# บทที่ 4

# ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต มีผลการศึกษาประกอบด้วย (1) องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate composition) ของวัตถุดิบ ได้แก่ แป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก (2) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณ และปริมาณสารต้านโภชนาการของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (4) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต (5) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต และ (6) การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งเป็นสารเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียว

## 4.1 การศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณ (proximate composition) ของวัตถุดิบ: แป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก

การศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก แสดงผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 54.12 โปรตีนร้อยละ 17.43 และไขมันร้อยละ 13.18 สอดคล้องกับการรายงานของ Yusuf *et al*. (2008) และกรมวิชาการเกษตร (2555) ที่พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 58-61, 15-19 และ 6-8 ตามลำดับ จากผลการรายงานของ Duke, (1986) และ Belitz *et al.* (2009) พบว่าโปรตีนในแป้งถั่วหรั่งมีปริมาณต่ำกว่าถั่วลิสงและถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 31 และ 41 ตามลำดับ แต่พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีปริมาณโปรตีนสูงใกล้เคียงกับแป้งถั่วเขียว ที่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนประมาณร้อยละ 19 แป้งถั่วหรั่งจึงถือเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีนอาหารจากพืชอีกแหล่งหนึ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเอทานอล (อัตราส่วน 9:1) พบว่าสามารถกำจัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งได้ประมาณร้อยละ 50 (ลดลงจากร้อยละ 13.18 เหลือเพียงร้อยละ 6.94) และพบว่าแป้งถั่วหรั่งมีโปรตีนเข้มข้นขึ้นจากร้อยละ17.43 เป็นร้อยละ 35.64 ในขณะที่ปริมาณความชื้น ไขมัน เถ้าและคาร์โบไฮเดรตมีค่าลดลง เนื่องจากการสกัดแยก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งทำให้แป้งถั่วหรั่งมีปริมาณโปรตีนเข้มข้นมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเตรียมแป้งถั่วหรั่งโดยสกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งก่อนการสกัดแยกโปรตีนเพื่อผลิตเป็นโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น

**ตารางที่ 6** องค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่ง และแป้งถั่วหรั่งที่สกัดไขมันออก

Proximate composition of bambara groundnut flour (BF) and defatted bambara grounut flour (DBF)

| Compositions (% wet wt.)* | BF | DBF |
|---|---|---|
| Moisture | $10.79 \pm 0.13^{b\dagger}$ | $8.97 \pm 1.38^{a\dagger}$ |
| Protein | $17.43 \pm 0.23^{a}$ | $35.64 \pm 0.20^{b}$ |
| Fat | $13.18 \pm 1.14^{b}$ | $6.94 \pm 0.62^{a}$ |
| Ash | $4.48 \pm 0.20^{a}$ | $4.32 \pm 0.14^{a}$ |
| Total carbohydrate# | $54.12 \pm 0.43^{b}$ | $44.13 \pm 0.59^{a}$ |
| Crude fiber | $3.27 \pm 0.10^{b}$ | $2.23 \pm 0.29^{a}$ |

#Total carbohydrate is calculated by difference

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

†Different superscripts (a-d) in the same row represent the significante differences at $p < 0.05$

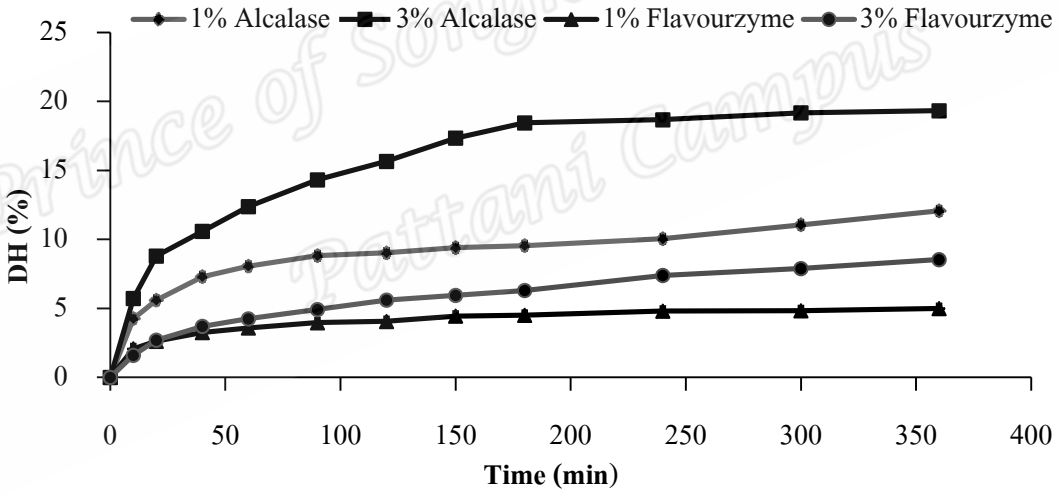
Prince of Songkla University Pattani Campus

**4.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต**

**4.2.1 ผลของระยะเวลาต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีน**

การศึกษาผลของระยะเวลาต่อระดับการย่อยสลายของ BPC ที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ภายใต้สภาวะที่กำหนด และตรวจสอบระดับการย่อยสลายที่ระยะเวลา 0 ถึง 360 นาที พบว่าการย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีลักษณะเส้นกราฟของการย่อยสลาย (Time-hydrolysis curve) ที่คล้ายกันคือ ในช่วง 60 นาทีแรกของการย่อยสลาย โปรตีนมีอัตราการย่อยสลาย (พิจารณาจากความชันของเส้นกราฟ) สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจาก 60 นาทีเป็น 180 นาที พบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 1 มีอัตราการย่อยสลายลดลงและมีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนที่ระยะเวลานานกว่า 180 นาที พบว่าโปรตีนมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมี

แนวโน้มคงที่ อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนมีระดับการย่อยสลายสูงสุดเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนที่ระยะเวลา 360 นาที (รูปที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu *et al.* (2006) ที่พบว่าการย่อยสลายโปรตีนจากจมูกข้าวสาลีด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรกและมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 25 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 360 นาที เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการย่อยสลายเดียวกัน พบว่าการย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 1 มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (เข้มข้นร้อยละ 1 และ 3) (รูปที่ 2) ในการทดลองครั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยต้องการหาระยะเวลาที่สามารถย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้มีระดับการย่อยสลายสูงสุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาการย่อยสลาย 360 นาที เป็นระยะเวลาที่จะใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป (การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น)



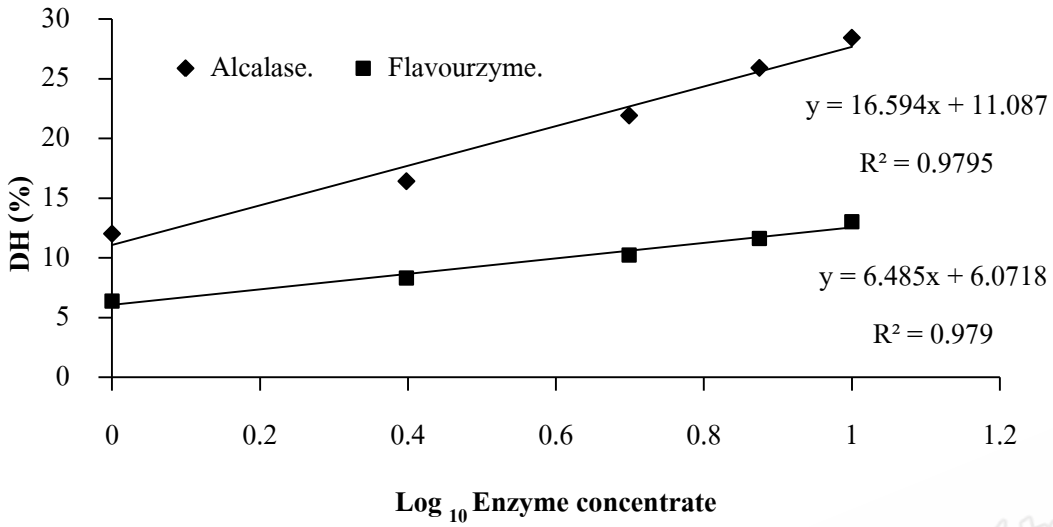

**รูปที่ 2** การเปลี่ยนแปลงระดับการย่อยสลาย (DH) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของเอนไซม์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน) ข้อมูลมาจากการดำเนินการทดลอง 2 ซ้ำ

DH changes of bambara groundnut protein concentrate (BPC) during hydrolysis using Alcalase or Flavourzyme at various enzyme concentration (w/w protein). Each data was the mean of duplicate measurement.

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2.2 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีน

จากการย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์แตกต่างกัน 6 ระดับ คือ ร้อยละ 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย เป็นเวลานาน 360 นาที ตรวจสอบระดับการย่อยสลายของ BPC จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมฐาน 10 ($Log_{10}$) ของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้กับระดับการย่อยสลาย (%) พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์เส้นตรงและมีสมการเชิงเส้นดังแสดงในรูปที่ 3 จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งได้ดีกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พิจารณาจากระดับการย่อยสลายที่มีค่าสูงกว่าในทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถใช้คำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา (ค่า X ในสมการ) เพื่อกำหนดระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ต้องการผลิต (ค่า Y ในสมการ) ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ระดับสูง ระดับกลาง และระดับต่ำ ภายใต้ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งของเอนไซม์แต่ละชนิด ผู้วิจัยจึงกำหนดระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส(จากการคำนวณเพื่อให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 พบว่าต้องใช้เอนไซม์อัลคาเลสเป็นปริมาณ 0.86, 1.28 และ 13.8 (g:100g protein) และร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าต้องใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นปริมาณ 0.68, 4.03 และ 23.80 (g :100 g protein) โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จะถูกนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่และการเป็นสารต้านออกซิเดชันในการศึกษาขั้นตอนถัดไป




**รูปที่ 3** ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log_{10}$ ความเข้มข้นของเอนไซม์และระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายดำเนินภายใต้ พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและพีเอช 7 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

Relationship between $\log_{10}$ enzyme concentration and degree of hydrolysis (%) in enzymatic hydrolysis of BPC using Alcalase or Flavourzyme. The reaction was performed for 6 h at 50°C, pH 8.0 for Alcalase and 60°C, pH 7.0 for Flavourzyme.

