) 40 มิลลิกรัม ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulphoxide) 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยทริสบัฟเฟอร์ ซึ่งมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายตัวถูกย่อยนี้จะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง และจะต้องเตรียมขึ้นใช้วันต่อวัน

4.2.1.3 สารละลายทริปซิน (Trypsin solution)

ละลายคริสทัลลีน พอร์ซีน ทริปซิน(Crystalline porcine trypsin) 10 มิลลิกรัม ในกรดเกลือความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.5 ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายนี้ (Stock trypsin solution) ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

สารละลายทริปซินที่ใช้ทำปฏิกริยา เตรียมได้โดยปิเปตต์สารละลายทริปซินที่เก็บไว้ (Stock trypsin solution) 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบด้วย กรดเกลือความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.5 ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์

4.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 2 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร สกัดบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมทริสบัฟเฟอร์ (Tris buffer) ซึ่งมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1-2 นาที จึงนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman No. 42) นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

4.2.3 วิธีวิเคราะห์

4.2.3.1 ปิเปตต์สารละลายต่างๆ ตามลำดับ และปริมาตรที่แสดงไว้ในตารางที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ลำดับการเติมและปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ลำดับ	สารละลาย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)			
		หลอดทดลองควบคุม		หลอดทดลองของตัวอย่าง	
		a	b	c	d
1	น้ำกลั่น	1	1	v*	v*
2	สารละลายตัวถูกย่อย	2	2	2	2
3	สารตัวอย่าง	-	-	1-v*	1-v*
4	เอนไซม์ทริปซิน	-	0.5	-	0.5
	—— อุ่นหลอดทดลองในเครื่องอังน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที——				
5	กรดน้ำส้มร้อยละ 30	0.5	0.5	0.5	0.5
6	เอนไซม์ทริปซิน	0.5	-	0.5	-
รวมปริมาตร		4	4	4	4

* v คือปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ปรับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์

4.2.3.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.2.3.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet spectrophotometer)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.4 การคำนวณ

จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินแสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ทริปซินที่ถูกยับยั้ง (Trypsin units inhibited, TUI) ต่อน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของตัวอย่าง (TUI/มิลลิกรัมตัวอย่าง) ดังนี้คือ

$$\text{TUI/มิลลิกรัมตัวอย่าง} = \frac{(A_b - A_a) - (A_d - A_c) \times 100}{\text{น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

A_a = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสารละลายในหลอดทดลอง a

A_b = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสารละลายในหลอดทดลอง b

A_c = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสารละลายในหลอดทดลอง c

A_d = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสารละลายในหลอดทดลอง d

$$\text{TUI/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง} = \frac{\text{TUI/มิลลิกรัมตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างสด 1 มิลลิกรัม}^{**}}$$

** น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม คิดจากร้อยละของความชื้นในตัวอย่าง

4.3 ศึกษาผลของการปรุงอาหารต่อปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในพืชตัวอย่าง

นำพืชตัวอย่างมาปรุงโดยวิธีการต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิ ความชื้นและระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 วิธีการปรุงอาหารและระยะเวลาต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย

ความชื้น	วิธีการ	อุณหภูมิ	เวลา									
			5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	1 วัน	2 วัน
wet method	แช่น้ำ	RT*						✓	✓	✓	✓	✓
	ต้มน้ำเดือด	100°C	✓	✓	✓	✓	✓					
	นึ่งอัดไอ**	121°C	✓	✓	✓	✓	✓					
dry method	อบแห้ง***	100°C	✓	✓	✓	✓	✓					

* RT คืออุณหภูมิห้อง

** นึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

*** อบแห้งโดยใช้ตู้อบ (Hot air oven)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารมาวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีในข้อ 4.2

4.4 ศึกษาผลของการแปรรูปถั่วเหลืองต่อปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

4.4.1 การทำน้ำนมถั่วเหลือง

ทำน้ำนมถั่วเหลือง โดยวิธีต่อไปนี้

วิธีที่ 1 แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำค้างคืน

วิธีที่ 2 แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำร้อน (80 องศาเซลเซียส) 2 ชั่วโมง

ต่อจากนั้นนำถั่วเหลืองที่แช่ไว้ในวิธีที่ 1 หรือวิธีที่ 2 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารโดยใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองที่แช่แล้ว 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน นำถั่วที่บดแล้วมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้ไปต้มด้วยไฟอ่อนๆ จนเดือดประมาณ 5 นาที แล้วเติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อน้ำนมถั่วเหลือง 1,000 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนจะนำไปทำให้แห้งในขณะเยือกแข็ง (Freeze drying) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ตามวิธีในข้อ 4.2

4.4.2 การทำเต้าหู้ขาวชนิดแข็ง

นำถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกแล้วจำนวน 300 กรัม แช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) กับน้ำ 2 ลิตร แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก ต้มน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้จนเดือด ยกลงจากเตา เติมแมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$)15 กรัม คนเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่ จึงเทใส่พิมพ์ ใช้ของหนักกดทับไว้เพื่อกดให้น้ำออก แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินตามวิธีในข้อ 4.2

4.4.3 การทำเต้าฮวย

นำถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกแล้วจำนวน 300 กรัม แช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดกับน้ำ 2 ลิตร แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเอากากออก ต้มน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้จนเดือด ยกลงจากเตา เตรียมสารละลายของแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4.1H_2O$) โดยละลายแคลเซียมซัลเฟต 10.5 กรัม ในน้ำ 1-2 มิลลิลิตร เทน้ำนมถั่วเหลืองที่ต้มเดือดแล้วลงในสารละลายแคลเซียมซัลเฟตเทกลับไปกลับมา 2 ครั้ง อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเต้าฮวยที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินตามวิธีในข้อ 4.2

4.4.4 การทำฟองเต้าหู้

นำถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกแล้วแช่ในน้ำอุ่น (65 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) กับน้ำโดยใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองที่แช่น้ำแล้ว 1 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วนแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้ไปต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำลงไปจนถึงระดับที่แห้งลงไป กรองด้วยผ้าขาวบางตาถี่ ปรับพีเอชของน้ำนมถั่วเหลืองเป็น 7-8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 เทลงบนกะทะแบนซึ่งตั้งอยู่บนเครื่องอังน้ำ (Water bath) ซึ่งมีอุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เมื่อผิวหน้าของน้ำนมถั่วเหลืองตึงเป็นแผ่น ช้อนแผ่นฟองเต้าหู้วางหงายขึ้นซับให้แห้งแล้วนำไปแขวนบนราวจนแห้งสนิท นำฟองเต้าหู้ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินตามวิธีในข้อ 4.2

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two ways analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารในระยะเวลาและวิธีการต่างๆ กันและหาค่าความแตกต่างของ

ค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองที่ผ่านการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์โดยวิธีต่างๆ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test (เต็มศรี ชำนิจารกิจ, 2531)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย