

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง และประเมินคุณค่าทางโภชนาการ

1.1. การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

นำถั่วเหลือง (จากบริษัทแลคตาชอย จำกัด) มาสกัดโปรตีนโดยการใช้วิธีบดแบบเปียก ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งดัดแปลงมาจาก วรรณิ (2537) ตามขั้นตอนดังนี้

1.1.1. นำถั่วเหลืองดิบแช่น้ำในอัตราส่วน ถั่วเหลืองดิบต่อน้ำเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.2. บดด้วยเครื่องบด (blender MX-311 N บริษัท National) แล้วบดให้ละเอียดยิ่งขึ้นด้วยเครื่องบดความเร็วสูง (Ultra-turax T25 บริษัท Junke & Kunkel Ika-Labortechnik) ที่ความเร็ว 24,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 นาที

1.1.3. ปรับพีเอช 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, G.R. ของบริษัท E. Merck) ความเข้มข้นร้อยละ 50 เพื่อให้โปรตีนละลายออกมามากที่สุด กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic

stirrer, nuova 7 stirrer Thermolyne บริษัท Sybron Corporation) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

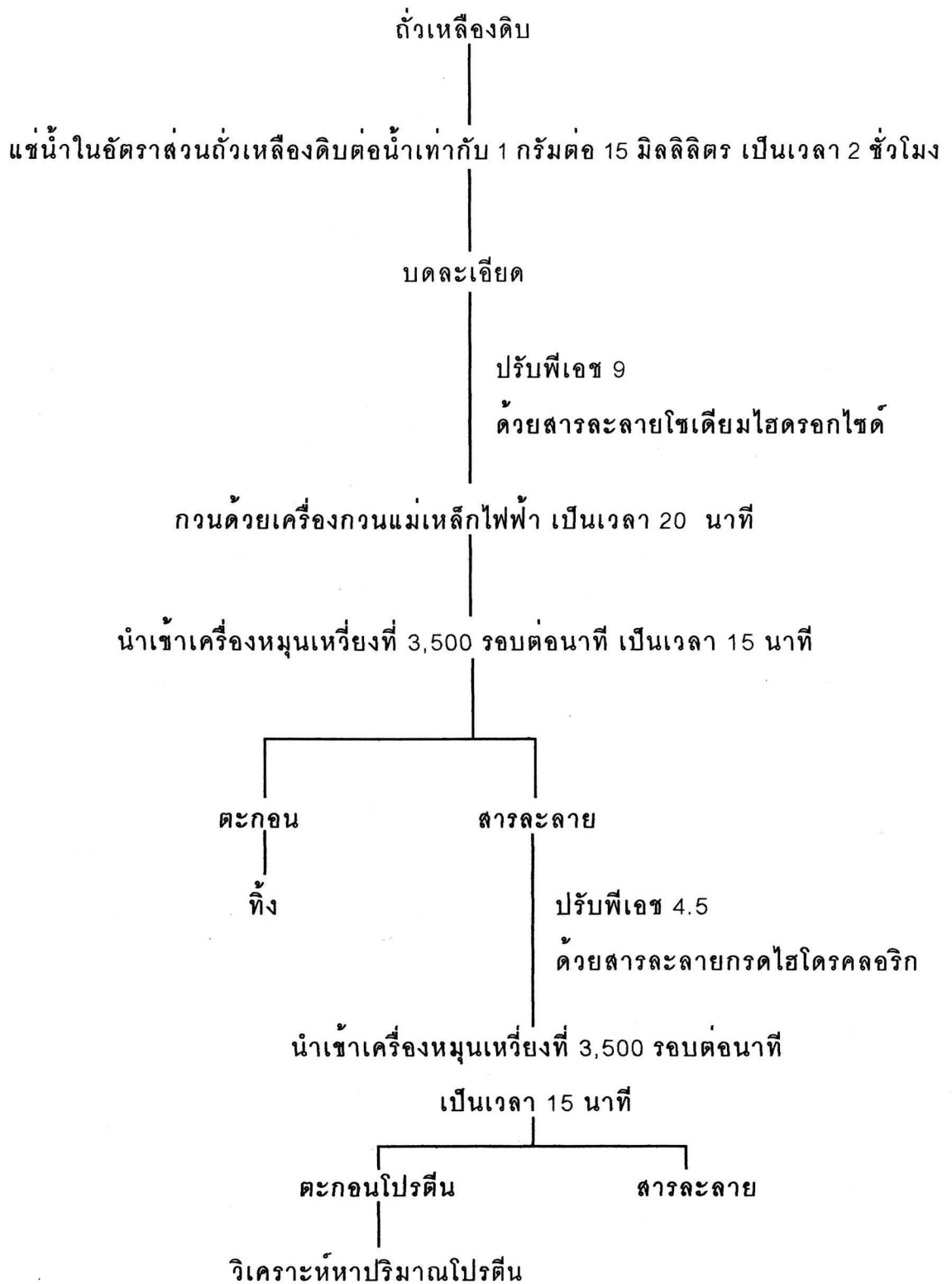
1.1.4. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Clements GS 100 ขนาดหัวเหวี่ยง 7 นิ้ว) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนสารละลายที่มีโปรตีนละลายอยู่ออกจากกากถั่วเหลือง

