บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีทดลอง

2.1 สารเคมี

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Barium hydroxide	MERCK
Bromelain	SIGMA
Calcium chloride anhydrous	CARLOERBA
Casein	BDH
Citric acid powder	BDH
Copper (II) sulfate anhydrous	MERCK
Diethyl ether	MERCK
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	FLUKA
Ethanol, absolute	MERCK
Ethanol, 95%	MERCK
Formaldehyde, 37%	MERCK
Hexane	MERCK
Hydrochloric acid	BDH
Methyl red	MERCK
Papain	FLUKA
Phenophthalene	MERCK
Petroleum ether	MERCK
Potassium hydrogen phthalate	FLUKA
Sodium carbonate	CARLO ERBA
Sodium hydroxide	AKZO NOBLE
Sodium hydrogen sulfate	MERCK
Sulfuric acid	LAB-SCAN, MERCK
Trichloroacetic acid	CARLO ERBA
Tris (Hydroxymethyl) - aminomethane	J.T. BAKER

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.2 เครื่องมือ

ตารางที่ 2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
ตะแกรงเบอร์ 16	-
เตาเผา, Model SCF 1200	CARBOLITE
ตู้เย็น	TOSHIBA
Analytical Balance	SATORIUS
Blender	NATIONAL
Buretle	THOMAS SCIENTIFIC
Centrifuge J2-Mc	BECKMAN
Crucible	THOMAS SCIENTIFIC
Desiccator	-
Heating mental	ELECTROMONTLE
Micropipetle, Verible volume	HAMILTON
pH Meter 25	RADIOMETER
Shaker bath	MEMMERT
Spectrophotometer uv/vis	PERKIN ELMER
Vortex mixer, model G-560E	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Water bath	MEMMERT

2.3 วัตถุดิบ

2.3.1 เมล็ดถั่วเขียวกระเทาะเปลือก ตลาดเมืองใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

2.3.2 เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 และ *Aspergillus* sp2 ห้องวิจัยลานนาโปรตีเอส ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.4 การเตรียมแป้งถั่วเขียว

นำถั่วเขียวกระเทาะเปลือกมาคัดเอาเมล็ดที่เสียและลีบออก นำไปปั่นให้ละเอียด และนำไปร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 16 ทำการสกัดไขมันออกโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus ใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัด 5 ชั่วโมง จน hexane ใส นำมาผึ่งให้ hexane ระเหยจนหมด หลังจากนั้นนำไปศึกษาองค์ประกอบและใช้ในการศึกษาการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ต่อไป

2.5 การหาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งถั่วเขียว

2.5.1 การวิเคราะห์หาความชื้น (Jacob M.B., 1958)

ความชื้นคือสารที่สูญเสียไปได้จากการเพิ่มความร้อนให้สารนั้น โดยความร้อนที่ให้จะต้องมีอุณหภูมิไม่สูงกว่าจุดเดือดของน้ำ หรืออาจปล่อยสารตั้งทิ้งไว้ในสารดูดความชื้น (dehydrating agent) หรือโดยการให้ความร้อนในสภาพสูญญากาศ น้ำหนักที่ลดลงคือสารที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile matter) ที่หายไป ณ ที่อุณหภูมินั้น ส่วนกากหรือของแข็งแห้งที่เหลืออยู่หลังจากการระเหยออกไปหมดแล้วเรียกว่า ของแข็งทั้งหมด (total solid) พบว่าน้ำในอาหารมี 2 รูป ได้แก่ Bound water คือน้ำที่รวมอยู่กับสารประกอบในสารด้วยพันธะทางเคมี (chemically bound) เป็นน้ำที่รวมอยู่ในผลึก (water of crystallisation หรือ hydrated) Adsorbed water เป็นน้ำที่ถูกดูดซับอยู่เป็นชั้นที่ผิวนอกของส่วนประกอบในสาร เป็นการรวมกันทางกายภาพ (physically bound) Bulk or Free water เป็นน้ำที่เป็นส่วนประกอบในสารที่แยกอยู่เป็นอิสระ และระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย เมื่อนำสารไปอบหรือทำให้แห้ง ในการหาความชื้นของแป้งถั่วเขียวนั้น จะหาเป็นสารระเหยได้ทั้งหมด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น Adsorbed water (ลักษณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2536)

ก. วิธีการวิเคราะห์หาความชื้น

ใช้จานโลหะอาจเป็นแพลตตินั่ม หรือ porcelain dish โดยใช้ได้ทั้งชนิดที่มีฝาปิดและไม่มีฝาปิด จานโลหะควรเป็นก้นเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-8 เซนติเมตร ต้องอบจานโลหะให้แห้งสนิทที่ 100-105 องศาเซลเซียสในตู้อบประมาณ 20-30 นาที ทำให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักจานโลหะนั้น