**4.3 การศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate composition) และปริมาณสารต้านโภชนาการของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)**

จากการสกัดแยกโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่งด้วยวิธีตกตะกอน ณ จุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point; pI) แล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในรูปผง ได้เป็น BPC พบว่า BPC ที่ผลิตได้มีปริมาณผลผลิต (Production yield) ของโปรตีนผงร้อยละ 11.53 โดยน้ำหนักโปรตีนผงต่อน้ำหนักแป้งถั่วหรั่งเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 66.83 ซึ่งเป็นปริมาณโปรตีนที่สูงในระดับโปรตีนเข้มข้น (Protein concentrate) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 29.23 และไขมันร้อยละ 2.28 ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตของโปรตีนผง พบว่าการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่าเมื่อเปรียบการศึกษาของ Mune *et al.* (2011) ที่สกัดแยกโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

โดยใช้สภาวะด่างที่พีเอช 8.99 ตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 และอบแห้งเป็นโปรตีนผงด้วยเตาอบแบบลมร้อน (50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง) ได้ปริมาณผลผลิตของโปรตีนผงประมาณร้อยละ 27 ทั้งนี้ปริมาณผลผลิตที่น้อยอาจเกิดจากการสูญเสียโปรตีนไปบางส่วนในขั้นตอนการผลิต เช่น การสูญเสียโปรตีนที่ละลายได้ในกรด (Acid-soluble protein) ที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 เพื่อตกตะกอนโปรตีน นอกจากนี้การได้ปริมาณผลผลิตของโปรตีนน้อยอาจเนื่องจากประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน จากงานวิจัยของ Chew *et al.* (2003) พบว่าการสกัดโปรตีนจากถั่ว Australian sweet lupin ด้วยสภาวะด่าง (pH 8-9) แม้จะสามารถทำละลายโปรตีนได้ถึงร้อยละ 87 แต่สามารถสกัดแยกโปรตีนด้วยวิธีตกตะกอน ณ จุดไอโซอิเล็กตริก (pH) ได้เพียงร้อยละ 59 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย

ผลการศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของ BPCH-A และ BPCH-F (ตารางที่ 7) พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มลดลง โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 64.47, 65.78 และ 62.72 สำหรับ BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 55.89, 57.91 และ 45.57 สำหรับ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ให้มีระดับระดับการย่อยสลายที่สูงขึ้นอาจมีผลต่อการลดปริมาณโปรตีนไนโตรเจนได้เล็กน้อย จากการศึกษาของ Sèvestre และ Wen-shui (2006) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนเคซีนด้วยเอนไซม์โปรตาแม็ก (Protamax) มีปริมาณโปรตีนไนโตรเจนลดลงจากร้อยละ 85.89 เป็นร้อยละ 76.67 เมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 20 ซึ่งผู้วิจัยวิจารณ์ผลการทดลองว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non protein nitrogen) จากผลการทดลองครั้งนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนของ BPCH-F จะเห็นว่า BPCH-F ทั้ง 3 ระดับการย่อยสลาย มีปริมาณโปรตีนไนโตรเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 15 เนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้ทำการผลิต BPCH-F โดยการเติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปเม็ด (Granule in form) และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนไนโตรเจนของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปเม็ด พบว่ามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 5.95 ซึ่งอีกร้อยละ 94.05 ขององค์ประกอบอาจเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นสารช่วยในการยึดเกาะ (Binder agent) เมื่อเติมเอนไซม์ในรูปเม็ดลงในระบบเพื่อย่อยสลายโปรตีนและทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผง จึงทำให้สัดส่วนของคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน) เพิ่มขึ้น ทำให้ BPCH-F มีปริมาณโปรตีนต่ำลงเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น (เติมเอนไซม์มากขึ้น) โดยในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปแบบเม็ดเป็นปริมาณร้อยละ 0.68, 4.03 และ 23.81 (โดยน้ำหนักเอนไซม์

ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย) สำหรับการย่อยที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ จึงทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงเป็นสัดส่วนกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นดังกล่าว นอกจากนี้พบว่าปริมาณไขมันของ BPCH-A และ BPCH-F มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.76-3.77 และร้อยละ 1.03-3.62 ตามลำดับ โดยจากผลการทดลองพบว่าปริมาณไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความแปรปรวนตามระดับการย่อยสลายของโปรตีน โดยที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 และ 10 สำหรับ BPCH-A และ BPCH-F ตามลำดับ มีปริมาณสูงสุดแต่จากรายงานวิจัยของ Jamdar *et al.* (2010) ที่ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 10-40 พบว่าปริมาณไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตมักมีค่าลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการสูญเสียไปในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งจะเห็นว่า BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 30 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 และ 15 มีปริมาณไขมันต่ำกว่าของ BPC เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของ BPC BPCH-A และ BPCH-F พบว่าปริมาณเยื่อใยของโปรตีนทั้งสามชนิดมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ในส่วนของปริมาณเถ้าพบว่า BPCH-A และ BPCH-F มีปริมาณเถ้ามากกว่า BPC ประมาณ 2 เท่า โดยพบปริมาณเถ้าของ BPCH-A อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 4.09 - 4.58 และมีปริมาณเถ้าของ BPCH-F อยู่ในช่วงร้อยละ 4.11 – 4.47 ทั้งนี้เป็นผลของปริมาณเกลือที่เกิดจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายโปรตีนถั่วหรั่งในขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีนก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการในตัวอย่างโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือฟลาโวไซม์ (BPCH-F) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแทนนิน และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณสารต้านโภชนาการสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (BPC) โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) ในโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตอยู่ในช่วงระหว่าง 88.93 - 548.33 mgGAE/g protein สำหรับ BPCH-A (ข้อมูลไม่ได้แสดงในตาราง) และอยู่ในช่วงระหว่าง 328.56 – 598.93 mgGAE/g protein สำหรับ BPCH-F (ข้อมูลไม่ได้แสดงในตาราง) และพบว่า BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน โดยปริมาณแทนนินแสดงเป็นค่าสมมูลของมิลลิกรัมของกรดแทนนิคต่อกรัมโปรตีน พบว่าปริมาณแทนนินของทั้ง BPCH-A BPCH-F มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 6.03-8.42 mgTAE/g protein และ12.14 – 15.51 mgTAE/g protein ตามลำดับ สารแทนนินจัดเป็นสารยับยั้งการใช้

ประโยชน์ได้ของโปรตีน (Inhibitor) เนื่องจากแทนนินมีคุณสมบัติที่สามารถจับตัวกับโปรตีนได้อย่างเหนียวแน่น (Reed, 1995) โดยทั่วไป สารแทนนินจะเกาะกับโปรตีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Tannin-protein complex) และไม่ถูกย่อยในสภาพความเป็นกรด-ด่างภายในกระเพาะอาหารหากร่างกายได้รับ แทนนินในปริมาณมากก็จะส่งผลกระทบต่อไต จากรายงานของ Material Safety Data Sheet Tannic acid MSDS (Science Lab.com, online 7/02/56) พบว่าปริมาณของแทนนินที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันเมื่อได้รับทางปาก โดยทำการทดลองในหนูมีปริมาณอยู่ที่ 2,260 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวของหนูหนึ่งกิโลกรัม และจากผลการทดลองพบว่าปริมาณแทนนินที่พบมากที่สุดคือโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีปริมาณแทนนินอยู่ที่ 15.50 มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณที่จะก่อให้เกิดพิษ โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จึงมีความปลอดภัยต่อการบริโภคเป็นโปรตีนอาหาร เนื่องจากมีปริมาณสารต้านโภชนาการต่ำ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 7 องค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)

Proximate composition of bambara groundnut protein concentrate and hydrolysate using enzyme Alcalase (BPCH-A) or Flavozyme (BPCH-F).

| Compositions (% Dry wt.)* | BPC | BPCH-A | | | BPCH-F | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 % DH | 20 % DH | 30 % DH | 5 % DH | 10 % DH | 15 % DH |
| Protein | $66.83 \pm 0.84^{d,z\dagger}$ | $64.47 \pm 0.90^{b}$ | $65.78 \pm 0.45^{c}$ | $62.72 \pm 0.41^{a}$ | $55.89 \pm 0.45^{x}$ | $57.91 \pm 1.40^{y}$ | $45.57 \pm 0.33^{w}$ |
| Fat | $2.28 \pm 0.21^{d,y}$ | $1.56 \pm 0.10^{b}$ | $3.77 \pm 0.20^{c}$ | $0.76 \pm 0.28^{a}$ | $1.03 \pm 0.04^{w}$ | $3.62 \pm 0.20^{x}$ | $1.48 \pm 0.07^{x}$ |
| Ash | $1.66 \pm 0.18^{a,w}$ | $4.58 \pm 0.31^{d}$ | $4.25 \pm 0.04^{c}$ | $4.09 \pm 0.06^{b}$ | $4.33 \pm 0.12^{y}$ | $4.47 \pm 0.22^{z}$ | $4.11 \pm 0.08^{x}$ |
| Total Carbohydrate# | $30.23 \pm 0.48^{c,w}$ | $29.39 \pm 0.81^{b}$ | $26.20 \pm 0.36^{a}$ | $33.43 \pm 0.24^{d}$ | $38.75 \pm 0.82^{y}$ | $34.00 \pm 0.36^{x}$ | $48.84 \pm 0.20^{z}$ |
| Crude fiber | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

#Total carbohydrate was calculated by difference

*Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

†Different superscripts (a-d) in the same row represent the significance differences between BPC and BPCH-A while differences superscripts (w-z) in the same row represent the significance differences of BPC and BPCH-F at $p < 0.05$

Prince of Songkla University Pattani Campus

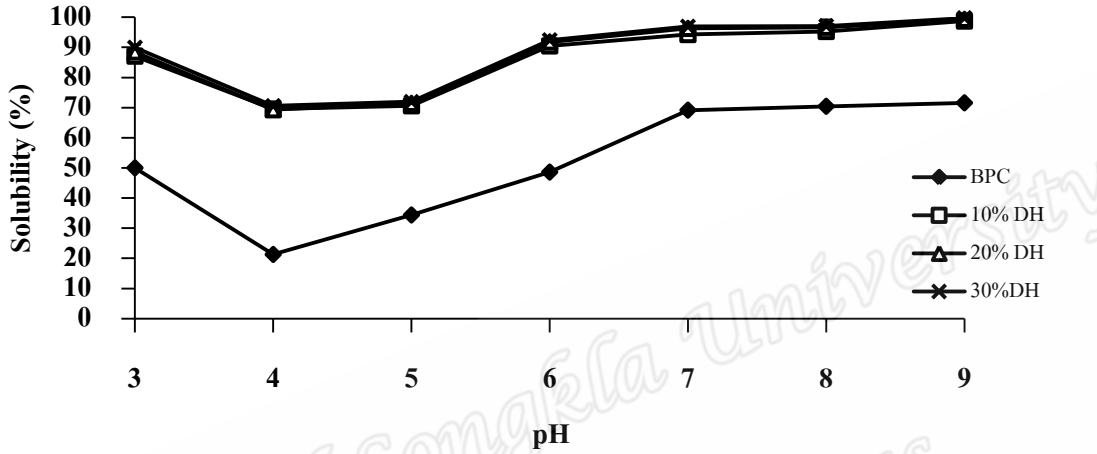
**4.4 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต**

