ภาคผนวก

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ก
การเผยแพร่ผลงาน

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๐

The 10th National Horticultural Congress 2011

ขอมอบเกียรติบัตรเพื่อรับรองว่าผลงานวิจัย ภาคบรรยาย

เรื่อง ผลของโบรมิเลนจากสับปะรดในการย่อยถั่วเหลืองต่อปริมาณ free-amino nitrogen ในเครื่องดื่ม

โดย

เข็มทอง อ่องทิพย์ ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และ นิอร โฉมศรี

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และได้นำเสนอในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ ๑๐
ระหว่างวันที่ ๑๘-๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๔

(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนพิภพ เกษมทรัพย์)
ประธานคณะกรรมการดำเนินการ
การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐

(ศาสตราจารย์ ดร. สายชล เกตุษา)
ประธานคณะอนุกรรมการฝ่ายวิชาการ
การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๑๐

สถานีวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

O14-2

ผลของโบรมิเลนจากสับปะรดในการย่อยถั่วเหลืองต่อปริมาณ free α-amino nitrogen ในเครื่องดื่ม
Effect of Soy Hydrolysis by Bromelain from Pineapple on Free α-amino Nitrogen in Beverage

เข็มทอง อ้องทิพย์[1] ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน[1] พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง[1] และนิอร โฉมศรี[1]
Ongthip, K.[1], Chanrittisen, T.[1], Nualbunruang, P.[1], and Chomsri, N.[1]

Abstract

This study examined the impact of bromelain from pineapple in the hydrolysis of soybean variety Rajamangla 1. The soy hydrolysate was used to produce pineapple juice to increase free - α amino nitrogen (FAN) content. The hydrolysis of four ratios of ground soybean and pineapple juice (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5) was performed at 50 °C for 2, 4, 6 and 12 hours. Increasing bromelain concentration level and hydrolysis time gave higher amounts of FAN (346.96±9.24–1181.26±298.55 mg/l), but lower proteins (158.08±7.68–252.18±5.40 μg/ml) in the soy hydrolysates. On SDS-PAGE gel, the protein subunit bands (30-97 kDa) of soy hydrolysate were decreased. Four formulas for beverage using the soy hydrolysate were prepared. The yellow color (*b**) of the beverage was similar to pineapple juice. The beverage with higher amount of soy hydrolysate also had higher content of FAN. The four drinks were evaluated by sensory analysis on a 9-point hedonic scale. Beverages containing soy hydrolysate of 25 and 33 % were given score levels of "like slightly" to "like moderately" for the quality attributes of appearance, color, odor, flavor, viscosity and overall preference (p>0.05).

Keywords : pineapple, soybean, bromelain, hydrolysate

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโบรมิเลนจากสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในการย่อยถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล 1 เพื่อเพิ่มปริมาณ free - α amino nitrogen (FAN) ในเครื่องดื่มน้ำสับปะรด โดยใช้ถั่วเหลืองเมล็ดแห้งบดละเอียดต่อน้ำสับปะรดสดในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 ย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณโบรมิเลนและระยะเวลาในแต่ละระดับ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยของถั่วเหลือง (soy hydrolysate) มีปริมาณ FAN เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง โดยมีค่าระหว่าง 346.96±9.24–1181.26±298.55 mg/l และ 158.08±7.68– 252.18±5.40 μg/ml ตามลำดับ เมื่อจำแนกโปรตีนในไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS–PAGE พบว่า ปริมาณโปรตีนขนาด 30-97 kDa ในไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองมีปริมาณลดลง การนำไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองไปทำเครื่องดื่มน้ำสับปะรดจำนวน 4 สูตร พบว่า เครื่องดื่มที่ได้มีค่าสีเหลือง (b*) ใกล้เคียงกับน้ำสับปะรด และการเพิ่มไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เครื่องดื่มมีค่า FAN ที่สูงขึ้นด้วย จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-point hedonic scale พบว่า เครื่องดื่มสูตรที่มีไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมร้อยละ 25 และ 33 ได้รับคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความข้นหนืด และความชอบโดยรวม อยู่ในระดับชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง (p>0.05)

คำสำคัญ : สับปะรด ถั่วเหลือง โบรมิเลน ไฮโดรไลเสท

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา 202 หมู่ 17 ต.พิชัย อ.เมือง จ.ลำปาง 52000
[1] Agricultural Technology Research Institute. Rajamangala University of Technology Lanna. 202 Moo 17, Pichai District, Amphur Muang, Lampang 52000

ผลของโบรมิเลนจากสับปะรดในการย่อยถั่วเหลืองต่อปริมาณ Free α-amino nitrogenในเครื่องดื่ม

The Effect on Free α-amino Nitrogen from Soybean Hydrolysis by Pineapple Bromelain in a Beverage

เข็มทอง อ๋องทิพย์[1] ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน[1] พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง[1] และนิอร โฉมศรี[1]
Ongthip, K.[1], Chanrittisen, T.[1], Nualbunruang, P.[1], and Chomsri, N.[1]

Abstract

This study examined the impact of bromelain from pineapple, Pattawia cultivar in the hydrolysis of soybean, Rajamangala 1 variety. The soy hydrolysate was used to produce pineapple juice to increase free α-amino nitrogen (FAN) content. The hydrolysis of five ratios of ground soybean to pineapple juice (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5) were performed at 50 ^{o}C for 2, 4, 6 and 12 hours. Increasing bromelain concentration level and hydrolysis time expressed higher amounts of FAN (346.96±9.24–1181.26±298.55 mg/l), but lower protein contents (158.08±7.68–252.18±5.40 μg/ml) in the soy hydrolysates. On SDS-PAGE gel, the protein subunit bands of soy hydrolysate (30-97 kDa) were decreased. Four formulas for beverage using the soy hydrolysate were prepared. The yellow color (b*) of the beverages were similar to pineapple juice. The beverage with higher amount of soy hydrolysate had higher content of FAN. The four drinks were evaluated for organoleptic analysis on a 9-point hedonic scale. The beverages containing soy hydrolysate of 25 and 33 % got scores at the level of “like slightly” to “like moderately” for the quality attributes of appearance, color, odor, flavor, viscosity and overall preference ($p>0.05$).

Keywords: pineapple, soybean, bromelain, hydrolysate

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโบรมิเลนจากสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในการย่อยถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล 1 เพื่อเพิ่มปริมาณ free–α amino nitrogen (FAN) ในเครื่องดื่มน้ำสับปะรดโดยใช้ถั่วเหลืองเมล็ดแห้งบดละเอียดต่อน้ำสับปะรดสดในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณโบรมิเลนและระยะเวลา

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา 202 หมู่ 17 ต.พิชัย อ.เมือง จ.ลำปาง 52000

[1] Agricultural Technology Research Institute. Rajamangala University of Technology Lanna. 202 Moo 17, Pichai District, Amphur Muang, Lampang 52000

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ในการย่อยผลผลิตที่ได้จากการย่อยของถั่วเหลือง (soy hydrolysate) มีปริมาณ FAN เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง โดยมีค่าระหว่าง 346.96±9.24 – 1181.26±298.55 mg/l และ 158.08±7.68–252.18±5.40 μg/ml ตามลำดับ เมื่อจำแนกโปรตีนในไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS–PAGE พบว่า ปริมาณโปรตีนขนาด 30-97 kDa ในไฮโดรไลเสทของถั่วเหลือง มีปริมาณลดลง การนำไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองไปทำเครื่องดื่มน้ำสับปะรดจำนวน 4 สูตร พบว่า เครื่องดื่มที่ได้มีค่าสีเหลือง (b*) ใกล้เคียงกับน้ำสับปะรด และการเพิ่มไฮโดรไลเสทของถั่วเหลือง เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เครื่องดื่มมีปริมาณ FAN ที่สูงขึ้นด้วย จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-point hedonic scale พบว่า เครื่องดื่มสูตรที่มีไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมร้อยละ 25 และ 33 ได้รับคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความข้นหนืด และความชอบโดยรวม อยู่ในระดับชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง ($p>0.05$)

คำสำคัญ: สับปะรด ถั่วเหลือง โบรมิเลน ไฮโดรไลเสท

คำนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) จัดอยู่ในพืชตระกูล *Bromeliaceae* (Devakate *et al.,* 2009) เป็นแหล่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนชื่อ โบรมิเลน (bromelain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) พบในส่วนเนื้อเยื่อ ลำต้น ผล และใบ โดยพบในส่วนของเนื้อมากที่สุด (วราพันธุ์และคณะ, 2547) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทางอาหารและยา เช่น ใช้ผลิตผงทำให้เนื้อนุ่ม ใช้ทำให้เบียร์ใส ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และใช้ผลิตยาช่วยย่อยอาหารและยาขับปัสสาวะ เป็นต้น โบรมิเลนมีจุดตัดกว้างที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน ไกลซีน ไทโรซีน และอลานีน ซึ่งให้เปปไทด์ที่มีกลิ่นรสไม่ขมและเป็นที่ยอมรับ (Wu and Cadwallader, 2002) สภาวะการทำงานที่เหมาะสมของโบรมิเลนอยู่ในช่วงพีเอช 6.0–8.5 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (Ketnawa *et al*., 2010; Polaina *et al*., 2007) จากคุณสมบัติของโบรมิเลนดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้โบรมิเลนในการย่อยถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 40 (ภัทราภรณ์และคณะ, 2545) เพื่อใช้ในการผลิตเครื่องดื่ม

สถาบันวิทยบริการโนเลียเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองที่เหมาะสม

โดยนำถั่วเหลืองเมล็ดแห้งพันธุ์ราชมงคล 1 บดละเอียด ผสมน้ำสับปะรดสดในอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อน้ำสับปะรด 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 (โดยน้ำหนัก) ทำการย่อยถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนออก แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (Bollag *et al*., 1996) ปริมาณ free alpha amino nitrogen; FAN (Wylie and Johnson, 1961) และจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท (Laemmli, 1970) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ 5x4 factorial in CRD (completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT)

2. ศึกษาการทำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง

ทำการผลิตเครื่องดื่มโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองตามสภาวะการผลิตที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 ผสมกับน้ำสับปะรดที่อัตราส่วน 1:0 1:1 1:2 และ 1:3 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที บรรจุในขวดแก้วขนาด 330 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำไปต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ90-95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าสี (L*, a*, b*) โดยใช้เครื่องวัดค่าสี ค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดโดยการไตเตรท ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(total soluble solid, TSS) โดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณ FAN และนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scaling test โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 20 คน วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ CRD สำหรับตัวแปรตามด้านกายภาพและเคมีและแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized completely block design) สำหรับตัวแปรตามด้านประสาทสัมผัสและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ($P<0.05$)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองที่เหมาะสม

การทดลองเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าปริมาณ FAN ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการใช้ถั่วเหลืองต่อน้ำสับปะรดในอัตราส่วน 1:3 1:4 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1:5 มีปริมาณสูงสุด (753.24±294.98-818.73±291.12 mg/l) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ดังแสดงใน Table 1 เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านระยะเวลา พบว่า การย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณ FAN ของไฮโดรไลเสทมีค่าเพิ่มสูงขึ้นโดยที่ระยะเวลาการย่อยนาน 12 ชั่วโมง จะให้ปริมาณ FAN สูงที่สุด (964.20 mg/l) ($P\leq0.05$) แสดงว่าการใช้ปริมาณโบรมิเลนและระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ไฮโดรไลเสทที่ได้มีปริมาณ FAN เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลง เนื่องจากโปรตีนในถั่วเหลืองเปลี่ยนไปเป็นเปปไทด์สายสั้นๆและกรดอะมิโนบางส่วน(Wu and Cadwallader, 2002) เมื่อนำโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทไปจำแนกด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ปริมาณโปรตีนขนาด 30-97 kDa ในไฮโดรไลเสทของถั่วเหลืองมีปริมาณลดลง ในขณะที่ความเข้มของแถบโปรตีนและเพบไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 20 kDa บนแผ่นเจลมีเพิ่มมากขึ้น (Figure 1) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เติมน้ำกลั่นแทนโบรมิเลน แสดงว่าโปรตีนขนาดใหญ่ในถั่วเหลืองน่าจะถูกโบรมิเลนย่อยให้เกิดเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง (Lamsal *et al*., 2007; Ortiza and Wagner, 2002)

การทำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยการใช้ถั่วเหลืองบดละเอียดย่อยด้วยโบรมิเลนจากน้ำสับปะรดที่อัตราส่วน 1:3 นาน 12 ชั่วโมง ในการผลิตเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง พบว่า ค่าสี L* และ b* ของเครื่องดื่มที่ผลิตจากการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองผสมกับน้ำสับปะรดที่อัตราส่วน 1:0 1:1 1:2 และ 1:3 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนเครื่องดื่มที่ใช้น้ำสับปะรดในปริมาณที่เพิ่มสูง พบว่า ค่า TSS ของเครื่องดื่มมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ที่มีอยู่ในน้ำสับปะรด และพบว่า เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มของปริมาณโปรตีนและปริมาณ FAN เพิ่มขึ้น (Table 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale พบว่า ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนเฉลี่ยในทุกๆ ด้านของเครื่องดื่มที่ผลิตจากการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองผสมกับน้ำสับปะรดที่อัตราส่วน1:2 และ 1:3 อยู่ในระดับความชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง (6.22-7.25 คะแนน) (Figure 2) สูงกว่าอัตราส่วน 1:0 และ 1:1 ($p\leq0.05$)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผล

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง คือ การใช้ถั่วเหลืองต่อน้ำสับปะรดในอัตราส่วน 1:3 และระยะเวลาการย่อยนาน 12 ชั่วโมงและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองที่ผลิตได้มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการผลิตเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีค่าFAN เพิ่มขึ้นได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ประจำปีงบประมาณ 2553

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย เนมขุนทด. 2530. สับปะรด. เรืองแสงการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 72 น.

วราพันธุ์ จินตณวิชญ์ อุทัย คันโท และปุณฑริกา หะรินสุต. 2547. การศึกษาปริมาณเอนไซม์โบรมิเลน องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำคั้นสับปะรดและการนำไปใช้ประโยชน์ย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลือง. การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่42. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 26-32 .

ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ นิอร โฉมศรี และนภษร ศรีสุวอ. 2545. รายงานฉบับสมบูรณ์: คุณภาพทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล1 และการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, ลำปาง. 39 น.

Bollag, D. M., Rozychi, M. D. and Edelstein, S. 1996. Protein methods. New York: John Wiley & Sons. 415 p.

Devakate, R.V., Patil, V.V., Waje, S.S. and Thorat, B.N. 2009. Purification and drying of bromelain. Separation and Purification Technology. 64: 259–264.

Ketnawa, S., Rawdkuen, S. and Chaiwut, P. 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. Biochemical Engineering Journal. 52: 205–211.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

สถาบันวิจัยและพัฒนาเกษตร

Lamsal, B.P., Jung, S. and Johnson, L.A. 2007. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. LWT: Food Science and Technolgoy. 40: 1215–1223.

Ortiza, S.E.M. and Wagner, J.R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. Food Research International. 35: 511–518.

Polaina, J. and MacCabe, A.P. 2007. Industrial enzyme: structure, function and applications. Dordrecht: Springer. 641 p.

Wu, Y.F. and Cadwallader, K.R. 2002. Characterization of the aroma of a meatlike process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(10): 2900–2907.

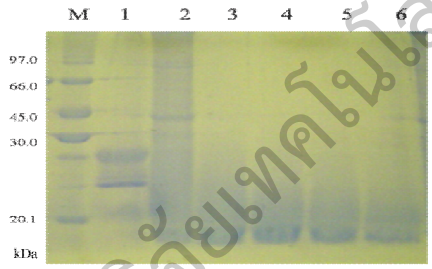


Figure 1 SDS-PAGE gel: (M) marker (1) pineapple juice (2) control; soybean:water (3) hydrolysate of soybean:pineapple juice at the ratio of 1:3 for 2 hr (4) 4 hr (5) 6 hr (6) 12 hr

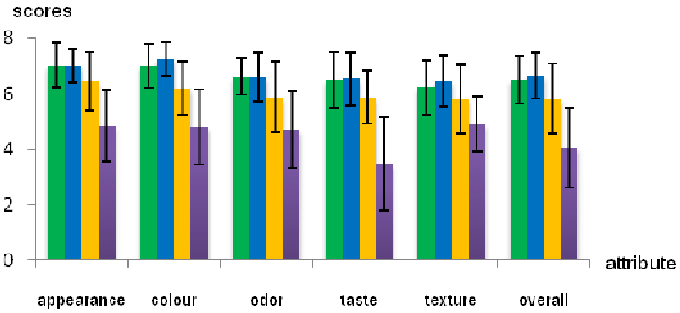


Figure 2 organoleptic quality of soy hydrolysate beverage mixed with pineapple juice at different ratios of soy hydrolysate:pineapple juice; 1:0 (■) 1:1 (■) 1:2 (■) and 1:3 (■)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Table 1 Effect of ratios (soybean:pineapple juice) and digestion time on soybean Hydrolysis

Factor	FAN (mg/l)	Protein (mg/l)
soybean:pineapple juice	*	*
1:1	423.72±71.57^{c}	230.19±25.17^{a}
1:2	637.31±196.20^{b}	228.56±28.80^{a}
1:3	818.73±291.12^{a}	206.99±17.27^{b}
1:4	753.24±294.98^{a}	170.48±23.75^{c}
1:5	801.30±249.30^{a}	176.09±21.92^{c}
digestion time (hour)	*	*
2	468.33±81.71^{d}	214.97±31.90^{a}
4	607.50±177.89^{c}	206.72±29.74^{a}
6	707.40±184.21^{b}	200.10±42.65^{ab}
12	964.20±310.46^{a}	188.05±28.30^{b}

Means within the same row with different superscripts are significantly different (P≤0.05).