ชั่งแป้งถั่วเขียวที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในจานโลหะที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแล้ว นำจานโลหะไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน ให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนัก นำไปอบซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้น้ำหนักที่คงที่ ซึ่งค่าที่ได้จะต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งหาน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวนหาน้ำหนักที่หายไป และคำนวนหาเปอร์เซนต์ความชื้นที่ได้

ข. วิธีการคำนวน

เปอร์เซนต์ความชื้น หรือสารระเหยทั้งหมด = $\frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$

2.5.2 **การวิเคราะห์หาไขมัน** (Williams, K.A., 1966)

ไขมันในอาหารจะมีสองชนิดคือ ลิปิดอิสระและ bound lipid โดยการสกัดไขมันโดยตรงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ โดยส่วนประกอบที่เป็นไขมันในอาหารจะเป็นสารประกอบจำพวกลิปิด ซึ่งสกัดออกโดย non-polar solvent สารที่สกัดได้จะเป็น crude fat เป็นลิปิดอิสระ (free lipid) แต่ถ้าทำการสกัดสารด้วย polar solvent สารที่สกัดได้จะมี bound lipid ปนอยู่ด้วย โดยพบว่า bound lipid จะสามารถสลายได้โดยการไฮโดรไลซิส หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีให้เป็นลิปิดอิสระ ดังนั้น ปริมาณของลิปิดในอาหารที่สกัดออกมาได้จึงขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดที่ใช้ (ลักษณา รุจนะไกรกานต์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2536)

ก. วิธีการวิเคราะห์หาไขมัน

ทำการสกัดไขมันโดยใช้ชุดอุปกรณ์ Soxhlet extraction apparatus นำแป้งถั่วเขียวอบให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก เมื่อได้น้ำหนักคงที่แล้ว ชั่งใส่ใน thimble ซึ่งผ่านการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว ชั่งหาน้ำหนัก ทำการสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet extration apparatus โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย สกัด 5-6 ชั่วโมง จน hexane ใส นำ thimble นำมาผึ่งให้แห้ง นำไปอบจนน้ำหนักคงที่ และนำไปชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น คือไขมันที่ถูกสกัดออกไป

ข. วิธีการคำนวณ

เปอร์เซนต์ไขมัน = $\frac{\text{น้ำหนักที่หายไปหลังการสกัด}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$

2.5.3 **การวิเคราะห์หา** fiber (Jacob M.B., 1958)

เส้นใยในอาหาร คือส่วนของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายและเหลืออยู่ หลังจากที่สารตัวอย่างผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ การสกัดเอาไขมันออกโดย ปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ สกัดด้วยสารละลายกรดกำมะถันเจือจาง สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง สารละลายกรดเจือจางแอลกอฮอล์ และอีเทอร์ ส่วนที่เหลือจากการสกัดคือเส้นใยที่ได้ พบว่าเส้นใยมีส่วน

ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส โดยส่วนที่เหลือเป็นลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดในเส้นใยจะแปรผันขึ้นกับชนิดของอาหารตัวอย่าง และวิธีการใช้วิเคราะห์ (Egan, H., et al. 1981)

ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หา fiber

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (light petroleum) มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส
2. สารละลายกรดกำมะถัน ความเข้มข้น 0.1275 โมลาร์ (0.255 นอร์มัล) เจือจางกรดกำมะถันเข้มข้น จำนวน 1.25 กรัม ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.313 โมลาร์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายกรดเกลือ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (% v/v) เจือจางกรดเกลือเข้มข้น จำนวน 10 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
5. เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (% v/v)
6. ไดเอธิลอีเทอร์

ข. วิธีการวิเคราะห์หา fiber ทั้งหมด

นำกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้าไปอบให้แห้ง และชั่งหาน้ำหนัก ชั่งแป้งถั่วเขียวที่บดละเอียด (ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงเบอร์ 16) มา 2.7-3 กรัม ใส่ในกระดาษกรอง ห่อแป้งถั่วเขียวด้วยกระดาษกรอง นำไปสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้ Soxhlet extraction apparatus หรืออาจใช้วิธีสกัดไขมันออกโดยวิธีการคน ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน เทชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ออก ทำซ้ำประมาณ 3 ครั้ง กากที่เหลือจากการสกัด ปล่อยตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

