

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

Study on chemical composition, functional properties and biological activities
of protein hydrolysate from bambara groundnut (*Vigna subterranean*)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปุณณานิ สัมภาวะผล
ดร.ธรรมรัตน์ แก้วมณี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2554 รหัสโครงการ AGR540642S

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

Study on chemical composition, functional properties and biological activities
of protein hydrolysate from bambara groundnut (*Vigna subterranean*)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปุกณานิ สัมภาวะผล
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

และ

ดร.ธรรมรัตน์ แก้วมณี
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ (%DH) 10, 20 และ 30 และโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ (%DH) 5, 10 และ 15 พบว่า BPC มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ไขมัน และเถ้า เป็นองค์ประกอบร้อยละ 66.83, 30.23, 2.28 และ 1.66 ตามลำดับ BPCH-A และ BPCH-F ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเถ้า เป็นองค์ประกอบอยู่ในช่วงร้อยละ 45.57-65.78, 26.20-48.84, 0.76-3.77 และ 4.09-4.58 ตามลำดับ BPC, BPCH-A และ BPCH-F มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นสูงกว่าระดับที่ FAO/WHO กำหนด ยกเว้นทริปโตเฟน (tryptophan), ทรีโอนีน (threonine), เมไทโอนีน (methionine) และซิสทีน (cysteine) สารต้านโภชนาการที่พบในโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC, BPCH-A และ BPCH-F) ประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก และแทนนิน ยกเว้นทริปซิน อินฮิบิเตอร์ และพบปริมาณสารต้านโภชนาการเพิ่มขึ้นเมื่อโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของ BPC, BPCH-A และ BPCH-F พบว่าความสามารถในการละลายของ BPCH-A และ BPCH-F (ทุกๆ ระดับการย่อยสลาย) ดีกว่า BPC ในช่วงพีเอชที่ทดสอบ (3-9) ความสามารถในการเกิดฟอง (FE) และความสามารถในการคงตัวของฟอง (FS) ของ 10%DH BPCH-A , 5 และ 10%DH BPCH-F สูงกว่า BPC เมื่อใช้ความเข้มข้นโปรตีนมากกว่าร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ FS มีค่าลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น ค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) ของ BPC, BPCH-A และ BPCH-F ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ดัชนีความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของ BPCH-A และ BPCH-F ที่ทุกระดับการย่อยสลายนี้อาจสูงกว่า BPC เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 0.5 และ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับ BPCH-F การศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสต พบว่าสารละลาย BPCH-A และ BPCH-F มีความคงตัวต่อความร้อนมากกว่าของสารละลาย BPC ในทุกระดับการย่อยสลายของโปรตีน และทุกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ทดสอบ (25-300 มิลลิโมลาร์) การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพของ BPC, BPCH-A และ BPCH-F ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร พบว่า 20%DH BPCH-A มีค่ากิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด (ร้อยละ 64.97) และ 30%DH BPCH-A มีค่ากิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating) สูงสุด (ร้อยละ 29.29 และ 74.41 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม BPC, BPCH-A และ BPCH-F ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae*)

ABSTRACT

Investigation on chemical composition of bambara groundnut protein concentrate (BPC), bambara groundnut protein hydrolysates (BPH) from BPC using Alcalase (BPH-A) with 10, 20 and 30% degree of hydrolysis (DH) and BPH from BPC using Flavourzyme (BPH-F) with 5, 10 and 15% DH showed that BPC contained protein, carbohydrate, fat and ash of 66.83, 30.23, 2.28 and 1.66%, respectively. BPCH-A and BPCH-F contained protein, carbohydrate, fat and ash in the range of 45.57-65.78, 26.20-48.84, 0.76-3.77 and 4.09-4.58%, respectively. BPC, BPCH-A and BPCH-F contained the higher level of essential amino acid than that of FAO/WHO recommendation, except tryptophan, threonine, methionine and cysteine. Antinutritional factors found in bambara groundnut protein (BPC, BPCH-A and BPCH-F) were phenolic compound and tannin, except trypsin inhibitor. Moreover, the level of antinutritional factors were increased when bambara groundnut protein concentrate were hydrolysed with enzyme. Investigation on the functionality properties of BPC, BPCH-A and BPCH-F found that solubility of BPCH-A and BPCH-F (at all DH) were better than BPC in all range of tested pH (3-9). Foaming expansion (FE) and foaming stability (FS) of 10%DH BPCH-A, 5 and 10%DH BPCH-F were higher than BPC when protein concentration at 1% (w/v) used. Moreover, FS was decreased when increasing DH of protein. The emulsifying activity index (EAI) of BPC, BPCH-A and BPCH-F decreased with increasing the protein concentration ($p < 0.05$). Emulsion stability index (ESI) of BPCH-A and BPCH-F at all DH were higher than BPC when using protein concentration of 1% (w/v) for BPCH-A and 0.5 and 1% (w/v) for BPCH-F. Heat stability study of BPH showed that BPCH-A and BPCH-F displayed greater heat stability than BPC in all range of DH and NaCl concentration (25-300 mM) tested. Study on antioxidative and antimicrobial activities of BPC, BPCH-A and BPCH-F at concentration of 0.5 mg protein/ml found that 20%DH BPCH-A showed the highest ABTS radical scavenging activities (64.97%) while 30%DH BPCH-A showed the highest DPPH radical scavenging and metal ion chelating activity (29.29 % and 74.41%, respectively). However, BPC, BPCH-A and BPCH-F exhibited non antimicrobial activities against tested pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ โพรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองเป็นโครงการที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์วิจัย และขอขอบคุณนางสาวลีนา หง้าฝ่า ผู้ช่วยวิจัยฯ ที่ช่วยดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปุณณานิ สัมภาวะผล

ดร.ธรรมรัตน์ แก้วมณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	26
ผลการทดลองและวิจารณ์	34
สรุปผลการทดลอง	63
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	64
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	
ก การวิเคราะห์ทางเคมี	74
ข การวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง	80
ค การวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง	84
ง คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง	87
จ ประวัติคณะผู้วิจัย	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของถั่วหรั่งสดและถั่วหรั่งแห้ง	5
2	องค์ประกอบทางเคมีของแป้งและสตาร์ชจากถั่วหรั่ง	6
3	องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BNP) โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยกรดซัคซินิก (Succinic acid) (BSP) และโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยอะซิติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) (BAP)	6
4	สารต้านโภชนาการในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ	7
5	ปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์	9
6	ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง	11
7	ค่าความสามารถในการเกิดฟองและค่าความคงตัวของฟองของโปรตีนจากพืชและโปรตีนพืชไฮโดรไลเสต	19
8	องค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่ง และแป้งถั่วหรั่งที่สกัดไขมันออก	35
9	องค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)	40
10	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต	43
11	ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆ	53
12	ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆ	55
13	กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ	61
14	กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ	61
ตารางภาคผนวกที่		
1	การละลายของโปรตีนเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)	87

2	การละลายของโปรตีนเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาไซม์ (BPCH-F)	87
3	ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)	88
4	ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)	89
5	ความสามารถในการคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)	90
6	ความสามารถในการคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-F)	91
7	การจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)	92
8	การจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)	92

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของแทนนิน	10
2	การละลายของโปรตีนจากถั่วลูกไก่ (Chickpea) และโปรตีนถั่วลูกไก่ไฮโดรไลเสต CPI, FCPH, ACPH และ AFCPH คือ โปรตีนถั่วลูกไก่ Isolate, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและโปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ตามลำดับ	17
3	การเปลี่ยนแปลงระดับการย่อยสลาย (DH) ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน)	36
4	ความสัมพันธ์ระหว่าง \log_{10} ความเข้มข้นของเอนไซม์และระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์	37
5	การละลายของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่พีเอชต่างๆ	45
6	ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3	47
7	ความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ	50
8	ความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ	51
9	ความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	57
10	ความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
11	การตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) โปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> และ <i>Vibrio cholerae</i>	58
ภาพภาคผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานของโปรตีน	80

บทนำ

ปัจจุบันโปรตีนไฮโดรไลเสตจากพืชถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารก่อโฟม สารเพิ่มอิมัลชัน สารเพิ่มความอ้วนน้ำ และใช้เป็นสารอาหารเพื่อเสริมโปรตีน เป็นต้น (Tsumura *et al.*, 2005) โปรตีนไฮโดรไลเสตจากพืชส่วนใหญ่ผลิตจากโปรตีนถั่วเหลืองเป็นหลัก เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่จัดหาได้ง่าย และมีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์ต่างๆ ของโปรตีนจากถั่วเหลืองอย่างแพร่หลาย ความต้องการโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองจึงมีปริมาณมาก แต่พบว่าปริมาณการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้ถั่วเหลืองบางส่วนถูกนำเข้าจากต่างประเทศ และมักพบปัญหาถั่วเหลืองนำเข้าผ่านการตัดแต่งทางพันธุกรรม ถึงแม้ว่าอันตรายของพืชที่ผ่านการตัดแต่งทางพันธุกรรมนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพหรือไม่ แต่ก็ทำให้ผู้บริโภคบางกลุ่มหลีกเลี่ยงที่จะไม่รับประทานถั่วเหลือง หรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง การวิจัยถึงแหล่งโปรตีนจากพืชแหล่งอื่น โดยเฉพาะถั่วสายพันธุ์ท้องถิ่นจึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารของไทย ทั้งในแง่การนำไปใช้ประโยชน์ทดแทนถั่วเหลืองและการเพิ่มมูลค่า

ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตระดับอุตสาหกรรมมักใช้กรดหรือด่างเพื่อการย่อยสลายโปรตีน ส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดเกิดการสลายตัวในสภาวะดังกล่าว นอกจากนี้กระบวนการย่อยสลายโปรตีนด้วยด่างยังก่อให้เกิดสารพิษปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตได้ (Clemente *et al.*, 1999) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงนิยมใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเสตไว้ได้ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่า (Clemente *et al.*, 1999) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วล้มลุกที่นิยมปลูกกันมากในภาคใต้ (จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2548) และศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านจุลชีพของถั่วหรั่งที่ผลิตได้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และนำไปสู่การประยุกต์ใช้โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ หรือใช้เป็นโปรตีนทางเลือกในการรับประทานทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแยกโปรตีนจากถั่วเหลือง และการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วเหลืองที่แยกได้
2. เพื่อศึกษาหาค่าประกอบทางเคมี ปริมาณกรดอะมิโน และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง
3. เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง
4. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง

การตรวจเอกสาร

1. ถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่ง (*Bambara groundnut*) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna subterranean* ถั่วหรั่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนชื้นของทวีปแอฟริกา บริเวณหมู่เกาะมาดากัสการ์ และได้แพร่กระจายพันธุ์ออกไปยังทวีปอเมริกาใต้ อเมริกากลาง ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย และทวีปเอเชีย โดยผ่านเข้ามาทางฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และชายแดนภาคใต้ของประเทศไทย (Pursegllove, 1968; Duke *et al.*, 1986) และกลายมาเป็นพืชที่สำคัญของท้องถิ่นภาคใต้ เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่ายและทนแล้งได้ดี เจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ได้แก่ ดินร่วนปนทรายหรือดินร่วนปนทรายที่ไม่มีน้ำขัง และสามารถปลูกได้ตลอดปี เกษตรกรส่วนใหญ่มักปลูกถั่วหรั่งเป็นพืชแซมในสวนยางพารา สวนมะพร้าว และสวนไม้ผล ดังนั้นการปลูกถั่วหรั่งจึงเป็นอาชีพเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรก่อนที่พืชหลักจะได้ผล โดยจังหวัดที่มีการปลูกถั่วหรั่งมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดสงขลา พัทลุง ปัตตานี นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และนราธิวาส ถั่วหรั่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส เรียกว่า กากแจโป สงขลา เรียกว่า ถั่วไทร หรือถั่วโบงูเก็ด พังงา และกระบี่ เรียกว่า ถั่วป็นหยี ส่วนพัทลุง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช เรียกว่า ถั่วเม็ดเดียว หรือถั่วหรั่ง สำหรับในต่างประเทศถั่วหรั่งมีชื่อเรียกอยู่หลายชื่อ เช่น ถั่วแบมบารา (*Bambara groundnut*) ถั่วคองโกกูเบอร์ (*Congo goober*) ถั่วมาดากัสการ์ (*Madagascar groundnut*) ถั่วเอิร์ธ (*Earth pea*) ถั่วแปฟฟิน (*Buffin pea*) และถั่วจูโก (*Njugo bean*) (National Academy of Science, 1979) ส่วนสำคัญของถั่วหรั่งที่นำมาใช้ประโยชน์ คือส่วนของเมล็ด โดยการนำผลหรือฝักที่มีเมล็ดอยู่ภายในมาต้มให้สุกแล้วแกะเปลือกเอาเมล็ดมารับประทาน ถ้าเป็นเมล็ดที่เก็บมาใหม่จะมีรสหวาน นอกจากใช้ต้มรับประทานแล้วยังนำมาประกอบอาหาร โดยใช้แทนถั่วลิสงในการประกอบอาหาร เช่น ต้มข่าหมู มัสมั่น และทำไส้ขนมเปียะ เป็นต้น

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วหรั่ง ถั่วหรั่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้

ราก ประกอบด้วยรากแก้ว (Primary root) รากแขนง (Secondary root) ซึ่งแตกต่างจากรากแก้ว นอกจากนี้ก็มีรากวิสามัญ (Adventitious root) เกิดบริเวณข้อของลำต้นที่ขนานกับพื้นดิน (ลำต้นเลื้อยขนาน) ลำต้นมี 2 ชนิด คือ ลำต้นแบบตั้งตรง (Erect type) เป็นลำต้นที่เจริญในระยะแรก หลังจากนั้นมีการแตกแขนงของลำต้นทอดขนานไปกับพื้นดินเรียกว่า ลำต้นเลื้อยขนาน (Prostrate type) ดอกถั่วหรั่งเป็นดอกแบน (Papilionaceous) มีขนาดเล็ก สีเหลือง ความกว้างของดอกเฉลี่ย 0.4 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 0.5 เซนติเมตร ดอกเกิดตามมุมโดยก้านใบและตามข้อของลำต้นเลื้อยขนาน อาจเกิดดอกเดี่ยวหรือเกิดเป็นกลุ่มๆ ละ 2-3 ดอก มีก้านดอกสั้นมาก ขนาดความยาวเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร แต่ละดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ ที่มีฐานเชื่อมติดกันและส่วนปลายแยกเป็นสองแฉก กลีบดอกมีสีเหลือง 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน ทำหน้าที่หุ้มเกสรตัวผู้และตัวเมีย เกสรตัวผู้มี 10 อัน เกสรตัวเมียมีรังไข่ยาวรี ใบเป็นใบประกอบ ขนาดของใบเฉลี่ยมีความกว้าง 3.9 เซนติเมตร ความยาว 4.9 เซนติเมตร ก้านใบรวบยาวและตั้งตรง ขนาดความยาวเฉลี่ย 12 เซนติเมตร ที่ฐานของก้านใบมีหูใบ 2 อัน ส่วนก้านใบย่อยสั้นมาก ขนาดเฉลี่ย 0.2 เซนติเมตร ฝักและเมล็ด

ฝักของถั่วหรั่งมีเมล็ดเดี่ยว หรือเป็นกลุ่มตามลำต้น ฝักเมื่อแก่เปลือกจะแข็งมีสีน้ำตาล รูปร่างกลมรีเล็กน้อย ขนาดความยาวฝักเฉลี่ย 1.2 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 1 เซนติเมตร เปลือกชั้นนอกและชั้นกลางเชื่อมติดกัน ส่วนเปลือกชั้นในแยกออกจากหาก มีลักษณะเหนียวและแข็ง ภายในมีเมล็ดที่มีลักษณะผิวเรียบ สีครีมแดง ขนาดของเมล็ดมีความยาวเฉลี่ย 1 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 0.8 เซนติเมตร มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่ค่อนข้างหนา

1.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการปลูกถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับปลูกในพื้นที่ดอน ดินทราย ทรายร่วนถึงดินร่วนปนทราย คือ ต้องเป็นดินที่มีความร่วนซุยสูง เพราะเข็มของถั่วหรั่งสามารถแทงลงไปดินเพื่อเกิดเป็นฝักได้ง่ายกว่าดินเหนียว ดินมีการระบายน้ำและอากาศได้ดี ไม่เป็นพื้นที่ที่มีน้ำขัง หรือฉ่ำน้ำเป็นบางครั้งคราว ถึงแม้ดินลักษณะดังกล่าวจะเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำมาก แต่ถั่วหรั่งก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพดินกรด แต่ไม่ทนดินด่างและดินเค็ม โดยระดับ pH ที่เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.0 – 6.5 ถั่วหรั่งเป็นพืชที่ปรับตัวต่อสภาพภูมิอากาศได้กว้างมาก ตั้งแต่เขตแห้งแล้งถึงร้อน กึ่งร้อนชื้น และฝนตกชุก เป็นพืชที่ต้องการแสงแดดมากและอุณหภูมิค่อนข้างสูง ถั่วหรั่งเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีฝนตกสม่ำเสมอในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ปลูกจนถึงระยะออกดอก แต่ก็สามารถปรับตัวทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ถั่วหรั่งเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 600 – 750 มิลลิเมตร และจะให้ผลผลิตสูงถ้ามีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 900 – 1,200 มิลลิเมตร ถั่วหรั่งเป็นพืชขั้วสั้น ที่เจริญเติบโตได้ตั้งแต่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลเล็กน้อย ถึงความสูง 1,520 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

1.3 สายพันธุ์ถั่วหรั่ง ถั่วหรั่งที่นิยมปลูก มี 2 พันธุ์คือ พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์สงขลา 1

ถั่วหรั่งพันธุ์พื้นเมือง เป็นพันธุ์ซึ่งปลูกต่อๆ กันมาในระบบการปลูกพืชไร่แซมระหว่างไม้ยืนต้น หรือเมื่อเริ่มเปิดพื้นที่ใหม่ในสมัยก่อน มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 150 – 180 วัน ระยะดอกแรกเริ่มบานเมื่ออายุประมาณ 52 วัน ติดฝักโปร่ง เนื่องจากข้อห่างและทรงต้นแผ่กว้าง ให้ผลผลิตฝักสดเฉลี่ย 401 กิโลกรัม/ไร่ และผลผลิตฝักแห้งเฉลี่ย 121 กิโลกรัม/ไร่ ขนาดเมล็ดเล็ก ใน 100 เมล็ดมีน้ำหนัก 36.9 กรัม เมล็ดภายในสีเหลืองครีม ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคใบไหม้

ถั่วหรั่งพันธุ์สงขลา 1 เป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร โดยเป็นพันธุ์ที่ได้จากการนำพันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงจากสถาบันวิจัยการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ (IITA) ประเทศไนจีเรีย เข้ามาทดสอบเปรียบเทียบกับพันธุ์พื้นเมืองในสภาพพื้นที่ปลูกของภาคใต้ทุกจังหวัด (จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2548) โดยมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นกว่าพันธุ์พื้นเมือง คือประมาณ 110 -120 วัน ระยะดอกเริ่มบานเมื่ออายุประมาณ 38 วัน การติดฝักแน่นเป็นกระจุก เนื่องจากทรงต้นค่อนข้างเป็นกระจุก จึงให้ผลผลิตฝักสดเฉลี่ย 462 กิโลกรัม/ไร่ และผลผลิตฝักแห้งเฉลี่ย 161 กิโลกรัม/ไร่ ขนาดเมล็ดโต ใน 100 เมล็ดมีน้ำหนัก 48.3 กรัม เมล็ดภายในสีแดง ค่อนข้างทนต่อโรคใบไหม้ และรสชาติเป็นที่นิยมของผู้บริโภค (จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2548; จิราพร ศิริรัตน์, 2550)

1.4 คุณค่าทางอาหารของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งมีคุณค่าทางอาหารสูง ภูมิสันต์ จิวพันธ์พงษ์ และ ธนาพร วีระประดิษศิลป์ (2536) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของถั่วหรั่งเมล็ดแห้ง พบว่าประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 51.3 โปรตีนร้อยละ 18.8 ไขมันร้อยละ 5.2 เส้นใยร้อยละ 3.0 และเถ้าร้อยละ 1.8 ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ในเมล็ดถั่วหรั่งยังมีกรดลิโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูง และมีเมทไธโอนีนที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นสูงกว่าที่พบในเมล็ดของพืชตระกูลถั่วอื่นๆ (จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2548)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วหรั่งสดและถั่วหรั่งแห้ง

องค์ประกอบทางเคมี	ถั่วหรั่งสด	ถั่วหรั่งแห้ง
ความชื้น (ร้อยละ)	57.3	10.3
ไขมัน (ร้อยละ)	3.1	5.2
โปรตีน (ร้อยละ)	7.8	18.8
เถ้า (ร้อยละ)	1.8	3.4
เส้นใย (ร้อยละ)	3.0	4.8
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	30.0	51.3
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	14	62
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	258	276
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.2	12.2
พลังงาน (แคลอรี)	152	357

ที่มา: ภูมิสันต์ จิวพันธ์พงษ์ และ ธนาพร วีระประดิษศิลป์ (2536)

ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล (2548) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งและสตาร์ชจากถั่วหรั่ง พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 61.59 โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย เท่ากับร้อยละ 15.48, 7.9, 4.19 และ 2.54 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Duke *et al.*, 1986; Amarteifio and Moholo, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าถั่วหรั่งเป็นแป้งประเภทถั่วซึ่งจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าแป้งที่ได้จากธัญพืชและพืชไร่ (Adebowale *et al.*, 2002) Lawal และคณะ (2007) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนและโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรทางเคมีของถั่วหรั่ง 3 แบบ คือ โปรตีนเข้มข้น (BNP) โปรตีนเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยกรดซัคซินิก (Succinic acid) (BSP) และโปรตีนเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยอะซิติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) (BAP) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งและสตาร์ชจากถั่วเหลือง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)	
	แป้งถั่ว	สตาร์ชถั่วเหลือง
ความชื้น	11.51 ± 0.32	8.90 ± 0.18
ไขมัน	7.9 ± 0.01	0.44 ± 0.05
โปรตีน	15.48 ± 0.18	0.61 ± 0.08
เถ้า	4.19 ± 0.03	0.47 ± 0.03
เยื่อใย	2.54 ± 0.38	0.60 ± 0.08
คาร์โบไฮเดรต	61.59 ± 0.86	88.98 ± 0.23
ปริมาณอะมิโลส	ND	21.67 ± 1.43

ND : ไม่ได้ตรวจวัด (Non determined)

ที่มา: ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล (2548)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BNP) โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยกรดซัคซินิก (Succinic acid) (BSP) และโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ดัดแปรด้วยอะซิติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) (BAP)

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)						
	ความชื้น	เถ้า	เยื่อใย	ไขมัน	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	pH
BNP	7.24±0.04 ^a	2.06±0.01 ^a	ND	0.30±0.01 ^a	79.43±2.34 ^a	12.97	5.6
BAP ^d	7.53±0.02 ^b	3.05±0.0 ^b	ND	0.02±0.01 ^a	78.5±5.22 ^b	13.72	5.4
BSP ^e	7.42±0.04 ^c	3.03±0.0 ^b	ND	0.02±0.01 ^a	78.1±4.61 ^b	14.25	4.8

ND : ไม่สามารถหาค่าได้ (Not detected)

^a, ^b และ ^c คือค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$, ^d คือ ระดับของการเกิดอะซิติกเลชัน (Acetylation) ที่ร้อยละ 78 (ปริมาณทั้งหมดคำนวณจากฐานโปรตีน) และ ^e คือ ระดับของการเกิดซัคซินิกเลชัน (Succinylation) ที่ร้อยละ 72 (ปริมาณทั้งหมดคำนวณจากฐานโปรตีน)

ที่มา: Lawal และคณะ (2007)

2. สารต้านโภชนาการ

สารต้านโภชนาการ เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีอยู่ในอาหารตามธรรมชาติ หากร่างกายได้รับเข้าไปจะก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย โดยสารต้านโภชนาการมีคุณสมบัติไปทำลายหรือขัดขวางการดูดซึม และการนำไปใช้ประโยชน์ของสารอาหาร เช่นวิตามิน และแร่ธาตุบางชนิด บางตัวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นในการย่อยอาหาร ดังนั้นสารต้านโภชนาการคือ สารที่คอยขัดขวางการนำสารอาหารต่างๆ ไปใช้ประโยชน์ภายในร่างกาย แต่สารต้านโภชนาการไม่ได้พบในอาหารทุกชนิด

พืช ผักและผลไม้เป็นแหล่งของสารอาหารหลากหลายชนิด แต่ก็มีองค์ประกอบของสารต้านโภชนาการประกอบอยู่ด้วย โดยเฉพาะในพืชเมล็ดถั่ว ที่มีองค์ประกอบของสารต้านโภชนาการอยู่หลายชนิด เช่น แทนนิน (Reddy *et al.*, 1985) กรดไฟติก (Urbano *et al.*, 2000) และสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Gupta, 1987; Singh, 1988) เป็นต้น โดยพืชเมล็ดหลายๆ ชนิดก็มีองค์ประกอบของสารต้านโภชนาการแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารต้านโภชนาการในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ

ชนิดพืช	สารต้านโภชนาการ
กากถั่วเหลือง	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, เลคติน, กรดไฟติก, ซาโปนิน, ไฟโตเอสโตรเจน, สารยับยั้งวิตามิน, สารก่อภูมิแพ้
กากเรพซีด	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, แทนนิน, กลูโคไซโนเลท, กรดไฟติก
กากเมล็ดลูปิน	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, ซาโปนิน, ไฟโตเอสโตรเจน, อัลคาลอย
กากถั่วลิสง	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, แลคติน, แทนนิน, ไฮยาโนเจน, กรดไฟติก, ซาโปนิน, สารยับยั้งวิตามิน
กากเมล็ดดอกทานตะวัน	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, ซาโปนิน, สารยับยั้งเอนไซม์อาร์จินเนส
กากเมล็ดฝ้าย	ไฟโตเอสโตรเจน, กรดไฟติก, กอสซีโพล, กรดไซโคโปรพิโอนิก, สารยับยั้งวิตามิน
กากเมล็ดงา	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, กรดไฟติก
กากใบลูเซียน่า	ไมโมซิน
กากใบอัลฟาฟา	สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส, ซาโปนิน, ไฟโตเอสโตรเจน, สารยับยั้งวิตามิน
กากเมล็ดมัสตาร์ด	กลูโคไซโนเลท, แทนนิน

ที่มา: Francis และคณะ (2001)

Francis และคณะ (2001) แบ่งสารต้านอนุมูลอิสระออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลขัดขวางการย่อยโปรตีน เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส แทนนิน และแลคติน เป็นต้น
2. สารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลขัดขวางการดูดซึมสารอาหารประเภทแร่ธาตุ เช่น ไฟเตต ออกซาเลต เม็ดสีกอสซีโพล และกลูโคไซด์โนเลท เป็นต้น
3. สารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลยับยั้งการดูดซึมวิตามิน
4. สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น ไมโคทอกซิน ไมโมซิน ออกซาเลต ไชยาโนเจน ไนเตรต อัลคาลอยด์ สารยับยั้งไฟโตเซนตีไซทิง ซาโปนิน และไฟโตเอสโตรเจน เป็นต้น

2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) (พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, 2548)

สารประกอบฟีนอลิก คือ สารที่สูตรโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. กรดฟีนอลิก (Phenolic acid หรือ Simple phenols) และอนุพันธ์ เช่น กรดแกลลิก (Gallic acid), กรดแอลลาจิก (Ellagic acid), กรดแทนนิก (Tannic acid), วานิลลิน (Vanillin), คาทีคอล (Catechol), รีซอร์ซินอล (Resorcinol) และกรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น ราสเบอร์รี่ (Raspberry) และแบล็กเบอร์รี่ (Blackberry) เป็นต้น

2. ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoids) ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่วงแหวนอะโรมาติกมีคาร์บอนไซด์เชน (Carbon side chain) 3 กลุ่มเกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid) เช่น กรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid), กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) และกรดคูมาริก (Coumaric acid) เป็นต้น, คูมาริน (Coumarin) ได้แก่ อัมเบลลิฟีโรน (Umbelliferone), สโคโปเลติน (Scopoletin), เอสคูเลติน (Aesculetin) และโซราเลน (Psoralen) เป็นต้น และลิกแนน (Lignan) ได้แก่ พินอเรซินอล (Pinoresinol), ยูจีนอล (Eugenol) และไมริสไตซิน (Myristicin) เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในแอปเปิล (Apple) แพร์ (Pear) และกาแฟ (Coffee) เป็นต้น

3. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_6-C_3-C_6$ แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่คาเทชิน (Catechin), โปรแอนโทไซยานิน (Proanthocyanin), แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin), ฟลาโวน (Flavone), ฟลาโวนอล (Flavonol), ฟลาโวนอน (Flavonone) และไอโซฟลาโวน (Isoflavone)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีทั้งประโยชน์ และโทษ โดยประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลนั้นพบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ ในขณะที่โทษของสารประกอบฟีนอลนั้นพบว่า จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต และก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของคนและสัตว์ที่รับประทานได้ เนื่องจากกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซิล (Phenolic hydroxyl) หลายๆ กลุ่มในสารประกอบฟีนอลสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน ไอออนของโลหะ และพอลิเมอร์โมเลกุลอื่นๆ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ ได้ ทำให้ร่างกายไม่

สามารถดูดซึมสารเหล่านี้ได้ ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกจึงมีผลลดความสามารถในการย่อยโปรตีน และกรดอะมิโนได้ (Schofield and Mbugua, 2001)

2.2 ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor)

ทริปซินอินฮิบิเตอร์ เป็นสารต้านโภชนาการที่มีฤทธิ์จับกับน้ำย่อยทริปซิน ทำให้ทริปซินไม่สามารถทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนได้ ส่งผลให้สัตว์มีการเจริญเติบโตลดลง แต่ผลของทริปซินอินฮิบิเตอร์ในการเจริญเติบโตของสัตว์ไม่ได้มีเพียงผลของการยับยั้งการย่อยโปรตีนในลำไส้เท่านั้น แต่พบว่าเมื่อมีตัวยับยั้งเอนไซม์ทริปซินอยู่ในอาหารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระด้วยนั้น จะนำไปสู่การสูญเสียกำมะถันในโปรตีนสำหรับผลต่อคนยังไม่ชัดเจน โดยส่วนใหญ่ทริปซินอินฮิบิเตอร์จะพบมากในถั่วเหลือง และมีรายงานพบว่าทริปซินอินฮิบิเตอร์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง โดยการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Guillamon *et al.*, 2008) ปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์

ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์	กิจกรรมของทริปซินอินฮิบิเตอร์ (มิลลิกรัม/กรัม)
ถั่วเหลือง	17-27
แป้งถั่วเหลือง	28-32
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	1.2-30
โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น	5.4-7.3
อาหารจากถั่วเหลือง	0.3-4.1

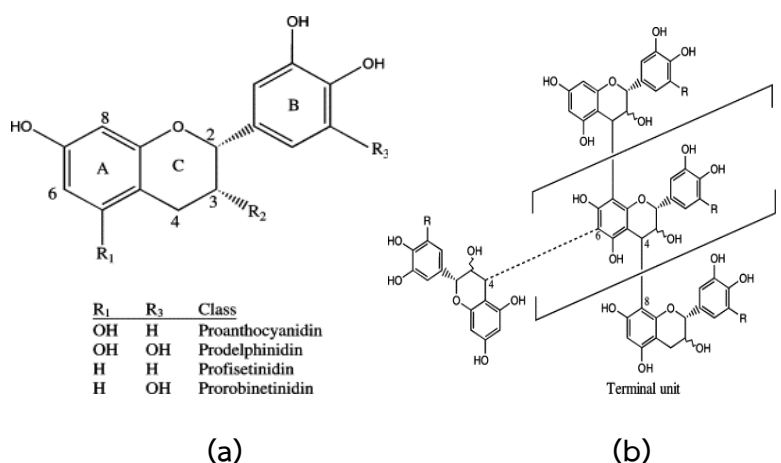
ที่มา: อาณัติ นิตติธรรมยง และประไพศรี ศิริจักรวาล (2553)

2.3 แทนนิน (Tannin)

แทนนินหรือโปรแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ประกอบด้วยกลุ่มของ Oligomers polyhydroxyflavan - 3 - ol และพอลิเมอร์ ที่เชื่อมโยงด้วยพันธะระหว่างคาร์บอน เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของฟลาโวนอล (Flavanol) ดังภาพที่ 1a และ 1b ปฏิกิริยาของแทนนินกับโมเลกุลทางชีวภาพมีความสำคัญ และมีผลทางโภชนาการและสรีรวิทยามาก กลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซิล (Phenolic hydroxyl) หลายกลุ่มจะนำไปสู่การสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน กับไอออนของโลหะ และกับพอลิเมอร์โมเลกุลอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) แทนนินเป็นพอลิเมอร์ของฟลาโวนอล ที่โมโนเมอร์มีสมมาตรในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในวงแหวนคาร์บอนดังภาพที่ 1 แม้ว่ารูปแบบในสเตอริโอที่ตำแหน่งเหล่านี้จะเกิดขึ้นในแทนนินธรรมชาติ แต่รูปแบบเหล่านี้ก็มีผลค่อนข้างน้อยในส่วนของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาแทนนิน การแทนที่กลุ่ม R_1 , R_2 , R_3 ในภาพที่ 1 อาจมีผลต่อปฏิกิริยาของแทนนิน บางครั้งเกิดการเอสเทอร์ไฟ (Esterified) เป็นกรดแกลลิก (Gallic acid) (เช่นในอิพิกาโลคาเทชิน กาลเลท (Epigallocatechin gallate) ($R_1 = R_3 = OH$, $R_2 = O - Galloyl$) ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลิก (Polyphenolic) หลักของชาเขียว) และหากในแทนนิน มีเอสเทอร์กาลเลท (Esters gallate) อาจเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวภาพของแทนนินได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่

ตำแหน่ง R_1 และ R_3 มีความแตกต่างกันของกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) และไฮโดรเจน (H) จะทำให้มีฟลาโวนอลโพลีเมอร์ (Flavanol polymer) แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) โดยการตอบสนองต่อสารต่างๆจะแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ โพรไซยานิดิน (Procyanidins) จึงแตกต่างจากโพรเดลฟินิดิน (Prodelphinidins) เพราะโพรเดลฟินิดินมีกลุ่มไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวน B จึงทำให้เกิดความแตกต่าง ตัวอย่างเช่น การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่างโพรเดลฟินิดิน/โพรไซยานิดิน จะเป็นการเพิ่มความสามารถในการรวมตัวของแทนนินกับโปรตีน

การออกซิเดชันระหว่างโมโนเมอร์ของฟลาโวนอล เกิดขึ้นมากที่สุดระหว่างตำแหน่งที่ 4 และ 8 และยังคงเกี่ยวข้องกับตำแหน่งที่ 4 และ 6 ของโมโนเมอร์ (ภาพที่ 1) และตำแหน่งอื่นๆ ด้วย ขณะที่จำนวนรวมของโมโนเมอร์ของฟลาโวนอลในเมล็ดตองุ่นสกัด อยู่ระหว่าง 2-17 อนุภาคพอลิเมอร์ แต่โพลีเมอร์เหล่านี้มักจะไม่ละลายน้ำและจึงทำให้ยากที่จะศึกษา (Schofield and Mbugua, 2001)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของแทนนิน

(a) สารในตำแหน่ง R_1 และ R_3 ดังแสดงด้านล่างของโครงสร้าง (b) โครงสร้างของแทนนิน หาก $R = H$ หรือ OH แล้วโครงสร้างจะเป็นโพรไซยานิดิน (Procyanidin) หรือโพรเดลฟินิดิน (Prodelphinidin) โดยจะเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง $4 \rightarrow 6$ (เส้นประ)

ที่มา: Schofield and Mbugua (2001)

3. โปรตีนจากพืช

โปรตีนจากพืช พบมากในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง (Soy bean) และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น เต้าหู้ เต้าเจี้ยว และเต้าฮวย เป็นต้น โปรตีนจากถั่วเหลือง (Soy protein) อุดมไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดแต่น้อยกว่าโปรตีนจากนม โปรตีนที่ได้จากพืชมักจะมีคุณภาพต่ำกว่าโปรตีนที่ได้จากสัตว์แต่มีไขมัน คอเลสเตอรอลและน้ำตาลแลคโตสในปริมาณที่ต่ำกว่ามาก นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยสารสำคัญอีกหลายชนิดได้แก่ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) ซาโปนิน (Saponins) และ ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ซึ่ง

ไม่พบในโปรตีนจากสัตว์ โปรตีนจากถั่วเหลืองแบ่งออกเป็น 3 ชนิด เช่นเดียวกับเวย์โปรตีน โดยแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง

โปรตีนจากถั่วเหลือง	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
Soy Flour	50
Soy Concentrate	70
Soy Isolate	90

ที่มา: อินเดอร์ยิตซิงห์ บัตติยา (2553)

นอกจากนี้โปรตีนจากพืชยังมีจุดเด่นคือ มีสารที่เรียกว่าฟลิกซ์เคมี (Phytochemical) เช่น ฮอโรโมนพืช (Phytoestrogen) ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ในขณะที่เอสโตรเจน (Estrogen) ที่เป็นฮอโรโมนที่พบในมนุษย์ และในเนื้อเยื่อของสัตว์ เมื่อได้รับในปริมาณมากอาจสร้างปัญหาต่อสุขภาพได้ นอกจากนี้พืชยังมีสารฟลิกซ์เคมีอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ โดยปัจจุบันพบสารกลุ่มนี้กว่า 12,000 ชนิด และสารเหล่านี้ให้ประโยชน์ต่อร่างกายได้อย่างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนจากพืช มีสารฟลิกซ์เคมีที่เป็นประโยชน์ปะปนอยู่มากมายหลายชนิด และสารเหล่านี้ยังเป็นสารเสริมสุขภาพที่พบได้เฉพาะในพืช ในขณะที่โปรตีนจากเนื้อสัตว์หลายชนิดมักก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือรบกวนภูมิคุ้มกันโรคบางอย่างได้ และยังอาจสร้างปัญหาให้กับผู้ป่วยได้ โดยทำให้มีปัญหาแทรกซ้อนทางไต อย่างไรก็ตามโปรตีนจากพืชยังมีข้อจำกัดที่จำต้องนำมาพิจารณาร่วมด้วยคือสารต้านโภชนาการที่มักพบในพืชบางชนิด เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่ช่วยย่อยโปรตีนในทางเดินอาหาร ไฟเตท (Phytate) ซึ่งมีผลขัดขวางการดูดซึมแร่ธาตุหลายชนิดในระบบทางเดินอาหาร แทนนิน และฮีแมกกลูตินิน (Hemmagglutinin) ซึ่งมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น (วินัย ดะห์ลัน, 2542)

4. โปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสต คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนโดยการตัดสายพอลิเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือเปปไทด์สายสั้นๆ โดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น (Kristinsson and Rasco, 2000 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550) จากรายงานการศึกษาพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ขึ้นอยู่กับขนาดและการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปปไทด์ (Chen *et al.*, 1998; Seutsuna and Chen, 2002; Vařtag *et al.*, 2010)

4.1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่

การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี เป็นการทำให้พันธะเปปไทด์แตกออกโดยใช้สารละลายกรดหรือด่าง ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ แต่ควบคุมระดับการย่อยโปรตีนได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ สามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี แต่ทำให้ทริปโตเฟน (Tryptophan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย สารละลายกรดที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้จะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยในการย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต และการย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นในกระบวนการเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไป (Kristinsson and Rosco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส สารละลายเบสที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีนได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากย่อยในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาราคีไมเซชัน (Racemization) ของกรดอะมิโน โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก L-Form เป็น D-Form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และทำให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (Dehydroalanine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ เกิดเป็นสารประกอบต่างๆ หลายชนิด เช่น ไลซีนอะลานีน (Lysinoalanine) และแลนธโอนีน (Lanthionine) เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย (Kristinsson and Rosco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลงและกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูง จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมาก และสามารถย่อยโปรตีนในภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์จะมีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic group) ในโมเลกุลโปรตีน เช่น ไอโซลิวซีน (Isoleucine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), ทริปโตเฟน (Tryptophan), ไทโรซีน (Tyrosine) และวาเลีน (Valine) แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้อาจจะเกิดน้อยลงเพราะสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดรสขม จึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยโปรตีน (Kristinsson and Rosco, 2000)

เอนไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ในการตัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิด ให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแปรโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547) โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเปปไทด์ของพอลิเปปไทด์ได้เป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโน

อิสระ เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ และการแบ่งตามกลไกการทำงาน

การแบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) เอกซีโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่าอะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase) ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่าคาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase)

2) เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่ของโมเลกุลโปรตีน ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเซตรที่เปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547)

และการแบ่งตามกลไกการทำงาน แบ่งได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1) ซีรีนโปรติเอส (Serine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (Alkali protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง pH 7.0 – 11.0 เป็นพวกเอนโดเปปติเดส มีอนุมูลซีรีล (Seryl residue) และหมู่อิมิดาโซล (Imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟลูออไรด์ (di-Isopropylphosphofluoride) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมูไฮดรอกซิลของอนุมูลเซรีลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ อีลาสเตส (Elastase), ทรอมบิน (Thrombin) และทริปซิน (Trypsin) เป็นต้น

2) ซัลไฮดริลโปรติเอส (Sulhydryl protease) หรือซิสเทอีนโปรติเอส (Cysteine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอส (Neutral protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.0 - 7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดส มีอนุมูลซัลไฟดริลอยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่าสารซัลไฮดริล (Sulhydryl reagent) ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือน และอาจสูญเสียแอกติวิตีไปในที่สุด เอนไซม์กลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ โบรมีเลน (Bromelain) และปาเปน (Papain) เป็นต้น

3) เมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอส มี pH ที่เหมาะสมคือ pH 7.8 เป็นพวกเอกซีโซเปปติเดส เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน โดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับอออนของโลหะ (Metal chelating agent) เช่น 1,10-ฟีแนนโทรลีน (1, 10 – Phenanthroline) และ กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก (Ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คาร์บอกซีเปปติเดส เอ (Carboxypeptidase A), คาร์บอกซีเปปติเดส บี (Carboxypeptidase B), คาร์โนซิเนส (Carnosinase) และโพรลิดเอส (Prolidase) เป็นต้น

4) แอสปาติกโปรติเอส (Aspartic protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นคาร์บอกซิลโปรติเอส (Carboxyl protease) และเอซิดโปรติเอส (Acid protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 2-4 มีหมู่มคาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาติก 2 อนุมูลอยู่ในบริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยเปปสแตติน (Pepstatin) เอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็น

เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่นเปปซิน (Pepsin) และเรนนิน (Rennin) เป็นต้น (Whitaker, 1994 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550)

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้า เช่น

1) อัลคาเลส (Alcalase[®]) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8-8.5 (Anonymous, 2000)

2) ฟลาวัวไซม์ (Flavourzyme[®]) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-7 (Anonymous, 2000)

3) นิวเตรส (Neutrase[®]) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-7 (Anonymous, 2000)

4.2 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยโปรตีน เป็นดัชนีที่ใช้บ่งชี้ระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความสะดวก ความเหมาะสม และระดับความละเอียดและเที่ยงตรงที่ต้องการ การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด การวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ (Free α -amino group) และการไตเตรทโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา (Silvestre, 1997)

1) การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid : TCA) สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธี Kjeldhal การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet : UV) ของเปปไทด์ที่มีหมู่วงแหวน และการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400 - 700 นาโนเมตร หลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยาไบยูเรต (Biuret) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (1) (Silvestre, 1997 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550)

$$DH = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนหลังจากการตกตะกอนด้วย TCA} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \dots\dots\dots 1$$

2) การวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธีไตเตรท (Formal titration) ซึ่งจะใช้สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน แล้วไตเตรทด้วยสารละลายเบส โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ (เปลี่ยนสีที่ pH 9.2) อัตราส่วนระหว่างแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free α - amino nitrogen) กับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถประมาณค่าระดับการย่อย

โปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้สารประกอบที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่อะมิโน เช่น Ninhydrine, Trinitrobenzene Sulfonic acid (TNBS), Polychroniadou, Fluorescamin และ Orthophtaldehyde (OPA) ก็สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน โดยวิธีเก่าแก่ที่สุดคือการใช้ Ninhydrine เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะได้สารประกอบสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น สารเคมีที่ใช้ไวต่อออกซิเจน มีการรบกวนจากแอมโมเนีย ค่าที่ได้จากแบลด์สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Moore และ Stein, 1948 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550) ส่วน TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ Primary amino groups ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับโปรตีนไฮโดรไลเสตแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย Picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ Proline และ Hydroxyproline และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับ amino group ของ lysine ได้ (ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550) สารประกอบอีกสองชนิด คือ Fluorescamin และ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี Fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูง แต่มีข้อเสีย คือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียรต่ำ (Church *et al.*, 1985 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (2)

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \times 100 \quad \dots\dots\dots 2$$

L_t = ปริมาณ α - amino acid ที่เวลา t

L_0 = ปริมาณ α - amino acid เริ่มต้น

L_{max} = ปริมาณ α - amino acid หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

3) การไตเตรทโปรตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เรียกว่าเทคนิค pH-Stat ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย ซึ่งทำให้หมู่อะมิโนหลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วย Sodium hydroxide หรือ Calcium hydroxide โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา ดังสมการ (3) (ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550)

$$DH = B \times N_b \times 1/M_b \times 1/\alpha \times 100/ h_{tot} \quad \dots\dots\dots 3$$

B = ปริมาณเบสที่ใช้ (มิลลิลิตร)

N_b = ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)

M_b = มวลของโปรตีน (กรัม)

$1/\alpha$ = ค่า Calibration สำหรับ pH – stat

h_{tot} = จำนวนพันธะเปปไทด์ในโปรตีน

วิธีการนี้จะใช้ในการวัดระดับการย่อยโปรตีนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะเป็นค่าสัมพัทธ์และหากต้องการความถูกต้องแม่นยำจะต้องตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เช่น TNBS หรือ OPA (Silvestre, 1997 อ้างถึงโดย ัณยพร จันทร์แสนโรจน์, 2550)

4.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

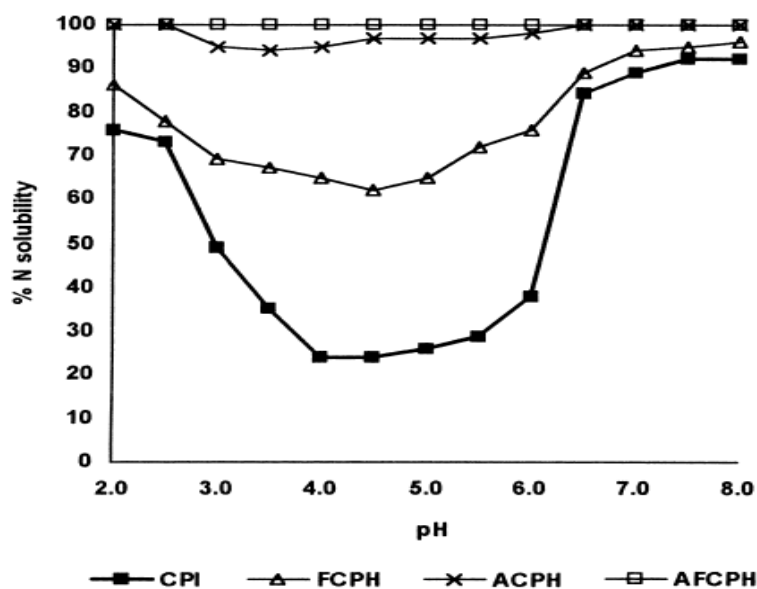
สมบัติเชิงหน้าที่ คือ สมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีน ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลเสตมาเป็นผู้ประกอบการอย่างมากมาย ทั้งนี้เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพและรสสัมผัสของอาหาร หรือเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับอาหาร โดยลักษณะเฉพาะของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีผลโดยตรงต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของโปรตีนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (Kristinsson and Rasco, 2000) ดังนั้นการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้ในอาหารต่างๆ นั้นจะต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย โปรตีนไฮโดรไลเสตถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสามารถทำหน้าที่สำคัญต่างๆ ได้หลายประการ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2551)

สมบัติการละลาย (Solubility) ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นคุณสมบัติที่สำคัญและมีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ เช่น ความหนืด การเกิดโฟม อิมัลชัน และการเกิดเจลของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารโดยส่วนใหญ่คือน้ำ โปรตีนที่สามารถยึดจับน้ำหรือละลายน้ำได้จึงสามารถรวมตัวเข้ากับอาหารและแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ได้ โปรตีนที่นำมาใช้ประโยชน์เชิงหน้าที่จึงควรจะมีความสามารถในการละลาย การวิจัยส่วนมากจึงใช้ความสามารถในการละลายของโปรตีนบ่งชี้คุณภาพของโปรตีน หรือโครงสร้างของโปรตีนทางอ้อม ปัจจัยที่มีผลต่อการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสต คือสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำของผิวหน้าโปรตีน พีเอช อุณหภูมิ ค่าความแรงของไอออน (Ionic strength) ค่าความเข้มข้นของโปรตีน และสารประกอบอื่นๆ เช่น โลหะ หรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ปริมาณไขมันที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสตก็มีผลต่อความสามารถในการละลายเช่นกัน โดยถ้ามีปริมาณไขมันอยู่มากจะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง (Kristinsson and Rasco, 2000)

พรชนัน เทียวทั่ว (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอนไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม พบว่าโปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (Surface hydrophobicity)

Clemente และคณะ (1999) ศึกษาสมบัติในการละลายของโปรตีนถั่วลูกไก่ (Chickpea) 4 แบบ คือ โปรตีนถั่วลูกไก่แบบเข้มข้น, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าโปรตีนถั่วลูกไก่อมีการละลายดีขึ้นเมื่อโปรตีนถั่วผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ โดย

โปรตีนถั่วลูกไก่ ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าการละลายที่ร้อยละ 100 ที่ pH อยู่ในช่วง 7-8 ในขณะที่การใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์มีระดับการย่อยร้อยละ 27 ที่ pH 7 และพบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในการตัดแปรโปรตีนถั่วลูกไก่ทำให้กราฟแสดงค่าการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลูกไก่เปลี่ยนจากลักษณะกราฟแบบรูปตัวยูให้เป็นแบบแนวราบ ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การละลายของโปรตีนจากถั่วลูกไก่ (Chickpea) และโปรตีนถั่วลูกไก่ไฮโดรไลเสต CPI, FCPH, ACPH และ AFCPH คือ โปรตีนถั่วลูกไก่ Isolate, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์, โปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและโปรตีนถั่วลูกไก่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ตามลำดับ

ที่มา: Clemente และคณะ (1999)

Walsh และคณะ (2003) ศึกษาการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองได้ที่ระดับการย่อยร้อยละ 20 โปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วง pH 3-5 และลดต่ำลงในช่วง pH 6-8

Govindaraju และ Srinivas (2004) ได้ศึกษาสมบัติสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนอะราชิน (Arachin) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายสูงขึ้นโปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงร้อยละ 55-60 ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำโปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 14-16 ในช่วง pH 4-4.5

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาข้างเหลือง (*Selavoides leptolepsis*) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยของโปรตีน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 5, 15 และ 25 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการ

ละลายสูงสุดเมื่อระดับการย่อยโปรตีนเท่ากับร้อยละ 25 และจากการทดสอบบิโทธิพลของค่า pH ในช่วง 2-12 ต่อความสามารถในการละลาย พบว่าที่ pH เท่ากับ 4 ค่าความสามารถในการละลายจะต่ำที่สุด ในขณะที่ pH ในช่วง 8-11 ค่าการละลายได้มากที่สุด ส่วนโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายสูงสุดในช่วง pH เท่ากับ 6-8

Thiansilakul และคณะ (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลาหูแหก (*Decapterus maruadsi*) และตรวจสอบค่าการละลายของโปรตีนดัดแปรที่ได้ด้วยวิธีการตรวจสอบ Nitrogen solubility index (NSI) พบว่าโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีค่า NSI เท่ากับ ร้อยละ 99

สมบัติการเกิดฟอง (Foaming properties) สมบัติการเกิดฟองของโปรตีน หมายถึงความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิล์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดฟอง ได้แก่ ไอศกรีม เค้ก และเมอร์แรงจ์ เป็นต้น สมบัติการเกิดฟองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ประจุ และค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของโปรตีน เช่น Globular protein จะเพิ่มความคงตัวของฟอง (Foaming stability) ในขณะที่ Fibrous protein จะช่วยให้เกิด Interfacial ของโปรตีน ระหว่างอากาศกับของเหลวอย่างรวดเร็วทำให้เกิด Foaming activity สูง (Damodaran and Paraf, 1997) โปรตีนทำหน้าที่สร้างความคงตัวให้กับโครงสร้างของฟอง ซึ่งกลไกการเกิดฟองของโปรตีน คือโปรตีนละลายในของเหลวและละลายตัวออกเป็นรูปร่างแบนตรงยาว หรือปลายงอน เมื่อตีอัดอากาศเข้าไป โปรตีนจะห่อหุ้มโมเลกุลของก๊าซไว้ในลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม โดยหันด้านไม่มีขั้วสู่อากาศ หันด้านมีขั้วสู่น้ำ ซึ่งโครงสร้างของฟองโดยทั่วไปจะไม่เสถียรถ้าฟองมีขนาดเล็กเกินไป เพราะโปรตีนแต่ละสายพยายามจะจัดเรียงตัวเองเข้าที่เดิมหากโมเลกุลอยู่ใกล้กัน ในทางกลับกัน หากฟองมีขนาดใหญ่เกินไป ฟองจะยุบตัวได้ง่าย เกิดการแตกของโครงสร้างได้รวดเร็ว ทั้งนี้เพราะฟิล์มโปรตีนไม่หนาแน่นและแข็งแรงพอ ทำให้อากาศภายในดันออกได้ง่าย Cherry และ Mc Watters (1981) ได้สรุปลักษณะของโปรตีนที่มีคุณสมบัติการเกิดฟองได้ดี และช่วยให้ฟองมีความคงตัว ดังนี้ คือ ละลายได้ดี ยึดอยู่ในชั้นระหว่างอากาศและน้ำได้ดี คลายเกลียวและเรียงตัวเป็นระเบียบในชั้นระหว่างอากาศและน้ำได้ตลอดเวลา และยึดโมเลกุลข้างเคียงได้หนาแน่น แต่ยึดหยุ่นรองรับแรงอัดอากาศเข้าและออกได้ดี จะได้ฟองที่มีความคงตัว สมบัติการเกิดฟองของโปรตีนพิจารณาจาก Formability หรือ Foam capacity ของโปรตีน

Lawal และคณะ (2007) ศึกษาผลของ pH (2-10) ต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนถั่วหรั่ง ที่ไม่ผ่านการดัดแปรและโปรตีนถั่วหรั่ง ที่ผ่านการดัดแปรด้วยสารเคมี 2 ชนิด คืออะซิทิเลท (Acetylated) และ Succinylated พบว่าที่ pH เท่ากับ 10 ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วย Succinylated มีความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนสูงที่สุด รองลงมาคือโปรตีนที่ผ่านการทำการดัดแปรด้วยสาร Acetylated ส่วนความสามารถในการคงตัวของฟองพบว่า โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรทั้ง 2 แบบมีการคงตัวของฟองมากที่สุด ที่ pH เท่ากับ 2 รองลงมาคือโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรที่ pH เท่ากับ 4

Chabanon และคณะ (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีน Rapeseed ที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยโปรตีนเท่ากับ 5 มีความสามารถในการเกิดฟองมากที่สุดและพบว่าที่ระดับการย่อยเท่ากับ 10 โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความคงตัวของฟองดีที่สุดที่เวลา 10, 30 และ 120 นาทีตามลำดับ

Taha และ Ibrahim (2002) ศึกษาผลของระดับการย่อย (%DH) ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนจากเมล็ดงา และโปรตีนจากจมูกข้าว โดยใช้เอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลน พบว่าโปรตีนจากพืชทั้ง 3 ชนิดที่ไม่ผ่านการย่อย (DH = 0) มีความสามารถในการเกิดฟองน้อยที่สุด รองลงมาคือโปรตีนจากจมูกข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ระดับการย่อยร้อยละ 8.8 และ 7.3 ตามลำดับ Radha และคณะ (2007) เปรียบเทียบสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสต จากพืช 3 ชนิด (โปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนงาและโปรตีนถั่วลิสง) พบว่าความสามารถและความคงตัวของฟองโปรตีนที่ผ่านการย่อยมีค่าสูงกว่าโปรตีนผสมที่ไม่ผ่านการย่อย ซึ่งมีค่าความสามารถในการเกิดฟองและค่าความคงตัวของฟองเท่ากับ ร้อยละ 122 และ 90 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยโปรตีนจากถั่วลิสงมีค่าความสามารถในการเกิดฟองและค่าความคงตัวของฟองต่ำที่สุดดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าความสามารถในการเกิดฟองและค่าความคงตัวของฟองของโปรตีนจากพืช และโปรตีนพืชไฮโดรไลเสต

ชนิดโปรตีน	ความสามารถในการเกิดฟอง (FC) (ร้อยละ)	ความคงตัวของฟอง (FS) (มิลลิลิตร)
โปรตีนไฮโดรไลเสตผสม	122 ± 5	90 ± 3
โปรตีนผสม	42 ± 2	34 ± 2
โปรตีนถั่วเหลือง	56 ± 3	42 ± 2
โปรตีนถั่วลิสง	40 ± 2	10 ± 1
โปรตีนจากงา	52 ± 3	16 ± 2

ที่มา: Radha และคณะ (2007)

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โปรตีนมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่สำคัญในอาหาร โดยโปรตีนที่ละลายน้ำสามารถเคลื่อนที่ไปยังส่วนที่อยู่ระหว่างเฟสของน้ำและน้ำมันและโปรตีนจะจัดเรียงตัวระหว่างเฟสโดยหันเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่ส่วนน้ำมัน และหันด้านที่ชอบน้ำไปยังเฟสน้ำ โดยโปรตีนอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่บริเวณระหว่างเฟสและอาจจัดรูปแบบโครงสร้างต่างๆ กัน เช่น เทรนลูป (Train loop) หรือ เทรล (Tail) ซึ่งล้วนมีผลต่อคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันรวมทั้งความคงตัวของอิมัลชัน ปัจจัยที่มีผลหรือมีบทบาทกำหนดคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน ได้แก่ ความสามารถในการละลายของโปรตีน คุณสมบัติการไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (Surface hydrophobicity) การสูญเสียสภาพของโปรตีน

รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ เมื่อโปรตีนถูกย่อยเกิดเป็นเปปไทด์ที่มีโมเลกุลสายสั้นลงทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็วและเคลื่อนที่ไปยังบริเวณพื้นผิวเม็ดน้ำมัน โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาเม็ดน้ำมันและหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาเฟสน้ำทำให้เกิดอิมัลชันขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะขึ้นอยู่กับระดับการย่อยโปรตีน ความเป็นกรดเบส เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน และคุณสมบัติการไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (Surface hydrophobicity : S_0) เป็นต้น โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะมีค่าต่ำ ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (Kristinsson and Rasco, 2000) สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์พิจารณาจากค่า Emulsifying activity index (EAI) ซึ่งจะใช้ประมาณความสามารถของโปรตีนในการช่วยให้เกิดอิมัลชันและประมาณความคงตัวของอิมัลชันโดยใช้ค่า Emulsion stability index (ESI) โดยทั้งสองค่าคำนวณมาจากการตรวจวัดความขุ่นของอิมัลชันที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

กระบวนการเกิดอิมัลชันเป็นกระบวนการหรือคุณสมบัติอันดับต้นๆที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในกระบวนการผลิตอาหาร อิมัลชัน คือ ระบบของเหลวตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในลักษณะหยดกลมเล็กๆ อยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ระบบของอิมัลชันจะแบ่งตามลักษณะการกระจายตัว ถ้าระบบเป็นหยดน้ำมันกระจายอยู่ในน้ำ เรียกว่า อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water, O/W) ถ้าระบบเป็นหยดน้ำกระจายในน้ำมัน เรียกว่า อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil, W/O) (Dickinson and Stainsby, 1982) โปรตีนทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ของระบบโดยมีการจัดเรียงส่วนที่เป็น Hydrophobic ของโมเลกุลโปรตีนที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (Clemente *et al.*, 1999 อ้างถึงโดย ฉันทพร จันทรแสนโรจน์, 2550) ความสามารถในการเกิดอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะขึ้นอยู่กับระดับการย่อยโปรตีน ความเป็นกรดเบส เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน และ Surface hydrophobicity (S_0) เป็นต้นโดยความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะมีค่าต่ำ ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (Kristinsson and Rasco, 2000)

Chabanon และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากโปรตีน Rapeseed โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และค่าความคงตัวของอิมัลชันดีกว่าโปรตีน Rapeseed ที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อย นอกจากนี้ได้ศึกษาโดยการแยกโปรตีน 2 ชนิดจากโปรตีน Rapeseed คือ โปรตีนโกลบูลินและโปรตีนอัลบูมิน พบว่าที่ระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 5 โปรตีนโกลบูลินมีค่าความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และค่าความคงตัวของอิมัลชันดีที่สุด คือ เท่ากับร้อยละ 50 ± 2 และที่ร้อยละ 45 ± 4 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนอัลบูมิน มีค่าความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีที่สุดที่ระดับการย่อยร้อยละ 10 คือ เท่ากับร้อยละ 54 ± 1 และมีค่าความคงตัวของอิมัลชันที่ระดับย่อยร้อยละ 5 คือ เท่ากับร้อยละ 69 ± 9

Nalinanon และคณะ (2011) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาทรายแดง (Ornate threadfin bream) ที่ผลิตโดยเอนไซม์เปปซินที่สกัดได้จากปลาโอแถบ (Skipjack tuna) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.10 และระดับการย่อยร้อยละ 10 มีค่าความสามารถในการเป็นสารอิมัล

ซีไฟเออร์ (Emulsion activity index หรือ EAI) และค่าความคงตัวของสารอิมัลชัน (emulsion stability index หรือ ESI) มากที่สุด คือ 116 ± 2.6 ตารางเมตร/กรัม และ 25.8 ± 2.2 นาที ตามลำดับ

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลาข้างเหลือง (Yellow stripe trevally) ที่ผลิตด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตโดยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซีไฟเออร์ และค่าความคงตัวของอิมัลชันดีที่สุดที่ระดับการย่อยโปรตีนเท่ากับ ร้อยละ 5 ที่ pH เท่ากับ 10 และ 8 ตามลำดับ

ฉันทพร จันทร์แสนโรจน์ (2550) ศึกษาการผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป่าฮือ (*Haliotis asinina*) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความคงตัวดีกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 0.10 โมล มีผลต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตและความคงตัวของอิมัลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ของ Bovine serum albumin (BSA) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์สูงกว่าแต่มีความคงตัวของอิมัลชันที่ใกล้เคียงกัน

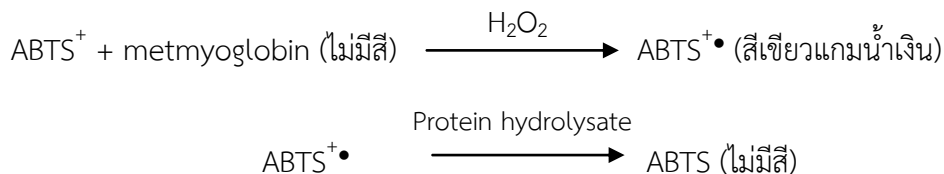
4.4 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนแหล่งต่างๆ หลายชนิด เช่น โปรตีนเคซีนในนม โปรตีนข้าวโพด โปรตีนไข่แดง โปรตีนกล้ามเนื้อปลา โปรตีนจากกล้ามเนื้อหมู โปรตีนซีรัมอัลบูมินจากเลือดวัว คอลลาเจน โปรตีนเวร์ โปรตีนกลูเตนจากแป้งสาลี และโปรตีนจากถั่วหลายชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Zhang *et al.*, 2009) โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สภาวะในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน ชนิดของโปรตีน ระดับการย่อย องค์ประกอบของกรดอะมิโนและเปปไทด์

ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร เช่น สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น เนื่องจากอิทธิพลดังกล่าว จึงทำให้ไม่สามารถใช้วิธีทดสอบเพียงวิธีเดียวในการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารใดๆ ได้ วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ทดสอบ มีดังนี้

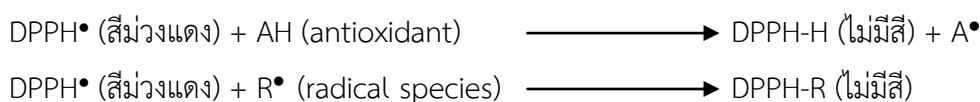
1. ABTS free radical scavenging method

ABTS⁺ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก เกิดจากสาร ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) ถูกออกซิไดส์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ใทกลายเป็น ABTS^{•+} (อนุมูลอิสระ) ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีน้ำเงินแกมเขียว ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้ทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ อัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้ (Landrault *et al.*, 2001).



2. DPPH radical scavenging method

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrozyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต มีหลักการคือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน จะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียร เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสี หรือมีสีจางลง ซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul *et al.*, 2007) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้



สุภาวดี ทรรศิรีไพบุลย์ (2550) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยวิธีทางเคมีและใช้เอนไซม์ พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อย และจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการการย่อยและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีแนวโน้มให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

Zhang และคณะ (2009) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จากเอนโดสเปิร์มของข้าวมีกิจกรรมในการจับอนุมูลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้เทียบเท่ากับกิจกรรมของ α -Tocopherol และยังสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (Auto oxidation ในระบบจำลอง Linoleic acid ได้ ร้อยละ 82.09 ซึ่งใกล้เคียงกับกิจกรรมการยับยั้งของ α -Tocopherol ที่ยับยั้งได้ร้อยละ 86.35 นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากเอนโดสเปิร์มของข้าวสามารถจับโลหะในรูป Ferrous ion ได้ถึง 1000 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

Tang และคณะ (2009) ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากเมล็ด Buckwheat ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น (ร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 15) และสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันเนื่องจาก Linoleic acid peroxide ได้ดี

นอกจากนี้พบว่าปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ Polyphenol ที่สูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นนอกจากจะให้ผลดีในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังต้องมีคุณค่าทางโภชนาการและมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีอีกด้วย

Nalinanon และคณะ (2011) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์เปปซินที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 มีกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในรูป ABTS และ DPPH ได้สูงที่สุด ส่วนกิจกรรมการจับไอออนโลหะจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับการย่อย และเมื่อทำการแยกเปปไทด์โดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography พบว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.3 kDa มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด

ปัจจุบันนี้มีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดพืชมากขึ้นโดยเฉพาะจากเมล็ดพืชน้ำมัน จึงทำให้มีงานวิจัยที่มุ่งศึกษาถึงผลและประโยชน์ในเชิงสุขภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตมากขึ้น (Zhu *et al.*, 2006; Chabanon *et al.*, 2007; Yoshie-Stark *et al.*, 2008) ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนไฮโดรไลเสตช่วยลดความดันผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตต่อการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตต่อต้านภาวะคลอเลสเทอรอลสูงและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Yoshie-Stark and Wasche, 2004 ; Horiguchi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005, 2007, 2008) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่เหมาะสมจะนำมาเป็นองค์ประกอบในอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งได้รับความสนใจเป็นพิเศษเพราะสามารถที่จะนำมาทดแทนสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบสังเคราะห์ได้ อย่างเช่น BHA, BHT และ TBHQ ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ (Vařtag *et al.*, 2010)

เยาวภา เจริญศิริลากุล (2549) ศึกษากิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาหูฉลาม (*Decapterus maruadsi*) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 20, 40 และ 60 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีประสิทธิภาพการจับกับอนุมูลอิสระ (DPPH^{*}) และ Reducing power สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแต่มีประสิทธิภาพการจับกับโลหะ (Fe²⁺) ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากเนื้อปลาหูฉลามซึ่งผ่านการกำจัดไขมันมีระดับการย่อยสลายสูงถึงร้อยละ 60 มีประสิทธิภาพการจับกับอนุมูลอิสระ (DPPH^{*}) และ Reducing power สูงสุด ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากเนื้อปลาที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดไขมันที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 มีประสิทธิภาพการจับกับโลหะ (Fe²⁺) ได้ดี ดังนั้นชนิดของเอนไซม์โปรตีนเนสระดับการย่อยสลาย รวมทั้งการกำจัดไขมันของเนื้อปลาก่อนการย่อยสลายมีผลต่อกิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

Peña-Ramos และ Xiong (2003) นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Crymotrypsin มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่าน

การย่อย พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอิน (Conjugated dienes) และการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ด้วยการทดสอบด้วยวิธี TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Crymotrypsin

Zhu และคณะ (2006) ทำการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากจมูกข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสเสตจากจมูกข้าวสาลีที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1500 Da มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดีใกล้เคียงกับ α -Tocopherol และที่ปริมาณ 1.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากจมูกข้าวสาลี จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีเทียบเท่า BHT (Butylated hydroxytoluene)

Li และคณะ (2008) ศึกษาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วลูกไก่ โดยคัดแยกเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ได้ด้วยวิธี Gel filtration เป็น 4 ส่วน (Fraction) คือ Fraction 1, Fraction 2, Fraction 3 และ Fraction 4 จากนั้น เมื่อนำมาวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Inhibition of linoleic acid autoxidation) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical-scavenging activity), วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical-scavenging activity), วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรูปแบบซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical-scavenging activity) พบว่าโปรตีนถั่วลูกไก่ไฮโดรไลสเสต จาก Fraction 4 มีสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจากกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีใกล้เคียงกับสาร α -tocopherol โดยมีระดับการยับยั้งร้อยละ 81.13 และร้อยละ 83.66 ตามลำดับ แต่มีระดับการยับยั้งน้อยกว่าสาร Butylated hydroxytoluene หรือ BHT ซึ่งเท่ากับร้อยละ 99.71 เมื่อวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดซูเปอร์ออกไซด์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วลูกไก่จาก Fraction 4 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุดตามลำดับ

Chanput และคณะ (2009) ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจากข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าวพบว่า โปรตีนข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลสเสตโดยใช้เอนไซม์เปปซินร่วมกับทริปซินมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสเสต นอกจากนี้จากการแยกชนิดโปรตีนรำข้าวทั้งหมด 4 ชนิด คืออัลบูมิน (Albumin), กลอบบูลิน (Globulin), โพรลามิน (Prolamin) และ กลูเทลิน (Glutelin) พบว่าโปรตีนชนิดกลอบบูลินมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบจำลองกรดลิโนเลอิกได้ดีที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์เฟอริก (Fe^{3+}) ของโปรตีนข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าวพบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดที่ผ่านการไฮโดรไลสเสตมีความสามารถในการรีดิวส์ปริมาณเฟอริก (Fe^{3+}) ให้เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของเฟอรัส (Fe^{2+}) ได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสเสต

Vaštag และคณะ (2010) ศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนเมล็ดฟักทองที่ผ่านการแยกน้ำมันออกและตรวจสอบความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) พบว่า การผลิตโปรตีนเมล็ดฟักทองไฮโดรไลเซตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนเท่ากับ 4.1 (HUT/มิลลิกรัม) ให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด

ฤทธิ์ต้านจุลชีพ งานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นพบน้อยกว่างานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากโปรตีนบางชนิดเช่น โปรตีนนมและโปรตีนไข่มีความสามารถในการต้านจุลชีพได้

Daoud และคณะ (2005) พบว่าเปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Bovine haemoglobin ที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์เปปซินที่ระดับการย่อยต่างๆ ภายหลังจากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) มีกิจกรรมการยับยั้งจุลชีพได้ 9 สายพันธุ์ โดยมีแกรมบวก มี 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus* และ *Staphylococcus simulans* และแกรมลบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* และ *Salmonella* Enteritidis

Salampessy และคณะ (2010) ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของเปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จากกล้ามเนื้อปลาหัว โดยใช้เอนไซม์ Bromelain พบว่ามีเปปไทด์จำนวน 2 fraction ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่เปปไทด์ fraction 12 ซึ่งมีค่า Minimum inhibition concentration (MIC) เท่ากับ 4.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และเปปไทด์ fraction 9 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้เพียงชนิดเดียว และมีค่า MIC เท่ากับ 5.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งพันธุ์สงขลา 1 ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซื้อมาจากตลาดสดในจังหวัดปัตตานี

1.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี

- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt; ABTS (Sigma-Aldrich, Germany)
- 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl; DPPH (Sigma-Aldrich, Germany)
- 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid; TNBS (Sigma, Germany)
- 3-(2-Pyridyl) - 5,6 - diphenyl- 1,2,4 - triazine - 4',4'', disulfonic acid sodium salt; Ferrozine (Sigma-Aldrich, USA)
- (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Tolox (Sigma-Aldrich, Germany)
- Bovine serum albumin; BSA (Fluka, Switzerland)
- Ethyl alcohol; C₂H₅OH (Merck Finechem, Australia)
- Folin and Ciocalteu Phenol Reagent (2.0 Normal) (LOBAL Chemie, India)
- Hydrochloric acid; HCl (J.T. Baker, USA)
- Iron (II) chloride tetrahydrate; Ferrous chloride (Sigma-Aldrich, Germany)
- L- 2 - Amino - 4 - methyl pentanoic acid; L-leucine (HIMEDIA, India)
- Methyl alcohol; CH₃OH (J.T. Baker, USA)
- Potassium persulfate; K₂S₂O₈ (Ajax Finechem, Australia)
- Sodium chloride; NaCl (Ajax Finechem, Australia)
- Sodium hydroxide; NaOH (Labscan Asia, Thailand)
- Sodium lauryl sulphate; SDS (LOBAL Chemie, India)
- Sodium sulfite; Na₂SO₃ (Ajax Finechem, Australia)
- Trichloromethane; CHCl₃ (Labscan Asia, Thailand)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Agar (HIMEDIA, India)
- Muller-Hinton broth (HIMEDIA, India)
- Nutrient broth (HIMEDIA, India)

1.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรค 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 1327, *Salmonella* Typhimurium DMST 562, *Staphylococcus aureus* DMST 8840 และ *Vibrio cholerae* non O1/non O139 DMST 2873 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (Department of Medical Sciences Thailand: DMST)

1.4 อุปกรณ์

Instrument	Model	Company/Country
Autoclave	SX-500	Tomy, Tokyo, Japan
Balance (2 digits)	BP2100S	Sartorius, Germany
Balance (4 digits)	LA230S	Sartorius, Germany
Bench Top Refrigerated Centrifuge	HARRIER 15/80	Sanyo, Japan
Centrifuge	CR22GIII	Hitachi, Japan
CIE Colorimeter	ColorFlex	Hunterlab, USA
Freeze dryer	FD8-Cool safe Advance	Scanvac, Denmark
Hot air oven	D-6450	Heraeus Hanau, Germany
Hotplate stirrer	002278	Fisher scientific, UK
Incubator	BD115	Binder, Germany
Laminar air flow cabinet	HB2448	Allerad, Denmark
Milling	Cyclotec TM 1093	Foss, Sweden
pH meter	FEP20	Mettler Toledo, Switzerland
Protein digestion set	TR	Gerhardt, Germany
Protein distillation set	VAP1	Gerhardt, Germany
Shaker incubator	LSI-5002M	Daihan Lab Tech, Korea
Sieve shaker	AS 200 basic	Retsch, Germany
Soxhlet distillatory	306 M	Gerhardt, Germany

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมแป้งถั่วหรั่ง และการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งถั่วหรั่ง

เตรียมแป้งถั่วหรั่ง โดยนำเมล็ดถั่วหรั่งล้างน้ำให้สะอาดแล้วแช่น้ำสะอาดทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง แกะเปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงออก อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเมล็ดถั่วหรั่งที่อบแล้วบดด้วยเครื่องบดแห้งจนละเอียดเป็นผงแป้ง ร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 60 เมส เก็บแป้งถั่วหรั่งที่ได้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงแดดและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Lawal *et al.*, 2007)

สกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่ง เริ่มจากนำแป้งถั่วหรั่งสกัดแยกไขมันออกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform : Methanol (อัตราส่วน 9:1) โดยผสมแป้งถั่วหรั่งกับตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำตะกอนที่ได้ไปจัดตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator (ดัดแปลงจาก Sittiwat and Narissara, 2000)

ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก โดยนำแป้งถั่วหรั่งที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนี้ ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000) ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Soxhlet method (AOAC, 2000) ปริมาณความชื้น ด้วยวิธี Air Oven Method (AOAC, 2000) ปริมาณเยื่อใยด้วยวิธีวิเคราะห์ Crude fiber (AOAC, 2000) และปริมาณเถ้าด้วยวิธี Furnace Method (AOAC, 2000) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก

2.2 การผลิตโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น

การสกัดโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว (ปริมาณของแป้งที่ใช้สกัดแต่ละครั้งประมาณ 250 กรัม) เติมน้ำกลั่น (DI) ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 10 โดยใช้ 1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ความเร็วรอบ 9000 g ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 4.5 ด้วย 1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 g ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้ (ดัดแปลงจาก Jamdar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008) ละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 10 ปริมาณ/ปริมาตร (w/v) ปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเท่ากับ 7 กวนสารละลายอย่างต่อเนื่อง ทำแห้งสารละลายด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อให้ได้โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นในรูปผง เรียกตัวอย่างว่าโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (Bambara groundnut protein concentrate; BPC)

2.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่ง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นโดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ (เอนไซม์อัลคาเลส และฟลาโวไซม์) เพื่อกำหนดระดับการย่อยสลายโปรตีนที่ระดับการย่อย

สลายร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่เตรียมได้ โดยเตรียมเป็นสารละลายโปรตีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร จากโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.3.1.2 ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้เท่ากับ 8 หรือ 7 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือฟลาโวไซม์ตามลำดับ บ่มสารละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์อัลคาเลส หรือบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยเติมเอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ ร้อยละ 1 และ 3 ปริมาณ/ปริมาตร บ่มสารละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิพร้อมเขย่าสารละลายด้วยความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที (rpm) เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ณ เวลา 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 และ 360 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายในน้ำร้อน อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ดัดแปลงจาก Jamda *et al.*, 2010) นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysis; DH) ด้วยวิธีการวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระโดยการทำปฏิกิริยากับ TNBS (Benjakul and Morrissey, 1997) รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลาย (%) ของโปรตีนกับเวลา (นาที)

ศึกษาผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีน เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร โดยใช้สภาวะการย่อยสลาย (พีเอชของสารละลายและอุณหภูมิในการบ่ม) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ตามวิธีการทดลองก่อนหน้านี้นี้ แต่เติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายในสภาวะการย่อยสลายที่กำหนดเป็นระยะเวลา 360 นาที เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายโปรตีนในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปตรวจสอบระดับการย่อยสลาย (% DH) เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 3.3.2.1 รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมฐาน 10 (\log_{10}) ของความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้กับระดับการย่อยสลายของโปรตีน (%) วิเคราะห์หาสมการเชิงเส้นจากกราฟความสัมพันธ์

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ ทำได้โดยคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องใช้สำหรับการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสมการเชิงเส้น เตรียมโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตให้ได้ระดับการย่อยสลายต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ จากนั้นทำแห้งสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตในรูปผง เรียกว่า โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นไฮโดรไลเสต (Bambara groundnut protein concentrate hydrolysate; BPCH) (ดัดแปลงจาก Klompong *et al.*, 2007) กำหนดให้ BPCH-A คือโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและ BPCH-F คือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

2.4 การตรวจสอบระดับการย่อยของโปรตีน (Degree of hydrolysis; DH)

ตรวจสอบระดับการย่อยโปรตีน (DH) ด้วยวิธีการวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระด้วยการทำปฏิกิริยากับ TNBS โดยการนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (125 ไมโครลิตร) เติม phosphate buffer เข้มข้น 0.2 โมลล์ (M) (pH 8.2) จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และเติม 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย TNBS เข้มข้นร้อยละ 0.01 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ในที่มืด) หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Sodium sulfite เข้มข้น 0.1 โมลล์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ α -amino acid ที่ได้อยู่ในรูปของแอลลูซีน (L-leucine) จากนั้นคำนวณระดับ DH โดยใช้สูตร (Benjakul and Morrissey, 1997)

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \times 100$$

L_t	=	ปริมาณ α - amino acid ที่เวลา t
L_0	=	ปริมาณ α - amino acid เริ่มต้น
L_{max}	=	ปริมาณ α - amino acid หลังจากย่อยโปรตีนด้วย 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโน

ซึ่งตัวอย่างที่บดละเอียดให้มีปริมาณโปรตีน 100 มิลลิกรัม ใส่ใน Bombelroll tube ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม 6 N HCl จนครบ 50 มิลลิลิตร ปิดให้สนิทแล้วนำไปย่อย จากนั้นตั้งทิ้งให้เย็น นำ hydrolysate 2.5 มิลลิลิตร มาระเหยกรดเกลือออกด้วยเครื่อง Vacuum Rotary Evaporator จนแห้ง ละลายตะกอนที่เหลือด้วย Sodium citrate buffer pH 2.2 จนครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกรอง hydrolysate ที่ได้ก่อนนำสารละลายมาวิเคราะห์หากรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino Analyzer (Sparkman *et al.*, 1958)

2.6 การวิเคราะห์สารต้านโภชนาการ

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด วิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีการของ Slinkard และ Singleton (1977) และ Rafat และคณะ (2010) ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่าง ทำโดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่อง shaker incubator ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง (whatman No. 5) นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ได้ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin – Ciocalteu ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1600 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง

Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาทีในที่มืดที่ แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV – Visible spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบลนด์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงเป็นค่าของกรดแกลลิกเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

การวิเคราะห์ทริปซินอินฮิบิเตอร์ การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน จะใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้นในการวิเคราะห์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์วัดโดยใช้สารสกัดจากถั่วหรั่ง โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ ชั่งแป้งถั่วหรั่ง 5 กรัม เติมน้ำละลาย 0.05 โมลล โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปเจือจางโดยให้มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินระหว่างร้อยละ 40 และ 60 หนึ่งหน่วยของทริปซินหมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้น 0.01 ที่ 280 นาโนเมตร ในเวลา 20 นาที สำหรับการเกิดปฏิกิริยาของตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร และ Trypsin Inhibitory Activity (TIA) เป็นหน่วยของการยับยั้งการทำงานของทริปซิน โดยแสดงผลเป็นหน่วยต่อน้ำหนักแห้ง (Ramakrishna *et al.*, 2006)

การวิเคราะห์แทนนิน ชั่งตัวอย่างหนัก 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำละลายอะซิโตน (acetone) ร้อยละ 70 ปริมาตร/ปริมาตร (v/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, สารละลาย *n*-butanol-HCl (95 : 5, ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 3 มิลลิลิตร และเติม 0.1 มิลลิลิตร ferric reagent (สารละลาย ammonium sulfater ferric ใน 2 นอร์มอล HCl ร้อยละ 2) ปิดปากหลอดด้วยกระจกใช้ป้องกันความร้อน และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเหวี่ยงแยกแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Ramakrishna *et al.*, 2006)

2.7 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต โดยตรวจสอบสมบัติต่างๆ ดังนี้

- สมบัติการละลาย (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)
- สมบัติการเกิดฟอง (ดัดแปลงจาก Shahidi *et al.*, 1995)

วิเคราะห์ค่าความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming expansion; FE) และวิเคราะห์ค่าความคงตัวของฟอง (Foam stability; FS)

- สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella, 1978)

วิเคราะห์ค่าดัชนีความสามารถในการอิมัลชัน (Emulsion ability index; EAI) และวิเคราะห์ค่าดัชนีค่าความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability index; ESI)

- สมบัติการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อน (ดัดแปลงจาก La-ongdao *et al.*, 2011)

รายละเอียดของวิธีวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan' s New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.8 การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS radical scavenging activity ตามวิธีของ Re *et al.* (1999)
- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity ตามวิธีของ Shimada *et al.* (1992)
- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Metal ions chelating activity ตามวิธีของ Decker and Welch (1990)

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ค วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DNMP) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

Disc-diffusion assay (Jorgensen *et al.*, 1999) นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตมากรองด้วย 0.45 µm Milipore filter จากนั้นหยดสารละลาย 20 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ปล่อยให้แห้ง โดยมีตัวควบคุมคือ สารละลายแอสท็อกซอลร้อยละ 95 (20 ไมโครลิตร/disc) และ ampicillin (20 ไมโครกรัม/disc) เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบได้แก่ *Bacillus cereus* C1113, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* O157:H7 DSMZ 12473 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 โดยเลี้ยงใน Nutrient broth (NB) และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ก้านสำลี (Cotton swab) จุ่มเชื้อแล้วกระจาย (spread) ลงบน Mueller hinton agar (MHA) แล้ววาง paper disc ที่อาบด้วยสารละลายที่เตรียมไว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

Broth dilution test (Jorgensen *et al.*, 1999) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตจากการทดสอบด้วย disc-diffusion assay จะถูกนำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC และ MBC ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธี broth dilution method ดังนี้ นำสารละลายมาทำการเจือจางเป็นลำดับแบบ 2 เท่า (2-fold serial dilution) เติมน้ำในแต่ละหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร และหลอดควบคุมเติมน้ำสารละลายแอสท็อกซอลร้อยละ 95 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อที่เจือจาง 200 เท่าจากความขุ่นที่เท่ากับ McFarland No. 0.5 ลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทุกหลอด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผล โดยหลอดแรกที่ใสเป็น MIC จากนั้นเปิด เชื้อจากหลอดที่ใส 0.01 มิลลิลิตร กระจายด้วยแท่งแก้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โดยถ้าเชื้อขึ้นมากกว่า 5 โคโลนี ถือว่าความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ไม่ถือว่าเป็น MBC แต่ถ้าเชื้อขึ้นน้อยกว่า 5 โคโลนี ถือว่าความเข้มข้นนั้นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เป็นค่า MBC

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสมปรีบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window Version 10

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่ง ไฮโดรไลเสต มีผลการศึกษาประกอบด้วย (1) องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate composition) ของวัตถุดิบ ได้แก่ แป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก (2) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (4) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต (5) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

3.1 การศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate composition) ของวัตถุดิบแป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก

การศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่งและแป้งถั่วหรั่งที่ผ่านการสกัดไขมันออก แสดงผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 54.12 (ร้อยละ 60.67 โดยน้ำหนักแห้ง) โปรตีนร้อยละ 17.43 (ร้อยละ 19.54 โดยน้ำหนักแห้ง) และไขมันร้อยละ 13.18 (ร้อยละ 14.77 โดยน้ำหนักแห้ง) สอดคล้องกับการรายงานของ Yusuf และคณะ (2008) และกรมวิชาการเกษตร (2555) ที่พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 58-61, 15-19 และ 6-8 ตามลำดับ จากผลการรายงานของ Duke (1986) และ Belitz และคณะ (2009) พบว่าโปรตีนในแป้งถั่วหรั่งมีปริมาณต่ำกว่าถั่วลิสงและถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 31 และ 41 ตามลำดับ แต่พบว่าแป้งถั่วหรั่งมีปริมาณโปรตีนสูงใกล้เคียงกับแป้งถั่วเขียว ที่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนประมาณร้อยละ 19 แป้งถั่วหรั่งจึงถือเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีนอาหารจากพืชอีกแหล่งหนึ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเอทานอล (อัตราส่วน 9:1) พบว่าสามารถกำจัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งได้ประมาณร้อยละ 50 (ลดลงจากร้อยละ 14.77 เหลือเพียงร้อยละ 7.62 โดยน้ำหนักแห้ง) และพบว่าแป้งถั่วหรั่งมีโปรตีนเข้มข้นขึ้นจากร้อยละ 19.54 เป็นร้อยละ 39.15 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ปริมาณความชื้น ไขมัน เถ้าและคาร์โบไฮเดรตมีค่าลดลง เนื่องจากการสกัดแยกไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งทำให้แป้งถั่วหรั่งมีปริมาณโปรตีนเข้มข้นมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเตรียมแป้งถั่วหรั่งโดยสกัดไขมันออกจากแป้งถั่วหรั่งก่อนการสกัดแยกโปรตีนเพื่อผลิตเป็นโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น

ตารางที่ 8 องค์ประกอบโดยประมาณของแป้งถั่วหรั่ง และแป้งถั่วหรั่งที่สกัดไขมันออก

Compositions	BF	DBF
Moisture	10.79 ± 0.13 ^{b†}	8.97 ± 1.38 ^{a†}
Protein	17.43 ± 0.23 ^{*a}	35.64 ± 0.20 ^{*b}
	(19.54 ± 0.15) ^{**a}	(39.15 ± 0.22) ^{**b}
Fat	13.18 ± 1.14 ^{*b}	6.94 ± 0.62 ^{*a}
	(14.77 ± 0.26) ^{**b}	(7.62 ± 0.68) ^{**a}
Ash	4.48 ± 0.20 ^{*a}	4.32 ± 0.14 ^{*a}
	(5.02 ± 0.22) ^{**a}	(19.54 ± 0.15) ^{**a}
Total carbohydrate [#]	54.12 ± 0.43 ^{*b}	44.13 ± 0.59 ^{*a}
	(60.67 ± 0.48) ^{**b}	(48.48 ± 0.65) ^{**a}
Crude fiber	3.27 ± 0.10 ^{*b}	2.23 ± 0.29 ^{*a}
	(3.67 ± 0.11) ^{**b}	(2.45 ± 0.32) ^{**a}

* Wet wt. basis (%)

** Dry wt. basis (%)

Total carbohydrate is calculated by difference

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

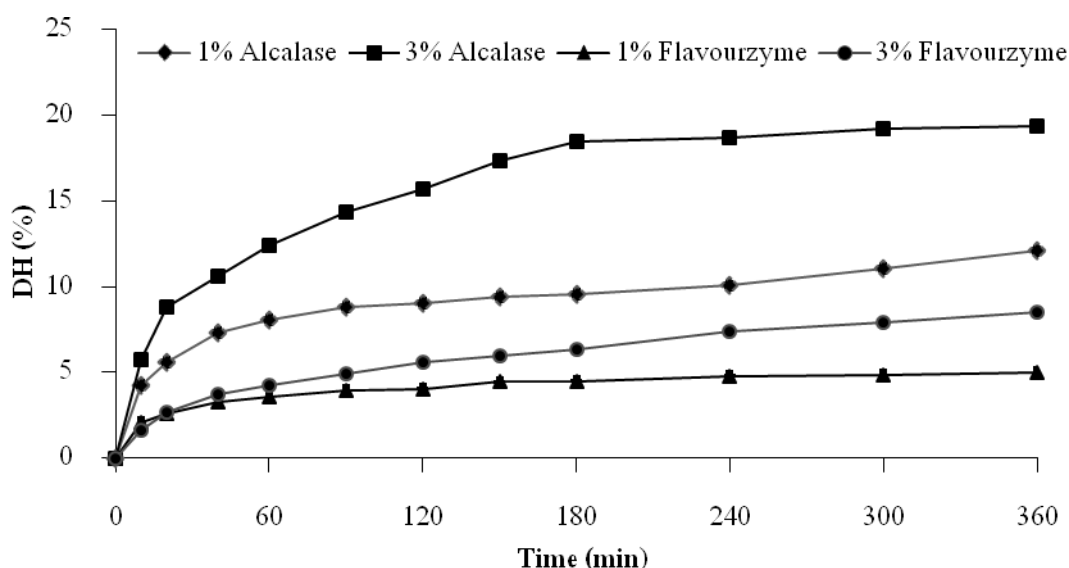
3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

3.2.1 ผลของระยะเวลาต่อระดับการย่อยสลาย (DH) ของโปรตีน

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 พบว่าโปรตีนมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และมีแนวโน้มคงที่ อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนมีระดับการย่อยสลายสูงสุดเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนที่ระยะเวลา 360 นาที (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu *et al.* (2006)

ที่พบว่าการย่อยสลายโปรตีนจากจมูกข้าวสาลีด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรกและมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 25 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 360 นาที เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการย่อยสลายเดียวกัน พบว่าการย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 1 มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (เข้มข้นร้อยละ 1 และ 3) (ภาพที่ 3)

ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น ผู้วิจัยเลือกระยะเวลาที่เอนไซม์ทั้งสองชนิด (อัลคาเลส และฟลาโวไซม์) มีระดับการย่อยสลายสูงสุด (360 นาที) ที่ทุกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ ตั้งแต่ระดับต่ำจนถึงสูง (ร้อยละ 0.5 จนถึง ร้อยละ 10) ที่สามารถย่อยสลาย BPC ให้มีระดับการย่อยสลายสูงสุดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

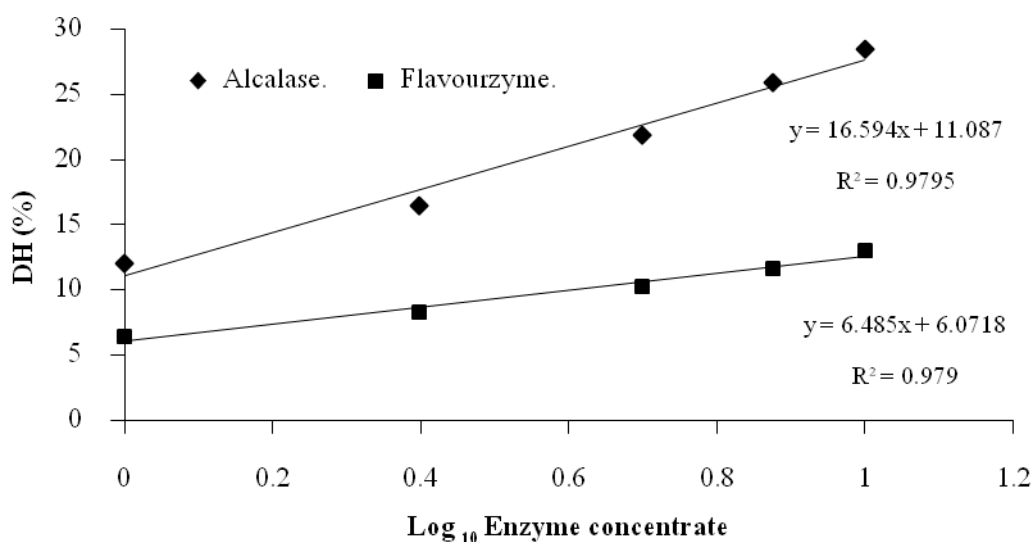


ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงระดับการย่อยสลาย (DH) ของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของเอนไซม์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน) (ข้อมูลมาจากการดำเนินการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.2.2 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 (%) พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์เส้นตรงและมีสมการเชิงเส้นดังแสดงในภาพที่ 4 จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองได้ดีกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์

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 (กรัม : 100 กรัมโปรตีน) และร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าต้องใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นปริมาณ 0.68, 4.03 และ 23.80 (กรัม : 100 กรัมโปรตีน) โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จะถูกนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่และการเป็นสารต้านออกซิเดชันในการศึกษาขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง \log_{10} ความเข้มข้นของเอนไซม์และระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายดำเนินภายใต้ พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและพีเอช 7 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

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

จากการสกัดแยกโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่งด้วยวิธีตกตะกอน ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point; pi) แล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในรูปผง ได้เป็น BPC พบว่า BPC ที่ผลิตได้มีปริมาณผลผลิต (Production yield) ของโปรตีนผงร้อยละ 11.53 โดยน้ำหนักโปรตีนผงต่อน้ำหนักแป้งถั่วหรั่งเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีนร้อยละ

ละ 66.83 ซึ่งเป็นปริมาณโปรตีนที่สูงในระดับโปรตีนเข้มข้น (Protein concentrate) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 29.23 และไขมันร้อยละ 2.28 ดังแสดงในตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตของโปรตีน พบว่าการศึกษานี้มีปริมาณผลผลิตน้อยกว่าเมื่อเปรียบการศึกษาของ Mune และคณะ (2011) ที่สกัดแยกโปรตีนจากแป้งถั่วหรั่ง โดยใช้สภาวะต่างที่พีเอช 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 และคณะ (2003) พบว่าการสกัดโปรตีนจากถั่ว Australian sweet lupin ด้วยสภาวะต่าง (pH 8-9) แม้จะสามารถทำละลายโปรตีนได้ถึงร้อยละ 87 แต่สามารถสกัดแยกโปรตีนด้วยวิธีตกตะกอน ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (pH) ได้เพียงร้อยละ 59 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย

ผลการศึกษาคู่ประกอบโดยประมาณของ BPOCH-A และ BPOCH-F (ตารางที่ 9) พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มลดลง โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 64.47, 65.78 และ 62.72 สำหรับ BPOCH-A ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 55.89, 57.91 และ 45.57 สำหรับ BPOCH-F ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ให้มีระดับการย่อยสลายที่สูงขึ้นอาจมีผลต่อการลดปริมาณโปรตีนไนโตรเจนได้เล็กน้อย จากการศึกษาของ Sévestre และ Wen-shui (2006) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนเคซีนด้วยเอนไซม์โปรตามัก (Protamax) มีปริมาณโปรตีนไนโตรเจนลดลงจากร้อยละ 85.89 เป็นร้อยละ 76.67 เมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 20 ซึ่งผู้วิจัยพิจารณาผลการทดลองว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non protein nitrogen) จากผลการทดลองครั้งนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนของ BPOCH-F จะเห็นว่า BPOCH-F ทั้ง 3 ระดับการย่อยสลาย มีปริมาณโปรตีนไนโตรเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 15 เนื่องจากในการศึกษานี้ทำการผลิต BPOCH-F โดยการเติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปแบบเม็ด (Granule in form) และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนไนโตรเจนของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปแบบเม็ด พบว่ามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 5.95 ซึ่งอีกร้อยละ 94.05 ขององค์ประกอบอาจเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นสารช่วยในการยึดเกาะ (Binder agent) เมื่อเติมเอนไซม์ในรูปแบบเม็ดลงในระบบเพื่อย่อยสลายโปรตีนและทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผง จึงทำให้สัดส่วนของคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน) เพิ่มขึ้น ทำให้ BPOCH-F มีปริมาณโปรตีนต่ำลงเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น (เติมเอนไซม์มากขึ้น) โดยในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในรูปแบบเม็ด ปริมาณร้อยละ 0.68, 4.03 และ 23.81 (โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย) สำหรับการย่อยที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเท่ากับ ร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ จึงทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงเป็นสัดส่วนกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นดังกล่าว นอกจากนี้พบว่าปริมาณไขมันของ BPOCH-A และ BPOCH-F มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.76-3.77 และร้อยละ 1.03-3.62 ตามลำดับ โดย

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความแปรปรวนตามระดับการย่อยสลายของโปรตีน โดยที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 และ 10 สำหรับ BPCH-A และ BPCH-F ตามลำดับ มีไขมันปริมาณสูงสุด แต่จากรายงานวิจัยของ Jamdar และคณะ (2010) ที่ศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 10-40 พบว่าปริมาณไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตมักมีค่าลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการสูญเสียไปในขั้นตอนการย่อยสลาย และการเตรียมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตในรูปแบบผง ซึ่งจะเห็นว่า BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 30 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 และ 15 มีปริมาณไขมันต่ำกว่าของ BPC เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของ BPC BPCH-A และ BPCH-F พบว่าปริมาณเยื่อใยของโปรตีนทั้งสามชนิดมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในส่วนของปริมาณถ้าพบว่า BPCH-A และ BPCH-F มีปริมาณถ้ามากกว่า BPC ประมาณ 2 เท่า โดยพบปริมาณถ้าของ BPCH-A อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 4.09 - 4.58 และมีปริมาณถ้าของ BPCH-F อยู่ในช่วงร้อยละ 4.11 - 4.47 ทั้งนี้เป็นผลของปริมาณเกลือที่เกิดจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายโปรตีนถั่วหรั่งในขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีนก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 9 องค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (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 ± 0.84 ^{d,z†}	64.47 ± 0.90 ^b	65.78 ± 0.45 ^c	62.72 ± 0.41 ^a	55.89 ± 0.45 ^x	57.91 ± 1.40 ^y	45.57 ± 0.33 ^w
Fat	2.28 ± 0.21 ^{d,y}	1.56 ± 0.10 ^b	3.77 ± 0.20 ^c	0.76 ± 0.28 ^a	1.03 ± 0.04 ^w	3.62 ± 0.20 ^x	1.48 ± 0.07 ^x
Ash	1.66 ± 0.18 ^{a,w}	4.58 ± 0.31 ^d	4.25 ± 0.04 ^c	4.09 ± 0.06 ^b	4.33 ± 0.12 ^y	4.47 ± 0.22 ^z	4.11 ± 0.08 ^x
Total Carbohydrate [#]	30.23 ± 0.48 ^{c,w}	29.39 ± 0.81 ^b	26.20 ± 0.36 ^a	33.43 ± 0.24 ^d	38.75 ± 0.82 ^y	34.00 ± 0.36 ^x	48.84 ± 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 $p < 0.05$

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านโภชนาการในตัวอย่างโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือฟลาโวไซม์ (BPCH-F) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแทนนิน และปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณสารต้านโภชนาการ 2 ชนิด (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแทนนิน) สูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (BPC) โดยโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) อยู่ในช่วงระหว่าง 88.93 - 548.33 มิลลิกรัมGAE/กรัมโปรตีน สำหรับ BPCH-A และอยู่ในช่วงระหว่าง 328.56 - 598.93 มิลลิกรัมGAE/g protein สำหรับ BPCH-F และพบว่า BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน โดยแสดงเป็นค่าสมมูลของมิลลิกรัมของกรดแทนนินต่อกรัมโปรตีน พบว่าปริมาณแทนนินของทั้ง BPCH-A และ BPCH-F มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 6.03 - 8.42 มิลลิกรัมTAE/g protein และ 12.14 -15.51 มิลลิกรัมTAE/g protein ตามลำดับ สารแทนนินจัดเป็นสารยับยั้งการใช้ประโยชน์ของโปรตีน (Inhibitor) เนื่องจากแทนนินมีคุณสมบัติที่สามารถจับตัวกับโปรตีนได้อย่างเหนียวแน่น (Reed, 1995) โดยทั่วไปสารแทนนินจะเกาะกับโปรตีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Tannin-protein complex) และไม่ถูกย่อยในสภาพความเป็นกรดต่างภายในกระเพาะอาหาร หากร่างกายได้รับแทนนินในปริมาณมากก็จะส่งผลกระทบต่อไต จาก Material Safety Data Sheet (MSDS) ของ Tannic acid (Science Lab.com, online 7/02/56) พบว่าปริมาณแทนนินที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันเมื่อได้รับทางปาก โดยทำการทดลองในหนูมีปริมาณอยู่ที่ 2,260 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวของหนูหนึ่งกิโลกรัม และจากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่พบปริมาณแทนนินมากที่สุด คือโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีปริมาณแทนนินอยู่ที่ 15.51 มิลลิกรัมTAE/g protein ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับปริมาณที่จะก่อให้เกิดพิษ

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ในตัวอย่างทั้งหมด พบว่าไม่มีตัวอย่างใดมีทริปซินอินฮิบิเตอร์ ดังนั้นโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จึงมีความปลอดภัยต่อการบริโภคเป็นโปรตีนอาหาร เนื่องจากมีปริมาณสารต้านโภชนาการต่ำ

3.4 การศึกษาปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต (BPH) (ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPH-A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPH-F) และมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 และ 10 ตามลำดับ) แสดงในตารางที่ 10 พบว่าทั้ง BPC และ BPH มีปริมาณกรดอะมิโน glutamic acid, aspartic acid, lysine และ leucine สูงสุด คือ มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 20.09-28.65, 7.22-8.75, 8.72-9.84 และ 8.29-9.28 ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ Kone และคณะ (2011) ที่พบว่ากรดอะมิโนที่มีมาก 4 อันดับแรกในแป้งถั่วหรั่ง คือ glutamic acid, aspartic acid, leucine และ lysine โดยมีปริมาณเท่ากับ 1047, 735, 408 และ 403 มิลลิกรัม/g total nitrogen ตามลำดับ BPC และ

BPH มีกรดอะมิโนจำเป็น เป็นองค์ประกอบหลายชนิด ได้แก่ histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan และ valine โดยมีค่าสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นต่อกรดอะมิโนไม่จำเป็น (essential amino acid and non-essential amino acid ratio) เท่ากับ 0.70, 0.74 และ 0.64 สำหรับ BPC, BPCH-A และ BPCH-F ตามลำดับ และพบว่า BPC และ BPH มีกรดอะมิโนจำเป็นชนิด lysine และ leucine ปริมาณมาก คือ มีปริมาณอยู่ในช่วงร้อยละ 8.72-9.84 และ 8.29-9.28 ตามลำดับ แต่มีปริมาณ tryptophan และ methionine น้อย เท่ากับร้อยละ 0.23-0.75 และ 0.09-0.23 ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกันกับปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นในงานวิจัยของ Mune และคณะ (2011) และของพืชโดยทั่วไป เช่น ถั่วลูกไก่ และ lupin (El-Adawy *et al.*, 2001; Sanchez-Vioque *et al.*, 1999). BPC และ BPH มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นสูงกว่าระดับที่ FAO/WHO (1991) กำหนด (ตารางที่ 10) ยกเว้น tryptophan, threonine และ กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (total sulphur amino acids; methionine+cysteine) ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าที่ FAO/WHO กำหนด เมื่อพิจารณา BPH-A และ BPH-F พบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิด ได้แก่ tryptophan, methionine และ sulphur amino acid ต่ำกว่า BPC ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสูญเสียโปรตีนอัลบูมิน (albumin) ไปบางส่วนในระหว่างการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งจากการรายงานของ Chavan และคณะ (2001) พบว่าโปรตีนอัลบูมินจะมี cystine และ methionine เป็นองค์ประกอบอยู่มาก

ตารางที่ 10 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

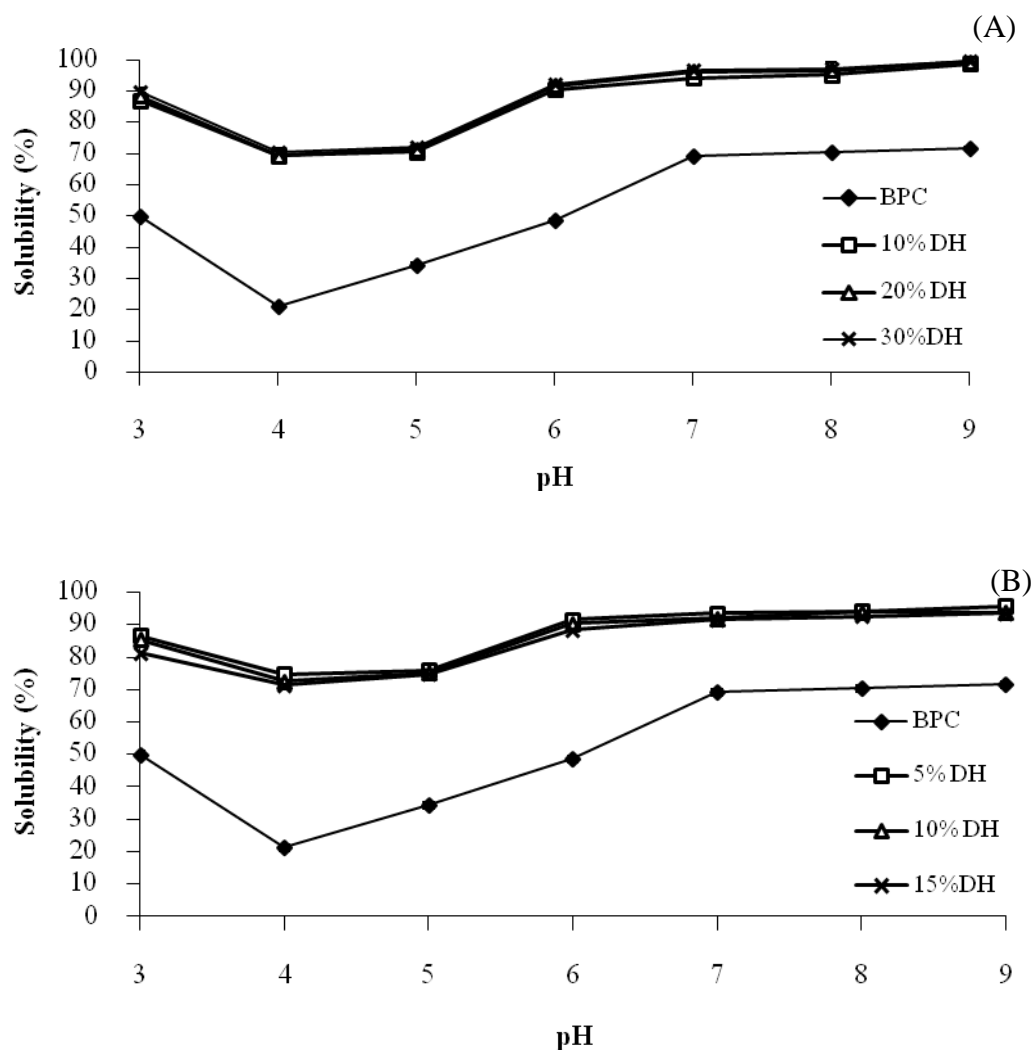
Amino acids	Content (g/ 100g)			
	BPC	BPH-A	BPH-F	FAO/WHO (1991)
Alanine	3.90	5.04	3.53	
Arginine	7.86	7.15	6.35	
Aspartic acid	8.75	8.31	7.22	
Cystine	0.06	0.00	0.00	
Glutamic acid	20.37	20.09	28.65	
Glycine	2.90	3.13	2.62	
Histidine *	6.00	4.93	4.24	1.90
Isoleucine *	3.96	4.63	3.95	2.80
Leucine *	8.29	9.28	8.35	6.60
Lysine *	8.72	9.33	9.84	5.80
Methionine *	0.23	0.09	0.13	
Phenylalanine *	6.03	5.68	5.76	
Proline	4.96	4.95	4.37	
Serine	4.68	4.36	2.69	
Threonine *	2.87	2.91	2.20	3.40
Tryptophan *	0.72	0.23	0.58	1.10
Tyrosine	5.25	4.49	5.37	
Valine *	4.45	5.40	4.14	3.50
Methionine+Cystine	0.29	0.09	0.13	2.5
Phenylalanine+Tyrosine	11.28	10.17	11.14	6.3
Total essential amino acids	41.26	42.47	39.20	33.9
Total non-essential amino acids	58.74	57.53	60.80	

* Essential amino acid

3.5 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต

3.5.1 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) ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 5A และ 5B พบว่าเมื่อพิจารณา BPC ซึ่งเป็นโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 20-60 ค่าการละลายของ BPC จะผันแปรไปตามค่าพีเอชของสารละลาย โดย BPC มีค่าการละลายต่ำสุดเมื่อพีเอชของสารละลายเท่ากับ 4 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่จุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีนจากพืชทั่วไป (pH 4-5) (Tsumura *et al.* 2005) และพบว่าค่าการละลายของ BPC เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายน้อยกว่าหรือมากกว่า 4 (ค่าพีเอชห่างจากจุดไอโซอิเล็กตริก) และมีค่าการละลายสูงสุดที่พีเอช 9 คือ มีค่าการละลายเท่ากับร้อยละ 71.59 การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถปรับปรุงการละลายของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นได้ พิจารณาจากค่าการละลายที่เพิ่มขึ้นของทั้ง BPCH-A และ BPCH-F โดยพบว่าทั้ง BPCH-A และ BPCH-F มีความสามารถในการละลายสูงกว่า BPC อย่างเห็นได้ชัด ในทุกระดับค่าพีเอชที่ทดสอบ (pH 3-9) BPCH-A และ BPCH-F มีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 87.10 - 99.75 และ 81.31 - 95.75 ตามลำดับ (ภาพที่ 5A และ 5B) โดยค่าการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะผันแปรไปตามพีเอชของสารละลายเช่นเดียวกับค่าการละลายของ BPC และพบว่าที่ pH เท่ากับ 4 การย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (BPCH-A และ BPCH-F) ในทุกระดับการย่อยสลาย สามารถปรับปรุงการละลายของโปรตีนให้สูงกว่าร้อยละ 70 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jamdar และคณะ (2010) ที่พบว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลาย สูงกว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลาย โดยมีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 86 - 100 เมื่อทำการทดสอบที่พีเอช 1-12 โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นหรือมีขนาดโมเลกุลเล็กจะส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีขนาดเล็กสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี ในขณะที่โปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จะมีขนาดใหญ่ มีความสามารถในการกระจายตัวในน้ำได้ต่ำ (Chobert *et al.*, 1988; Linder *et al.*, 1996; Gbogouri *et al.*, 2004) โมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดการคลายตัวเอากรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic amino acid) ออกมาได้มาก ส่งผลให้พื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนแสดงความมีขี้้วได้มากขึ้น โปรตีนจึงมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี (Sikorski, 1981) เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยสลายต่อค่าการละลายของโปรตีน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้นทั้ง BPCH-A และ BPCH-F มีค่าการละลายของโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 5A และ 5B) อาจเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมให้มีโครงสร้างของเปปไทด์ที่ได้มีความเป็นขี้้วมากขึ้นทำให้เปปไทด์จับกับน้ำได้ดีระดับการย่อยสลายของโปรตีนจึงไม่มีผลต่อความแตกต่างของโปรตีนมากนัก

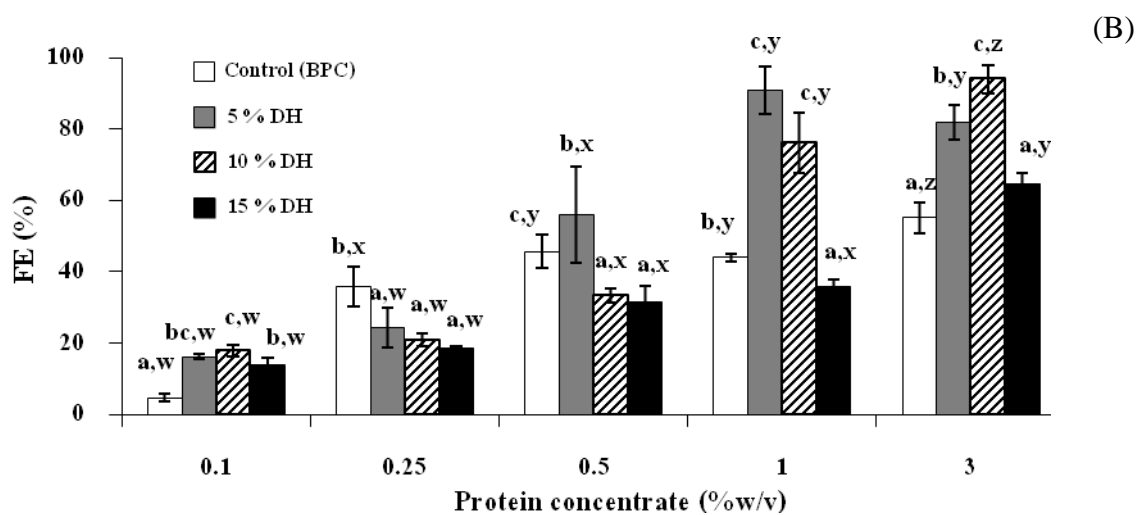
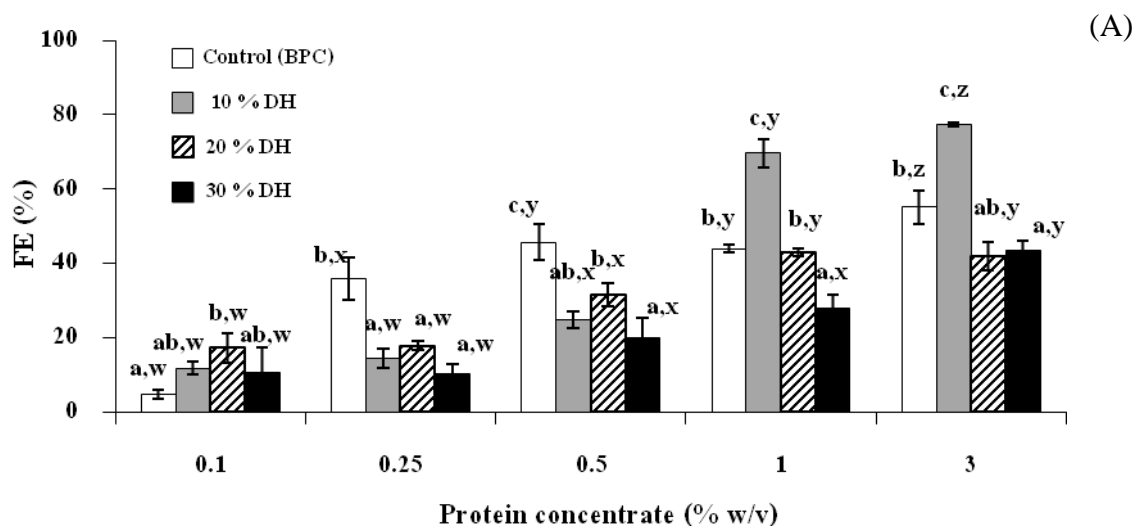


ภาพที่ 5 การละลายของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสดที่ย่อยสลายด้วย เอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพ A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพ B) ที่พีเอชต่างๆ (ข้อมูลเป็น ค่าเฉลี่ยมาจากการดำเนินการทดลอง 3 ครั้ง)

3.5.2 สมบัติการเกิดฟอง

3.5.2.1 ความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming expansion)

ผลการศึกษาความสามารถในการเกิดฟอง (FE) ของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ชนิดเอนไซม์ละ 3 ระดับการย่อยสลาย คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 5, 10 และ 15 สำหรับ BPCH-F เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Control; BPC) โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3 (w/v) พบว่าทั้งโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าความสามารถในการเกิดฟอง (FE) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น และมีค่า FE สูงสุดเมื่อใช้โปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับร้อยละ 3 ($p < 0.05$) (ภาพที่ 6A และ 6B) เมื่อพิจารณาผลของระดับการย่อยสลายร่วมกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ของโปรตีนไฮโดรไลเสตเปรียบเทียบกับ BPC ซึ่งเป็นโปรตีนเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย พบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับร้อยละ 1 และ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) BPCH-A ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 มีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่า BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 6A) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าการใช้ BPCH-A ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0.1 ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 มีค่าความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่า BPC ($p < 0.05$) ได้เช่นเดียวกัน แต่การใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และ 0.5 จะมีค่าความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 6A) 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 ($p < 0.05$) (ภาพที่ 6B)



ภาพที่ 6 ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพ A) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพ B) ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3

จากการศึกษาจะเห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ระดับการย่อยสลายต่ำๆ ได้แก่ ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 สำหรับ BPCH-A และร้อยละ 5 และ 10 สำหรับ BPCH-F มีความสามารถในการเกิดฟองที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ BPC ทั้งนี้มีปัจจัยภายใน (Internal factor) หลายอย่าง ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดฟองของโปรตีน เช่น ขนาดของโมเลกุลโปรตีน ลำดับของกรด อะมิโน ความมีขี้ของโปรตีน ปริมาณหมู่ไฮโดรโฟบิกของโปรตีน เป็นต้น (Kinsella, 1976) ซึ่งโปรตีนชนิด BPCH-A ที่ย่อยสลายร้อยละ 10 และ BPCH-F ที่ย่อยสลายร้อยละ 5 และ 10 มีความสามารถในการเกิดฟองที่ดีกว่า BPC อาจเนื่องจากมีเปปไทด์ที่สามารถละลายได้ดีในส่วนที่เป็นของเหลวจะสามารถแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศและจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำได้ดี แต่ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนในระดับที่สูงๆ เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้น โมเลกุลขนาดเล็กส่งผลให้โปรตีนขาดความสามารถในการจัดเรียงตัวบริเวณผิวหน้าของอากาศและน้ำ (Air-water interface) จึงไม่เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มฟองอากาศไว้ โปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ระดับการย่อยสลายสูงๆ จึงมีความสามารถในการเกิดฟองไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ระดับการย่อยสลายต่ำๆ ดังกล่าว สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nalinanon และคณะ (2011) ที่พบว่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากเนื้อปลาทรายแดงโมง หรือ Ornate threadfin bream ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินที่สกัดได้จากเครื่องในปลาโอแลบมีค่าความสามารถในการเกิดฟองลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 10 จากผลการศึกษานี้ พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลสเสตทั้ง BPCH-A และ BPCH-F ในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าร้อยละ 1 ไม่สามารถปรับปรุงค่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนได้ และมีค่าความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า BPC การเกิดฟองของโปรตีนเกิดจาก 3 กระบวนการ คือ 1) การเคลื่อนที่ (Transportation) 2) การซึมแทรก (Penetration) และ 3) การจัดเรียงตัวใหม่ (Reorganization) ของโมเลกุลโปรตีนที่พื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำโดยโปรตีนที่ดูดซับตรงบริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำในขณะที่มีการตีฟองอากาศได้เร็วมีการคลายตัว (Unfold) และจัดเรียงตัวกันใหม่บริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำได้ดี จึงแสดงค่าความสามารถในการเกิดฟองที่ดีกว่าโปรตีนที่ถูกดูดซับได้ช้าและโมเลกุลไม่คลายตัวบริเวณพื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำ (Damodaran and Paraf, 1997) ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีน และส่งผลต่อกระบวนการเกิดฟองโปรตีนดังกล่าว

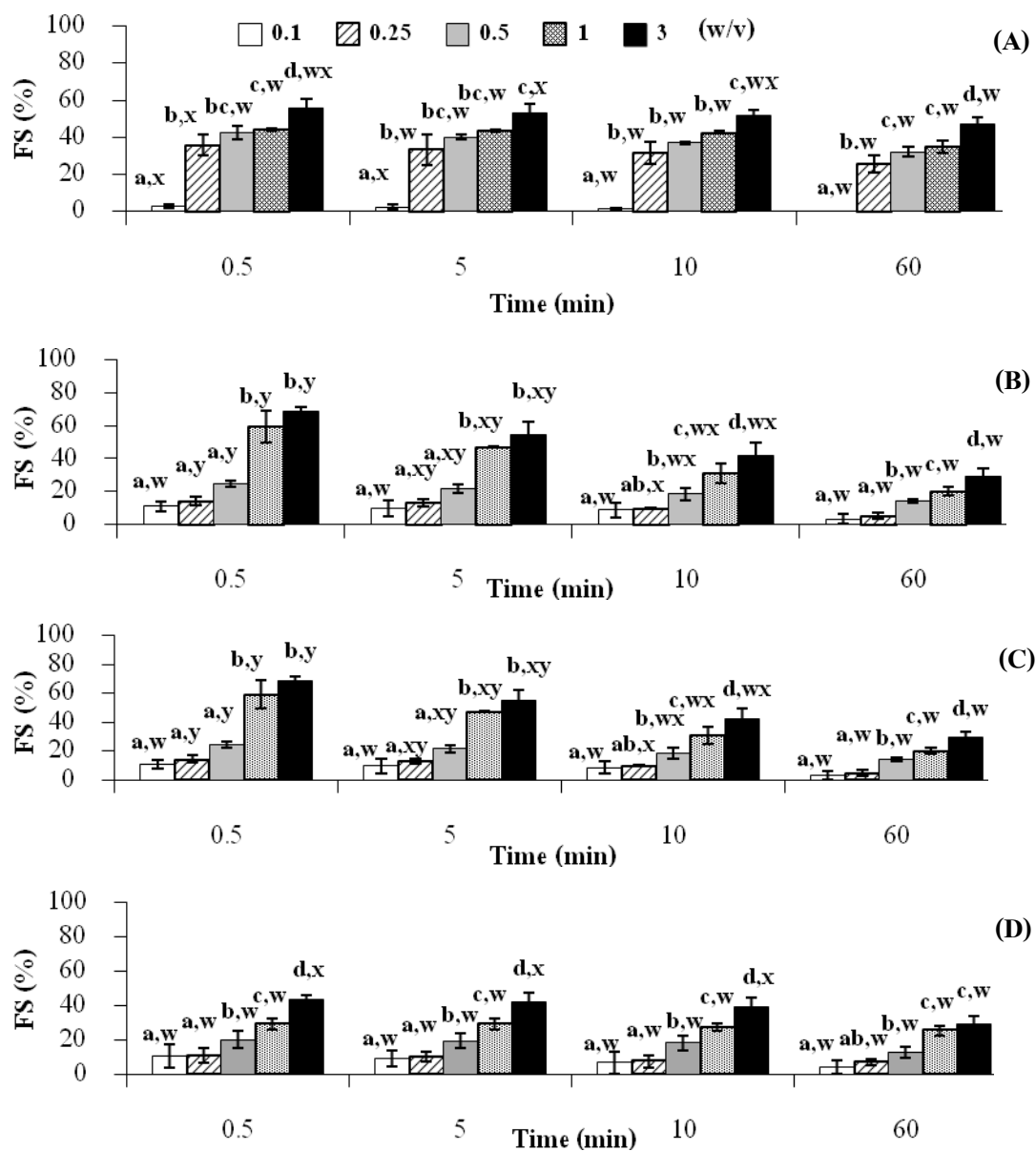
3.5.2.2 ความคงตัวของฟอง (Foaming stability)