Table 2 Physical and Chemical quality of soy hydrolysate beverage mixed with pineapple juice

Quality	soy hydrolysate : pineapple juice			
	1:0	1:1	1:2	1:3
Colour L*	36.37±3.33	35.06±2.42	36.78±2.59	36.05±1.14
a*	-2.15±0.25^{a}	-4.49±0.07^{b}	-4.98±0.07^{c}	-5.59±0.01^{d}
b*	15.72±3.80	16.35±0.62	17.14±1.87	16.81±0.05
FAN (mg/l)	1,285.96±0.79^{a}	775.00±38.53^{b}	605.34±64.75^{b}	551.40±5.96^{b}
Protein (μg/ml)	179.58±8.84^{a}	72.92±9.43^{b}	67.29±2.95^{c}	54.58±2.06^{c}
Total Acidity (% as citric	0.65±0.10	0.80±0.15	0.72±0.09	0.77±0.06
Total Soluble Solid (°Brix)	8.80±0.28^{b}	9.20±0.28^{b}	11.00±0.00^{a}	11.10±0.14^{a}
pH	5.21±0.23^{a}	4.23±0.02^{b}	4.07±0.09^{b}	3.92±0.03^{c}

Means within the same row with different superscripts are significantly different (P≤0.05).

สถาบันวิทยบริการ เทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

beef extract	5.00	กรัม
peptone	5.00	กรัม
sodium chloride	2.50	กรัม
distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร

วิธีการ

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ(Auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

beef extract	5.00	กรัม
peptone	5.00	กรัม
sodium chloride	2.50	กรัม
agar	15.00	กรัม
distilled water	1,000.00	กรัม

วิธีการ

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ(Auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ก. การตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic activity) **ตามวิธีดัดแปลงจาก** Chomsri (2001) **และ** Khan *et al.* (2003)

1. สารเคมี

1.1 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany)

เตรียมโดยชั่ง TCA 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายเคซีน (casein; Fluka) ร้อยละ 1

เตรียมโดยชั่งเคซีน 1 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลล์ พีเอช 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 ดูดสารละลายเคซีนจำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2 เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีสารละลายเคซีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นบ่มเพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.3 หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยการเติมสารละลาย TCA จำนวน 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

2.4 นำส่วนใสที่ได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมโปรติเอสดังข้อ 3

2.5 การทำ blank test ทำตามวิธีข้อ 1–4 แต่เติมสารละลาย TCA ก่อนเติมเอนไซม์

3. การคำนวณหาค่ากิจกรรมโปรติเอส

$$\text{ค่ากิจกรรมโปรติเอส (enzyme activity)} = \frac{AxBxC}{VxT}$$

โดยที่

A คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

C คือ ความเจือจางของตัวอย่าง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา(มิลลิลิตร)

T คือ เวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (นาที)

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

4.1 สารเคมี

1) ไทโรซีน (tyrosine) (Merck, Darmstadt, Germany)

2) Hydrochloric acid 1 M (HCl 1 M) (Merck, Darmstadt, Germany)

3) Sodium hydroxide 0.5 M (NaOH 0.5 M; Merck, Darmstadt, Germany)

เตรียมโดยชั่งไทโรซีน 0.0300 กรัม เติมสารละลาย HCl 1 M จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร (solution A) ปิเปตสารละลายไทโรซีน (solution A) 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH 0.5 M จำนวน 1 มิลลิลิตร (solution B)

4.2 วิธีการทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายไทโรซีน

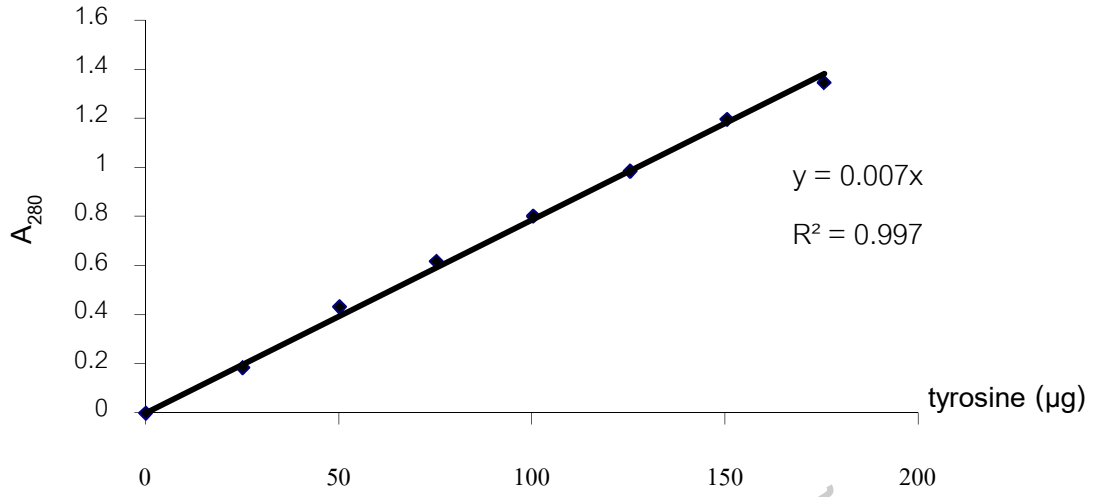
1) ดูดสารละลายไทโรซีน (solution B) ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง ปริมาตร 0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 และ 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 4 มิลลิลิตร

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A 280) แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} กับความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน (µg)

ตารางผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{280}) ของไทโรซีน

Solution	tube number								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
tyrosine (ml)	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00
H_2O (ml)	4.00	3.50	3.00	2.50	2.00	1.50	1.00	0.50	0.00
tyrosine(µg/ml)	0.00	25.08	50.16	75.25	100.33	125.41	150.50	175.58	200.67
A_{280}	0.00	0.18	0.43	0.62	0.80	0.98	1.19	1.34	1.79

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร



ภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่างของกราฟมาตรฐานไทโรซีนสำหรับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

ข. การวิเคราะห์ free alpha amino nitrogen (FAN) ตามวิธีดัดแปลงจาก Wylie andJohnson (1961)

1. สารละลาย

1.1 สารละลาย S1

1) di-sodium hydrogenphosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$; Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Loughborough Leies, U.K.) 100 กรัม (ถ้าเป็น $Na_2HPO_4.2H_2O$ ให้ใช้ 49.71 กรัม)

2) potassium di-hydrogenphophate (KH_2PO_4) (Riedel–de Haen, Germany) 60 กรัม

3) Ninhydrin (Fluka, Czech Rep) 5 กรัม

4) Fructose (Ajax Finechem, Auckland, New Zealand) 3 กรัม

เตรียมโดยชั่งส่วนผสมทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา เก็บได้นาน 1 สัปดาห์