1.1.5. นำส่วนสารละลายมาปรับพีเอช 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid , G.R. บริษัท E. Merck) ความเข้มข้น 6 นอร์มัล เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนมากที่สุด

1.1.6. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออก

1.1.7. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Macro Kjeldahl รายละเอียดการวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

ภาพที่ 1 การเตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ดัดแปลงจากวิธีของวรรณิ (2537)



1.2. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ดิบโดยวิธีทางฟิสิกส์และเคมี (Osborne และ Voogt, 1972 ; Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990 ; Kirk และ Sawyer, 1991)

นำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางฟิสิกส์ และเคมีดังนี้

1.2.1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยการอบในตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven method)

1.2.2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Macro Kjeldahl

1.2.3. วิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเครื่อง Soxhlet

1.2.4. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ash) โดยการเผาในเตาเผาเถ้า (Muffle furnace)

1.2.5. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและกากใยอาหาร ได้จากการ คำนวณ โดยนำผลรวมขององค์ประกอบอื่นๆที่วิเคราะห์ได้ในข้อ 1.2.1 - 1.2.4 มาหัก ออกจากค่า 100

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

2. การเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

อาหารทางการแพทย์ควรมีการกระจายของพลังงานที่เหมาะสมกับความต้องการของร่างกาย ดังนี้

โปรตีน	ร้อยละ 15 - 20
ไขมัน	ร้อยละ 30 - 35
คาร์โบไฮเดรต	ร้อยละ 45 - 55

ส่วนประกอบของสารอาหาร และปริมาณวัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารทางการแพทย์ สูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง แสดงในตารางที่ 1

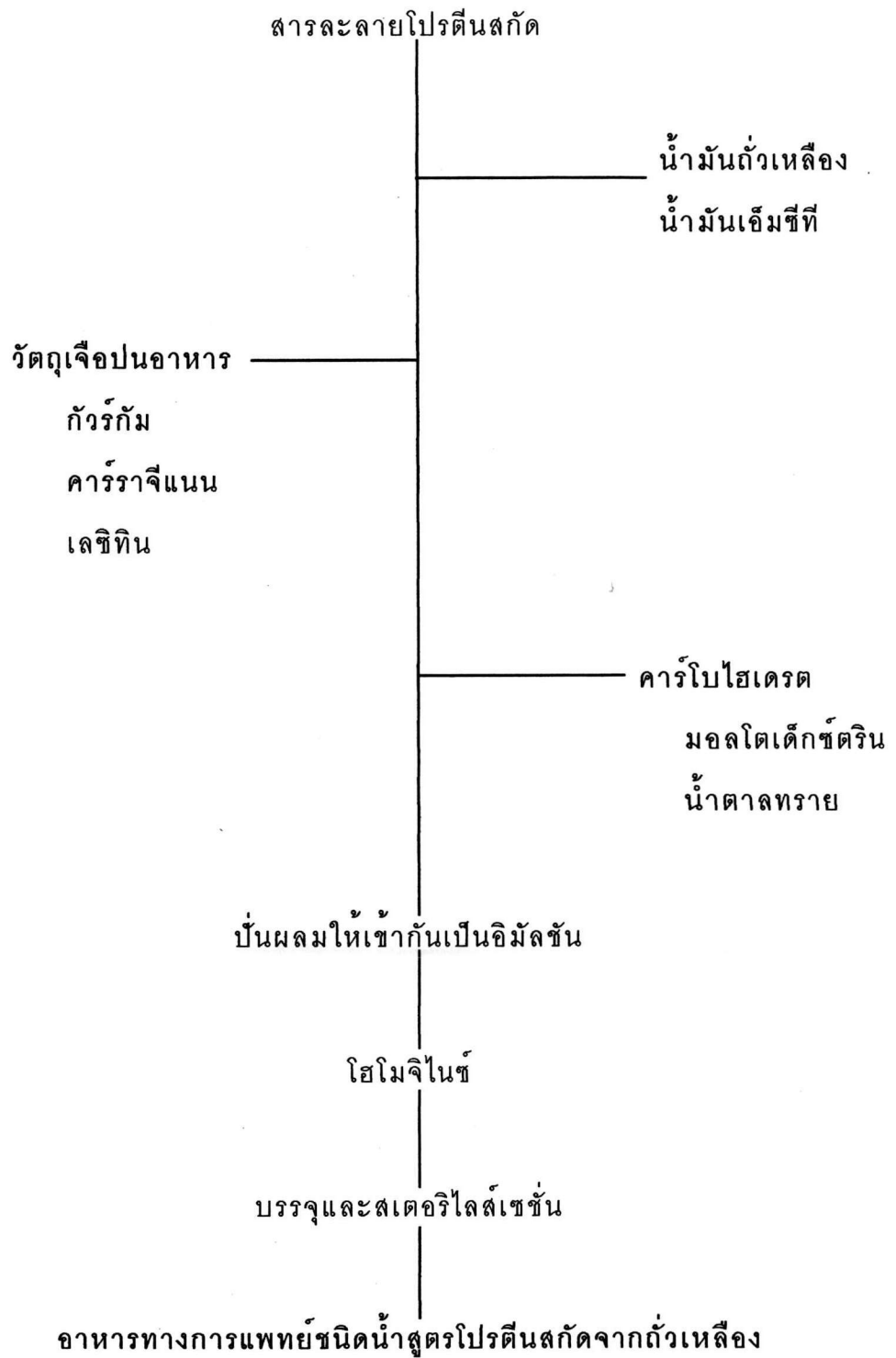
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารอาหารที่ใช้เตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