**4.4.1 สมบัติการละลาย**

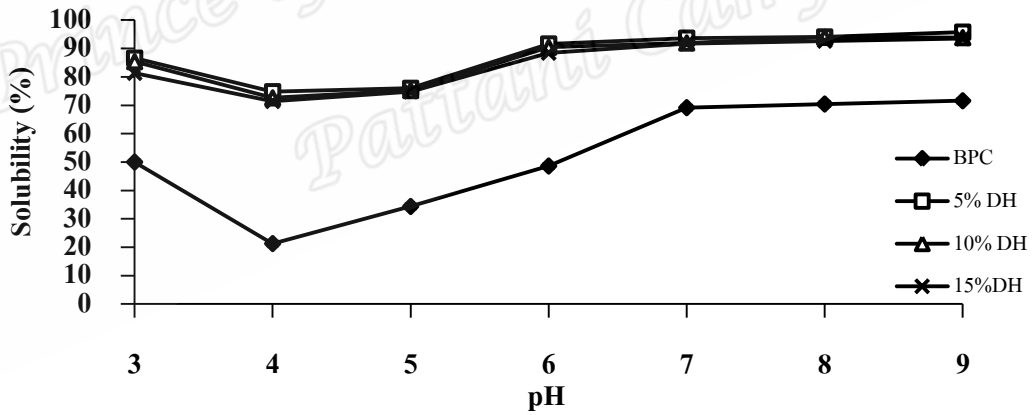
ผลการศึกษาสมบัติด้านการละลายของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่มีระดับการย่อยสลายต่างกัน 3 ระดับ คือระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส หรือร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Control: BPC) พบว่าเมื่อพิจารณา BPC ซึ่งเป็นโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 20-60 ค่าการละลายของ BPC จะผันแปรไปตามค่าพีเอชของสารละลาย โดย BPC มีค่าการละลายต่ำสุดเมื่อพีเอชของสารละลายเท่ากับ 4 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่จุดไอโซอิเล็คตริก (pI) ของโปรตีนจากพืชทั่วไป (pH 4-5) (Tsumura *et al.* 2005) และพบว่าค่าการละลายของ BPC เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายน้อยกว่าหรือมากกว่า 4 (ค่าพีเอชห่างจากจุดไอโซอิเล็คตริก) และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 9 คือ มีค่าการละลายเท่ากับร้อยละ 71.59 การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถปรับปรุงการละลายของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นได้ พิจารณาจากค่าการละลายที่เพิ่มขึ้นของทั้ง BPCH-A และ BPCH-F โดยพบว่าทั้ง BPCH-A และ BPCH-F มีความสามารถในการละลายสูงกว่า BPC อย่างเห็นได้ชัดในทุกระดับค่าพีเอชที่ทดสอบ (pH 3-9) BPCH-A และ BPCH-F มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 87.10 - 99.75 และ 81.31 - 95.75 ตามลำดับ (รูปที่ 4A และ 4B) โดยค่าการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะผันแปรไปตามพีเอชของสารละลายเช่นเดียวกับค่าการละลายของ BPC และพบว่าที่ pH เท่ากับ 4 การย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (BPCH-A และ BPCH-F) ในทุกระดับการย่อสลาย สามารถปรับปรุงการละลายของโปรตีนให้สูงกว่าร้อยละ 70 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jamdar *et al.* (2010) ที่พบว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลาย สูงกว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลาย โดยมีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 86 - 100 เมื่อทำการทดสอบที่พีเอช 1-12 โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นหรือมีขนาดโมเลกุลเล็กลงจะส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีขนาดเล็กสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี ในขณะที่โปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จะมีขนาดใหญ่ มีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำได้ต่ำ (Chobert *et al.,* 1988; Gbogouri *et al.,* 2004; Linder *et al.,* 1996) โมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดการคลายตัวเอากรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic amino acid) ออกมาได้มาก ส่งผลให้พื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนแสดงความมีขั้วได้มากขึ้น โปรตีนจึงมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี (Sikorski, 1981) เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อย

สลายต่อค่าการละลายของโปรตีน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้นทั้ง BPCH-A และ BPCH-F มีค่าการละลายของโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<$ 0.05) (รูปที่ 4A และ 4B) อาจเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมให้มีโครงสร้างของเปปไทด์ที่ได้มีความเป็นขั้วมากขึ้นทำให้เปปไทด์จับกับน้ำได้ดี ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจึงไม่มีผลต่อความแตกต่างของโปรตีนมากนัก

(A)




(B)




**รูปที่ 4** การละลายของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพ A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพ B) ที่พีเอชต่างๆ ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยมาจากการดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ

Protein solubility pattern of BPC and its hydrolysate using Alcalase (A) or Flavourzyme (B) as a function of pH. Each value is the mean and standard deviation of triplication measurement.

Prince of Songkla University Pattani Campus

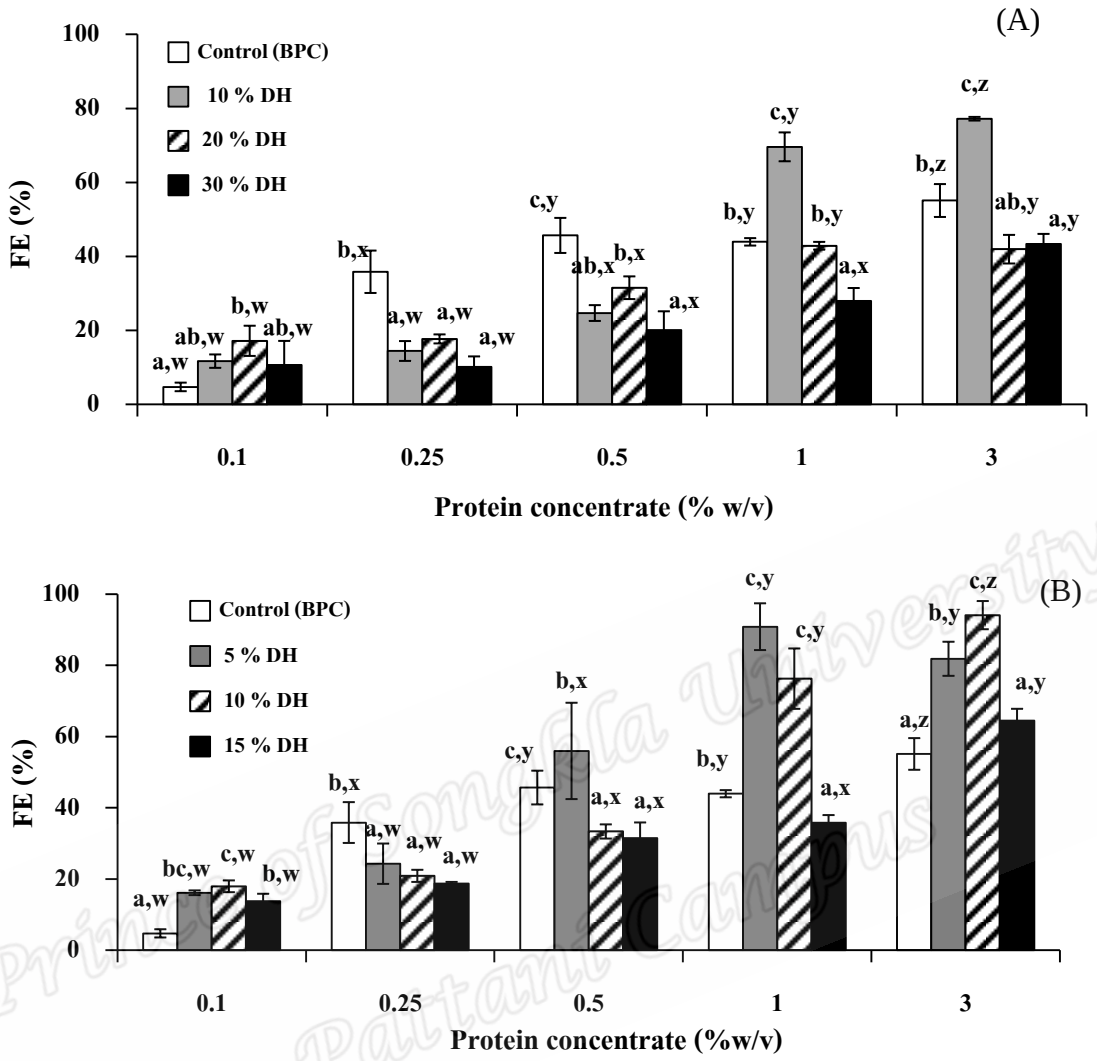
**4.4.2 สมบัติการเกิดฟอง**

4.4.2.1 ความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming expansion)

ผลการศึกษาความสามารถในการเกิดฟอง (FE) ของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ชนิดเอนไซม์ละ 3 ระดับการย่อยสลาย คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 5, 10 และ15 สำหรับ BPCH-F เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Control; BPC) โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3 (w/v) พบว่าทั้งโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าความสามารถในการเกิดฟอง (FE) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น และมีค่า FE สูงสุดเมื่อใช้โปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 3 ($p<$ 0.05) (รูปที่ 5A และ 5B) เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยสลายร่วมกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ของโปรตีนไฮโดรไลเสตเปรียบเทียบกับ BPC ซึ่งเป็นโปรตีนเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 1 และ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) BPCH-A ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 มีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่า BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p<$ 0.05) (รูปที่ 5A) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าการใช้ BPCH-A ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.1 ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 มีค่าความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่า BPC ($p<$ 0.05) ได้เช่นเดียวกัน แต่การใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และ 0.5 จะมีค่าความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p<$ 0.05) (รูปที่ 5A) ในส่วน BPCH-F เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยสลายร่วมกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เปรียบเทียบกับ BPC พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 1 และ 3 BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 และ 10 มีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่า BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p<$ 0.05) แต่ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 0.25 และ 0.5 พบว่า BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน (DH ร้อยละ 5 และ 10) มีค่าความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า BPC ($p<$ 0.05) (รูปที่ 5B)

จากการศึกษาจะเห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายต่ำๆ ได้แก่ ระดับการย่อยสลายร้อยละ10 สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 5 และ10 สำหรับ BPCH-F มีความสามารถในการเกิดฟองที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ BPC ทั้งนี้มีปัจจัยภายใน(Internal factor) หลายอย่าง ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดฟองของโปรตีน เช่น ขนาดของโมเลกุลโปรตีน ลำดับของกรดอะมิโน ความมีขั้วของโปรตีน ปริมาณหมู่ไฮโดรโฟบิคของโปรตีน เป็นต้น (Kinsella, 1976) ซึ่งโปรตีนชนิด BPCH-A ที่ย่อยสลายร้อยละ 10 และ BPCH-F ที่ย่อยสลายร้อยละ 5 และ 10 มีความสามารถในด้านการเกิดฟองที่ดีกว่า BPC อาจเนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่สามารถละลายได้ดี

ในส่วนที่เป็นของเหลวจะสามารถแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศและจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำได้ดี แต่ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนในระดับที่สูงๆเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นโมเลกุลขนาดเล็กส่งผลให้โปรตีนขาดความสามารถในการจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำ (Air–water interface) จึงไม่เกิดเป็นฟิลม์ห่อหุ้มฟองอากาศไว้ (ณรงค์, 2538) โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายสูงๆ จึงมีความความสามารถในการเกิดฟองไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายต่ำๆดังกล่าว สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nalinanon *et al*. (2011) ที่พบว่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาทรายแดงโม่ง หรือ Ornate threadfin bream ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินที่สกัดได้จากเครื่องในปลาโอแถบมีค่าความสามารถในการเกิดฟองลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 10 จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตทั้ง BPCH-A และ BPCH-F ในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าร้อยละ 1 ไม่สามารถปรับปรุงค่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนได้ และมีค่าความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า BPC การเกิดฟองของโปรตีนเกิดจาก 3 กระบวนการ คือ 1) การเคลื่อนที่ (Transportation) 2) การซึมแทรก (Penetration) และ 3) การจัดเรียงตัวใหม่ (Reognization) ของโมเลกุลโปรตีนที่พื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำ โดยโปรตีนที่ดูดซับตรงบริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำในขณะที่มีการตีฟองอากาศได้เร็ว มีการคลายตัว (Unfold) และจัดเรียงตัวกันใหม่บริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำได้ดี จึงแสดงค่าความสามารถในการเกิดฟองที่ดีกว่าโปรตีนที่ถูกดูดซับได้ช้าและโมเลกุลไม่คลายตัวบริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำ (Damodaran, 1997) ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีน และส่งผลต่อกระบวนการเกิดของโปรตีนดังกล่าว

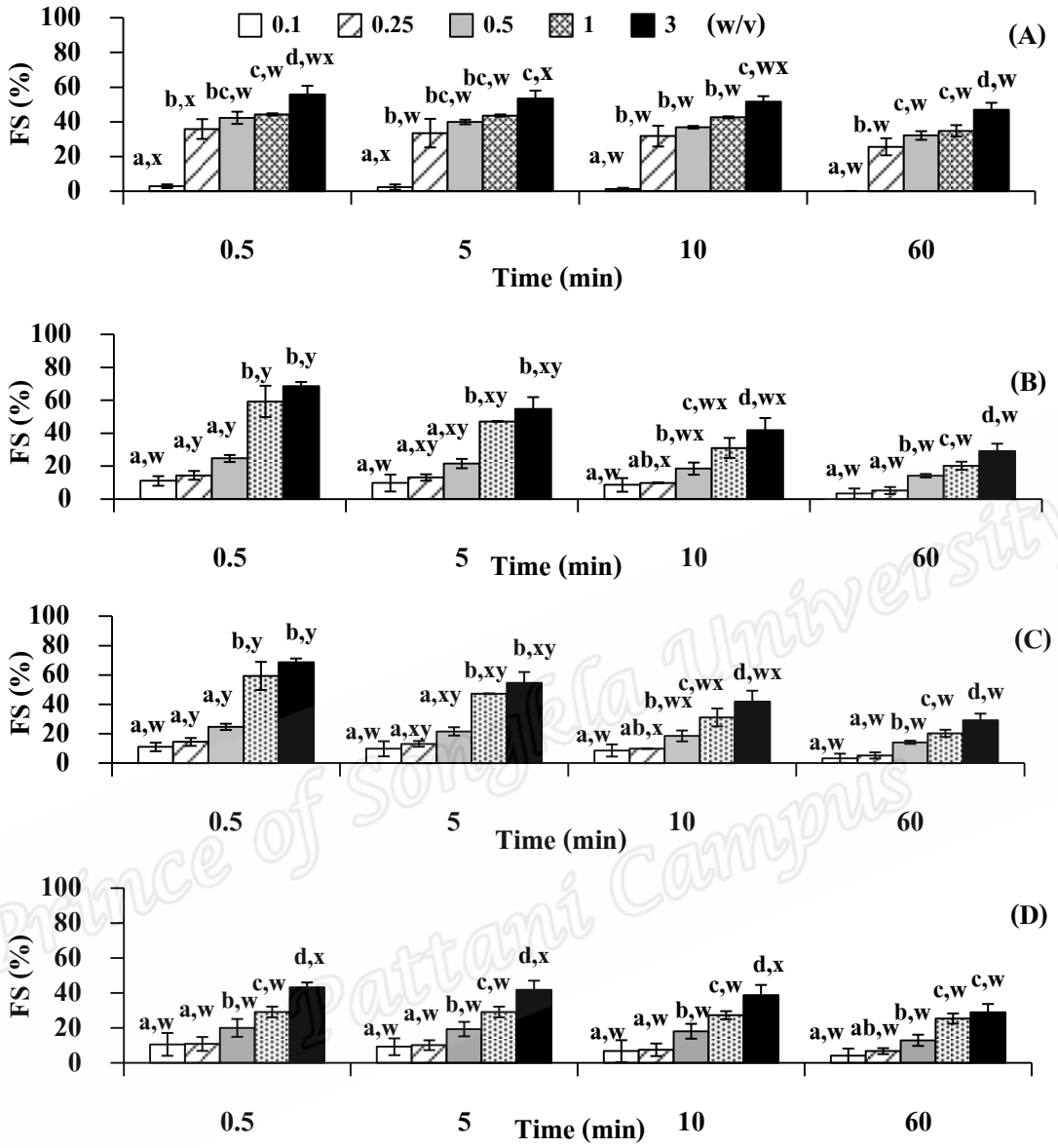



**รูปที่ 5** ค่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพ A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพ B) ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3 Foaming expansion (FE) of BPC and its hydroysate using Alcalase (BPCH-A) (A) or Flavozyme (BPCH-F) (B) as a function of protein concentration. Different characters (a-d) on the top of bars within the figures represent the significance at $p< 0.05$ among sample specific protein concentration, while different (w-z) indicate the significance at $p< 0.05$ among various protein concentrations

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.4.2.2 ความคงตัวของฟอง (Foaming stability)

ผลการศึกษาความคงตัวของฟอง (FS) ของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (รูป 6B-6D) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (รูป 7B - 7D) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (Control; BPC) (รูป 9A หรือ 10A) โดยแปรระดับความเข้มข้นของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3 (w/v) ตรวจวัดค่าความคงตัวของฟองที่ช่วงเวลา 0.5, 5, 10 และ 60 นาที พบว่า BPC มีค่า FS อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.18 ถึงร้อยละ 55.78 เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาที่ทดสอบเดียวกัน พบว่าค่า FS ของ BPC เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้นและมีค่า FS สูงสุดเมื่อใช้โปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 3 เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPC มีค่า FS ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที แสดงถึงความสามารถในการคงตัวที่ดีของฟองโปรตีน (รูปที่ 6A) เมื่อพิจารณาโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (BPCH-A และ BPCH-F) พบว่าค่า FS ของ BPCH-A ที่ทุกระดับการย่อยสลายของโปรตีน (DH ร้อยละ 10, 20 และ 30) ให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกับ BPC คือ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาที่ทดสอบเดียวกัน พบว่าค่า FS ของ BPCH-A จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น และมีค่า FS สูงสุดเมื่อใช้โปรตีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-A มีค่า FS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที แสดงถึงความไม่คงตัวของฟองโปรตีน (รูปที่ 6B, 6C หรือ 6D) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า FS ของ BPCH-A กับ BPC (รูปที่ 6A) พบว่า BPCH-A มีแนวโน้มที่จะให้ค่าความคงตัวของฟองต่ำกว่า BPC ในทุกระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ทดสอบ และพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่สูงขึ้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 30 จะมีแนวโน้มที่จะให้ค่าความคงตัวของฟองลดลง (เปรียบเทียบระหว่างรูปที่ 6B, 6C และ 6D)