1.2 สารละลาย S2

1) potassium iodate (KIO_3) (Merck, Darmstadt, Germany) 2 กรัม

2) เอทธานอลร้อยละ 95 (Ethanol absolute 95%; Merck, Darmstadt, Germany) 400 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง KIO_3 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ500 มิลลิลิตร เติมเอทธานอล 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บได้นาน 1 เดือน

สถาบันวิทยบริการ เทคโนโลยีเกษตร

1.3 สารละลายไกลซีนมาตรฐาน

ไกลซีน (glycine) (Merck, Darmstadt, Germany) 107.2 มิลลิกรัม

เตรียมโดยชั่งไกลซีน 107.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 1:100 ก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์

2. วิธีการวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ควรจะมีปริมาณ FAN ประมาณ -3 กรัม/ลิตร ตัวอย่างเช่น น้ำอุ่นทำการเจือจาง 1:100 ไวน์ทำการเจือจาง 1:50 น้ำสับปะรดทำการเจือจาง 1:100 ไวน์สับปะรดทำการเจือจาง 1:50-1:100 เป็นต้น

2.1 ดูดสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง

2.2 เติมสารละลาย S1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 16 นาที

2.3 ทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำ(ประมาณ 20 นาที)

2.4 เติมสารละลาย S2 จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

2.6 การทำ blank test โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วทำตามข้อ2-5

2.7 วิเคราะห์ปริมาณ free α-amino nitrogen ในสาระลายไกลซีนมาตรฐาน โดยใช้สารละลายไกลซีนมาตรฐาน (ข้อ 2.3) จำนวน 2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง แล้วทำตามข้อ 2.2-2.5

3. การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ FAN (mg/l} = \frac{\mathbf{A\ 570}\ \text{ของตัวอย่าง}\ \mathbf{x\ 2\ x}\ \text{การเจือจาง}}{\mathbf{A\ 570}\ \text{ของสารละลายไกลซีนมาตรฐาน}}$$

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford method) (Bollag *et al*., 1996)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

เตรียมโดยชั่ง BSA 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร (solution A) ปิเปตสารละลาย BSA (solution A) 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (solution B)

1.2 Bradford stock solution

1) เอทานอลร้อยละ 95 (ethanol; Merck, Darmstadt, Germany) 100 มิลลิลิตร

2) กรดฟอสฟอริกร้อยละ 86 (phosphoric acid; J.T. Baker, U.S.A.) 200 มิลลิลิตร

3) coomassie Brilliant Blue G 250 (Fluka, U.K.) 350 มิลลิกรัม

เตรียมโดยชั่ง coomassie Brilliant Blue G 250 350 มิลลิกรัม ละลายในกรดฟอสฟอริก เติมเอทานอล เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิห้อง(27±3 องศาเซลเซียส)

1.3 Bradford working buffer (BWB)

1) เอทานอลร้อยละ 95 (ethanol; Merck, Darmstadt, Germany) 15 มิลลิลิตร

2) กรดฟอสฟอริกร้อยละ 86 (phosphoric acid; J.T. Baker, U.S.A.) 30 มิลลิลิตร

3) Bradford stock solution 30 มิลลิลิตร

4) น้ำกลั่น(distilled water) 425 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (wintech, Japan) แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2. วิธีการทำกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย BSA

2.1 ดูดสารละลาย BSA (solution B) ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง ปริมาตร 0 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 และ 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ0.3 มิลลิลิตร (ตารางผนวกที่ 2)

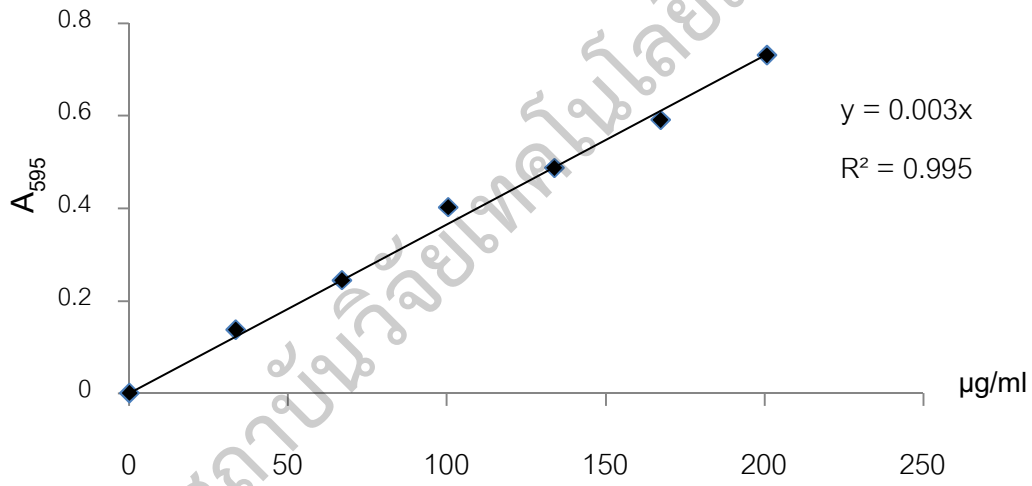
2.2 เติมสารละลาย BWB 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595}) แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{595} กับความเข้มข้นของสารละลาย BSA

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{595}) ของ BSA

Solution	tube number						
	1	2	3	4	5	6	7
BSA (ml)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
H_2O (ml)	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.00
BWB (ml)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
BSA(µg/0.3 ml)	0.00	33.47	66.93	100.40	133.87	167.33	200.80
A_{595}	0.00	0.13	0.24	0.40	0.48	0.59	0.73



สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพผนวกที่ 2 ตัวอย่างของกราฟมาตรฐาน BSA สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีแบรดฟอร์ด

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 ดูดตัวอย่างจำนวน 0.3 มิลลิลิตร

3.2 เติมสารละลาย BWB 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595}) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน

ง. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ

1. สารเคมี

1.1 citrate buffer pH 4 5 และ 6 ทำโดยเตรียมสารละลาย ดังต่อไปนี้

1) stock solution A; Citric acid (Merck, Darmstadt, Germany) 0.1 โมลล์ ชั่งกรดซิตริกจำนวน 21.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2) stock solution B; 1.2 Sodium citrate (Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Loughborough Leies, U.K.) 0.1 โมลล์ ชั่งโซเดียมซิเตรทจำนวน 29.41 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครพ,000 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 3 การเตรียม citrate buffer ที่พีเอช 4 5 และ 6

citrate buffer	stock solution A (ml)	stock solution B (ml)	distilled water (ml)	final volume (ml)
pH 4	33.00	17.00	50.00	100.00
pH 5	20.50	29.50	50.00	100.00
pH 6	9.50	41.50	50.00	100.00

1.2 Phosphate buffer pH 7 และ 8 ทำโดยเตรียมสารละลาย ดังต่อไปนี้

1) stock solution A: di–potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Riedel – de Haen, Germany) 1 โมลล์ ชั่ง di–potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) จำนวน 174.18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครพ,000 มิลลิลิตร

2) stock solution B: Potassium di–hydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Riedel – de Haen, Germany) 1 โมลล์ ชั่ง potassium-di–hydrogen phosphate (KH_2PO_4) จำนวน 136.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครพ,000 มิลลิลิตร

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ตารางผนวกที่ 4 การเตรียม phosphate buffer ที่พีเอช 7 และ 8

Phosphate buffer	stock solution A (ml)	stock solution B (ml)	final volume (ml)
pH 7	61.50	38.50	100.00
pH 8	94.00	6.00	100.00

จ. การจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อย ตามวิธีของ Laemmi (1970)

1. สารเคมี

1.1 Acrylamide/Bis : 30%T, 2.67% C

1) Acrylamide 146.0 กรัม

2) N,N'-Mthylen-bis Acrylamide 4.0 กรัม

เตรียมโดยชั่งส่วนผสมทั้งหมด ละลายน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร กรอง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืด และเก็บได้นานสูงสุด 30 วัน

1.2 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris base 54.45 กรัม

เตรียมโดยชั่ง Tris base 54.45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 300 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ4 °C

1.3 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base 6.00 กรัม

เตรียมโดยชั่ง Tris base 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.4 10%(w/v) sodium dodesylsulfate (SDS)

SDS 10.00 กรัม

เตรียมโดยชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น คนเบาๆ และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.5 10%(w/v) ammonium persulfate

ammonium persulfate 100.00 มิลลิกรัม

เตรียมโดยชั่ง ammonium persulfate 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.6 Sample Buffer (SDS reducing buffer : 62.5 mM Tris buffer, pH 6.8, 20% glycerol, 2%SDS, 5% β-mercaptoethanol)

1) Distilled water	3.0	มิลลิลิตร
2) 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
3) 10% SDS	1.6	มิลลิลิตร
4) β-mercaptoethanol	0.4	มิลลิลิตร
5) Glycerol	1.6	มิลลิลิตร
6) 0.5%(w/v)bromophenol blue (ในน้ำ)	0.4	มิลลิลิตร

เตรียมโดยปิเปตสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ก่อนใช้ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย sample buffer อัตราส่วน 1:4 และให้ความร้อน 95 °C เป็นเวลา 4 นาที

1.7 5x Electrode (Running) buffer (1x = 25 mM tris, 192 mM glycine, 0.1%SDS ,pH 8.3)

1) Tris base	45	กรัม
2) Glycine	216	กรัม
3) SDS	15	กรัม

เตรียมโดยชั่งส่วนผสมทั้งหมด ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 3000 ml (ไม่ควรทำการปรับพีเอชด้วยกรดหรือด่าง เก็บที่อุณหภูมิ4 °C) ก่อนใช้ทำการเจือจางโดยใช้ 5x Electrode (Running) buffer 300 ml ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1200 ml สำหรับการรันเจลอิเล็กโตรโฟริซีส 1 ครั้ง

หมายเหตุ : ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นควรจะอุ่นที่อุณหภูมิ37 °C ก่อนนำมาใช้งาน

2. สีย้อม

การเตรียมสีที่ใช้การย้อมเจล ตามวิธี SDS-PAGE สามารถเตรียมได้ดังนี้

1) Coomassie brilliant blue R	2.50	กรัม
2) Methanol	45.50	กรัม
3) Glacial Acetic acid	9.00	กรัม

เตรียมโดยนำส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการเทคโนโลยีเกษตร

3. สารล้างสีย้อม

การเตรียมสารล้างสีที่ใช้การล้างเจล ตามวิธี SDS-PAGE สามารถเตรียมได้ดังนี้

1) Methanol 500 มิลลิลิตร

2) Glacial Acetic acid 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยนำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียมเจล SDS-PAGE

	Separating Gel 15% (0.375 M Tris, pH 8.8)	Stacking Gel 4.0% (0.125 M Tris, pH 6.8)
Acrylamide/Bis: 30%T, 2.67% C (ml)	5.00	1.30
Distilled water (ml)	2.35	6.10
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	2.50	0.00
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	0.00	2.50
10%(w/v) SDS (ml)	0.10	0.10
10%(w/v) ammonium persulfate (µl)	50.00	50.00
TEMED (µl)	5.00	10.00
Total monomer (ml)	**10.00**	**10.00**

4. วิธีการเตรียมเจล

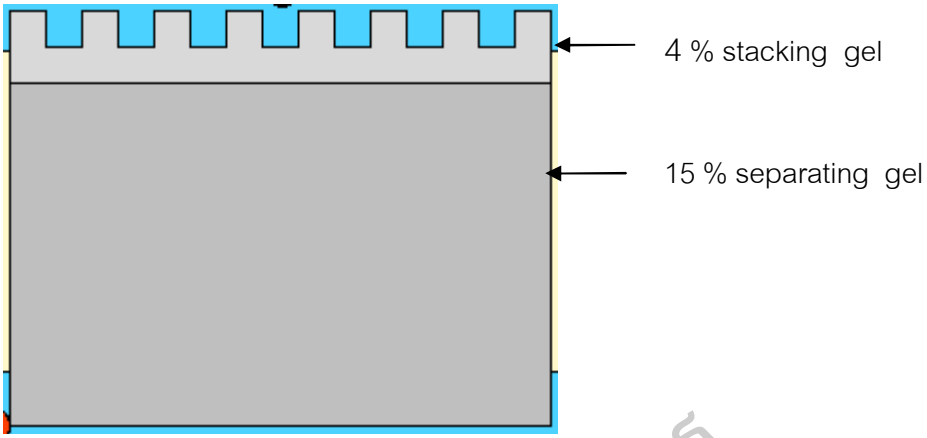
4.1 การเตรียมเจล 15 % separating gel

ทำได้โดยปิเปตสาร acrylamide/Bis 5.00 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 2.35 มิลลิลิตร Tris-HCl pH 8.8 2.50 มิลลิลิตร และ SDS 0.10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไล่อากาศ เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม ammonium persulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร

4.2 การเตรียมเจล 4 % Stacking Gel

ทำได้โดยปิเปตสาร acrylamide/Bis 1.30 มิลลิลิตร น้ำกลั่น6.10 มิลลิลิตร 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 2.50 มิลลิลิตร และ 10 %SDS 0.10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไล่อากาศ 20 นาที จากนั้นเติม 10% ammonium persulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะแผ่นเจล SDS

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ง
ตัวอย่างการวิเคราะห์ทางด้านสถิติ

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ทางเคมีด้านปริมาณ FAN ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลน

Source of Variance	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F – value	Prob.
Time	3	1970929.84	656976.61	34.90	0.00*
ratio	4	1279071.83	656976.61	16.98	0.00*
Time x ratio	12	328937.73	27411.47	1.45	0.18
Error	40	752911.85	18822.79		
Total	59	4331851.26			

หมายเหตุ: G.M. = 686.86

C.V. = 19.97 %

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก จ
แบบสอบถาม

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลือง

<u>คำแนะนำ</u> กรุณาทดสอบ**เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลือง**แล้วให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะตามคำอธิบายระดับคะแนนความชอบที่ตรงตามความรู้สึกของท่านดังนี้

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

คุณลักษณะ	**ระดับคะแนนความชอบ**			
ลักษณะปรากฏ				
สี				
กลิ่น				
รสชาติ				
ความข้นหนืด				
ความชอบรวม				

ข้อเสนอแนะ

……

……

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือค่ะ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลือง

คำแนะนำ กรุณาทดสอบ**เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลือง**แล้วให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะตามคำอธิบายระดับคะแนนความชอบที่ตรงตามความรู้สึกของท่านดังนี้

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

คุณลักษณะ	**ระดับคะแนนความชอบ**
ลักษณะปรากฏ	
สี	
กลิ่น	
รสชาติ	
ความข้นหนืด	
ความชอบรวม	

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ข้อเสนอแนะ

……

……

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือค่ะ

แบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค

เรื่อง การยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง

โดย นางสาวเข็มทอง อ่องทิพย์ นักศึกษาระดับปริญญาโทชั้นปีที่ 2 หลักสูตรเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

คำชี้แจง ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการผลิตที่สะอาด ปลอดภัย ถูกหลักอนามัย โดยการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคนี้ ข้อมูลที่ได้รับจะเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ซึ่งข้อมูลที่ได้จะไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผู้ตอบแบบสอบถามเพราะเป็นข้อมูลเชิงสำรวจเท่านั้น

อนึ่ง หากท่านมิชอบ / ไม่สามารถบริโภคถั่วเหลืองได้ กรุณาแจ้งให้ทราบด้วยค่ะ

คำอธิบาย **เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง**เป็นเครื่องดื่มน้ำสับปะรดที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง จากการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (โปรติเอส) ย่อยถั่วเหลืองเพื่อให้ได้เป็นกรดอะมิโนและเพบไทด์ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

คำแนะนำ กรุณาใส่เครื่องหมาย / ลงในวงเล็บ หน้าคำตอบที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมและตรงกับของท่าน

สำหรับเจ้าหน้าที่ ☐

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับผู้บริโภค

1. เพศ ☐

( ) 1. ชาย ( ) 2. หญิง

2. อายุ ☐

( ) 1. 16-20 ปี ( ) 2. 21-25 ปี

( ) 3. 26-30 ปี ( ) 4. 31-35 ปี

( ) 5. 36-40 ปี ( ) 6. มากกว่า 40 ปี

3. การศึกษาสูงสุด ☐

( ) 1. มัธยมศึกษาตอนปลาย / ปวช. ( ) 2. ปวส./อนุปริญญา

( ) 3. ปริญญาตรี ( ) 4. ปริญญาโท

( ) 5. ปริญญาเอก

4. อาชีพ ☐

( ) 1. นักเรียน / นักศึกษา ( ) 2. ข้าราชการ / พนักงานราชการ

( ) 3. พนักงานบริษัทเอกชน ( ) 4. ค้าขาย/ ธุรกิจส่วนตัว

( ) 5. รับจ้างทั่วไป ( ) 6. แม่บ้าน

( ) 7. พนักงานรัฐวิสาหกิจ ( ) 8. อื่นๆ โปรดระบุ

5. รายได้ต่อเดือน ☐

( ) 1. น้อยกว่า 5000 บาท ( ) 2. 5,001 – 10,000 บาท

( ) 3. 10,001 - 15,000 บาท ( ) 4. 15,001 – 20,000 บาท

( ) 5. 20,001 - 25,000 บาท ( ) 6. มากกว่า 25,000 บาท

ส่วนที่ 2 ข้อมูลพฤติกรรมการบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

6. ท่านเคยรับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหรือไม่ ☐

( ) เคย ( ) ไม่เคย (ไปทำข้อ 10)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

สำหรับเจ้าหน้าที่

7. ความถี่ในการรับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง ☐

( ) ทุกวัน ( ) 2-3 ครั้งสัปดาห์

( ) อย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง ( ) เดือนละครั้ง

( ) อื่นๆ โปรดระบุ.....

8. ท่านเคยรับประทานผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองชนิดใดบ้าง (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) น้ำนมถั่วเหลือง ( ) โปรตีนเกษตรจากถั่วเหลือง ☐☐

( ) ถั่วเน่า ( ) โยเกิร์ตถั่วเหลือง ☐☐

( ) ซอสถั่วเหลือง ( ) เต้าหู้ถั่วเหลือง ☐☐

( ) เต้าเจี้ยว ( ) อื่นๆ โปรดระบุ..... ☐☐

9. ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ท่านรับประทานซื้อได้จากไหน (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) ร้านสะดวกซื้อ (เช่น 7-eleven,108 shop) ☐

( ) ซุปเปอร์สโตร์ (Big C , Lotus ฯลฯ) ☐

( ) ตลาดสด ☐

( ) รถเข็น ☐

( ) อื่นๆ โปรดระบุ..... ☐

ส่วนที่ 3 ข้อมูลพฤติกรรมการบริโภคเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

10. ท่านเคยดื่มเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพหรือไม่

( ) เคย ( ) ไม่เคย (ไปทำส่วนที่ 4) ☐

11. ความถี่ในการรับประทานเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

( ) ทุกวัน ( ) 2-3 ครั้งสัปดาห์ ☐☐

( ) อย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง ( ) เดือนละ 1-2 ครั้ง ☐☐

( ) เดือนละครั้ง ( ) อื่นๆ โปรดระบุ..... ☐☐

12. ท่านนิยมรับประทานเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่ทำมาจากวัตถุดิบใด (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) ทำมาจากผลไม้ ( ) ทำมาจากสัตว์ ☐☐

( ) ทำมาจากผัก ( ) ทำมาจากธัญพืช ☐☐

( ) ทำมาจากสมุนไพร ( ) อื่นๆ โปรดระบุ ☐☐

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

สำหรับเจ้าหน้าที่

13. ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่ท่านดื่มจัดอยู่ในประเภทใดบ้าง (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) เพื่อความสวยความงาม เช่น บิวติดริ้ง สกินน์ ฟิต ☐

( ) เพื่อผ่อนคลายและลดความตึงเครียด เช่น ฮาร์ทติ เบเนคอล บีอิ้ง ☐

( ) เพื่อบำรุงสมอง เช่น ซุปไก่สกัด เปปทีน ☐

( ) เพื่อบำรุงกำลังและออกกำลังกาย เช่น สปอนต์เซอร์ เรดดี้ ☐

( ) อื่นๆ โปรดระบุ..... ☐

14. ท่านต้องการเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ประเภทใดมากที่สุด (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) บำรุงร่างกาย เช่น บำรุงหัวใจ บำรุงสมอง ฯลฯ ☐

( ) ช่วยให้ร่างกายสดชื่น กระปรี่กระเปร่า ☐

( ) ลดความเครียด ☐

( ) เพื่อความสวยความงาม ☐

( ) คุณค่าทางโภชนาการ เช่น มีกรดอะมิโนที่จำเป็น มีวิตามินซีสูง ☐

( ) อื่นๆ โปรดระบุ ..... ☐

ส่วนที่ 4 ข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท

คำแนะนำ กรุณาทดสอบเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง แล้วให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะตามคำอธิบายระดับคะแนนความชอบที่ตรงตามความรู้สึกของท่านดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย

7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะ	**ระดับคะแนนความชอบ**	
	256	654
ลักษณะปรากฏ		
สี		
กลิ่น		
รสชาติ		
ความข้นหนืด		
ความชอบรวม		

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเกษตร

สำหรับเจ้าหน้าที่

15. ท่านยอมรับเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองนี้ หรือไม่

( ) ยอมรับ ( ) ไม่ยอมรับเพราะ..... □

กรุณาดูผลิตภัณฑ์ก่อนตอบคำถาม

16. ถ้ามีเครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองจำหน่าย ในราคา 30 บาท (ปริมาตรสุทธิ 200 มิลลิลิตร) ท่านคิดว่าจะซื้อหรือไม่ □

( ) 1. ซื้อ (กรุณาทำต่อ ข้อ17)

( ) 2. ไม่ซื้อ เพราะ.....

ราคาสินค้าที่ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์

ชื่อผลิตภัณฑ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ราคา (บาท)
เปปทีน 4000	100	38
เปปทีน 8000	150	72

17. เหตุผลที่ท่านตัดสินใจว่าจะซื้อเครื่อ**ดื่**มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง ดังกล่าว (เลือกได้มากกว่า 1 ข้อ)

( ) เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ( ) รสชาติดี □□

( ) รูปร่างสีสัน ( ) ราคาถูก □□

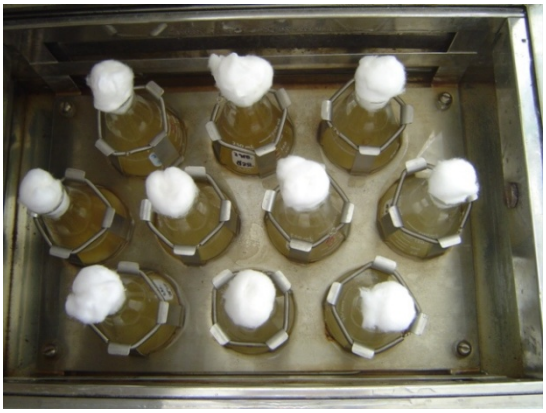
( ) สะอาด ปลอดภัย ( ) คุณค่าทางโภชนาการ □□

( ) อื่นๆ ระบุ..... □

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ฉ
ภาพผลิตภัณฑ์และการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ภาพผนวกที่ 4 เครื่องดื่มน้ำสับปะรดผสมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสท



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MR10 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

สถาบันวิทยบริการ เทคโนโลยีเกษตร

ภาพผนวกที่ 6 ลักษณะการเลี้ ยงเชื้ อ*B. subtilis* MR10 ในถั่วเหลือง

ภาพผนวกที่ 7 การย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพผนวกที่ 8 การทดสอบทางประสาทสัมผัสในห้องปฏิบัติการ

ภาพผนวกที่ 9 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค ณ บริเวณโรงเรียนกวดวิชาดิวดรอป จังหวัดลำปาง

ภาพผนวกที่ 10 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค ณ บริเวณหน้าร้านมินิมาร์ท ตรงข้ามมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

ภาพผนวกที่ 11 ร้านขายน้ำเต้าหู้บริเวณหน้าสถานีรถไฟ จังหวัดลำปาง

ภาพผนวกที่ 12 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค ณ บริเวณหน้าห้างหุ้นส่วนจำกัด ลำปางเสรีสรรพสินค้า จังหวัดลำปาง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีแห่ง