นำกากที่แห้งแล้วไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เติมสารละลายกรดกำมะถัน ความเข้มข้น 0.1275 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร การเติมสารละลายกรดกำมะถัน ให้เติมลงไปประมาณ 30-40 มิลลิลิตรก่อน เพื่อช่วยให้กากที่แห้งกระจายตัวได้ดี แล้วจึงเติมให้ครบ 200 มิลลิลิตร ภายใน 1 นาที อาจเติมสารป้องกันการเกิดฟอง (anti-foaming agent) เช่น ลูกแก้วเล็ก ๆ (glass bead) หรือ แผ่นสังกะสี ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดนาน 30 นาที การต้มต้องทำด้วยความระมัดระวัง ควรใช้เตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ขณะต้มควรปิดฟลาสค์ด้วยกระจกนาฬิกา และรักษาปริมาตรของสารภายในให้คงที่ ถ้าปริมาตรลดลงให้เติมน้ำร้อนลงไปจนปริมาตรเท่าเดิม โดยทำเครื่องหมายชี้บ่งระดับของสารละลายไว้ข้างฟลาสค์ด้วย ขณะต้มควรเขย่าฟลาสค์เป็นครั้งคราว เพื่อให้ตัวอย่างผสมกันได้ทั่วถึง และพาเอาตัวอย่างบางส่วนที่ติดอยู่ข้างฟลาสค์ลงมาด้วย

กรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 54 โดยใช้ hartley form of buchner funnel ค่อย ๆ เทน้ำเดือดใส่ลงในกรวย ปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยร้อน แล้วจึงเปิด suction นำฟลาสค์ที่ใส่สารละลายกรดที่ต้มเดือดครบ 30 นาที แล้วปล่อยตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เทใส่ลงในกรวย กรองกากทั้งหมดโดย

ใช้ suction ให้เสร็จภายใน 10 นาที ล้างกากด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีกรดเหลืออยู่ในกาก เทกากที่ล้างแล้วนี้กลับลงไปในฟลาสค์ใบเดิม ใช้ wash bottle ที่มีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.313 โมลาร์ จำนวน 200 มิลลิลิตร ล้างกากออกจากกระดาษกรองใส่ลงในฟลาสค์ให้หมด ต้มให้เดือดภายใน 1 นาที และปล่อยให้เดือดนาน 30 นาที แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้ suction เช่นเดียวกับขั้นตอนแรก ล้างด้วยน้ำร้อนจนแน่ใจว่าไม่มีด่างเหลืออยู่ เทกากที่ล้างแล้วนี้กลับลงไปในฟลาสค์ใบเดิม ล้างกากด้วยสารละลายกรดเกลือ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างตามด้วยน้ำร้อนอีกจนแน่ใจว่าไม่มีกรดเหลืออยู่ หลังจากนั้นนำกากไปล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง และตามด้วยไดเอธิลอีเทอร์อีก 3 ครั้ง นำกากที่เหลือทั้งหมดใส่ลงบนกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแน่นอน หรือใส่ใน porcelain dish ที่ผ่านการอบและทราบน้ำหนักแล้ว ล้างส่วนที่ติดกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนเล็กน้อย นำไประเหยให้แห้งบน boiling-water bath แล้วนำไปอบต่อในตู้อบ 100 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของกากที่เหลือ

นำกากไปเผาต่อในเตาเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ ประมาณ 500-550 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้

ข. วิธีการคำนวณ

ปริมาณเส้นใยในอาหาร = น้ำหนักแห้งของกาก - น้ำหนักเถ้า

2.5.4 **การวิเคราะห์หาเถ้าทั้งหมด (Heart, F.L., 1971)**

เถ้าของอาหารคือสารประกอบอนินทรีย์ที่เหลืออยู่ (inorganic residue) หลังจากทำการเผาไหม้ให้สารประกอบอินทรีย์ (organic matter) สลายไปหมดแล้ว ปริมาณของเถ้าที่ได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับจำนวนสารประกอบอนินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเสมอไป เพราะอาจมีบางส่วนของเถ้าหายไป เนื่องจากการระเหย (volatilisation) หรือเกิด interaction ระหว่างส่วนประกอบ (ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2536)

ก. วิธีการวิเคราะห์หาเถ้าทั้งหมด

เผาจานแพลตตินั่ม หรือจานกระเบื้องซิลิก้าก้นแบนที่ใช้ในการวิเคราะห์เถ้าในเตาเผา (Muffle Furnace) ที่อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งหาน้ำหนักของจานเปล่า

ชั่งแป้งถั่วเขียวมา 2-5 กรัม ใส่ลงในจานสำหรับหาเถ้า เผาไหม้อาหารดังกล่าวโดยใช้ตะเกียงบุนเซนจนไม่มีควันดำเสียก่อน แล้วจึงนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว นำไปทำให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้า คำนวนหาเปอร์เซนต์ในอาหารตัวอย่าง

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้าที่ได้}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

2.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (AOAC, 1990)

เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ (organic nitrogen content) ซึ่งมีทั้งโปรตีน และสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน แต่มีไนโตรเจน (non protein nitrogen) รวมอยู่ด้วย โดยอาหารจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) ได้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ ในการย่อยจะเติมโซเดียมหรือโปรแตสเซียมซัลเฟตลงไป เพื่อเพิ่มจุดเดือดของการย่อยให้สูงขึ้น และมีคอปเปอร์ซัลเฟตหรือเมอร์คิวริคออกไซด์ เป็นคะตะลิสต์เพื่อเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น แอมโมเนียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นที่มากเกินพอ จะได้ก๊าซแอมโมเนียออกมา ทำการกลั่นโดยตรงหรือทำ steam distillation เพื่อไล่แอมโมเนียออกให้หมด จับกาซแอมโนเนียด้วยสารละลายกรดบอริค แล้วไทเทรทหาปริมาณแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดกำมะถันมาตรฐาน

ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50% (w/v)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นลงในขวด วัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นลงในขวด วัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงในขวด วัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 480 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟาธาเลท 0.1000 โมลาร์

ชั่งโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟาธาเลท 2.0423 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. กรดกำมะถันเข้มข้น (96-98%)

6. เมธิลเรด 1% (w/v)

ชั่งเมธิลเรด 1 กรัม ละลายด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ลงในขวด วัดปริมาตร 100

มิลลิลิตร และปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยเอธิลแอลกอฮอล์

7. ฟีนอฟธาลีน 1% (w/v)

ชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ลงในขวด วัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยเอธิลแอลกอฮอล์

8. คอปเปอร์ซัลเฟต แอนไฮดรัส

ข. ทำมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก

ปิเปตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสค์ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสค์ นำการไตเตรทด้วยสารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนพาธาเลท 0.1000 โมลาร์ โดยใช้เมธิลเรด 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ นำปริมาตรที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวนหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) เมื่อได้ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่แน่นอนแล้ว นำไปไทเทรทหาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก โดยใช้ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ได้ (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

ค. วิธีวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี kjeldahl

ชั่งแป้งถั่วเขียวแห้ง 0.5 กรัม (ชั่งละเอียด) ใส่ในขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ boiling chip 5-10 เม็ด เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ส่วนผสมนี้ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง) ปล่อยให้สารละลายที่ได้เย็น ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายนี้ไปถ่ายลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

นำขวดก้นกลมที่บรรจุสารละลายที่ได้ไปติดตั้ง ดังรูปที่ 2.1 เพื่อทำการกลั่นก๊าซแอมโมเนีย ก่อนติดตั้งให้ใส่ boiling chip ลงไปเล็กน้อย เพื่อป้องกัน super heating แล้วค่อยรินโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซนต์ลงไป 75 มิลลิลิตร ต่อขวดก้นกลมเข้ากับชุดกลั่นทันที จากนั้นเริ่มกลั่นสารผสมด้วยไอน้ำโดยให้ปลายคอนเดนเซอร์จุ่มในสารละลายกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนปริมาณ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และหยดเมทธิลเรดลงไป 2-3 หยด ทำการกลั่นจนกระทั่งแอมโมเนียหมด ทดสอบโดยกระดาษลิตมัสชื้น อังที่ปลายคอนเดนเซอร์

นำสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริกที่ได้จากการกลั่นไปไตเตรท (Back titration) กับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอล์ฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้ว นำกลับมาคำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ง. วิธีคำนวณ

การทำมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ใช้สูตรคำนวนคือ

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

โดย M_1 = ความเข้มข้นของสารที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเป็นโมลาร์

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเป็นมิลลิลิตร ที่ใช้ไทเทรท

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการไตเตรทที่ต้องการความเข้มข้น

M_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการหา

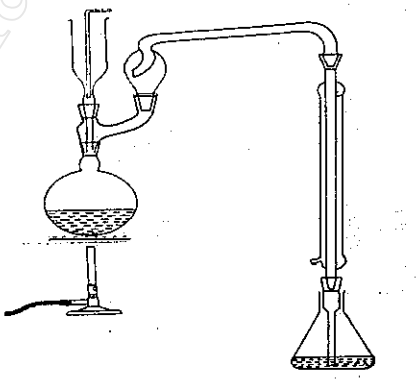
การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีในแป้งถั่วเขียว โดยคำนวนได้จากสูตร