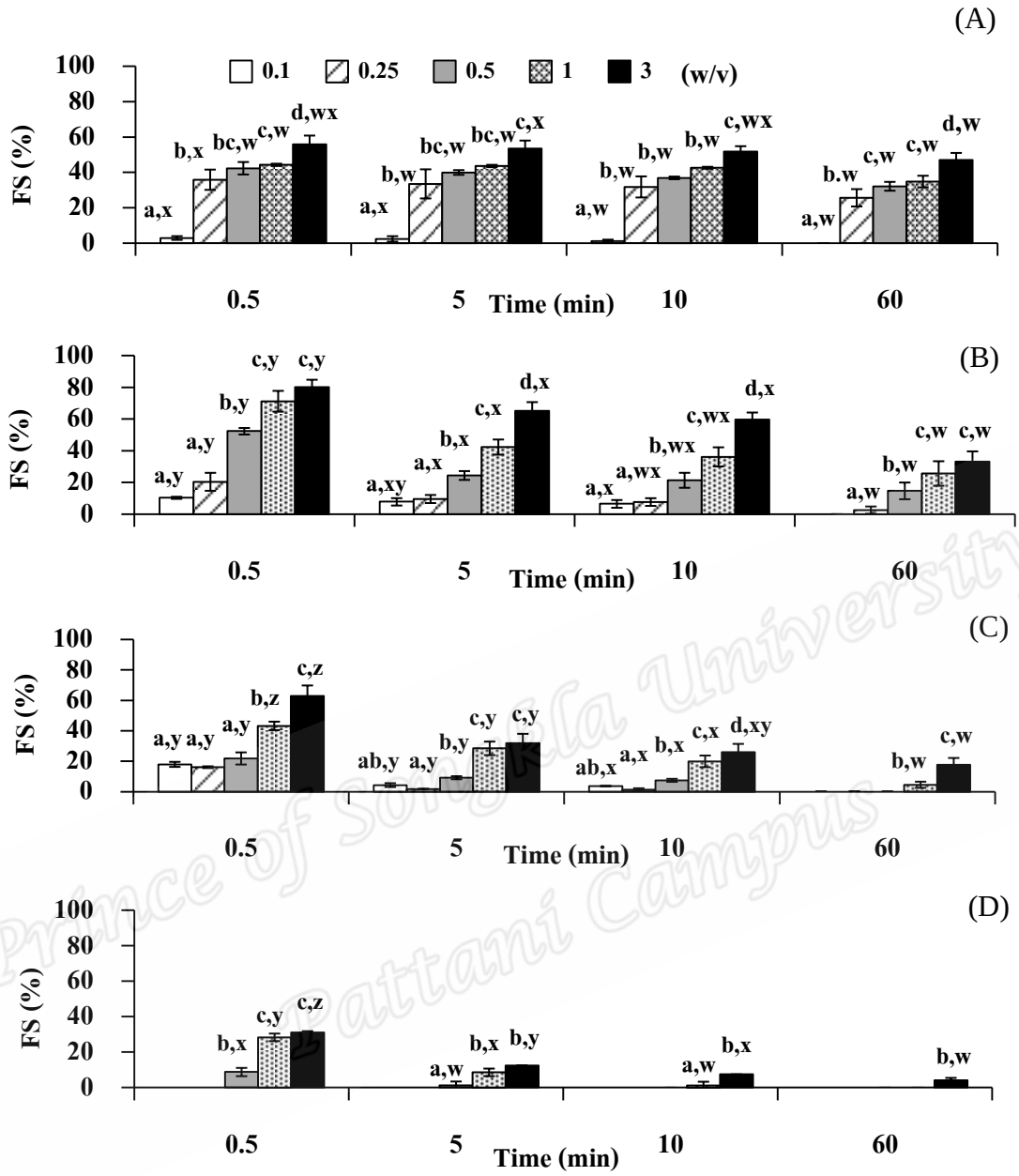

**ภาพที่ 6** ค่าความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ A คือ BPC; B C และ D คือ BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ

Foaming stability (FS) of BPC and its hydroysate using Alcalase (BPCH-A) as a function of concentration used, A: control (BPC); B: 10%; C: 20% and D: 30%. Different characters (a-d) on the top of bars within the figures represent the significance at $p< 0.05$ among sample specific time, while different (w-z) indicate the significance at $p< 0.05$ among various times.

Prince of Songkla University Pattani Campus

เมื่อพิจารณาค่า FS ของ BPCH-F พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับ BPC และ BPCH-A คือเมื่อพิจารณาที่ช่วงระยะเวลาที่ทดสอบเดียวกัน พบว่า BPCH-F มีค่า FS สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-F จะมีค่า FS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยสลายของโปรตีน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นค่า FS ของ BPCH-F จะมีค่าลดลง โดยพบว่าที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 15 มีค่า FS ต่ำ

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีความสามารถในการคงตัวของฟองต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กทำให้โปรตีนสูญเสียประสิทธิภาพในการห่อหุ้มฟองอากาศเอาไว้ จึงทำให้ฟองอากาศมีลักษณะเปราะและแตกได้ง่าย (Mitchell, 1986) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนต่างๆ (BPCH-A ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 หรือ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10 และ 15) สามารถปรับปรุงความคงตัวของฟองโปรตีนได้ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ให้สูงขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในระบบจะทำให้ฟองอากาศที่ได้มีความแข็งแรง เนื่องจากฟิลม์โปรตีนที่ห้อหุ้มฟองอากาศมีความหนามากขึ้น และการเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบยังเป็นการเพิ่มความหนืด (Viscosity) ของวัฏภาคน้ำ (Aqueous phase) ซึ่งจะทำให้ฟองที่เกิดขึ้นมีความคงตัวที่ดี (Phillips *et al*., 1994)




**ภาพที่ 7** ค่าความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ A คือ BPC; B C และ D คือ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ

Foaming stabilities (FS) of BPC and its hydroysate using Flavourzyme (BPCH-F) as a function of concentration used, A: BPC; B: 5%; C: 10% and D: 15%. Different characters (a-d) on the top of bars within the figures represent the significance at $p<$ 0.05 among sample specific time, while different (w-z) indicate the significance at $p<$ 0.05 among various times.

Prince of Songkla University Pattani Campus

**4.4.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน**

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ตารางที่ 8) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ตารางที่ 9) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (BPC) โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0 และ 3.0 (w/v) ค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนแสดงด้วยค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying ability index; EAI) และค่าความเสถียรของอิมัลชันแสดงด้วยค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability index ; ESI) พบว่า BPC ซึ่งเป็นโปรตีนถั่วหรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยสลายมีค่า EAI อยู่ในช่วง 17.23-31.94 $m^2/g$ และจะมีค่า EAI ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้สูงขึ้น การใช้ BPC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ค่า EAI สูงสุด ($p< 0.05$) และการใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 มีค่า EAI ต่ำกว่าการใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) เมื่อพิจารณาค่า ESI ของ BPC พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 19.70-40.92 นาที และการใช้ BPC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 มีค่า ESI สูงสุด รองลงมาคือการใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1 ตามลำดับ ($p< 0.05$)

เมื่อพิจารณาสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BPCH-A (ตารางที่ 8) พบว่าค่า EAI ของ BPCH-A อยู่ในช่วง 3.34-57.85 $m^2/g$ เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน พบว่าการใช้ BPCH-A ความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลให้ค่า EAI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) และการใช้ BPCH-A ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.1 มีค่า EAI สูงกว่าค่า EAI ของ BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น BPCH-A จะมีค่า EAI ลดลง และมีค่าต่ำสุดที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 30 ($p< 0.05$) ในด้านของค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) พบว่า BPCH-A มีค่า ESI อยู่ในช่วงระหว่าง 19.70-87.14 นาที เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน พบว่า ESI มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ BPCH-A ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับร้อยละ 1, 0.1 และ 0.5 สำหรับ BPCH-A ที่มีระดับการย่อยสลายเท่ากับ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ ($p< 0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า ESI ของ BPCH-A มีความแปรปรวน ไม่สัมพันธ์กับระดับการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความคงตัวของอิมัลชันนั้นขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ร่วมของทั้ง ขนาด รูปร่าง และความเป็นขั้วของโมเลกุลโปรตีน (Zayas, 1997 ) โดยทั่วไปการเกิดอิมัลชันจะเป็นผลมาจากการดูดซับของโมเลกุลโปรตีนหรือเปปไทด์ไว้บนพื้นผิวของหยดน้ำมัน กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic amino acid) จะทำให้โปรตีนสามารถเกาะตัวอยู่บนผิวของน้ำมันโดยการแทรกตัวเข้าไปอยู่บนผิวของตัวน้ำมัน และหันส่วนที่มีขั้วออกมาสัมผัสน้ำ (Pomeranz, 1991)

**ตารางที่ 8** ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ

Emulsion ability index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of BPC and BPCH-A at various concentration used

| Concentration (%) | Emulsifying activity index [*] ($m^2/g$) | Emulsion stability index [†] (min) |
|---|---|---|
| BPC | | |
| 0.1 | $31.94 \pm 0.83^{ab,y}$ | $40.92 \pm 2.24^{d,y}$ |
| 0.5 | $17.27 \pm 1.07^{c,x}$ | $21.58 \pm 0.65^{a,x}$ |
| 1.0 | $11.21 \pm 0.48^{c,w}$ | $19.70 \pm 2.01^{a,w}$ |
| 3.0 | $17.23 \pm 1.95^{d,x}$ | $44.24 \pm 2.59^{d,z}$ |
| 10% DH BPCH-A | | |
| 0.1 | $34.64 \pm 3.32^{b,z}$ | $37.55 \pm 3.55^{bc,x}$ |
| 0.5 | $16.36 \pm 1.68^{b,y}$ | $23.98 \pm 2.13^{ab,w}$ |
| 1.0 | $10.09 \pm 0.70^{b,x}$ | $46.14 \pm 1.22^{d,y}$ |
| 3.0 | $6.25 \pm 0.78^{c,w}$ | $19.97 \pm 3.01^{a,w}$ |
| 20% DH BPCH-A | | |
| 0.1 | $57.85 \pm 1.82^{d,z}$ | $38.70 \pm 1.32^{c,y}$ |
| 0.5 | $17.56 \pm 1.41^{c,y}$ | $25.63 \pm 0.18^{c,w}$ |
| 1.0 | $10.58 \pm 0.50^{bc,x}$ | $33.21 \pm 0.24^{b,wx}$ |
| 3.0 | $5.61 \pm 0.01^{b,w}$ | $37.86 \pm 1.53^{c,x}$ |
| 30% DH BPCH-A | | |
| 0.1 | $47.35 \pm 1.82^{c,z}$ | $26.57 \pm 1.72^{a,w}$ |
| 0.5 | $10.07 \pm 0.37^{a,y}$ | $87.14 \pm 4.53^{d,z}$ |
| 1.0 | $6.18 \pm 0.42^{a,x}$ | $38.28 \pm 2.11^{c,y}$ |
| 3.0 | $3.43 \pm 0.10^{a,w}$ | $22.91 \pm 0.44^{b,x}$ |

**Means ± SD from triplication determinations.

[†] Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$) among sample specific concentration, while different (w-y) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$) among various protein concentrations.

