บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด จาก บริษัท The Solae Company (USA)

3.1.2 เอ็นไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) 3.0 units/mg บริษัท Sigma-Aldrich Inc.

3.1.3 (Alcalase®) 2.4 AU/mg บริษัท Novo Nordisk Co., Ltd.

3.1.4 succinic anhydride บริษัท Sigma-Aldrich Inc.

3.1.5 สารเคมี

- Sodium hydroxide
- Hydrochloric acid
- Monosodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)
- Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4. H_2O$)
- Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)
- Copper (II) Sulfate
- Trichloroacetic acid (TCA)
- 2, 2 – Azino- bis (3-ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic) (ABTS)
- Tris (hydroxymethyl) Aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)
- Glycerol
- Bromophenol Blue
- Ammonium persulfate
- Acrylamide
- N, N-Methylene-bis (acrylamide)
- N,N,N,N – Tetrametyl ethylenediamine (TEMED)
- Bromophenol Blue
- Methanol
- Coom assie brilliant blue
- 2 – Mercaptoethanol
- Hydrogen peroxide
- Linoleic acid

- 99.5% Ethanol
- 95% Ethanol
- Ferrous chloride
- Ammonium thiocyanate
- Ascorbic acid
- Trorox (6-aaahydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97%)

3.2อุปกรณ์ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

- Freeze Dryer	Vacuum freeze drier FT33
- Spectrophotometer	Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- SDS-PAGE	Amersham phamacia biotech, Sweden
- Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R

- หลอดเซนตริฟิว
-Water bath shaker
- multistirrer
- Water bath
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.3.1 อุปกรณ์ในการทดสอบระดับการย่อยสลาย

- ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Buchi Distillation unit B-316, Switzerland
- Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R

- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3.2 อุปกรณ์ในการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

- Electrophoresis set	Amershame pharmacia biotech, Sweden
- Easy Breeze Gel Dryer	Hoefer scientific instruments
- Micropipette P1000 pipetman	Gilson Medical Electronic

- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3.3 อุปกรณ์ในการทดสอบความสามารถในการละลาย

- Spectrophotometer Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- Centrifuge Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3.4 อุปกรณ์ในการทดสอบสมบัติการต้านออกซิเดชัน

- Spectrophotometer Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- Quazt cuvetter
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 ศึกษาสมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ทำการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีดังนี้

3.5.1.1 ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ตามวิธีของ Landrault และคณะ (2001)

3.5.1.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามวิธีของ Yen และคณะ (1995)

3.5.1.3 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate (FTC) ตามวิธีของ Larrauri และคณะ (1996)

3.5.2 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ตามวิธีของ พรชนัน (2548) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.5 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อ

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Kim และคณะ (1989) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.5.3 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

ย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ตามวิธีของ Waish และคณะ (2003)โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.0 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Kim และคณะ (1989) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.5.4 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

ดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ตามวิธีของ El-Adawy (2000) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมกรดซัคซินิคแอนไฮไดร์ ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชของสารละลายเป็น8.0 และควบคุมให้คงที่ตลอดปฏิกิริยา เป็นระยะเวลาต่างกัน 4 ระดับ คือ 15 30 60 และ 120 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการไดอะไลซีส (dialysis) ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดซัคซินิคแอนไฮไดร์มาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95