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{(A - B) \times 1.4}{W}$$

โดย A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน กรดไฮโดรคลอริก x ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ x ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน

W = น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)



รูปที่ 2.1 kjeldhal Distillation Apparatus

2.6 การย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น

2.6.1 การย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น

ก. สารเคมีที่ใช้ในการย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น

1. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (MW. 36.46 g/mol)
2. โซเดียมคาร์บอเนต แอนไฮดรัส (MW. 105.99 g/mol)

ข. วิธีย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น

ชั่งแป้งถั่วเขียวที่สกัดไขมันออกแล้วมา 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 กรัม ตามลำดับ ใส่ในขวดก้นกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 7 ใบ ใส่ boiling chip ลงไป 5-6 เม็ดเพื่อกันการเดือดอย่างรุนแรง เติมน้ำกลั่นลงไปในฟลาสค์ ฟลาสค์ละ 10 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ โดยต่อขวดก้นกลมกับคอนเดนเซอร์ ย่อยสลายแป้งถั่วเขียว 12-16 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ทำการปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต โดยค่อย ๆ เติมลงในสารละลาย เพราะจะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ควรเติมโซเดียมคาร์บอเนตทีละน้อย ๆ ปรับให้พีเอชเป็น 7.0 ด้วยพีเอชมิเตอร์ กรองสารย่อยสลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

2.6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์

ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้งถั่วเขียวโดยตรงด้วยเอนไซม์โปรติเอสและกรดเกลือเข้มข้น ซึ่งผลผลิตที่ได้จะมีทั้งกรดอะมิโนอิสระ สายเปปไทด์สั้น และโปรตีน ซึ่งปนกันอยู่ภายในสารละลาย จึงต้องทำการตรวจสอบปริมาณสารทั้งหมดด้วยการใช้วิธีการหาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนเพื่อดูปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทั้งหมด และทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารละลาย เพื่อใช้เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ว่ามีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ สารเปปไทด์ และโปรตีนที่ถูกย่อยสลายออกมาในสารละลายในปริมาณที่มากน้อยเพียงใด เมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารละลายที่ได้นั้น (Nakadai T. and Nasuno, S., 1972)

ก. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ ไนโตรเจน (Formaldehyde nitrogen, F.N.) (AOAC, 1990)

เมื่อเติมฟอร์มาลีนลงในสารละลายอาหารตัวอย่างที่เป็นกลาง ซึ่งมีโปรตีนและกรดอะมิโน ฟอร์มาลีนจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ที่อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนและกรดอะมิโน ได้เป็นหมู่ methylene-imino ($-N-CH_2$) ทำให้มีหมู่คาร์บอกซิลเหลืออยู่เป็นอิสระ ซึ่งหาปริมาณได้โดยการไทเทรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน ปฏิกิริยาของฟอร์มาลีนกับกรดอะมิโน มีดังนี้

$$HOOC - R - NH_2 + HCHO \longrightarrow HOOC - R - N{=}CH_2 + H_2O$$

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนได้รวดเร็ว และนิยมใช้วิเคราะห์อาหารเหลว เช่น น้ำนม น้ำปลา น้ำผลไม้ และไอศกรีม เป็นต้น (ลักษณา รุจนะไกรกานต์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2536)

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาดีไฮด์ไนโตรเจน

1.1 0.1 N แบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH)_2$) (MW. = 171.34 g/mol)

ชั่งแบเรียมไฮดรอกไซด์ 17.134 กรัม ละลายในน้ำ ปราศจากไอออน (deionizede water) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

1.2 ฟอร์มาลิน (formalin)

ดูดสารละลายฟอร์มาลิน 30-40% มา 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยแบเรียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ 1 เปอร์เซนต์ฟีนอฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

1.3 0.1 M กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) (MW. = 98.08 g/mol)

ดูดสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 96% มา 0.549 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. วิธีหาฟอร์มาดีไฮด์ไนโตรเจน

ดูดสารละลายมา 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 กรัม ด้วย 0.1 N แบเรียมไฮดรอกไซด์ และเติมให้เกินพอเพื่อที่จะทำให้ซัลเฟต (sulfate) ฟอสเฟต (phosphate) และคาร์บอเนต (carbonate) ตกตะกอน แล้วปรับพีเอชให้เป็น 8.0 ด้วย 0.1 N กรดซัลฟูริค แล้วเติมสารละลายฟอร์มาลิน 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่าง 2-3 นาที ไตเตรทด้วย 0.1 N แบเรียมไฮดรอกไซด์ จนพีเอชเป็น8.0