Prince of Songkla University Pattani Campus

สมบัติการเป็นอิมัลไฟเออร์ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) แสดงในตารางที่ 8 พบว่าค่า EAI ของ BPCH-F มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1.08-30.86 $m^2/g$ เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยของสลายโปรตีนที่เท่ากัน พบว่า BPCH-F มีค่า EAI สูงสุดเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และจะมีค่า EAI ลดลงเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้น ($p< 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-F มีค่า EAI ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น ($p< 0.05$) ยกเว้นเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับร้อยละ 0.1 ที่พบว่า BPCH-F มีค่า EAI สูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น ในด้านค่า ESI เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากัน พบว่า ESI ของ BPCH-F มีค่าลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยพบว่า BPCH-F มีค่า ESI สูงสุดเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.1 ($p< 0.05$) และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 มีค่า ESI สูงสุด ($p< 0.05$) โดยค่า ESI ของ BPCH-F มีความแปรปรวนไม่สัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย และความเข้มข้นของโปรตีนเช่นเดียวกับ BPCH-A ดังนั้นการเลือกนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตไปใช้จึงไม่ควรพิจารณาเฉพาะค่า ESI เพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและดัชนีความคงตัวของอิมัลชันแตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อยสลายของโปรตีนและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ ทั้งนี้การย่อยสลายของโปรตีนด้วยเอนไซม์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของทั้งขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของโปรตีน เกลียวโปรตีนที่คลายตัวออกเนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์จะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุและไม่มีประจุของโปรตีนที่ซ่อนอยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนเกิดขึ้นที่ผิวของโปรตีนมากขึ้น ซึ่งมีอิทธิพลต่อความสามารถในการจับน้ำและน้ำมันของโปรตีนไฮโดรไลเสต ดังนั้นการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันที่ระดับการย่อยสลายต่างกัน จึงอาจทำให้ได้เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์แตกต่างกันด้วย ในกรณีที่โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันไม่ดีอาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ทำให้โปรตีนมีความเป็น Amphiphilic ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอิมัลชันที่ดี (Chobert *et al*., 1988) นอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง (ทั้ง BPCH-A และ BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้นจะส่งผลให้ค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำให้ระบบมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น อาจส่งผลให้โปรตีนหรือเปปไทด์เกิดการจับเรียงตัว (Aggeration) กันเองของโมเลกุลโปรตีนมากขึ้น ทำให้โปรตีนไม่สามารถแทรกตัวหรือถูกดูดซับบนพื้นผิวของหยดน้ำมันได้ ความสามารถในการห่อหุ้มเม็ดไขมันของโปรตีนบริเวณ

ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงลดลง (Kristinsson and Rasco, 2000) ส่งผลให้การเกิดอิมัลชันเกิดได้ไม่ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Thiansilakul *et al*. (2007) ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนปลาทูแขกข้างเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์เพิ่มสูงกว่าร้อยละ 0.5 อิมัลชันจะมีค่า EAI และ ESI ลดลง ส่วนในกรณีที่โปรตีนมีระดับความเข้มข้นน้อยสามารถที่จะทำให้เกิดอิมัลชันของโปรตีนได้ดี Lawal *et al*. (2007) อธิบายว่าเนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่ความเข้มข้นน้อยๆนั้น สามารถเคลื่อนตัวและถูกดูดซับบริเวณผิวหน้าของน้ำมันได้ดีกว่าโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนตัวและการถูกดูดซับของโปรตีน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนด้วยเช่นกัน

Prince of Songkla University Pattani Campus

**ตารางที่ 9** ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ

Emulsion ability index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of BPC and BPCH-F at various concentration used.

| Concentration (%) | Emulsifying activity index ($m^2/g$) | Emulsion stability index(min) |
|---|---|---|
| Control | | |
| 0.1 | $31.94 \pm 0.83^{d,y*}$ † | $40.92 \pm 2.24^{a,x}$ |
| 0.5 | $17.27 \pm 1.07^{d,x}$ | $21.58 \pm 0.65^{a,w}$ |
| 1.0 | $11.21 \pm 0.48^{d,w}$ | $19.70 \pm 2.01^{a,w}$ |
| 3.0 | $17.23 \pm 1.95^{d,x}$ | $44.24 \pm 2.59^{d,x}$ |
| 5% DH BPCH-F | | |
| 0.1 | $20.51 \pm 0.53^{ab,z}$ | $59.47 \pm 0.00^{c,y}$ |
| 0.5 | $7.31 \pm 0.26^{c,y}$ | $35.14 \pm 1.17^{b,x}$ |
| 1.0 | $5.61 \pm 0.08^{c,x}$ | $32.30 \pm 0.43^{c,x}$ |
| 3.0 | $4.21 \pm 0.04^{c,w}$ | $17.26 \pm 2.53^{b,w}$ |
| 10% DH BPCH-F | | |
| 0.1 | $24.81 \pm 1.57^{b,y}$ | $45.76 \pm 1.76^{b,yz}$ |
| 0.5 | $5.98 \pm 0.26^{b,x}$ | $44.24 \pm 2.39^{c,y}$ |
| 1.0 | $3.94 \pm 0.93^{b,w}$ | $29.84 \pm 1.37^{b,x}$ |
| 3.0 | $3.72 \pm 0.15^{b,w}$ | $16.57 \pm 0.17^{a,w}$ |
| 15% DH BPCH-F | | |
| 0.1 | $30.86 \pm 0.13^{c,y}$ | $85.96 \pm 3.48^{d,z}$ |
| 0.5 | $3.46 \pm 0.26^{a,x}$ | $70.00 \pm 0.00^{d,x}$ |
| 1.0 | $1.73 \pm 0.11^{a,w}$ | $46.45 \pm 2.05^{d,y}$ |
| 3.0 | $1.08 \pm 0.12^{a,w}$ | $27.63 \pm 1.51^{c,w}$ |

* Means ± SD from triplication determinations.

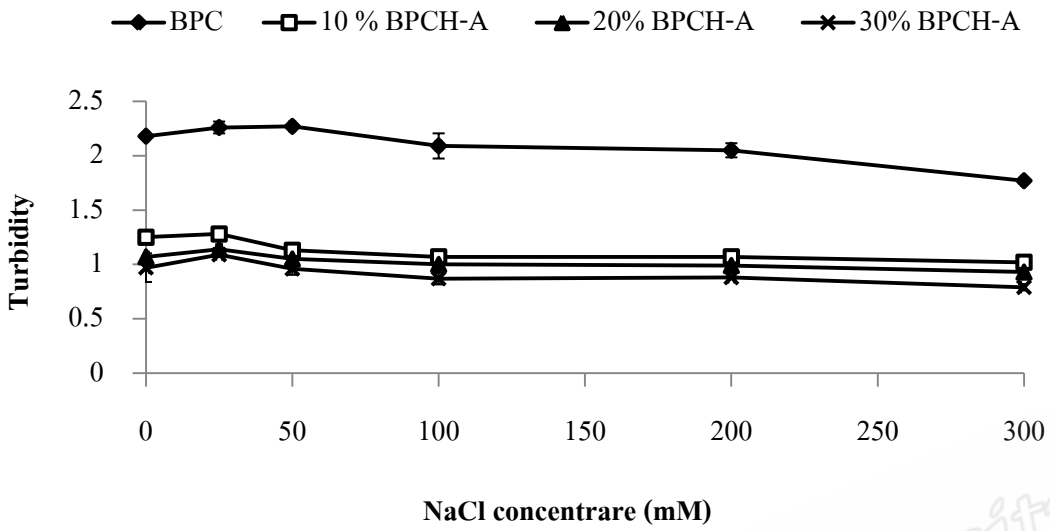
† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p< 0.05$) among sample specific concentration, while different (w-y) in the same column indicate the significance ($p< 0.05$) among various protein concentrations.

Prince of Songkla University Pattani Campus

**4.4.4 สมบัติการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อน**

จากการทดสอบการจับเรียงตัวภายใต้ความร้อน (Thermal aggregation) ของโปรตีน โดยตรวจสอบค่าความขุ่น (O.D. 400 nm) ของสารละลายโปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (รูปที่ 8) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (รูปที่ 9) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (BPC) โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน (0-300 มิลลิโมลาร์) พบว่าสารละลาย BPC มีค่าความขุ่นอยู่ช่วงระหว่าง 1.77-2.18 และมีค่าความขุ่นลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณา BPCH-A เปรียบเทียบกับ BPC พบว่าภายหลังการให้ความร้อนสารละลาย BPCH-A มีค่าความขุ่นน้อยกว่า BPC อย่างเห็นได้ชัด ในทุกระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ทดสอบ (รูปที่ 8) แสดงถึงความคงตัวต่อความร้อนที่ดีของ BPCH-A เนื่องจากโปรตีนในสารละลายจับเรียงตัวเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ได้น้อยเมื่อผ่านการให้ความร้อน และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากัน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นสารละลายโปรตีนจะมีค่าความขุ่นลดลง

Prince of Songkla University Pattani Campus

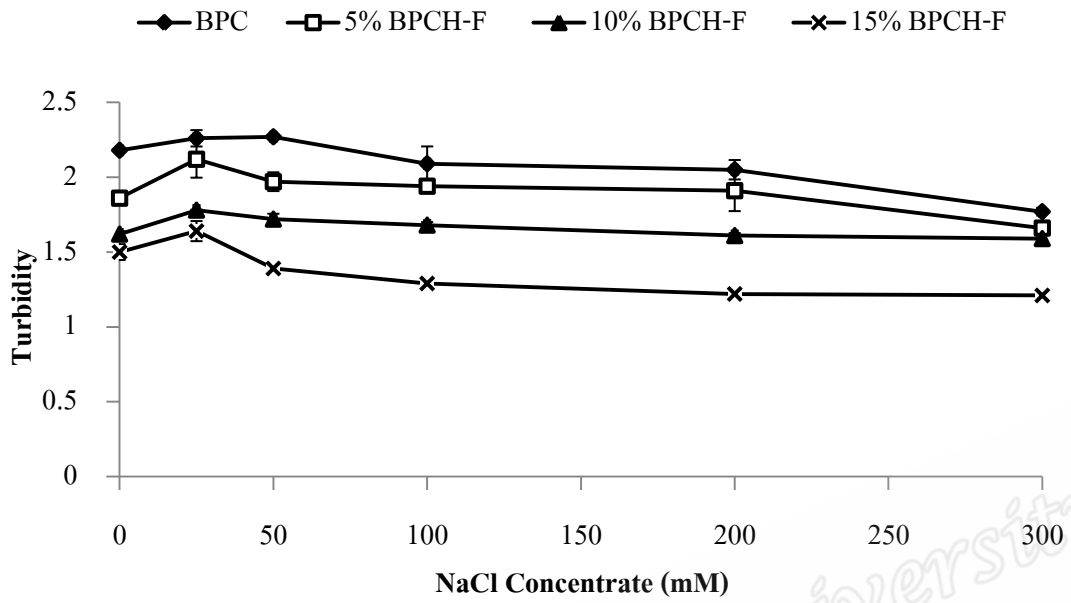



**รูปที่ 8** ค่าความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Turbidity of BPC and BPCH - A solution (1 mg protein/ml) containing NaCl at different levels during heating 80 ºC for 30 min. Bars represent standard deviations (n = 3).