สารอาหาร	ปริมาณ (ร้อยละ)
โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง	4.70
น้ำมันถั่วเหลือง	3.20
น้ำมันเอ็มซีที	1.00
มอลโตเด็กซ์ทริน	15.30
วัตถุเจือปนอาหาร	ตามที่กำหนด
เติมน้ำจนครบ	100.00

นำโปรตีนที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 1.1 ปริมาณ 66.30 กรัม มากระจายตัวในน้ำ 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าให้โปรตีนละลาย นำมาปั่นผสมด้วยเครื่องบดปั่นความเร็วสูง พร้อมทั้งเติมสารต่างๆตามลำดับต่อไปนี้คือ เติมน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil , บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด) น้ำมันเอ็มซีที (MCT oil ® , บริษัท Mead Johnson) วัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ที่เหมาะสม dl-methionine ในปริมาณ 1.2 กรัมต่อ 16 กรัมในโตรเจน (Parthasarathy และคณะ,1964) มอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrin , C*PUR O 19 12 ® , Nutrition Limited Partnership) และน้ำตาลทราย (sucrose , บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด) ตามลำดับ ปั่นผสมให้เข้ากันเป็นอิมัลชัน (emulsion) ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร บรรจุใส่ขวด แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ (sterization) ด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave ,Ashcroft , Wisconsin Aluminum Foundry Co , Inc) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้ผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง นำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ , ประเมินคุณค่าทางโภชนาการโดยการวิเคราะห์ทางฟิสิกส์และทางเคมี

ขั้นตอนการเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง แสดงไว้ในภาพที่ 2

ภาพที่ 2 การเตรียมอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง
ดัดแปลงจากวิธีของกุลวดี (2534)



2.1. ปรับปรุงสูตรอาหารโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณวัตถุดิบอาหาร

เลือกวัตถุดิบอาหารและปริมาณที่เหมาะสม เตรียมผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง โดยผลิตภัณฑ์ที่ 1 เติมหั้วร์กัม (guar gum) ปริมาณ 0.01 , 0.02 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ที่ 2 เติมคาร์ราจีแนน (carrageenan) ปริมาณ 0.01 , 0.02 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ที่ 3 เติมเลซิทีน (lecithin) ปริมาณ 0.1 , 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปริมาณที่ดัดแปลงจากสูตรของกุลวดี (2534) นำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดไปวัดค่าความหนืดเพื่อเลือกวัตถุดิบอาหารที่เหมาะสม โดยใช้เครื่อง Haake Rotovisco RV 20 ใช้ Cup , Sensor และสภาวะการทำงานต่างๆตามข้อกำหนดของเครื่องที่เหมาะสมที่สุดกับตัวอย่าง

2.2. ปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์

2.2.1. ปรับปรุงรสหวาน เปลี่ยนแปลงส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปให้มีน้ำตาลทรายเป็นส่วนผสมอยู่ร้อยละ 0, 25, 30 และ 35 ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทำการประเมินผลทางประสาทสัมผัส (panel test) (Maynard, Pangborn และ Roessler, 1965) โดยใช้ผู้ชิม 15 คน ให้คะแนนผลิตภัณฑ์ทั้งความหวาน , รส และกลิ่น ตั้งแต่ 1-4 จากชอบมากที่สุดไปน้อยที่สุด เพื่อเลือกหาอัตราส่วนของน้ำตาลทรายและมอลโตเด็กซ์ตรินที่เหมาะสมเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด

2.2.2. ปรับปรุงกลิ่น เปลี่ยนแปลงชนิดของกลิ่นที่ใส่ในผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ไม่แต่งกลิ่น กลิ่นวานิลลา กลิ่นช็อกโกแลต และกลิ่นสตรอเบอร์รี่ ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทำการประเมินผลทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับการปรับปรุงความหวาน เพื่อเลือกกลิ่นที่ผู้บริโภคนิยมมากที่สุด

3. การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่แต่งกลิ่นรสแล้ว

เตรียมผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ที่ปรับปรุงสูตรโดยเลือกวัตถุดิบอาหารปริมาณที่เหมาะสม และรสชาติเป็นที่ยอมรับ มาประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ ได้แก่

3.1. ลักษณะที่ปรากฏ (Appearance) (Bustamante ,Chun และ Martin ,1993)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่เตรียมได้ทุกสูตร มาศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ การแยกชั้นของไขมันด้วยตาเปล่า (phase separation) , สี (color) , กลิ่น (odor)

3.2. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

3.2.1. การวัดขนาดอนุภาคไขมันชั้นเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีในท้องตลาด (Lachman, Lieberman และ Kaning, 1993)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตร และผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาดมาวัดขนาดอนุภาคที่ระยะเวลาเริ่มต้น , 1 เดือน , 2 เดือน และ 3 เดือนหลังจากผลิต การวัดขนาดอนุภาคของไขมันจะตัดแปลงโดยคำนวณเป็นตัวเลขเรียกว่า Homogenizer effect หรือฟาร์อลลินเดกซ์ (Farrall index) รายละเอียดของวิธีวัดขนาดอนุภาคไขมันอยู่ในภาคผนวก ก.

3.2.2. การวัดความหนืดของอิมัลชัน (อรวรรณ, 2527 ; Lachman และคณะ, 1993)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตรมาวัดค่าความหนืดที่ระยะเวลาเริ่มต้น , 1 เดือน , 2 เดือน และ 3 เดือนหลังจากผลิต โดยใช้เครื่อง Haake Rotovisco RV 20

3.2.3. การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง (Accelerated studies) (Lachman และคณะ, 1993)

3.2.3.1 ระยะเวลาและอุณหภูมิ (Aging and Temperature)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตร มาเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และตู้ควบคุมอุณหภูมิ (General Electric , Precision Scientific) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สลับอุณหภูมิเช่นนี้ 6 หรือ 8 รอบ แล้วดูลักษณะการแยกชั้นของไขมันด้วยตาเปล่า

3.2.3.2. การหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) (Becher, 1965)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตรมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge ,Clements GS 100) ที่ความเร็ว 2,000 - 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูลักษณะการแยกชั้นของไขมันด้วยตาเปล่า

3.2.3.3 การเขย่า (Agitation)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตร มาเขย่าด้วยเครื่อง shaker incubator (New Brunswick Scientific Edison ,N.J. ,USA) ความเร็ว 60 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วดูลักษณะการแยกชั้นของไขมันด้วยตาเปล่า

3.3 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี

3.3.1. การวัดค่าพีเอช (pH) (Becher ,1965)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองทุกสูตร มาวัดค่าพีเอชที่ระยะเวลาเริ่มต้น , 1 เดือน , 2 เดือน และ 3 เดือน หลังจากผลิต ด้วยเครื่อง pH Meter (Radiometer PHM 64 Research pH Meter , Copenhagen)

3.3.2. การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ที่ปรับปรุงรสชาติแล้ว

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาประเมินคุณค่าทางโภชนาการโดยวิธีทางฟิสิกส์และเคมีตามวิธีในข้อ 1.2 ที่ระยะเวลาเริ่มต้น , 1 เดือน , 2 เดือน และ 3 เดือนหลังจากผลิต และวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (amino acids) ที่ระยะเวลาเริ่มต้น และ 3 เดือนหลังจากผลิต รายละเอียดวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

นำปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณค่าอะมิโนแอซิดสคอร์ (Amino acid score) โดย

$$\text{อะมิโนแอซิดสคอร์} = \frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม) ในโปรตีน 1 กรัม}}{\text{ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม) ชนิดเดียวกันในโปรตีนมาตรฐาน* 1 กรัม}}$$

* โปรตีนมาตรฐานของ FAO/WHO 1973 (Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee ,1973) แสดงในตารางภาคผนวก จ

3.4. การทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (Lachman และคณะ, 1976)

นำอาหารทางการแพทย์ชนิดน้ำสูตรโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง มาทำ Microbiological Test หาจำนวนโคโลนี โดยวิธี Standard Plate Count ที่ระยะเวลาเริ่มต้น , 1 เดือน , 2 เดือน และ 3 เดือนหลังจากผลิต รายละเอียดวิธีวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ก.

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (วัชรภรณ์, 2529 ; เต็มศรี, 2531)

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่