3. วิธีคำนวณ

$$\text{F.N. (กรัม/100 มิลลิลิตร)} = A \times F \times \frac{100}{10} \times 0.0014$$

โดย A = ปริมาตรที่ใช้ 0.1 N แบเรียมไฮดรอกไซด์

F = ความเข้มข้นของแบเรียมไฮดรอกไซด์

หมายเหตุ : 0.1 N Ba(OH)2 1 มิลลิลิตร = 1.4 มิลลิกรัมไนโตรเจน

= 0.0014 กรัมไนโตรเจน

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเกลือเข้มข้นจากข้อ 2.6.1 มาตรวจหา

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี kjeldahl โดยใช้สารละลาย 3 มิลลิลิตร ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ถ้าการย่อยสลายใช้เวลานานให้เพิ่มปริมาณกรดกำมะถันเข้มข้นในการย่อย ตามวิธีที่ 2.5.5

2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งถั่วเขียว โดยเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ

2.7.1 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสและการตรวจสอบผลิตภัณฑ์

การตรวจสอบแอคติวิตี หรือความสามารถในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งถั่วเขียว จะตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยการทดสอบหาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพื่อดูความสามารถในการย่อยแป้งถั่วเขียวของเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ในสภาวะที่ทำการศึกษา

ก. การหาแอคติวิตีเอนไซม์โปรติเอส

แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสามารถหาได้โดยนำเอนไซม์ย่อยสับสเตรทเคซีนในทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยโปรติเอสหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนเท่ากับ 1 ไมโครกรัมของไทโรซีนต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

1. การเตรียมสารสำหรับการหาแอคติวิตีเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีไฮโดรไลซ์เคซีน

1.1 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ pH 7.0

ชั่งไตรไฮดรอกซีอะมิโนเมทิลามีน (Tris) (MW. 121.14 g/mol) 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 6.0 โมลาร์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.37 กรัม ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 1 เปอร์เซนต์ เคซีน

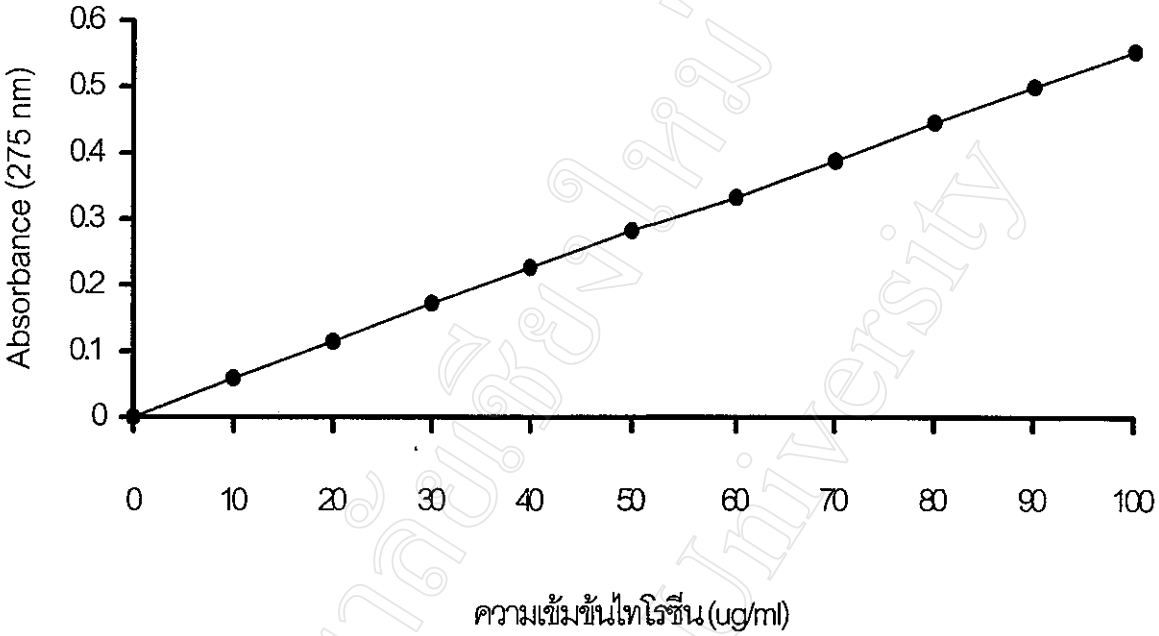
ชั่งเคซีน 1.0 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 มิลลิโมลาร์ของแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