ในส่วนของ BPCH-F พบว่าสารละลาย BPCH-F ทั้ง 3 ระดับการย่อยสลาย มีค่าความขุ่นภายหลังการให้ความร้อนต่ำกว่า BPC อย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เท่ากัน และพบว่าค่าความขุ่นของสารละลายลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 9) เมื่อพิจารณาผลของระดับโซเดียมคลอไรด์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ส่งผลต่อการเพิ่มค่าความขุ่นของทั้ง BPCH-A และ BPCH-F เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ อาจเนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นสภาวะที่จะส่งเสริมให้โปรตีนเกิดการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนได้มาก เนื่องจากเกิดการปรับปรุงประจุของโมเลกุลโปรตีนด้วยอิออนของเกลือ ทำให้โปรตีนคลายตัวบางส่วน ส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน แต่ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นปริมาณอิออนที่มากจะไปปรับปรุงประจุในโมเลกุลโปรตีนได้มาก โปรตีนมีแรงผลัก (Repulsive force) ระหว่างโมเลกุลมากจึงจับเรียงตัวกันได้น้อยเมื่อนำไปให้ความร้อน

Prince of Songkla University Pattani Campus




**รูปที่ 9** ค่าความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Turbidity of BPC and BPCH–F (1 mg protein/ml) containing NaCl at different levels during heating 80 ºC for 30 min. Bars represent standard deviations (n = 3)

การวิเคราะห์ค่าความขุ่นของโปรตีนภายหลังการให้ความร้อนเป็นการตรวจสอบปริมาณการสูญเสียสภาพ (Denaturation) และการจับเรียงตัว (Aggregation) กันของโมเลกุลโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนโดยการที่สารละลายโปรตีนมีค่าความขุ่นสูงขึ้นภายหลังการให้ความร้อน เกิดจากการจับเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการกระเจิงแสง (Light scattering) ในช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจวัด (400 nm) สารละลายโปรตีนที่มีค่าความขุ่นมากแสดงถึงความไม่คงตัวต่อความร้อน (Thermal stability) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร ซึ่งนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะขุ่นแล้ว ยังอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะด้านอื่นๆ เช่น ความหนืดของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์เกิดการตกตะกอน หรืออาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นเจล (Gel) ซึ่งเหล่านี้อาจเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ของผลิตภัณฑ์ได้ จากผลการทดลองจะเห็นว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 สองชนิด สามารถปรับปรุงสมบัติการคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนจากถั่วหรั่งได้ดี ซึ่ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ryan *et al*. (2008) ที่พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในช่วงพีเอชที่ทำการทดสอบเท่ากับ 7.1 และ 7.5 กล่าวคือสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีค่าความขุ่นต่ำกว่าโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการให้ความร้อนร่วมกับปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นการจำลองระบบอาหารที่มีการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นเครื่องปรุงรส ซึ่งเกลือจะมีคุณสมบัติโดยตรงต่อการเพิ่มหรือลดความคงตัวของโปรตีนในระหว่างการให้ความร้อน เนื่องจากเกลือมีความสามารถในการปรับเปลี่ยนประจุสุทธิของโปรตีนได้ (Damodaran, 1997) โดยจากผลการทดลองจะเห็นว่าการมีเกลือในระบบอาหารมีผลต่อการลดค่าความขุ่นของสารละลายโปรตีนได้ การที่โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อความร้อนที่ดี ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนถั่วหรั่งไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่ใช้ความร้อน เช่น อาหารที่ต้องผ่านการให้ความร้อนหรือฆ่าเชื้อ เป็นต้น

**4.5 ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต (BPCH)**

ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยตรวจสอบกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH และกิจกรรมการจับโลหะไอออนของ BPCH-A (ตารางที่ 10) และ BPCH-F (ตารางที่ 11) เปรียบเทียบกับ BPC พบว่า BPC ซึ่งเป็นโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH และกิจกรรมในการจับโลหะไอออนเท่ากับร้อยละ 33.2, 21.45 และ 35.72 ตามลำดับ

เมื่อย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายจะมีกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย โดยพบว่า BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 20 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงสุด คือร้อยละ 64.16 และ 64.97 ตามลำดับ ($p< 0.05$) (ตารางที่ 4) (ตารางที่ 10) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Nalinanon *et al*. (2011) ที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปบซินที่ได้จากปลากทูน่าพันธ์โอแถบ พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 โปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีรายงานของ สุภาวดี (2550) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย

และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น จากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.5 และพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นการทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง โปรตีนจึงแสดงลักษณะของความเป็นขั้วมากขึ้น ทั้งนี้ BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 20 มีความสามารถที่จะจับกับอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ ได้ดี อาจเนื่องมากจาก BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายดังกล่าวมีกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นประจุลบ (Nagatively chareged R group) อยู่บนโครงสร้างของโปรตีนมากจึงสามารถที่จะจับกับอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ ได้ดีบ่งชี้ถึงความสามารถที่จะทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่จะเกิดขึ้นได้ (Re *et al.*, 1999)

เมื่อพิจารณาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ BPCH-A พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น ($p<$ 0.05) โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 29.29 เมื่อโปรตีนมีระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 30 (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่า BPCH-A มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (Electron donor) กับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความสเถียร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jamdar *et al*. (2010) ที่ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสต ต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (จากร้อยละ10 เป็น 20 30 และ 40) ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating) พบว่าเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นค่าจับกับโลหะไอออน ($Fe^{2+}$) ของ BPCH-A ก็เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 10) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Jamdar *et al*. (2010) ที่พบว่าโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการจับโลหะไอออนสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายโปรตีนถั่วลิสงเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 20, 30 และ 40 ตามลำดับ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเปปไทด์ในโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตสามารถทำหน้าที่เป็นสารคีเลตหรือสารอินทรีย์ที่สามารถจับอนุมูลอิสระหรือทำหน้าที่เป็น Prooxidants นำไปสู่การลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งการจับกับธาตุที่มีประจุบวก เช่น เหล็ก สังกะสี หรือทองแดง ในระบบของอาหารจะช่วยลดอัตราการเกิด Autoxidation และชะลอการเกิดสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่จะส่งผลต่อ กลิ่น รส ในอาหาร (Gordon, 2001)

**ตารางที่ 10** กิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ

Antioxidant activities of BPC and BPCH-A with different DHs as determined by various assays.

| Hydrolysates | Activities tested | | |
|---|---|---|---|
| | ABTS (%) | DPPH (%) | Metal ion chelating (%) |
| BPC | $33.2 \pm 0.62^{a*\dagger}$ | $21.45 \pm 0.76^{a}$ | $35.73 \pm 0.02^{a}$ |
| 10% DH BPCH-A | $64.16 \pm 0.85^{c}$ | $28.16 \pm 0.55^{b}$ | $54.54 \pm 0.02^{b}$ |
| 20% DH BPCH-A | $64.97 \pm 0.47^{cd}$ | $29.03 \pm 0.43^{c}$ | $66.95 \pm 0.01^{c}$ |
| 30% DH BPCH-A | $60.30 \pm 0.71^{b}$ | $29.29 \pm 0.25^{d}$ | $74.41 \pm 0.01^{d}$ |

*Means ± SD from triplication determinations.

† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$)

ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH- F) พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 โปรตีนมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือร้อยละ 48.58 และเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงขึ้นโปรตีนจะมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลง ดังแสดงในตารางที่ 11 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prommool *et al.* (2010) ที่พบว่ากิจกรรมการต้าน ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น (ระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น)

เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า BPCH-F มีความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 คือมีค่าเท่ากับร้อยละ 27.23 อย่างไรก็ตามพบว่า BPCH-F ในทุกระดับการย่อยสลายมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า BPC ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (ตารางที่ 11) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chun-He *et al.* (2009) ที่ศึกษาความสามารถในการจับอนมูลอิสระ DPPH ในเมล็ดข้าวบัค-ฮวีท (Buckwheat) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5-25 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.00 - 1.0 mg/ml พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดและมีค่า $IC_{50}$ (50% Inhibitory Concentration) เท่ากับ 0.56 mg/ml นอกจากนี้ Klompong *et al.* (2007) ศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากกล้ามเนื้อปลา

Prince of Songkla University Pattani Campus

สีกุนข้างเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากกล้ามเนื้อปลาสีกุนข้างเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายในช่วงร้อยละ 5 ถึง ร้อยละ 25 การย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระที่ค่อนข้างหลากหลายขึ้นกับความจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงขนาดและองค์ประกอบของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กจะมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ (Wu *et al*., 2003) เมื่อพิจารณาความสามารถในการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating ) ของ BPCH-F พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นความสามารถในการจับโลหะไอออนก็เพิ่มขึ้นด้วย

จากผลการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต ทั้งในรูปแบบ ABTS, DPPH และ Metal ion chelating พบว่าโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายโดยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ มีเปปไทด์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระทำให้เกิดโมเลกุลที่มีความเสถียร จึงมีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ (Stohs and Bagchi, 1995) นอกจากนี้เปปไทด์จากโปรตีนถั่วหรั่งที่ผลิตได้ยังสามารถจับโลหะไอออนได้ดี โลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้มากมาย โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส ($Fe^{2+}$) จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นอนุมูล Superoxide anion radical **($O_2^-$ )** ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ต่อไป (Dinis *et al.,* 1994) ดังนั้นการที่โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดี จึงมีผลต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงๆ ได้แก่ BPCH-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 30 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 15

**ตารางที่ 11** กิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ

Antioxidant activities of BPC and BPCH-F with different DHs, as determined by various assays.

| Hydrolysates | Activities tested | | |
|---|---|---|---|
| | ABTS radical scavenging (%) | DPPH radical scavenging (%) | Metal ion chelating (%) |
| BPC | 33.20 ± 0.62[a*†] | 21.45 ± 0.76[a] | 35.73 ± 0.03[a] |
| 5% DH BPCH-F | 48.58 ± 0.54[d] | 27.23 ± 0.99[d] | 40.38 ± 0.01[b] |
| 10% DH BPCH-F | 46.54 ± 0.20[c] | 25.70 ± 0.24[c] | 46.93 ± 0.02[c] |
| 15% DH BPCH-F | 39.97 ± 0.12[b] | 23.23 ± 0.89[b] | 51.36 ± 0.02[d] |

*Means ± SD from triplication determinations.

† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$)

**4.6 ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งเป็นสารเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ชาเขียว**

**4.6.1 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ**

จากการคัดเลือกโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยร้อยละ 20 สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 5 สำหรับ BPCH-F ซึ่งเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจากการผลศึกษาในหัวข้อที่ 4.4.1 และ 4.5 คือมีคุณสมบัติเด่นในด้านการละลาย และการเป็นสารต้านออกซิเดชัน เติมในผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มรสต้นตำรับ ผลิตโดยบริษัทยูนิ-เพรสซิเดนท์ ประเทศไทย จำกัด เติมที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตต่างกัน 3 ระดับ คือร้อยละ 0.5, 1 และ 3 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร พบว่าผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่เติมเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 12 และพบว่าผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มที่ไม่ได้เติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตมีค่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระทั้ง DPPH และ ABTS อีกทั้งกิจกรรมการจับโลหะอิออน (Metal ion chelating) ต่ำกว่าโปรตีนที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตอย่างเห็นได้ชัด ($p < 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมร้อยละ 18.50, 20.54 และ 39.91 ตามลำดับ แต่เมื่อเติม 20%DH BPCH-A พบว่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และการจับโลหะอิออนมีค่าสูงขึ้นตามปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต และพบว่ามีกิจกรรมสูงสุดเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 3.0 mg/ml โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับร้อยละ 37.68, 75.69 และ 90.11 ตามลำดับ

Prince of Songkla University Pattani Campus

และเมื่อเติม 5% DH BPCH-F พบว่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ และการจับอิออนโลหะสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 3.0 mg/ml โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับร้อยละ 30.01, 61.57 และ 62.44 สำหรับกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และ การจับโลหะอิออนตามลำดับ ทั้งนี้ในตัวของผลิตภัณฑ์ชาเขียวนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่แล้วในระดับหนึ่ง เนื่องจากชาเขียวมีสารประกอบ Catechin polyphenol ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสาร Polyphenolic หลักที่พบในชาเขียว (Schofield *et al*., 2001) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และ การจับโลหะอิออนในตัวผลิตภัณฑ์ชาเขียว ที่ไม่เสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต จึงสามารถพบกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระได้ แต่เมื่อเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งทั้งสองชนิดเข้าไป พบว่าตัวผลิตภัณฑ์ชาเขียวมีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นมากกว่า 50% ของกิจกรรมเริ่มต้น (ตารางที่ 12) ดังนั้นการเติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตจึงสามารถเสริมฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวพร้อมดื่มได้

Prince of Songkla University Pattani Campus

**ตารางที่ 12** กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมดื่มเสริมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

Antioxidant activities of green tea drink incorporated with 20%DH BPCH-A and 5%DH BPCH-F, at various concentrate as determined by various assays.

| Concentration | 20% DH BPCH-A | | | 5% DH BPCH-F | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | DPPH (%) | ABTS (%) | Metal ion chelating (%) | DPPH (%) | ABTS (%) | Metal ion chelating (%) |
| Control (with out protein hydrolysate) | 18.68 ± 0.35[a] | 49.59 ± 0.28[a] | 20.51 ± 0.39[a] | 18.68 ± 0.35[a] | 49.59 ± 0.28[a] | 20.51 ± 0.39[a] |
| 0.5 mg/ml | 30.00 ± 0.33[b] | 64.64 ± 0.81[b] | 68.36 ± 0.13[b] | 27.81 ± 0.56[b] | 52.88 ± 0.10[b] | 46.21± 0.11[b] |
| 1.0 mg/ml | 34.21 ± 0.06[c] | 71.75 ± 0.21[c] | 87.21 ± 0.32[c] | 29.06 ±0.26[c] | 57.24 ± 0.06[c] | 58.32 ± 0.21[c] |
| 3.0 mg/ml | 37.68 ± 0.48[d] | 75.69 ± 0.21[d] | 90.11 ± 0.37[d] | 30.01 ± 0.20[d] | 61.57 ± 0.10[d] | 62.44 ± 0.45[d] |

*Means ± SD from triplication determinations.

† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**4.6.2 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มเสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต**

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสเพื่อศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคด้านสี กลิ่น (กลิ่นชาขียว) รสชาติ เนื้อสัมผัส (ลักษณะความเป็นตะกอน) ความขม และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ชาเขียวเสริม 20% DH BPCH-A หรือ 5% DH BPCH-F โดยเติมที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร คัดเลือกความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อที่ 4.7.1 โดยพิจารณาจากความสามารถในการละลาย ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และต้นทุนเมื่อเติมโปรตีนลงในผลิตภัณฑ์ชาเขียว การศึกษาใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9 – point hedonic scale พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบด้านรสชาติและความขมของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวและเครื่องดื่มชาเขียวชาเขียวที่เติม 20% DH BPCH-A หรือ 5% DH BPCH-F ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p< 0.05$) (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่าการเติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตไม่มีผลกระทบต่อรสชาติและความขมของผลิตภัณฑ์ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p> 0.05$) ของคะแนนด้าน ลักษณะทั้ง 6 ด้าน คือ ความใส กลิ่นรส (ชาเขียว) รสชาติ เนื้อสัมผัส (ความเป็นตะกอน) ความขม และ ความชอบโดยรวม ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่เสริม 20% DH BPCH-A และ 5% DH BPCH-F แต่ในด้านความใส กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบแก่ผลิตภัณฑ์ที่เสริมโปรตีนไฮโดรไลเสตต่ำกว่าเครื่องดื่มชาเขียวที่ไม่เสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต (ชุดการทดลองควบคุม) โดยมีระดับความชอบอยู่ในช่วงเฉยๆ จนถึงชอบเล็กน้อย แต่ผลิตภัณฑ์ที่เสริมโปรตีน 20% DH BPCH-A และ 5% DH BPCH-F มีคะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกัน ($p< 0.05$) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Jookyeong (2011) ที่ศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภคของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตเสริมในเครื่องดื่มชาดำรสมะนาวที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่เติม 4 ระดับ คือร้อยละ 1, 2.5, 5 และ 7 เปรียบเทียบกับเครื่องดื่มชาดำรสมะนาวที่ไม่เติมโปรตีน (Control) พบชาเขียวที่เติมและไม่เติมโปรตีนไฮโดรไลเสตมีคะแนนความชอบในด้านความขมของผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 13** การประเมินทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มชาเขียวด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-Point Hedonic Scale Sensory

Sensory evaluations of green tea drink using 9-Point Hedonic Scale.

| Green tea drink samples | Liking scale | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Clearness | Odor | Flavour | Texture | Bitterness | Overall |
| Control (without protein hydrolysate) | 7.43 ± 1.5[b] | 6.90 ± 1.3[b] | 6.60 ± 1.9[a] | 7.03 ± 1.1[b] | 5.97 ± 1.7[a] | 7.13 ± 1.4[b] |
| Adding with 20% DH BPCH-A | 5.50 ± 1.5[a] | 6.13 ± 1.4[a] | 5.83 ± 1.2[a] | 5.67 ± 1.3[a] | 5.23 ± 1.3[a] | 6.00 ± 1.2[a] |
| Adding with 5% DH BPCH-F | 6.03 ± 1.2[a] | 6.50 ± 1.4[ab] | 5.77 ± 1.6[a] | 5.03 ± 1.7[a] | 5.17 ± 1.7[a] | 5.60 ± 1.6[a] |

*Means ± SD from triplication determinations.

†Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance differences ($p < 0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus

จากการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสเพื่อศึกษาความแตกต่างของตัวอย่างด้านความใสของน้ำชา ความขม และความเป็นตะกอน โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความแตกต่าง (Scoring test) ที่ระดับคะแนน 1-5 คือ 1 เท่ากับแตกต่างมาก 2 เท่ากับแตกต่างปานกลาง 3 เท่ากับแตกต่างน้อย 4 เท่ากับแตกต่างเล็กน้อย และ 5 เท่ากับไม่แตกต่างเลย ในตารางที่ 14 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เสริมโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้ง 2 ชนิด (20%DH BPCH-A และ 5%DH BPCH-F) มีค่าคะแนนความใสต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม (ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวที่ไม่เสริมโปรตีนไฮโดรไลเสต) แต่พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนด้านความใสของน้ำชา ของผลิตภัณฑ์ชาเขียวพร้อมดื่มที่เสริม 20%DH BPCH-A และ 5%DH BPCH-F ไม่แตกต่างกัน ($p>$ 0.05) โดยมีคะแนนอยู่ที่ระดับ 2.60 และ 3.13 ตามลำดับ คะแนนความขมของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียว พบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวที่เติม และไม่เติม 20%DH BPCH-A และ 5%DH BPCH-F มีระดับความขมไม่แตกต่างกันโดยมีระดับคะแนนความขมอยู่ในช่วง 3.33-3.97 คืออยู่ในช่วงความขมเล็กน้อย-ขมน้อย การเติมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตจะส่งผลให้เครื่องดื่มชาเขียวเปลี่ยนจากสารละลายใส เป็นสารละลายสีขุ่น แต่ไม่ตกตะกอนนอนก้น อาจเนื่องจากขีดจำกัดด้านการละลายของโปรตีน ทั้งนี้ในเครื่องดื่มชาเขียวมีองค์ประกอบของสารในกลุ่ม Polyphenol อยู่มาก สารเหล่านี้ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนเกิดเป็นสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และละลายน้ำยากดังนั้นการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้าไปในผลิตภัณฑ์ชาเขียวจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีลักษณะขุ่นดังดังกล่าว ในส่วนของลักษณะด้านเนื้อสัมผัส โดยพิจารณาลักษณะความเป็นตะกอนที่แขวนลอยในผลิตภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีคะแนนความความเป็นตะกอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<$ 0.05) โดยผลิตภัณฑ์ชาเขียวเสริม 5%DH BPCH-F 20%DH BPCH-A และชุดการทดลองควบคุม มีค่าคะแนนด้านเนื้อสัมผัสน้อยที่สุด เท่ากับ 2.20, 3.60 และ 4.53 คะแนนตามลำดับ กล่าวคือ การเสริม 5%DH BPCH-F ทำให้ผลิตถัณฑ์มีความเป็นตะกอนมากที่สุด รองลงมาคือ การเสริม 20%DH BPCH-A ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโมเลกุลของเปปไทด์ 5%DH BPCH-F สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อย เนื่องจากมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่ต่ำกว่า เมื่อโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสตในผลิตภัณฑ์ไม่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ จึงอาจทำให้เกิดอันตรปฏิกิริยาขึ้นระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยกันเอง (Protein-protein interactions) ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ผู้ทดสอบจึงสัมผัสได้ถึงความเป็นตะกอนแขวนลอยในของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 14 การประเมินทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนแบบ Scoring test

Evaluation of green tea drink using Scoring test

| Green tea drink samples | Scoring | | |
|---|---|---|---|
| | Clearness | Bitterness | Suspended sediment |
| Control (with out protein hydrolysate | 3.57 ± 1.4[b] | 3.47 ± 1.1[a] | 4.53 ± 1.0[c] |
| Adding with 20% DH BPCH-A | 2.60 ± 1.1[a] | 3.33 ± 1.0[a] | 3.60 ± 1.2[b] |
| Adding with 5% DH BPCH-F | 3.13 ± 1.0[ab] | 3.97 ± 0.8[b] | 2.20 ± 1.1[a] |

*Means ± SD from triplication determinations.

† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus