หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

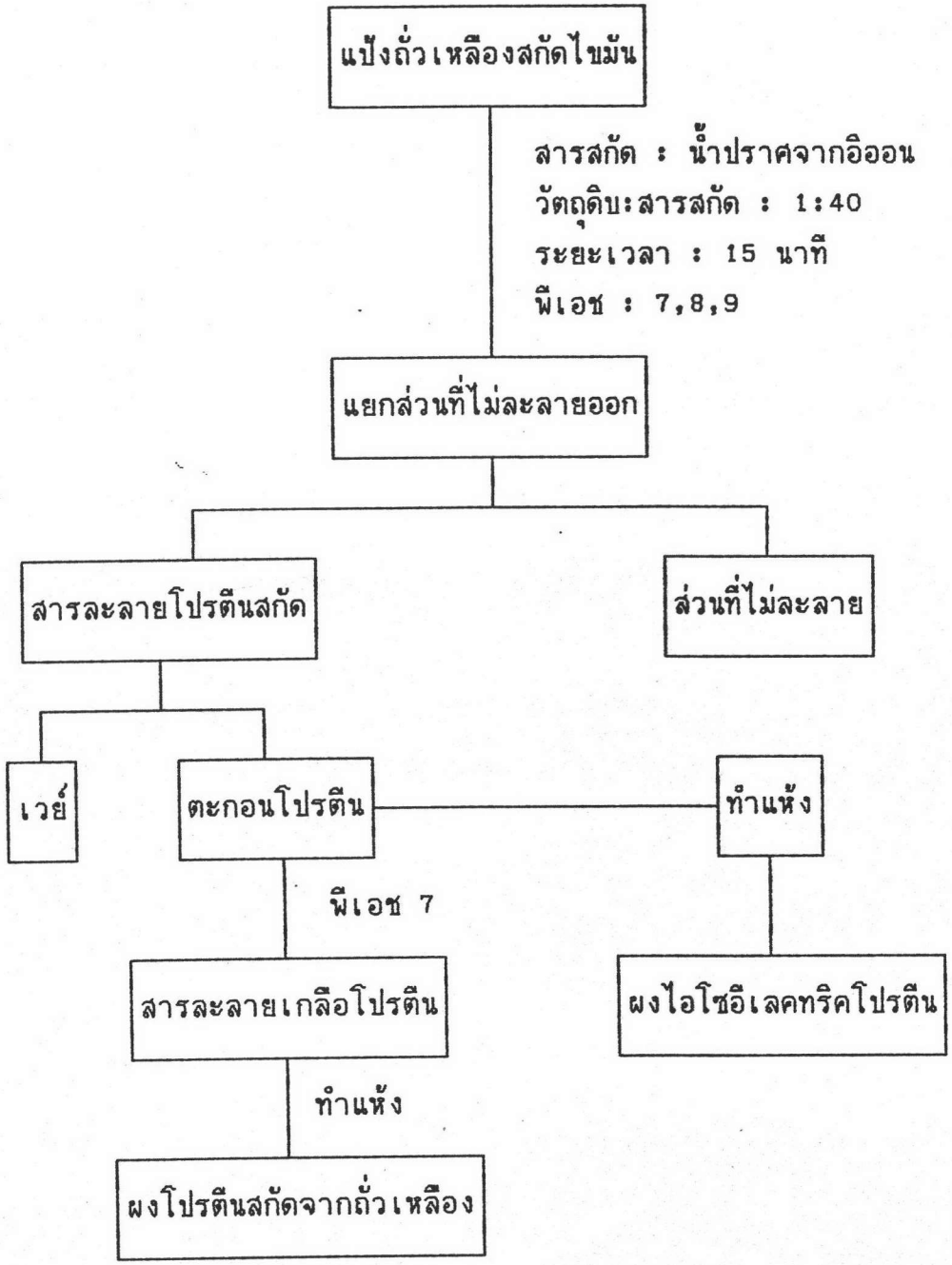
1. การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

1.1 หาพีเอชที่เหมาะสมในการสกัด ใช้วิธีการผลิตซึ่งดัดแปลงมาจากผลการทดลองของสมชาย[15] โดยละลายแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน (ชื่อทางการค้า คือ Nutrisoy ของบริษัท ADM) จำนวน 50 กรัม ด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) จำนวน 2 ลิตร (อัตราส่วนของแป้งต่อน้ำเท่ากับ 1:40) แล้วปรับพีเอชของน้ำแป้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, G.R. ของบริษัท E. Merck) เข้มข้นร้อยละ 50 ให้ได้พีเอช 7, 8 และ 9 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer, Thermolyne nuova 7) เป็นเวลา 15 นาที นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Flements GS 100) เพื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายออก นำส่วนใสมาปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดเกลือ (Hydrochloric acid G.R. ของบริษัท E. Merck) ความเข้มข้น 6 นอร์มัล ตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอนแล้วจึงแยกส่วนใสตอนบนทิ้งไป นำส่วนที่เหลือเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออก นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำพีเอชต่างๆ กันนี้ไปอบแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ เพื่อเลือกพีเอชที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

1.2 การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองชนิดผงแห้ง เมื่อได้พีเอชที่เหมาะสมในการสกัดแล้ว เตรียมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเช่นเดียวกับข้อ 1.1 นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปกระจายตัวในน้ำให้ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณร้อยละ 4 ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าจนตะกอนโปรตีนละลายหมด นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Mini Spray dryer, Buchi) โดยใช้อุณหภูมิลมเข้า 190° ซ. อุณหภูมิลมออก 90° ซ. ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองชนิดผง

1.3 การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง โดยวิธีทางเคมี (Chemical Analysis)[36-40] นำตะกอนอบแห้งของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง มาหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีการต่อไปนี้

ภาพที่1 แผนภูมิการเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ดัดแปลงจากวิธีของสมชาย[17]



1.3.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยการอบด้วยตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven Method)

1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Micro Kjeldahl

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้เครื่อง Soxhlet

1.3.4 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าโดยการเผาในเตาเผาเถ้า (Muffle Furnance)

1.3.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและใยอาหาร ได้จากการคำนวณ โดยนำผลบวกขององค์ประกอบอื่นๆ ที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 1.3.1-1.3.4 หักออกจากค่า 100

1.3.6 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (เฉพาะผงโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino Acid Analyzer)[40]

รายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ อยู่ในภาคผนวก ก.

2. <u>การเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง</u> นำโปรตีนสกัดที่ได้จากการตกตะกอนในข้อ 1.1 มาทำให้กระจายตัวในน้ำ 150 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มัล กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าจนตะกอนโปรตีนละลายหมด เติมน้ำมันข้าวโพด (ชื่อทางการค้า คือ Mazola) และ MCT oil (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Mead Johnson) ปริมาณ 16 และ 4 กรัมตามลำดับ เติมวัตถุเจือปนอาหาร (Food Additive) ที่เหมาะสม เติมส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรต (Maltodextrin ของบริษัท Goodman Fielder และ น้ำตาลทราย) 60 กรัมปั่นผสมให้เข้ากันในเครื่องปั่นผสมจนเกิดเป็นอีมัลชั่น นำไป homogenize ด้วย homogenizer (Polytron, Kinematica GmbH ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Mini Spray dryer, Buchi) โดยใช้อุณหภูมิลมเข้า (inlet temperature) และอุณหภูมิลมออก (outlet temperature) 130 และ 90° ซ. ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูตรที่ 1 นำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ, ประเมินคุณค่าทางโภชนาการด้วยการวิเคราะห์ทางเคมีและการศึกษาทางชีวภาพ ดังรายละเอียดในข้อ 3, 4 และ 5 ที่จะกล่าวถึงต่อไป

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูตรที่ 1 มาเติม dl-methionine ในปริมาณ 1.2 กรัมต่อ 16 กรัมไนโตรเจน ได้อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูตรที่ 2 นำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน

(ข้อ 4.6) และหาคุณค่าทางโภชนาการทางชีวภาพ (ข้อ 5)

2.1 ปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์ เปลี่ยนแปลงส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปให้มีน้ำตาลทรายเป็นส่วนผสมอยู่ร้อยละ 0, 10, 20 และ 30 ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทำ Panel test[41] โดยใช้ผู้ชิม 15 คน โดยให้คะแนนผลิตภัณฑ์ทั้งรส, กลิ่นและสี ตั้งแต่ 1-4 จากชอบมากที่สุดไปน้อยที่สุด เพื่อเลือกหาอัตราส่วนของน้ำตาลทรายและ maltodextrin ที่เหมาะสมเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด

2.2 ปรับปรุงการละลาย (Solubility) และความคงตัวของการแขวนตะกอน (Colloidal Stability) ของผลิตภัณฑ์

2.2.1 การเลือกวัตถุเจือปนอาหาร (Food Additive) ที่เหมาะสมเตรียมผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง 3 ผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์ที่ 1 ไม่เติมวัตถุเจือปนอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ 2 และ 3 เติมเลซิติน (Lecithin) และกัวร์กัม (Guargum) ปริมาณ 0.5 และ 0.1 กรัมต่อผลิตภัณฑ์พร้อมดื่ม (ready to drink product) 100 มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณสูงที่สุดที่องค์การอนามัยโลกอนุญาตให้เติมลงในผลิตภัณฑ์นม นำผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ดรรชนีการละลาย (Solubility Index) และความคงตัวของการแขวนตะกอน (Apparent Colloidal Stability) เพื่อเลือกวัตถุเจือปนอาหารที่เหมาะสม รายละเอียดของการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพอยู่ในภาคผนวก ก.

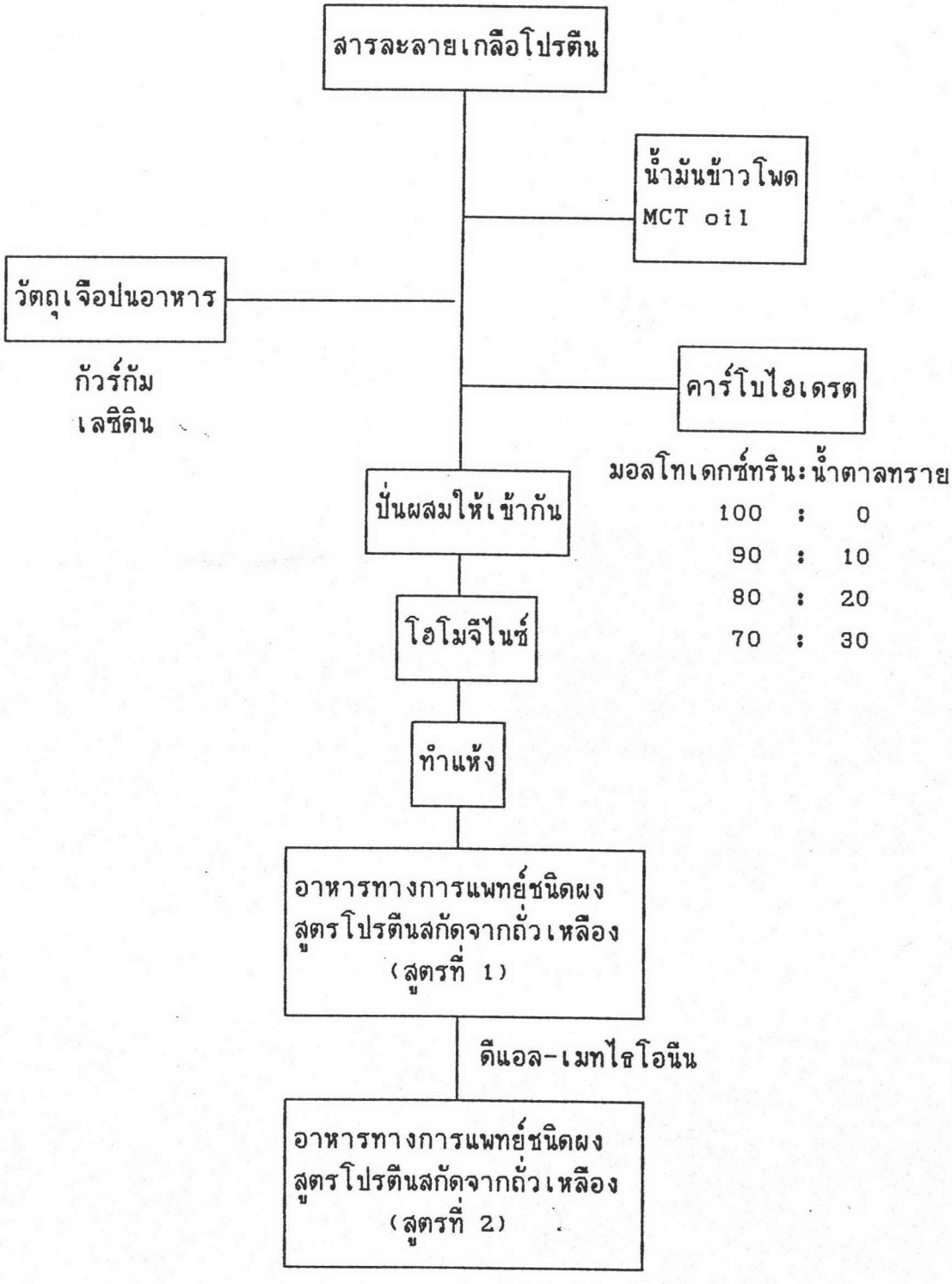
2.2.2 หาปริมาณที่เหมาะสมของวัตถุเจือปนอาหาร เตรียมผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองหลายๆ ผลิตภัณฑ์ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของวัตถุเจือปนอาหารที่เลือกไว้ในข้อ 2.2.1 แล้วนำไปทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 เพื่อเลือกปริมาณที่เหมาะสมที่จะเติมลงในผลิตภัณฑ์ โดยจะเลือกปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีการละลายดีและไม่มีการแยกชั้นเมื่อละลายน้ำ และตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

3. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ นำผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่เตรียมได้มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical Properties) ได้แก่

3.1 การทดสอบ Bulk Density[36] ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ลงในกระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร ปล่อยกระบอกตวงลงบนพื้นที่นุ่ม ที่ระดับความสูง 150 มิลลิเมตร 10 ครั้ง อ่านค่า Bulk Density ของผลิตภัณฑ์

017670

ภาพที่ 2 แผนภูมิการเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง



เป็นกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 <u>การทดสอบดรรชนีการละลาย</u> (Solubility Index)[36]

3.3 <u>การทดสอบความคงตัวของการแขวนตะกอน</u>(Colloidal Stability)[42]

รายละเอียดของข้อ 3.2 และ 3.3 อยู่ในภาคผนวก ก.

4. <u>การประเมินคุณค่าทางโภชนาการโดยการวิเคราะห์ทางเคมี</u>[35-40] (Chemical Analysis) นำผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่เตรียมได้ มาหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีการต่อไปนี้

4.1 <u>วิเคราะห์ปริมาณความชื้น</u> โดยการอบด้วยตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven Method)

4.2 <u>วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u> โดยวิธี Micro Kjeldahl

4.3 <u>วิเคราะห์ปริมาณไขมัน</u> โดยวิธีของ Rose-Gottlieb

4.4 <u>วิเคราะห์ปริมาณเถ้า</u> โดยการเผาในเตาเผาเถ้า (Muffle Furnance)

4.5 <u>ปริมาณคาร์โบไฮเดรต</u> ได้จากการคำนวณโดยนำผลบวกขององค์ประกอบอื่นๆ ที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 4.1-4.4 หักออกจากค่า 100 (ปริมาณใยอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีปริมาณต่ำมากเนื่องจากโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีปริมาณใยอาหารต่ำ[19]

4.6 <u>วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน</u> โดยใช้ Amino Acid Analyzer

รายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ อยู่ในภาคผนวก ก.

5. <u>การประเมินคุณค่าทางโภชนาการทางชีวภาพ</u>(Biological Assay)[39,43] นำผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เตรียมได้มาทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในหนูทดลอง (Weaning male rat) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ เคซีอิน (ANRC reference casein) และสูตรอาหารโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Prosobee ของบริษัท Mead Johnson) เพื่อหาค่า Protein Efficiency Ratio (PER), Net Protein Ratio (NPR), Relative NPR (RNPR), Biological Value (BV), True Digestibility (TD) และNet Protein Utilization(NPU) ด้วยวิธีการต่อไปนี้

5.1 การหาค่า Protein efficiency ratio (PER) โดยวิธีของ AOAC 1990

5.1.1 เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงหนูทดลองให้มีส่วนประกอบดังนี้ คือ โปรตีนร้อยละ 10 ไขมันร้อยละ 8 เกลือแร่ (Salt mixture) ร้อยละ 5 ส่วนผสมของวิตามิน (Vitamin mixture) ร้อยละ 1 ใยอาหาร (Cellulose Fiber) ร้อยละ 1 น้ำร้อยละ 5 คาร์โบไฮเดรต (น้ำตาลทราย : แป้งข้าวโพด 1:1) ร้อยละ 70 เก็บอาหารที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° ซ. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Micro Kjeldahl (รายละเอียดของเกลือแร่และวิตามินอยู่ในภาคผนวก ข.)

5.1.2 สัตว์ทดลองใช้หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar สั่งจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศูนย์ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้หนูเพศผู้อายุ 21-24 วัน แยกเลี้ยงกรงละ 1 ตัวในกรงที่มีที่รองรับอุจจาระ ปัสสาวะ (metabolic cage) นำหนูทดลองมาแบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ให้น้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มต่างกันไม่เกิน 5 กรัม แต่ละกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารต่างกันดังต่อไปนี้

กลุ่มมาตรฐาน	เลี้ยงด้วยอาหารโปรตีนมาตรฐานคือเคซิอิน
กลุ่มทดลอง 1	เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูตรที่ 1
กลุ่มทดลอง 2	เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูตรที่ 2
กลุ่มทดลอง 3	เลี้ยงด้วยอาหารทางการแพทย์ชนิดผงสูตรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

เลี้ยงในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25° ซ. ให้แสงสว่างเวลากลางวัน 12 ชั่วโมงและมืดในเวลากลางคืน 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 28 วัน ให้อาหารและน้ำตลอดวัน บันทึกน้ำหนักอาหารที่กินและน้ำหนักตัวของหนูทดลองทุก 2 - 3 วัน นำไปคำนวณหาค่า PER ได้ดังนี้

$$\text{PER} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของโปรตีนที่กิน (กรัม)}}$$

$$\text{CPER} = \frac{\text{PER ของกลุ่มทดลอง}}{\text{PER ของกลุ่มมาตรฐาน}} * 2.5$$

5.2 การหาค่า Net Protein Ratio (NPR) และ Relative NPR (RNPR) ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเพื่อหาค่า PER แต่เป็นกลุ่มสัตว์ทดลองอีก 1 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้อาหารปราศจากโปรตีน (Zero protein group, กลุ่ม Z) มีส่วนประกอบดังนี้คือ ไขมัน, เกลือแร่, วิตามิน, ใยอาหาร และ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 8, 5, 1, 1, 5 และ 80 ตามลำดับ เลี้ยงนาน 14 วัน บันทึกน้ำหนักอาหารที่กินและน้ำหนักตัวของหนูทดลองทุก 2-3 วัน นำมาคำนวณค่า NPR และ RNPR ได้ดังนี้

$$NPR = \frac{\text{นน. ตัวที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มทดลอง + นน. ตัวที่ลดลงของกลุ่ม Z}}{\text{โปรตีนที่กินโดยกลุ่มทดลอง - โปรตีนที่กินโดยกลุ่ม Z}}$$

$$RNPR = \frac{\text{NPR ของกลุ่มทดลอง}}{\text{NPR ของกลุ่มมาตรฐาน}} * 100$$

5.3 การหาค่า Net protein utilization (NPU) ใช้วิธี Nitrogen balance technique โดยการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเช่นเดียวกับการหาค่า NPU เลี้ยงหนูทดลองเป็นเวลา 14 วัน บันทึกน้ำหนักอาหารที่กินและน้ำหนักตัวทุก 2-3 วัน เก็บอุจจาระและปัสสาวะทุกวันตลอดการทดลองโดยรวบรวมไว้ในตู้เย็น นำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในปัสสาวะและอุจจาระโดยวิธี Micro Kjeldahl (รายละเอียดในภาคผนวก ก.) นำมาคำนวณค่า NPU, True Digestibility (TD) และ Biological Value ได้ดังนี้

$$TD = \frac{(I - (F - F_o))}{I} * 100$$

$$BV = \frac{(I - (F - F_o) - (U - U_o))}{(I - (F - F_o))} * 100$$

$$NPU = BV * TD$$

โดยที่

I = ปริมาณไนโตรเจนที่กลุ่มทดลองกิน

F = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระของกลุ่มทดลอง

F_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางอุจจาระของกลุ่ม Z

U = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะของกลุ่มทดลอง

U_o = ปริมาณไนโตรเจนที่ขับออกทางปัสสาวะของกลุ่ม Z

6. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ [44,45] โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Varience) นำมาหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่เพื่อทดสอบ Honestly Significant Difference Test(HSD Test)