1.3 10 เปอร์เซ็นต์ ไตรคลอโรอะซิติคแอซิค

ชั่ง Trichloroacetic acide (MW. 163.39 g/mol) ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เตรียมสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งไทโรซีน 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายไทโรซีนให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-90 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายไทโรซีนตั้งแต่ 1-9 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 10.0 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไทโรซีน



รูปที่ 2.2 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

3. การหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

ใส่ 1 เปอร์เซนต์เคซีน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นทันทีแล้วเติม 10 เปอร์เซนต์ไตรคลอโรอะซิติค แอซิค ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นตกตะกอนที่ 7500 rpm 10 นาที เอาส่วนสารละลายใสเหนือตะกอนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เทียบหาปริมาตรไทโรซีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์โดยใช้กราฟมาตรฐานไทโรซีน

ข. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจน

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ มาทำการหาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีที่แสดงในข้อ 2.6.2 (ก)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ

มาทำการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี kjeldahl โดยใช้สารละลาย 3 มิลลิลิตร ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ถ้าการย่อยสลายใช้เวลานานให้เพิ่มปริมาณกรดกำมะถันเข้มข้นในการย่อยตามวิธีที่แสดงในข้อ 2.5.5

2.7.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อการย่อยแป้งถั่วเขียว

ก. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. สับสเตรทแป้งถั่วเขียว 5% (w/v)

ชั่งแป้งถั่วเขียว 2.5 กรัม ใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละขวดจำนวน 32 ขวด เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดขวดด้วยจุกสำลีแล้วหุ้มกระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น

ข. วิธีทำ

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ โบรมิเลน ปาเปน เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 (SP1) และ *Aspergillus* (SP2) ซึ่งทำการหาแอคติวิตีโดยการย่อย 1 เปอร์เซนต์เคซีน ตามการทดลองที่ 2.7.1 (ก) และเมื่อทราบแอคติวิตีแน่นอนแล้ว นำมาละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ใส่ลงในฟลาสค์ที่มีสับสเตรทแป้งถั่วเขียว 5% (w/v) โดยใส่เอนไซม์ 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 250 ยูนิต ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน shaker bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปเซนติฟิวจ์ นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปหาปริมาณฟอร์มาดีไฮด์ไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

2.7.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งถั่วเขียวในการย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ

ก. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. สับสเตรทแป้งถั่วเขียว

ชั่งแป้งถั่วเขียว 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละขวดจำนวน 4 ชุด รวม 28 ขวด เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 50 มิลลิลิตร จะได้สับสเตรทความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เปอร์เซนต์ (w/v) ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ปิดขวดด้วยจุกสำลีแล้วหุ้ม

กระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น

ข. วิธีทำ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอสต่อการย่อยแป้งถั่วเขียว (2.7.1) ใช้เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 (SP1) และ *Aspergillus* sp2 (SP2) ความเข้มข้น 150 โปรติเอสยูนิต และเอนไซม์ปาเปน และโบรมิเลน ความเข้มข้น 100 ยูนิต ชั่งละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ใส่ลงในฟลาสค์ที่มีสับสเตรทความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เปอร์เซนต์ (w/v) ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน shaker bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปเซนติฟิวจ์ นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปหาฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

2.7.4 การศึกษาผลของความเป็นกรดเบสในการย่อยแป้งถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ

ก. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. 0.1 โมลาร์ กรดซิตริก

ชั่งกรดซิตริก (citric acid monohydrate MW. 210.14) 21.014 กรัม ละลายในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. 0.2 โมลาร์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (MW. 141.98 g/mol) มา 28.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0

ปิเปต 0.1 โมลาร์กรดซิตริก ปริมาตร 79.45 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 M ไดโซ-เดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 20.55 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 3.0 ด้วย 0.1 โมลาร์กรดซิตริก เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.074 กรัมผสมให้เข้ากัน

4. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0

ปิเปต 0.1 โมลาร์ กรดซิตริก ปริมาตร 61.45 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 โมลาร์

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 38.55 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 4.0 ด้วย 0.2 โมลาร์ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.074 กรัม ผสมให้เข้ากัน

5. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0

ปิเปต 0.1 โมลาร์ กรดซิตริกปริมาตร 48.50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 51.50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 ด้วย 0.2 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.074 กรัม ผสมให้เข้ากัน

6. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0

ปิเปต 0.1 โมลาร์ กรดซิตริกปริมาตร 36.85 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตร 63.15 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.0 ด้วย 0.2 โมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.074 กรัม ผสมให้เข้ากัน

7. สารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7, 8 และ 9

ชั่งไตรไฮดรอกซี อะมิโนเมทิลามีน (Tris) 0.42 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6.0 โมลาร์ หรือกรดไฮโดรคลอริก 6.0 โมลาร์ เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.74 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

8. สับสเตรทแป้งถั่วเขียว

ชั่งแป้งถั่วเขียว 2.5 กรัม ใส่ลงในขวดชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตรแต่ละขวด จำนวน 28 ขวด เติมบัฟเฟอร์ซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก ที่มี 0.5 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ พีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในแต่ละฟลาสค์ จำนวน 4 ชุด เขย่าให้เข้ากัน ปิดขวดด้วยจุกสำลีแล้วหุ้มกระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น

ข. วิธีทำ

ใช้สับสเตรทแป้งถั่วเขียว ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (w/v) ในบัฟเฟอร์ พีเอชต่าง ๆ กัน คือ พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 เติมเอนไซม์โปรติเอสทั้งสี่ชนิด โดยโปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 (SP1) และ *Aspergillus* sp2 (SP2) ใช้ 150 โปรติเอสยูนิต และเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลนใช้ 100 โปรติเอสยูนิต เติมลงในฟลาสค์ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน

shaker bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปเซนติฟิวจ์และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปหาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

2.7.5 **การศึกษาผลของอุณหภูมิในการย่อยแป้งถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ**

ชั่งแป้งถั่วเขียว 2.5 กรัม ใส่ขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 28 ขวด เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น เติมเอนไซม์โดยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 (SP1) และ *Aspergillus* sp2 (SP2) ใช้เอนไซม์ 150 โปรติเอสยูนิต เอนไซม์ปาเปน และโบรมิเลน ใช้ 100 โปรติเอสยูนิต ต่อฟลาสค์ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน shaker bath อุณหภูมิ 25, 30, 37, 42, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปเซนติฟิวจ์ และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาหาฟอร์มาดิไฮด์ ไนโตรเจนและหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

2.7.6 **การศึกษาผลของเวลาในการย่อยแป้งถั่วเขียวโดยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ**

ชั่งแป้งถั่วเขียว 2.5 กรัม ใส่ขวดชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 28 ขวด เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น เติมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp1 (SP1) และ *Aspergillus* sp2 (SP2) ใช้เอนไซม์ 150 โปรติเอสยูนิต เอนไซม์ปาเปน และโบรมิเลน ใช้ 100 โปรติเอสยูนิต ต่อฟลาสค์ เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน shaker bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปเซนติฟิวจ์ และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาหาฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจน และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

2.8 การเปรียบเทียบผลการย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์และกรดเกลือเข้มข้น

นำปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น โดยเปรียบเทียบกัน ณ ความเข้มข้นของแป้งถั่วเขียวเท่ากัน และให้การย่อยสลายแป้งถั่วเขียวโดยกรดเกลือเข้มข้นเป็นการย่อยสลายสมบูรณ์ (100% digestibility) โดยคำนวณตามสูตร

$$\text{Digestibility} = \frac{A}{B} \times 100$$

โดย A = ปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

B = ปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายแป้งถั่วเขียวด้วยกรดเกลือเข้มข้น

2.9 การขยายขนาดการย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา

ชั่งแป้งถั่วเขียว 150 กรัม ใส่ในขวดชมพู่ ขนาด 5 ลิตร เติมบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 3 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกด้วยสำลี แล้วหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น (จะได้สับสเตรทเข้มข้น 5% w/v) เติมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp2 (SP2) 9000 ยูนิต (เอนไซม์ 150 โปรติเอสยูนิต ต่อ 50 มิลลิลิตร 5% w/v สับสเตรท) เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ใน shaker bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอนไซม์โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปเซนติฟิวจ์ และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองไปทดสอบหาฟอร์มาดีไฮด์ไนโตรเจนและหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป

2.10 การทำเข้มข้นผลผลิตที่ได้จากการขยายขนาด การย่อยแป้งถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา

นำสารละลายที่ได้จากการย่อยแป้งถั่วเขียว ในข้อ 2.9 นำมาใส่ในฟลาสค์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาณฟลาสค์ละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาสค์ นำไประเหย โดยใช้ hot water bath จนเหลือปริมาตรฟลาสค์ละ 80, 60, 40 และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้ไปเจือจางและหาปริมาณฟอร์มาดิไฮด์ไนโตรเจน และไนโตรเจนทั้งหมดต่อไป