ผลการศึกษาค่าความคงตัวของฟอง (FS) ของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลสเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพที่ 7B-7D) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพที่ 8B - 8D) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (Control; BPC) (ภาพที่ 7A หรือ 8A) โดยแปรระดับความเข้มข้นของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลสเสตที่ร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 3 (w/v) ตรวจสอบค่าความคงตัวของฟองในช่วงเวลา 0.5, 5, 10 และ 60 นาที พบว่า BPC มีค่า FS อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.18 ถึงร้อยละ 55.78 เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาที่ทดสอบเดียวกัน พบว่าค่า FS ของ BPC เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้นและมีค่า FS สูงสุดเมื่อใช้โปรตีนที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 3 เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPC มีค่า FS ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที แสดง

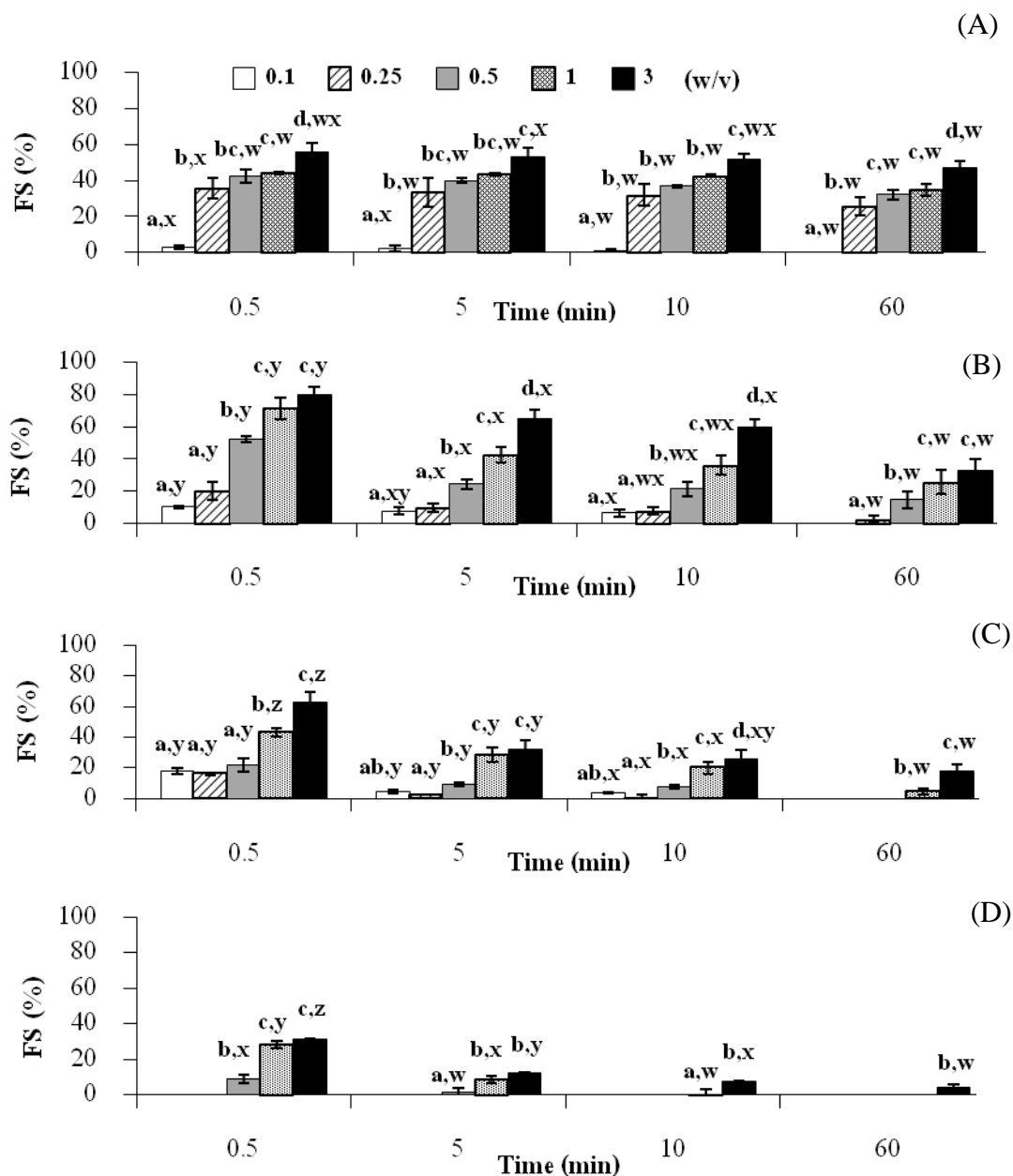
ถึงความสามารถในการคงตัวที่ดีของฟองโปรตีน (ภาพที่ 7A) เมื่อพิจารณาโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วย เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (BPCH-A และ BPCH-F) พบว่าค่า FS ของ BPCH-A ที่ทุกระดับการย่อยสลายของโปรตีน (DH ร้อยละ 10, 20 และ 30) ให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกับ BPC คือ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาที่ทดสอบ เดียวกัน พบว่าค่า FS ของ BPCH-A จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เพิ่มขึ้น และมีค่า FS สูงสุดเมื่อ ใช้โปรตีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-A มี ค่า FS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที แสดง ถึงความไม่คงตัวของฟองโปรตีน (ภาพที่ 7B, 7C หรือ 7D) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า FS ของ BPCH-A กับ BPC (ภาพที่ 7A) พบว่า BPCH-A มีแนวโน้มที่จะให้ค่าความคงตัวของฟองต่ำกว่า BPC ในทุกระดับความ เข้มข้นของโปรตีนที่ทดสอบ และพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่สูงขึ้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 30 จะมีแนวโน้มที่จะให้ค่าความคงตัวของฟองลดลง (เปรียบเทียบระหว่างภาพที่ 7B, 7C และ 7D)

เมื่อพิจารณาค่า FS ของ BPCH-F พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับ BPC และ BPCH-A คือเมื่อพิจารณาที่ช่วงระยะเวลาที่ทดสอบเดียวกัน พบว่า BPCH-F มีค่า FS สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีน ที่ใช้เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่า BPCH-F จะมีค่า FS ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่าง 0.5 ถึง 60 นาที เมื่อพิจารณาผล ของระดับการย่อยสลายของโปรตีน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นค่า FS ของ BPCH-F จะมี ค่าลดลง โดยพบว่าที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 15 มีค่า FS ต่ำสุด

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีความสามารถในการคงตัวของฟองต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กทำให้โปรตีน สูญเสียประสิทธิภาพในการห่อหุ้มฟองอากาศเอาไว้ จึงทำให้ฟองอากาศมีลักษณะเปราะและแตกได้ง่าย แต่ อย่างไรก็ตามพบว่า ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนต่างๆ (BPCH-A ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10, 20 และ 30 หรือ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10 และ 15) สามารถปรับปรุงความคงตัวของฟองโปรตีน ได้ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ให้สูงขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในระบบจะทำให้ ฟองอากาศที่ได้มีความแข็งแรง เนื่องจากฟิล์มโปรตีนที่ห่อหุ้มฟองอากาศมีความหนามากขึ้น และการเพิ่ม ปริมาณโปรตีนในระบบยังเป็นการเพิ่มความหนืด (Viscosity) ของวัฏภาคน้ำ (Aqueous phase) ซึ่งจะทำให้ ฟองที่เกิดขึ้นมีความคงตัวที่ดี (Phillips *et al.*, 1994)



ภาพที่ 7 ความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วย เอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ (A คือ BPC; B, C และ D คือ BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 10 20 และ 30 ตามลำดับ)



ภาพที่ 8 ความคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วย เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ต่างๆ (A คือ BPC; B, C และ D คือ BPCH-F ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ)

3.5.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ โพรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ผ่านย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ตารางที่ 11) หรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ตารางที่ 11) เปรียบเทียบกับโพรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (BPC) โดยแปรความเข้มข้นของโพรตีนที่ใช้ร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0 และ 3.0 (w/v) ค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโพรตีนแสดงด้วยค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying ability index; EAI) และค่าความเสถียรของอิมัลชันแสดงด้วยค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability index ; ESI) พบว่า BPC ซึ่งเป็นโพรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยสลายมีค่า EAI อยู่ในช่วง 17.23-31.94 m^2/g และจะมีค่า EAI ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรตีนที่ใช้สูงขึ้น 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 11) พบว่าค่า EAI ของ BPCH-A อยู่ในช่วง 3.34-57.85 m^2/g เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน พบว่าการใช้ BPCH-A ความเข้มข้นสูงจะให้ค่า EAI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และการใช้ BPCH-A ที่ความเข้มข้นของโพรตีนร้อยละ 0.1 มีค่า EAI สูงกว่าค่า EAI ของ BPC อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโพรตีนที่ใช้เท่ากัน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น BPCH-A จะมีค่า EAI ลดลง และมีค่าต่ำสุดที่ระดับการย่อยสลายของโพรตีนเท่ากับร้อยละ 30 ($p < 0.05$) ในด้านของค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) พบว่า BPCH-A มีค่า ESI อยู่ในช่วงระหว่าง 19.70-87.14 นาที เมื่อพิจารณาที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน พบว่า ESI มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ BPCH-A ที่ระดับความเข้มข้นโพรตีนเท่ากับร้อยละ 1, 0.1 และ 0.5 สำหรับ BPCH-A ที่มีระดับการย่อยสลายเท่ากับ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ ($p < 0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า ESI ของ BPCH-A มีความแปรปรวน ไม่สัมพันธ์กับระดับการย่อยสลายและความเข้มข้นของโพรตีนที่ใช้ ทั้งนี้อาจเพราะความคงตัวของอิมัลชันขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ร่วมของทั้ง ขนาด รูปร่าง และความเป็นขั้วของโมเลกุลโพรตีน โดยทั่วไปการเกิดอิมัลชันจะเป็นผลมาจากการดูดซับของโมเลกุลโพรตีนหรือเปปไทด์ไว้บนพื้นผิวของหยดน้ำมัน กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic amino acid) จะทำให้โพรตีนสามารถเกาะตัวอยู่บนผิวของน้ำมัน โดยการแทรกตัวเข้าไปอยู่บนผิวของตัวน้ำมัน และหันส่วนที่มีขั้วออกมาสัมผัสน้ำ (Pomeranz, 1991)

ตารางที่ 11 ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีน ถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆ

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

สมบัติการเป็นอิมัลไฟเออร์ของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) แสดงในตารางที่ 12 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 ดังนั้นการเลือกนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ (BPCH-A และ BPCH-F) ไปใช้งานจึงไม่ควรพิจารณาเฉพาะค่า ESI เพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและดัชนีความคงตัวของอิมัลชันแตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อยสลายของโปรตีนและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ ทั้งนี้การย่อยสลายของโปรตีนด้วยเอนไซม์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของทั้งขนาดโมเลกุลและโครงสร้างของโปรตีน เกลียวโปรตีนที่คลายตัวออกเนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์จะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุและไม่มีประจุของโปรตีนที่ซ่อนอยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนเกิดขึ้นที่ผิวของโปรตีนมากขึ้น ซึ่งมีอิทธิพลต่อความสามารถในการจับน้ำและน้ำมันของโปรตีนไฮโดรไลเสต ดังนั้นการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันที่ระดับการย่อยสลายต่างกัน จึงอาจทำให้ได้เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์แตกต่างกันด้วย ในกรณีที่โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันไม่ดีอาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ทำให้โปรตีนมีความเป็น Amphiphilic ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอิมัลชันที่ดี (Chobert *et al.*, 1988)

ตารางที่ 12 ดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ของโปรตีน ถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆ

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

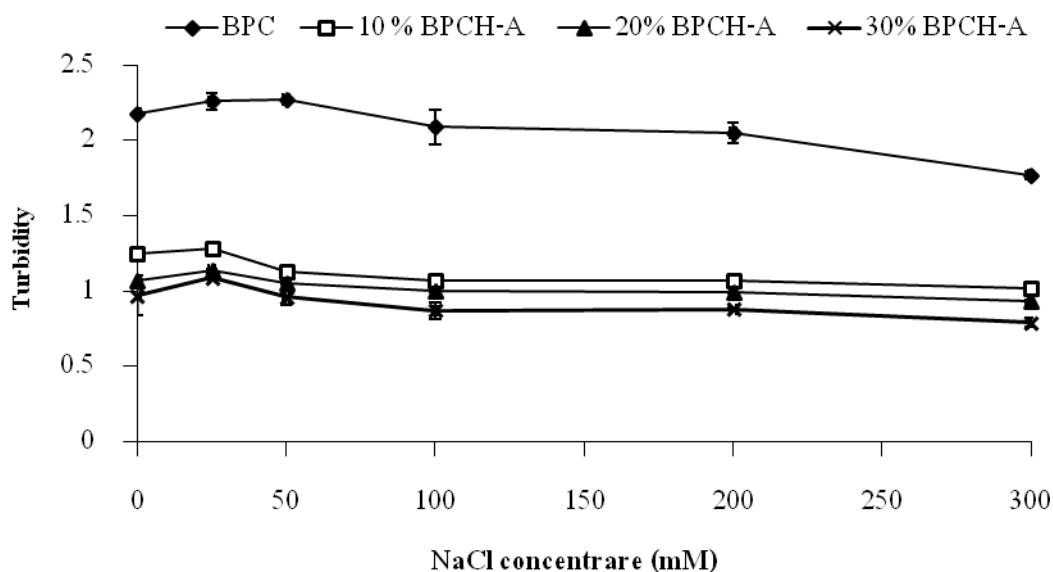
* Means ± SD from triplication determinations.

† 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.

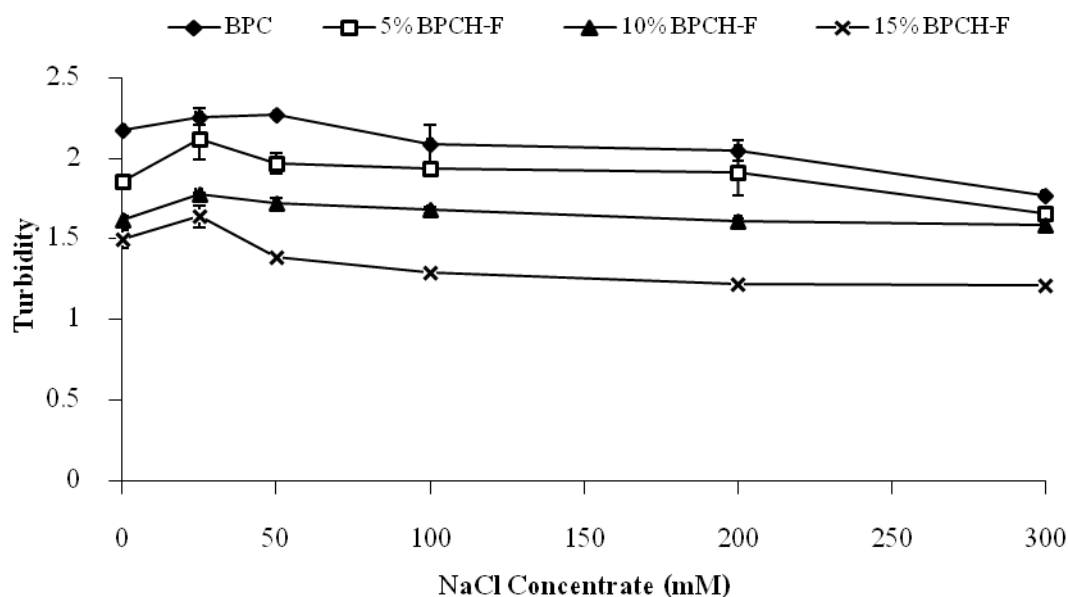
นอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง (ทั้ง BPCH-A และ BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้นไปจะส่งผลให้ค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำให้ระบบมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น อาจส่งผลให้โปรตีนหรือเปปไทด์เกิดการจับเรียงตัว (Aggregation) กันเองของโมเลกุลโปรตีนมากขึ้น ทำให้โปรตีนไม่สามารถแทรกตัวหรือถูกดูดซับบนพื้นผิวของหยดน้ำมันได้ ความสามารถในการห่อหุ้มเม็ดไขมันของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงลดลง (Kristinsson and Rasco, 2000) ส่งผลให้การเกิดอิมัลชันเกิดได้ไม่ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Thiansilakul และคณะ (2007) ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนปลาทูแวกซ์แห้งเหลือไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์เพิ่มสูงกว่าร้อยละ 0.5 อิมัลชันจะมีค่า EAI และ ESI ลดลง ส่วนในกรณีที่โปรตีนมีระดับความเข้มข้นน้อยสามารถที่จะทำให้เกิดอิมัลชันของโปรตีนได้ดีขึ้น Lawal และคณะ (2007) อธิบายว่าเนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่มีความเข้มข้นน้อยๆนั้น สามารถเคลื่อนตัวและถูกดูดซับบริเวณผิวหน้าของน้ำมันได้ดีกว่าโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนตัวและการถูกดูดซับของโปรตีน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนด้วยเช่นกัน

3.5.4 สมบัติการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อน

จากการทดสอบการจับเรียงตัวภายใต้ความร้อน (Thermal aggregation) ของโปรตีน โดยตรวจสอบค่าความขุ่น (O.D. 400 นาโนเมตร) ของสารละลายโปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (ภาพที่ 9) หรือเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (ภาพที่ 10) เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (BPC) โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน (0-300 มิลลิโมลาร์) พบว่าสารละลาย BPC มีค่าความขุ่นอยู่ช่วงระหว่าง 1.77-2.18 และมีค่าความขุ่นลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณา BPCH-A เปรียบเทียบกับ BPC พบว่าภายหลังจากให้ความร้อนสารละลาย BPCH-A มีค่าความขุ่นน้อยกว่า BPC อย่างเห็นได้ชัด ในทุกระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ทดสอบ (ภาพที่ 9) แสดงถึงความคงตัวต่อความร้อนที่ดีของ BPCH-A เนื่องจากโปรตีนในสารละลายจับเรียงตัวเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ได้น้อยเมื่อผ่านการให้ความร้อน และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากัน พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น สารละลายโปรตีนจะมีค่าความขุ่นลดลง



ภาพที่ 9 ความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที



ภาพที่ 10 ความขุ่นของโปรตีนถั่วหรั่ง (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ในส่วนของ BPCF-F พบว่าสารละลาย BPCF-F ทั้ง 3 ระดับการย่อยสลาย มีค่าความขุ่นภายหลังการให้ความร้อนต่ำกว่า BPCF-A อย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เท่ากัน และพบว่าค่าความขุ่นของสารละลายลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10) เมื่อพิจารณาผลของระดับโซเดียมคลอไรด์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ ส่งผลต่อการเพิ่มค่าความขุ่นของทั้ง BPCF-A และ BPCF-F เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ อาจเนื่องมาจากที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นสภาพที่จะส่งเสริมให้โปรตีนเกิดการจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนได้มาก เนื่องจากเกิดการปรับประจุของโมเลกุลโปรตีนด้วยไอออนของเกลือ ทำให้โปรตีนคลายตัวบางส่วน ส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน แต่ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นปริมาณไอออนที่มากจะไปปรับประจุในโมเลกุลโปรตีนได้มากโปรตีนมีแรงผลัก (Repulsive force) ระหว่างโมเลกุลมากจึงจับเรียงตัวกันได้น้อยเมื่อนำไปให้ความร้อน

การวิเคราะห์ค่าความขุ่นของโปรตีนภายหลังการให้ความร้อนเป็นการตรวจสอบปริมาณการสูญเสียสภาพ (Denaturation) และการจับเรียงตัว (Aggregation) กันของโมเลกุลโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนโดยการที่สารละลายโปรตีนมีค่าความขุ่นสูงขึ้นภายหลังการให้ความร้อน เกิดจากการจับเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการกระเจิงแสง (Light scattering) ในช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจวัด (400 นาโนเมตร) สารละลายโปรตีนที่มีค่าความขุ่นมากแสดงถึงความไม่คงตัวต่อความร้อน (Thermal stability) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร ซึ่งนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะขุ่นแล้ว ยังอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะด้านอื่นๆ เช่น ความหนืดของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์เกิดการตกตะกอน หรืออาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นเจล (Gel) ซึ่งเหล่านี้อาจเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ของผลิตภัณฑ์ได้ จากผลการทดลองจะเห็นว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 สองชนิด สามารถปรับปรุงสมบัติการคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนจากถั่วหรั่งได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ryan และคณะ (2008) ที่พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในช่วงพีเอชที่ทำการทดสอบเท่ากับ 7.1 และ 7.5 กล่าวคือสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตมีค่าความขุ่นต่ำกว่าโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการให้ความร้อนร่วมกับปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นการจำลองระบบอาหารที่มีการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นเครื่องปรุงรส ซึ่งเกลือจะมีคุณสมบัติโดยตรงต่อการเพิ่มหรือลดความคงตัวของโปรตีนในระหว่างการให้ความร้อน เนื่องจากเกลือมีความสามารถในการปรับเปลี่ยนประจุสุทธิของโปรตีนได้ (Damodaran and Paraf, 1997) โดยจากผลการทดลองจะเห็นว่า การมีเกลือในระบบอาหารมีผลต่อการลดค่าความขุ่นของสารละลายโปรตีนได้ การที่โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อความร้อนที่ดี ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนถั่วหรั่งไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่ใช้ความร้อน เช่น อาหารที่ต้องผ่านการให้ความร้อนหรือฆ่าเชื้อ เป็นต้น

3.6 การศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่ว หรั่ง ไฮโดรไลเสต (BPCH)

ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยตรวจสอบกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH และกิจกรรมการจับโลหะไอออนของ BPCH-A (ตารางที่ 13) และ BPCH-F (ตารางที่ 14) 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 13) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Nalinanon และคณะ (2011) ที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่ได้จากปลาทูลูน่าพันธุ์โอแถบ พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 โปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุดในเช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีรายงานของ สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์ (2550) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.5 และพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นการทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง โปรตีนจึงแสดงลักษณะของความเป็นขั้วมากขึ้น ทั้งนี้ BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 20 มีความสามารถที่จะจับกับอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ดี อาจเนื่องมาจาก BPCH-A ที่ระดับการย่อยสลายนี้นั้นมีกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นประจุลบ (Negatively charged R group) อยู่บนโครงสร้างของโปรตีนมากจึงสามารถที่จะจับกับอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ดี บ่งชี้ถึงความสามารถที่จะทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่จะเกิดขึ้นได้ (Re *et al.*, 1999)

เมื่อพิจารณาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ BPCH-A พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 29.29 เมื่อโปรตีนมีระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 30 (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่า BPCH-A มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (Electron donor) กับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jamdar และคณะ (2010) ที่ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสต ต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น (จากร้อยละ 10 เป็น 20 30 และ 40) ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating) พบว่าเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นค่าจับกับโลหะไอออน (Fe^{2+}) ของ BPC-H-A ก็เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 13) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Jamdar และคณะ (2010) ที่พบว่าโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการจับโลหะไอออนสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายโปรตีนถั่วลิสงเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 20, 30 และ 40 ตามลำดับ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเปปไทด์ในโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเสตสามารถทำหน้าที่เป็นสารคีเลตหรือสารอินทรีย์ที่สามารถจับอนุมูลอิสระหรือทำหน้าที่เป็น Prooxidants นำไปสู่การลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งการจับกับธาตุที่มีประจุบวก เช่น เหล็ก สังกะสี หรือทองแดง ในระบบของอาหารจะช่วยลดอัตราการเกิดออกซิเดชัน และชะลอการเกิดสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่จะส่งผลต่อกลิ่น รส ในอาหาร (Gordon, 2001)

ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPC-H-F) พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 โปรตีนมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือร้อยละ 48.58 และเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงขึ้นโปรตีนจะมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลง ดังแสดงในตารางที่ 14 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prommool และคณะ (2010) ที่พบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากเครื่องในปลาหูฉลามที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น (ระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น)

เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า BPC-H-F มีความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 คือมีค่าเท่ากับร้อยละ 27.23 อย่างไรก็ตามพบว่า BPC-H-F ในทุกระดับการย่อยสลายมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า BPC ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (ตารางที่ 14) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chuan-He และคณะ (2009) ที่ศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ในเมล็ดข้าวบัคควีท (Buckwheat) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5-25 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.00 - 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดและมีค่าความเข้มข้นที่แสดงการยับยั้งร้อยละ 50 (50% Inhibitory Concentration: IC_{50}) เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ Klompong และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากกล้ามเนื้อปลาสิ่กุนข้างเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมจากกล้ามเนื้อปลาสิ่กุนข้างเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายในช่วงร้อยละ 5 ถึง ร้อยละ 25 การย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระที่ค่อนข้างหลากหลายขึ้นกับความจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงขนาดและองค์ประกอบของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กจะมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ (Wu *et al.*, 2003) เมื่อพิจารณาความสามารถในการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating) ของ BPC-H-F พบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นความสามารถในการจับโลหะไอออนก็เพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 13 กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ

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

*Means ± SD from triplication determinations.

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

ตารางที่ 14 กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ

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.

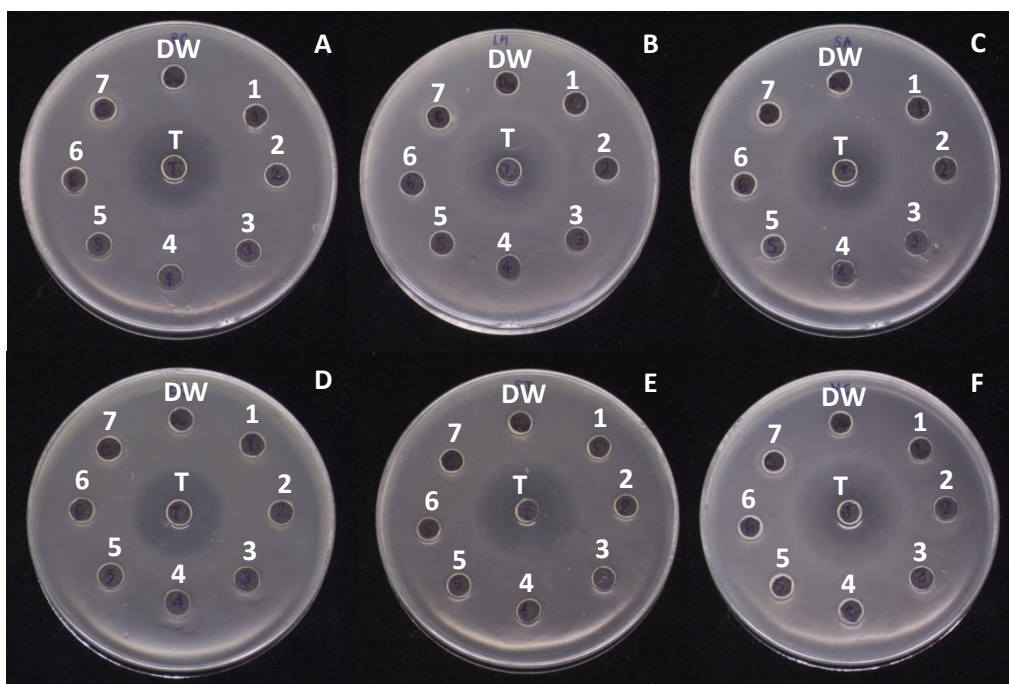
† Different superscripts (a-d) in the same column indicate the significance ($p < 0.05$)

จากผลการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสต ทั้งในรูปแบบ ABTS, DPPH และ Metal ion chelating พบว่าโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายโดยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ มีเปปไทด์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระทำให้เกิดโมเลกุลที่มีความเสถียร จึงมีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ (Stojs and Bagchi, 1995) นอกจากนี้เปปไทด์จากโปรตีนถั่วหรั่งที่ผลิตได้ยังสามารถจับโลหะไอออนได้ดี โลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้มากมาย โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นอนุมูล Superoxide anion radical (O_2^-) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ต่อไป (Dinis *et al.*, 1994) ดังนั้นการที่โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการจับโลหะไอออนได้ดี จึงมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

ออกซิเดชันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงๆ ได้แก่ BPCH-A ที่ระดับการย่อยร้อยละ 30 และ BPCH-F ที่ระดับการย่อยร้อยละ 15

3.7 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของ BPC, BPCH-A และ BPCH-F พบว่าทั้ง BPC, BPCH-A และ BPCH-F ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่นำมาทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) โปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลสเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A) และโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลสเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ (A) *Bacillus cereus*; (B) *Listeria monocytogenes*; (C) *Staphylococcus aureus*; (D) *Escherichia coli*; (E) *Salmonella* Typhimurium และ (F) *Vibrio cholerae* โดยมีน้ำกลั่น (DW) และ Tetracyclin (10 ไมโครกรัม) เป็นชุดควบคุมลบและบวก ตามลำดับ (1: BPC; 2: 10%DH BPCH-A; 3: 20%DH BPCH-A; 4: 30%DH BPCH-A; 5: 5%DH BPCH-F; 6: 10%DH BPCH-F; 7: 15%DH BPCH-F)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของโปรตีนไฮโดรไลสเสตนั้นพบน้อยกว่างานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ผลิตจากโปรตีนบางชนิดเช่น โปรตีนนมและโปรตีนไข่มีความสามารถในการต้านจุลชีพได้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. โปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นที่ผลิตได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง เมื่อผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 62.72 – 64.47 และ 45.57 – 57.91 ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และแทนนินอยู่ในช่วงระหว่าง 88.93 – 598.93 มิลลิกรัมGAE/g protein และ 6.03-8.42 มิลลิกรัมTAE/g protein ตามลำดับ
2. การย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์สามารถปรับปรุงความสามารถในการละลายให้ดีขึ้น และทำให้โปรตีนละลายได้ดีในช่วง พีเอชที่กว้าง สารละลายโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความคงทนต่อความร้อนที่ดีกว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตได้ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้มีสมบัติการเกิดฟอง และการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้แตกต่างกันขึ้นกับระดับการย่อยสลายของโปรตีนและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ โปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 20 และโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 และ 15 สามารถปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดฟองและการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนได้ดี เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสม
3. การย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH รวมทั้งการจับโลหะไอออน (Metal ion chelating) ของโปรตีน โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 20 มีกิจกรรมในการจับอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด แต่มีกิจกรรมในการจับอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมการจับโลหะไอออนสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 30 โปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS และ DPPH ของโปรตีนสูงที่สุดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 แต่มีกิจกรรมการจับโลหะไอออนสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 15 แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านจุลชีพของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น และโปรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

หากมีการศึกษาต่อจากการวิจัยในครั้งนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมดังต่อไปนี้

1. โพรตีนถั่วหรั่งเข้มข้นและโพรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่สูงอยู่ จึงควรพัฒนาวิธีการสกัดแยกโพรตีนให้มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณน้อย และโพรตีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น
2. โพรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ควรนำมาทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามน้ำหนักโมเลกุล ศึกษาลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (Amino acid sequence) เพื่อให้ทราบโครงสร้างที่แน่ชัดของเปปไทด์ที่ผลิตได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการสังเคราะห์โพรตีนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับอุตสาหกรรมได้
3. ควรมีการนำโพรตีนถั่วหรั่งไฮโดรไลเสตไปทดลองประยุกต์กับผลิตภัณฑ์อาหารประเภทอื่น เช่น สารต้านออกซิเดชันในระบบอาหาร หรือสารแต่งกลิ่นรสในอาหาร เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2555. ถั่วหรั่ง. (ออนไลน์). สืบค้นจาก: www.jobdoa.com. (5 เมษายน 2555)
- จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2548. เอกสารวิชาการถั่วหรั่ง. ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 8
- จิราพร ศิริรัตน์. 2550. การศึกษาด้วยยั้งโปรตีนเอสจากถั่วหรั่งและการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
- ฉันทพร จันทร์แสนโรจน์. 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinine*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- นิธยา รัตนาปนนท์. 2551. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล. 2548. การปรับปรุงแป้งและสตาร์ชจากถั่วหรั่ง. รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- พรชนัน เทียวทั่ว. 2548. การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราโดยกระบวนการทางเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- พิสมัย เหล่าภัทรเกษม. 2548. บทบาทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็ง. ศรีนครินทร์ เวชสาร. ฉบับที่ 20(3) หน้า 180-189
- ภูมิสันต์ จีวิพันธ์พงษ์ และ ธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป์. 2536. การศึกษาคุณสมบัติของถั่วหรั่งและการนำไปใช้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เยาวภา เขียวศิลากุล. 2549. กิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาทุแขก (*Decapterus maruadsi*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- วินัย ตะห์ลัน. 2542. ผลิตภัณฑ์โปรตีน (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.elibonline.com/doctors/food_protein01.html (25 พฤษภาคม 2553)
- สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูลย์. 2550. ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- อาณัติ นิตติธรรมยง และประไพศรี ศิริจักรวาล. 2553. ถั่วเหลืองกับสุขภาพ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://www.inmu.mahidol.ac.th/th/knowledge/pdf/68.pdf> (13 มิถุนายน 2553)
- อินเตอร์เน็ตซิงค์ บัดติยา. 2553. โปรตีน (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.livewellguide.com/maintheme/thai.html> (25 พฤษภาคม 2553)

- Adebowale, K. O., Afolabi, T. A. and Lawal, O. S. 2002. Isolation, chemical modification and physicochemical characterization of Bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*) starch and flour. *Food chem* 78: 305-311
- Amarteifio, J. O. and Moholo, D. 1998. The chemical composition of four legumes consumed in Botswana. *J. Food Comp. Anal.* 11: 329-332
- Anonymous. 2000. Novozyme. (Online). Available from: www.Novozymes.com. (28 December 2010)
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. 17th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists
- Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. 4th ed. Amino acids, Peptides, Proteins. Berlin, Germany: Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 8-92
- Benjakul, S. and Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3423-3430
- Chavan, U. D., McKenzie, D. B. and Shahidi, F. 2001. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chem.* 74:177-187
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., and Mare, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, Characterization and functional properties of hydrolysates. *Proc. Biochem.* 42: 1419-1428
- Chanput, W., Theerakulkait, C., and Nakai, S. 2009. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *J. Cereal Sci.* 49: 422-428
- Chen, H. M., Muramatoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46: 49-53
- Cherry, J. P. and Mc Watters, K. H. 1981. Whippability and aeration. In Cherry, J. P. Editor. *Protein Functionality in Foods*. ACS Symposium Series. 147. American Chemical Society Washington, DC. p. 149
- Chew, P., Casey A. J. and Johnson S. K. 2003. Protein quality and physico - functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. *Food Chem.* 83: 575-583
- Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Nicolus, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 883-892

- Chuan-He, T., Jing, P., Da-Wen, Z. and Zhong, C. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chem.* 115: 672 – 678
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F. 1999. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *J. Food Chem.* 67: 269-274
- Church, F. C., Porter, D. H. Catignani, G. L. and Swaisgood, H. E. 1985. An o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem.* 146: 343-348
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F. and Chihib, N. E. 2005. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides* 26: 713–719
- Damodaran, S. and Paraf, A. 1997. *Food protein and their application*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Decker, E. A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38: 674-677
- Dickinson, E. and Stainsby, G. 1982. *Colloid in food*, 533. pp. London UK. Elsevier Applied Science Publishers. LTD.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M. and Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophysics.* 315: 161-169
- Duke, J. A., Okigbo, B. N., Reed, C. F., and Weder, J. K. P. 1986. *Voandzeia subterranean* (L). Thouars, *Handbook of Legume of world Economics Improtance*. pp. 307-310.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A. and Gafar, A. F. 2001. Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chem.* 74: 455-462
- FAO/WHO. 1991. *Energy and protein requirements*. Nutrition report series 52. Rome, Italy: FAO.
- Francis, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture.* 199: 197–227
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *J. Food Sci.* 69: 615–622

- Gordon, M. 2001. Antioxidants and food stability. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (Eds.), *Antioxidant in Food: 7–21*. New York, USA: CRC Press. 158-322
- Govindaraju, K and Srinivas, H. 2004. Studies on the effect of enzymatic hydrolysis on functional and physico – chemical properties of arachin. *Food Sci. Tech.* 56: 183-191
- Guillamon, E., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Cuadrado, C., Sanchez, M. C. and Muzquiz, M. 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chem.* 107: 68-74
- Gupta, Y. P. 1987. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. *Plant Foods for Human Nutrition.* 37: 201–228
- Horiguchi, N., Horiguchi, H. and Suzuki, Y. 2005. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69:2445–2449
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem.* 121: 178–184
- Jorgensen, J., Turnidge, J. and Washington, J. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R.H. Editors. *Manual of clinical microbiology.* 6th Ed. Washington DC: ASM Press. p.1526-1543
- Kaewmanee, T., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2011. Effect of NaCl on thermal aggregation of egg white proteins from duck egg. *Food Chem.* 125(2): 706-712.
- Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of food proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 7:219-280
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shaidi, F., 2007, Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Dearoides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102: 1317–1327
- Kone, M., Paice, A. G. and Toure, Y. 2011. Bambara Groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc. (Fabaceae) usage in human health. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevent.* p.185-195
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysate: productivity, biochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 40: 43-81
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P. Gase, F., Cros, G. and Teissedre, P. L. 2001. Antioxidant

- capacity and phenolics levels of France wine from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* 49; 3341-3348
- La-ongdao, W., Premwadee, S., Kalyanee, J. and Parichat, H. 2011. Potential use of antioxidative mungbean protein hydrolysate as an anticancer Asiatic acid carrier. *Food Res. Inter.* 44: 812–817
- Lawal, O. S., Adebawale, K. O., and Owale, Y. A. A. 2007. Functional properties of native and chemically modified protein concentrates from bambarra groundnut. *J. Food Res. Inter.* 40: 1003-1011
- Li, G. H., Le, G. W., Liu, H. and Shi, Y. H. 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Tech. Inter.* 11: 281–287
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., and Wu, Y. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 102: 1135–1143
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *J. Food Chem.* 106: 444–450
- Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. 1996. Functional properties of veal bone hydrolysates. *J. Food Sci.* 61: 712–716
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* 100:1409-1418
- Moore, S. and Stein, W. H. 1948. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176: 367-388
- Mune, M. A. M., Minka, S. R., Lape, I. and Etoa, F. 2011. Nutritional potential of Bambara bean protein concentrate. *Pakistan J. Nutrit.* 10: 112-119
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 124: 1354-1362
- National Academy of Science. 1979. Bambara Groundnut. *Tropical Legumes: Resources for the Future.* 47-53

- Pearce, K. N., and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716–723
- Peña-Ramos E. A. and Xiong Y. L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci.* 64: 259–263
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M. and Kinsella, J. E. 1994. Protein stabilized foams, structure function of food proteins. New York: Academic Press, Inc. 131–152
- Pomeranz, Y. 1991. Functional properties of food components. 2nd Ed. San Diego, CA: Academic Press, Inc. 248–298
- Prommool, S., Jongjareonrak, A. and Benjaku, S. 2010. Study on antioxidant activities of protein hydrolysate from Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscery. 35th Congress on Science and Technology of Thailand.
- Purseglove, J. W. 1968. Tropical crops: Dicotyledons. New York, USA. Wiley. 719 p.
- Radha, C., Kumar R. P. and Prakash, V. 2007. Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem.* 106: 1166-1174
- Rafat, A., Philip, K. and Muniandy, S. 2010. Antioxidant potential and content of phenolic compounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. *J. Med. Plants Res.* 4: 197-202
- Ramakrishna, V., Rani, P. J. and Rao P. R. 2006. Anti-nutritional factors during germination in Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *J. Dairy Food Sci.* 1: 6-11
- Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K and Salunkhe, D. K. 1985. Dry bean tannins a review of nutritional implications. *J. American Oil Chemists Soc.* 62: 541–549
- Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannin and related polyphenols in forage legumes. *J. Animal Sci.* 73: 1516-1528
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice, E. C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biol. Med.* 26: 1231-1237
- Ryan, M., Mc Evoy, E., Duignan, S., Crowley, C., Fenelon, M., O'Callaghan, D. M. and Fitzgerald, F. J. 2008. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. *Food Chem.* 108:503-510
- Salampeyy, J., Phillips, M., Seneweera, S. and Kailasapathy, K. 2010. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chem.* 120: 556-560

- Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Viogue, J., Bautista, J. and Millan, F. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 64:237-243
- Schofield., D. M. and Mbugua, A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *J. Animal Feed Sci. Tech.* 53: 21-40
- Seutsuna, K. and Chen, J. R. 2002. Isolation and characterization of peptides with antioxidative activity derived from wheat gluten. *Food Sci. Tech. Res.* 8: 227–230
- Séverin, S. and Wen-shui, X. 2006. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 7: 90-98
- Shahidi, F., Han, X. Q. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53:285–293
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945–948
- Sikorski, Z. E. and Naczki, M. 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrate. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 14: 201–230
- Silvestre, M. P. C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysate. *Food Chem.* 60(2): 263-271
- Singh, U. 1988. Antinutritional factors of chick pea and pigeon pea and their removal by processing. *Food Human Nutrit.* 38: 251–261
- Sittiwat, L. and Narissara, Ki. 2000. Antioxidant activity and fatty acid constituents in durian seeds. *Nutrit Res. Council Thailand.* 33: 153-161
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1977. Total phenolic analysis: automation and comparison with manual methods. *American J. Enol. Viticulture* 28: 49-55
- Sparkman, D. H., Stein, E. H. and Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 119
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.* 18: 321–336
- Tang , C. H., Peng, J., Zhen, D. W. and Chen, Z. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chem.* 115: 672-678
- Taha, F. S. and Ibrahim M. A. 2002. Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins. *Grasasy Aceites.* 53 (Fasc.3): 273-281

- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.* 103: 1385–1394
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. and Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *J. Food Sci. Tech.* 38:255-261
- Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E. and Porres, J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function. *J. Physiol. Biochem.* 56: 283–294
- Vaštag, Z., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. and Perićin, D. 2010. Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food Bioprod. Proc.* 88: 277 – 282
- Walsh, D. J., Cleary, D., Mc Carthy, E., Murphy, S. and Fitz Gerald, R. J. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Res. Inter.* 36: 677–683
- Whitaker, J. R. 1994. The proteolytic enzyme. *In Principles of Enzymology for the food Science.* New York: Marcel Dekker Inc. pp. 469 -498
- Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. 2003. Free amino acid and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Inter.* 36: 949-957
- Yoshie-Stark, Y. and Wasche, A. 2004. *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolate and their hydrolysates. *Food Chem.* 88: 179–184
- Yoshie-Stark, Y., Wada, Y. and Wasche, A. 2008. Chemical composition, functional properties and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chem.* 107: 32–39
- Yusuf, A. A., Ayedun, H. and Sanni, L. O. 2008. Chemical composition and functional properties of raw and roasted Nigerian benniseed (*Sesamum indicum*) and Bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *Food Chem.* 111: 277–282
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, Li., Guo, X., Wang, X. and Yao, H. 2009. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Res. Tech.* 229: 709-719
- Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Proc. Biochem.*4: 1296-1302

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม โดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000)

สารเคมี

1. Conc. Sulfuric acid
2. Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)
3. Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้ Sodium hydroxide 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. Hydrochloric เข้มข้น 0.1 N
5. Boric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ
6. Indicator เตรียมโดยใช้ (mixed indicator: methylred 0.1 กรัม: bromocresol green 0.1 กรัม ใน ethanol 100 มิลลิลิตร)

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม (ควรมีโปรตีนประมาณ 5 กรัม) ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม Mixed catalyst: CuSO_4 0.1 กรัม, NaSO_4 2 กรัม และ conc. H_2SO_4 25 กรัม

การย่อย (Digestion)

ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆจนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อน อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

การกลั่น (Distillation)

1. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10-15 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
2. เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 40-50 มิลลิลิตร
3. นำ receiving flask ที่มีสารละลาย boric acid ร้อยละ 40 อยู่ 20-25 มิลลิลิตร และเติม indicator เรียบร้อยแล้วมารองรับสารละลายที่กลั่นได้
4. กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 มิลลิลิตร
5. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู
6. ทำ blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

7. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

การคำนวณ

การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีนี้ ควรทำตัวอย่างไว้ตรวจสอบ เรียกว่า Blank (โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง)

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 1.4 \times F}{W_t}$$

- A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)
- W_t คือ น้ำหนักของตัวอย่าง
- N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)
- F คือ ค่าแฟคเตอร์

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วย Soxhlet (AOAC, 2000)

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

วิธีวิเคราะห์

1. ใส่ขวดกลมสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก 3-5 กรัม ท่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมัน ประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา
4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด
7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ
8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_2 \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น โดยวิธี Air Oven Method (AOAC, 2000)

วิธีวิเคราะห์

1. อบอุ่นอะลูมิเนียมในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105±5 องศาเซลเซียส เวลา 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ใส่ลงในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงชั่งน้ำหนัก
2. กระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบ และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

วิธีวิเคราะห์

1. เผาด้วยกระบี่เบี่ยงเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2. กระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_1)

3. ชั่งตัวอย่าง อย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระบี่เบี่ยงเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4 จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_2)

6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{S} \times 100$$

5. การตรวจสอบระดับการย่อยโปรตีน (DH) ด้วยวิธีการวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระด้วยการทำปฏิกิริยากับ TNBS (Benjakul and Morrissey, 1997)

สารเคมี

1. 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid (TNBS)
2. Sodium sulfite
3. L- 2 – Amino – 4 – methyl pentanoic acid (L-leucine)

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (125 ไมโครลิตร) เติม phosphate buffer เข้มข้น 0.2 M (pH 8.2) จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และเติม 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย TNBS เข้มข้นร้อยละ 0.01 เขย่าให้เข้ากัน
2. ตั้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ในที่มืด)
3. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Sodium sulfite เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร
5. คำนวณปริมาณ α -amino acid ที่ได้อยู่ในรูปของ L-leucine
6. จากนั้นคำนวณระดับ DH โดยใช้สูตร (Benjakul and Morrissey, 1997)

$$DH = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

L_t = ปริมาณ α - amino acid ที่เวลา t

L_0 = ปริมาณ α - amino acid เริ่มต้น

L_{max} = ปริมาณ α - amino acid หลังจากย่อยโปรตีนด้วย 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 100 องศา

เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

1. สมบัติการละลาย (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. Bovine serum albumin

วิธีวิเคราะห์

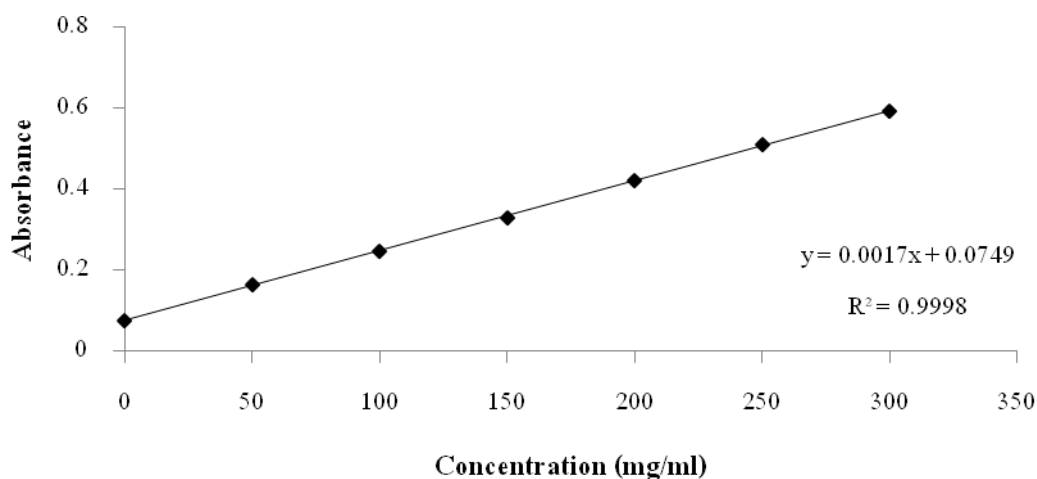
1. ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต จำนวน 10 มิลลิกรัมโปรตีน ละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water; DI) จำนวน 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH นำสารละลายกวนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับสารละลายก่อนหน้านี้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 *g* เป็นเวลา 15 นาที

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในส่วนใส ด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น Standard และปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ได้หลังจากละลายตัวอย่างใน 0.5 N NaOH

4. คำนวณความสามารถในการละลายจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

$$\text{Solubility (\%)} = (\text{ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้} / \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}) \times 100$$



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

2. สมบัติการเกิดฟอง (ดัดแปลงจาก Shahidi *et al.*, 1995)

วิธีวิเคราะห์

2.1 การตรวจสอบ Foaming Capacity

2.1.1 เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 3.0 (กรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้เกิดฟองโดยใช้ Homogenizer ที่ความเร็ว 16,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทลงในกระบอกตวงปริมาตร 250 มิลลิลิตร ตรวจวัดปริมาตรฟองทั้งหมด จากนั้นคำนวณหาค่า FE (Foam expansion) ดังสมการ

$$FE (\% \text{ volume increase}) = (V_1/V_0) \times 100$$

เมื่อ V_1 คือ ปริมาตรฟองทั้งหมด

เมื่อ V_0 คือ ปริมาตรสารละลายเริ่มต้นก่อนตีปั่นให้เกิดฟอง

2.2 การตรวจสอบ Foam Stability

2.2.1 ตรวจสอบความคงตัวของฟอง โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับการหาค่า FE แต่บันทึกปริมาตรของสารละลายทั้งหมดหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 0.5, 5, 10 และ 60 นาที คำนวณค่า FS ดังนี้

$$FS (\%) = (V_t / V_0) \times 100$$

เมื่อ V_t คือ ปริมาตรหลังการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ณ เวลาต่างๆ

เมื่อ V_0 คือ ปริมาตรทั้งหมดหลังจากตีปั่น (ที่เวลา 0 นาที)

3. สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella, 1978)

วิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตถั่วหรั่ง โดยวิเคราะห์ หาค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันจากค่า EAI และวิเคราะห์ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจากค่า ESI

วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปรตีนปริมาณ 6 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ 0.10, 0.25 ,0.50 และ 1.0 (กรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 20,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2. จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่นาที ที่ 0 และ 10 นำมาเจือจาง 100 ด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A_{500} จากนั้นคำนวณค่า EAI และ ESI ดังนี้

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_{500} \times DF) / l \times C$$

- A_{500} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
- DF = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชันเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้
- l = light path length (เมตร)
- \varnothing = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชัน
- C = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

ค่า ESI คำนวณได้จาก

$$ESI (\text{นาทีก}) = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

- A_0 = ค่าความขุ่น
- Δt = ระยะเวลาที่ผ่านไป (นาทีก)
- ΔA = ค่าความขุ่นที่เปลี่ยนไป $A_0 - A_{10}$

4. สมบัติการจับเรียงตัวของภายใต้สภาวะการให้ความร้อน (ดัดแปลงจาก La-ongdao *et al.*, 2011 และ Keawmanee *et al.*, 2011)

สารเคมี

1. Na-phosphate buffer pH 7.0
2. NaCl

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายโปรตีนโดยนำตัวอย่างโปรตีนผง 1 กรัม ผสมในสารละลาย 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.0 ที่มีปริมาณเกลือ NaCl เข้มข้นแตกต่างกัน (0, 25, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์)
2. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยใช้น้ำเย็น ตรวจสอบวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรเสตจากถั่วเหลือง

1. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS radical scavenging activity (Re *et al.*, 1999)

สารเคมี

1. 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt (ABTS)
2. Potassium persulfate
3. Methanol

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียม Stock solution ที่มีส่วนผสมของสารละลาย ABTS เข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate เข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ ผสม Stock solution ทั้งสองด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บสารละลายผสมในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2. นำสารละลายที่ได้มาเจือจางโดยใช้ Methanol ในอัตราส่วน (1:50 ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลาย ABTS ที่ใช้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง

3. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 2850 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer (เตรียม Blank โดยผสมสารตัวอย่างเหมือนข้างต้นแต่เปลี่ยนมาเติมน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง) คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยร้อยละ (% Radical-scavenging activity)

การคำนวณ

$$\text{Radical-scavenging activity (\%)} = [(B-A)/B] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

2. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity (Shimada *et al.*, 1992)

สารเคมี

1. 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)
2. Ethanol

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

2. ผสมสารละลายให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยวางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-1800 spectrophotometer คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยร้อยละ (% Radical-scavenging activity)

การคำนวณ

$$\text{Radical-scavenging activity (\%)} = [(B-A)/B] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

3. ตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Metal ions chelating activity (Decker and Welch 1990)

สารเคมี

1. Ferrous chloride
2. 3-(2-Pyridyl) – 5,6 – diphenyl- 1,2,4 – triazine - 4',4'', disulfonic acid sodium salt (Ferrozine)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Ferrous chloride ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ferrozine ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรจากนั้นคำนวณค่ากิจกรรม Chelating activity ในหน่วยร้อยละ (% Chelating activity)

การคำนวณ

$$\text{Chelating activity (\%)} = [(B-A)/B] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B = ค่าความยาวคลื่นของ Blank

ภาคผนวก ง
คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง

ตารางภาคผนวกที่ 1 การละลายของโปรตีนเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)

pH	Solubility (%)			
	BPC	10%DH BPCH-A	20%DH BPCH-A	30%DH BPCH-A
3	50.02 ± 0.11 ^{*†d}	87.10 ± 0.19 ^b	88.47 ± 0.19 ^c	89.95 ± 0.95 ^d
4	21.29 ± 0.67 ^a	69.53 ± 0.48 ^a	69.29 ± 0.33 ^a	70.58 ± 0.56 ^a
5	34.38 ± 0.66 ^b	70.62 ± 0.19 ^a	71.42 ± 0.60 ^b	71.94 ± 0.28 ^b
6	48.61 ± 0.29 ^c	90.48 ± 0.40 ^c	91.79 ± 0.60 ^d	92.41 ± 0.32 ^c
7	69.17 ± 0.22 ^e	94.25 ± 0.67 ^d	96.30 ± 0.43 ^e	96.92 ± 0.11 ^e
8	70.44 ± 0.11 ^f	95.27 ± 1.09 ^d	96.68 ± 0.66 ^e	97.10 ± 2.14 ^f
9	71.59 ± 0.44 ^g	98.72 ± 1.54 ^e	99.31 ± 0.71 ^f	99.75 ± 0.43 ^g

*Means ± SD from triplication determinations.

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

ตารางภาคผนวกที่ 2 การละลายของโปรตีนเข้มข้น (BPC) และโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาไซม์ (BPCH-F)

pH	Solubility (%)			
	BPC	5%DH BPCH-F	10%DH BPCH-F	15%DH BPCH-F
3	50.02 ± 0.11 ^{*†d}	86.58 ± 0.21 ^c	85.36 ± 0.51 ^b	81.31 ± 0.47 ^c
4	21.29 ± 0.67 ^a	74.78 ± 0.53 ^a	72.62 ± 0.12 ^a	71.40 ± 0.23 ^a
5	34.38 ± 0.66 ^b	75.98 ± 0.21 ^b	75.20 ± 0.65 ^c	74.80 ± 0.60 ^b
6	48.61 ± 0.29 ^c	91.59 ± 0.44 ^d	90.44 ± 0.92 ^d	88.42 ± 0.39 ^d
7	69.17 ± 0.22 ^e	93.64 ± 0.74 ^e	91.94 ± 0.47 ^e	91.68 ± 0.13 ^e
8	70.44 ± 0.11 ^f	94.07 ± 0.32 ^e	93.97 ± 0.42 ^f	92.66 ± 0.66 ^f
9	71.59 ± 0.44 ^g	95.76 ± 0.80 ^f	93.83 ± 0.20 ^f	93.49 ± 0.52 ^g

*Means ± SD from triplication determinations.

†Different superscripts (a-g) in the same column indicate the significance ($p < 0.0$)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)

Concentration (% w/v)	Foam expansion (%)			
	BPC	10%DH BPCH-A	20%DH BPCH-A	30%DH BPCH-A
0.1	4.73 ± 1.16 ^{a,w,*†}	11.69 ± 1.81 ^{ab,w}	17.18 ± 4.08 ^{b,w}	10.64 ± 6.53 ^{ab,w}
0.25	35.84 ± 5.73 ^{b,x}	14.44 ± 2.68 ^{a,w}	17.70 ± 1.22 ^{a,w}	10.15 ± 2.82 ^{a,w}
0.5	45.67 ± 4.74 ^{c,y}	24.69 ± 2.14 ^{ab,x}	31.53 ± 3.07 ^{b,x}	20.06 ± 5.10 ^{a,x}
1.0	43.94 ± 1.01 ^{b,y}	69.61 ± 3.90 ^{c,y}	42.87 ± 1.05 ^{b,y}	27.95 ± 3.51 ^{a,x}
3.0	55.10 ± 4.45 ^{b,z}	77.21 ± 0.49 ^{c,z}	41.95 ± 3.86 ^{ab,y}	43.34 ± 2.74 ^{a,y}

*Means ± SD from triplication determinations.

†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.

ตารางภาคผนวกที่ 4 ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)

Concentration (% w/v)	Foam expansion (%)			
	BPC	5%DH BPCH-F	10%DH BPCH-F	15%DH BPCH-F
0.1	4.73 ± 1.16 ^{a,w,*†}	16.13 ± 0.66 ^{bc,w}	17.94 ± 1.66 ^{c,w}	13.74 ± 2.10 ^{b,w}
0.25	35.84 ± 5.73 ^{b,x}	24.28 ± 5.67 ^{a,w}	20.87 ± 1.70 ^{a,w}	18.76 ± 0.41 ^{a,w}
0.5	45.67 ± 4.74 ^{c,y}	55.95 ± 8.52 ^{b,x}	33.33 ± 1.99 ^{a,x}	31.45 ± 4.41 ^{a,x}
1.0	43.94 ± 1.01 ^{b,y}	90.84 ± 6.57 ^{c,y}	76.25 ± 8.47 ^{c,y}	35.80 ± 2.41 ^{a,x}
3.0	55.10 ± 4.45 ^{a,z}	81.82 ± 4.79 ^{b,y}	94.08 ± 3.96 ^{c,y}	64.43 ± 3.34 ^{a,y}

*Means ± SD from triplication determinations.

†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.

ตารางภาคผนวกที่ 5 ความสามารถในการคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)

Concentration (% w/v)	Foaming stability (FS) (min)			
	0.5	5	10	60
BPC				
0.1	2.87 ± 1.05 ^{a,x,*}	2.37 ± 1.54 ^{a,x}	1.18 ± 0.77 ^{a,w}	0.00 ± 0.00 ^{a,w}
0.25	35.84 ± 5.73 ^{b,x}	33.49 ± 8.24 ^{b,w}	31.76 ± 5.96 ^{b,w}	25.62 ± 4.90 ^{b,w}
0.5	42.33 ± 3.35 ^{bc,w}	39.94 ± 1.33 ^{bc,w}	36.88 ± 0.75 ^{b,w}	32.13 ± 2.50 ^{c,w}
1.0	44.27 ± 0.64 ^{c,w}	43.62 ± 0.66 ^{bc,w}	42.62 ± 0.54 ^{b,w}	34.81 ± 3.11 ^{c,w}
3.0	55.78 ± 5.03 ^{d,wx}	53.41 ± 4.59 ^{c,x}	51.71 ± 3.11 ^{c,wx}	46.99 ± 4.01 ^{d,w}
10%DH BPCH-A				
0.1	11.05 ± 2.92 ^{a,w}	9.77 ± 5.14 ^{a,w}	8.63 ± 4.15 ^{a,w}	3.32 ± 3.14 ^{a,w}
0.25	14.44 ± 2.68 ^{a,y}	13.13 ± 1.95 ^{a,xy}	9.87 ± 0.22 ^{ab,x}	5.23 ± 2.13 ^{a,w}
0.5	24.69 ± 2.14 ^{a,y}	21.60 ± 2.83 ^{a,xy}	18.52 ± 3.70 ^{b,wx}	14.20 ± 1.07 ^{b,w}
1.0	59.35 ± 9.54 ^{b,y}	47.25 ± 0.25 ^{b,xy}	31.10 ± 6.09 ^{c,wx}	20.28 ± 2.45 ^{c,w}
3.0	68.57 ± 2.63 ^{b,y}	54.65 ± 7.36 ^{b,xy}	41.88 ± 7.40 ^{d,wx}	29.18 ± 4.52 ^{d,w}
20%DH BPCH-A				
0.1	17.18 ± 4.08 ^{a,w}	13.93 ± 1.29 ^{a,w}	12.40 ± 1.94 ^{a,w}	7.90 ± 3.24 ^{a,w}
0.25	17.70 ± 1.22 ^{a,w}	14.17 ± 4.42 ^{a,w}	12.65 ± 3.49 ^{a,w}	8.92 ± 2.74 ^{ab,w}
0.5	31.53 ± 3.07 ^{b,w}	31.53 ± 3.07 ^{b,w}	30.08 ± 4.53 ^{b,w}	24.19 ± 5.05 ^{b,w}
1.0	42.87 ± 1.05 ^{c,w}	38.59 ± 0.94 ^{c,w}	35.75 ± 3.02 ^{c,w}	29.95 ± 3.65 ^{c,w}
3.0	46.12 ± 7.79 ^{d,x}	35.98 ± 1.32 ^{d,x}	33.69 ± 1.46 ^{d,x}	27.06 ± 5.45 ^{c,w}
30%DH BPCH-A				
0.1	10.64 ± 6.53 ^{a,w}	9.25 ± 4.82 ^{a,w}	6.73 ± 6.31 ^{a,w}	4.06 ± 4.17 ^{a,w}
0.25	10.87 ± 3.98 ^{a,w}	10.15 ± 2.82 ^{a,w}	7.52 ± 3.61 ^{a,w}	6.75 ± 1.70 ^{ab,w}
0.5	20.06 ± 5.10 ^{b,w}	19.37 ± 4.14 ^{b,w}	18.13 ± 4.25 ^{b,w}	12.96 ± 3.21 ^{b,w}
1.0	29.19 ± 3.06 ^{c,w}	29.19 ± 4.25 ^{c,w}	27.28 ± 2.35 ^{c,w}	25.38 ± 2.93 ^{c,w}
3.0	43.34 ± 2.47 ^{d,x}	41.75 ± 3.21 ^{d,x}	38.80 ± 5.87 ^{d,x}	28.96 ± 4.81 ^{c,w}

* Different characters (a-d) 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.

ตารางภาคผนวกที่ 6 ความสามารถในการคงตัวของฟองของโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-F)

Concentration (% w/v)	Foaming stability (FS) (min)			
	0.5	5	10	60
BPC				
0.1	2.87 ± 1.05a,x,*	2.37 ± 1.54a,x	1.18 ± 0.77a,w	0.00 ± 0.00a,w
0.25	35.84 ± 5.73b,x	33.49 ± 8.24b,w	31.76 ± 5.96b,w	25.62 ± 4.90b,w
0.5	42.33 ± 3.35bc,w	39.94 ± 1.33bc,w	36.88 ± 0.75b,w	32.13 ± 2.50c,w
1.0	44.27 ± 0.64c,w	43.62 ± 0.66bc,w	42.62 ± 0.54b,w	34.81 ± 3.11c,w
3.0	55.78 ± 5.03d,wx	53.41 ± 4.59c,x	51.71 ± 3.11c,wx	46.99 ± 4.01d,w
5%DH BPCH-F				
0.1	10.37 ± 0.66a,y	7.82 ± 2.33a,xy	6.52 ± 2.45a,x	0.00 ± 0.00a,w
0.25	20.47 ± 5.67a,y	9.61 ± 2.56a,x	7.70 ± 2.43a,wx	2.62 ± 2.27a,w
0.5	52.38 ± 2.06b,y	24.45 ± 2.79b,x	21.43 ± 4.72b,wx	14.74 ± 5.28b,w
1.0	71.31 ± 6.57c,y	42.38 ± 4.78c,x	36.20 ± 6.03c,wx	25.71 ± 7.74c,w
3.0	80.11 ± 4.79c,y	65.26 ± 5.50d,x	59.66 ± 4.56d,x	33.17 ± 6.51c,w
10%DH BPCH-F				
0.1	17.94 ± 1.66a,y	4.35 ± 1.23ab,y	3.71 ± 0.14ab,x	0.00 ± 0.00a,w
0.25	16.09 ± 0.57a,y	1.79 ± 0.06a,y	1.21 ± 1.05a,x	0.00 ± 0.00a,w
0.5	21.84 ± 3.98a,y	9.20 ± 1.00b,y	7.47 ± 1.00b,x	0.00 ± 0.00a,w
1.0	43.22 ± 2.79b,z	28.47 ± 4.45c,y	19.92 ± 3.83c,x	4.56 ± 2.02b,w
3.0	62.97 ± 6.81c,z	31.97 ± 6.05c,y	26.07 ± 5.33d,xy	17.67 ± 4.49c,w
15%DH BPCH-F				
0.1	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w
0.25	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w
0.5	8.83 ± 2.35b,x	1.28 ± 2.22b,w	0.00 ± 0.00a,w	0.00 ± 0.00a,w
1.0	28.40 ± 2.14c,y	8.64 ± 2.14c,x	1.23 ± 2.14b,w	0.00 ± 0.00a,w
3.0	30.99 ± 0.88c,z	12.40 ± 0.18c,y	7.44 ± 0.11c,x	4.13 ± 1.41b,w

* Different characters (a-d) 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.

ตารางภาคผนวกที่ 7 การจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (BPCH-A)

NaCl Concentrate (mM)	Turbidity			
	BPC	10%DH BPCH-A	20%DH BPCH-A	30%DH BPCH-A
0	2.18 ± 0.00 ^{cd,y,*}	1.25 ± 0.03 ^{d,x}	1.07 ± 0.01 ^{c,w}	0.97 ± 0.13 ^{b,w}
25	2.26 ± 0.05 ^{d,y}	1.28 ± 0.01 ^{d,x}	1.14 ± 0.01 ^{d,w}	1.09 ± 0.01 ^{d,w}
50	2.27 ± 0.00 ^{d,z}	1.13 ± 0.01 ^{c,y}	1.05 ± 0.01 ^{c,x}	0.96 ± 0.06 ^{b,w}
100	2.09 ± 0.12 ^{bc,y}	1.07 ± 0.02 ^{b,x}	1.00 ± 0.01 ^{b,x}	0.87 ± 0.05 ^{b,w}
200	2.05 ± 0.06 ^{b,y}	1.07 ± 0.02 ^{b,x}	0.99 ± 0.00 ^{b,w}	0.88 ± 0.01 ^{b,w}
300	1.77 ± 0.03 ^{a,z}	1.02 ± 0.02 ^{a,y}	0.93 ± 0.01 ^{a,x}	0.79 ± 0.03 ^{a,w}

* Different characters (a-d) represent the significance at $p < 0.05$ among the same sample, while different (w-z) indicate the significance at $p < 0.05$ among the same NaCl concentrate.

ตารางภาคผนวกที่ 8 การจับเรียงตัวภายใต้สภาวะการให้ความร้อนของโปรตีนถั่วหรั่งเข้มข้น (BPC) และโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (BPCH-F)

NaCl Concentrate (mM)	Turbidity			
	BPC	5%DH BPCH-F	10%DH BPCH-F	15%DH BPCH-F
0	2.18 ± 0.00 ^{cd,z,*}	1.86 ± 0.01 ^{a,y}	1.62 ± 0.02 ^{a,x}	1.50 ± 0.05 ^{d,w}
25	2.26 ± 0.05 ^{d,x}	2.12 ± 0.12 ^{b,x}	1.78 ± 0.00 ^{d,w}	1.64 ± 0.07 ^{e,w}
50	2.27 ± 0.00 ^{d,z}	1.97 ± 0.06 ^{a,y}	1.72 ± 0.04 ^{c,x}	1.39 ± 0.01 ^{c,w}
100	2.09 ± 0.12 ^{bc,z}	1.94 ± 0.01 ^{a,y}	1.68 ± 0.02 ^{b,x}	1.29 ± 0.01 ^{b,w}
200	2.05 ± 0.06 ^{b,z}	1.91 ± 0.14 ^{a,w}	1.61 ± 0.02 ^{a,y}	1.22 ± 0.01 ^{a,x}
300	1.77 ± 0.03 ^{a,z}	1.66 ± 0.00 ^{a,x}	1.59 ± 0.01 ^{a,w}	1.21 ± 0.01 ^{a,y}

* Different characters (a-d) represent the significance at $p < 0.05$ among the same sample, while different (w-z) indicate the significance at $p < 0.05$ among the same NaCl concentrate.

ภาคผนวก จ

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุณณานิ สัมภาวะผล

หน่วยงานและคณะ: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ที่อยู่/สถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์:

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

โทรศัพท์ : 0-7428-6366

โทรสาร : 0-7455-8866

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ : punnanee.s@psu.ac.th

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ: Nutrition / Food microbiology / Food safety

ผลงานตีพิมพ์

- Pongsetkul, J., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.**, Osako, K. and Faithong, N. 2017. Characterization of endogenous protease and the changes in proteolytic activity of *Acetes vulgaris* and *Macrobrachium lanchesteri* during Kapi production. *Journal of Food Biochemistry*. 41(1): DOI: 10.1111/jfbc.12311.
- Thongruck, K., Saelao, S., **Sumpavapol, P.**, Benjakul, S. and Maneerat, S. 2017. Monitoring of changes in lactic acid bacteria during production of Thai traditional fermented shrimp (Kung-som) by culturing method and PCR-DGGE technique. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 39(1): 41-47.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.**, Osako, K. and Faithong, N. 2017. Comparative studies on autolysis and antioxidative properties of salted shrimp paste (*Kapi*) from *Acetes vulgaris* and *Macrobrachium lanchesteri*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 17(4): 805-814
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.**, Osako, K. and Faithong, N. 2016. Effect of post-mortem storage prior to salting on quality of salted shrimp paste (*Kapi*) produced from *Macrobrachium lanchesteri*. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. 8(2): 93-106.

- Pongsetkul, J., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.**, Osako, K. and Faithong, N. 2016. Properties of saled shrimp paste (Kapi) from *Acetes vulgaris* as affected by postmortem storage prior to salting. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40(4): 636-646.
- Tirawat, D., Phongpaichi, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2016. Microbial load reduction of sweet basil using acidic electrolyzed water and lactic acid in combination with mild heat. *Food Control*. 64: 29-36.
- Arfat, Y.A., Benjakul, S., Prodpran, T., **Sumpavapol, P.** and Songtipya, P. 2016. Physico-mechanical characterization and antimicrobial properties of fish protein isolate/fish skin gelatin-zinc oxide (ZnO) nanocomposite films. *Food and Bioprocess Technology*. 9(1): 101-112.
- Arfat, Y.A., Benjakul, S., Vongkamjan, K., **Sumpavapol, P.** and Yarnpakdee, S. 2015. Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin-ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil. *Journal of Food Science and Technology*. 52(10): 6182-6193.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.** and Kishimura, H. 2015. Purification and characterization of extracellular gelatinolytic protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Biochemistry*. 39(1): 119-128.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.** and Kishimura, H. 2015. Antioxidant activity of gelatin hydrolysate produced from fish skin gelatin using extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39(4): 394-403.
- Maqsood, S., Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.** and Abushelaibi, A. 2015. Antioxidant activity of date (*Phoenix dactylifera* var. *Khalas*) seed and its preventive effect on lipid oxidation in lipid model systems. *International Food Research Journal*. 22(3): 1180-1188.
- Kaewmanee, T., Nagfar, L., **Sumpavapol, P.** and Benjakul, S. 2015. Functional and antioxidative properties of bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*. 22(4): 1584-1595.
- Wonghirundecha, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2014. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of stink bean (*Parkia speciosa* Hassk.) pod extracts. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 36(3): 301-308.
- Ayama, H., **Sumpavapol, P.** and Chanthachum, S. 2014. Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 36(3): 291-300.

- Sai-Ut, S., Benjakul, S. **Sumpavapol, P.** and Kishimura, H. 2014. Optimization of gelatinolytic enzyme production by *B. amyloliquefaciens* sp. H11 through Plackett-Burman design and response surface methodology. *International Aquatic Research*. 6 (1): 10p
- Arfat, Y.A., Benjakul, S., Prodpran, T., **Sumpavapol, P.** and Songtipya, P. 2014. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*. 41: 265-273.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S. **Sumpavapol, P.** and Kishimura, H. 2014. Effect of drying methods on odourous compounds and antioxidative activity of gelatin hydrolysate produced by protease from *B. amyloliquefaciens* H11. *Drying Technology*. 32(13): 1552-1559.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.**, Osako, K. and Faithong, N. 2014. Chemical composition and physical properties of salted shrimp paste (*Kapi*) produced in Thailand. *International Aquatic Research*. 6:155-166.
- Khunthongpan, S., Bourneow, C., H-Kittikun, A., Tanasupawat, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. *Enterobacter siamensis* sp. nov., a transglutaminase-producing bacterium isolated from seafood processing wastewater in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 59(2): 135-140.
- Khunthongpan, S., **Sumpavapol, P.**, Tanasupawat, S., Benjakul, S. and H-Kittikun, A. 2013. *Providencia thailandensis* sp. nov., isolated from seafood processing wastewater. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 59(3): 185-190.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. Gelatinolytic enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from fish docks: characteristics and hydrolytic activity. *Journal of Food Science and Biotechnology*. 22(4): 1015-1021.
- Ahmad, M., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.** and Nirmal, N.P. 2012. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. 155(3): 171-178.
- Benjakul, S., Kittiphanattanabawon, P., **Sumpavapol, P.** and Maqsood, S. 2012. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 51(11): 3026-3037.
- Bourneow, C., Benjakul, S., **Sumpavapol, P.** and H-Kittikun, A. 2012. Isolation and cultivation of transglutaminase-producing bacteria from seafood processing factories. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 10: 28-39.

Aderibigbe, E.Y., Visessanguan, W., **Sumpavapol, P.** and Kongtong, K. 2011. Sourcing starter cultures for *Parkia biglobosa* fermentation I: Phylogenic grouping of *Bacillus* species from commercial 'iru' samples. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. 2(7): 121-127.

Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajawatee, N., Luxananil, P. and Visessanguan, W. 2010. *Bacillus siamensis* sp. nov. isolated from salted crab (*pookhem*) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(10): 2364-2370.

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

Sumpavapol, P. and Rakmai, J. 2016. Development of thermophilic spore-forming bacteria detection method for thermal processed food. 1st International Conference on Biodiversity, Food Security and Health. November 22-23, 2016. Gadjah Mada, Indonesia.

Sumpavapol, P. and Tirawat, D. 2016. Biofilm-forming ability and resistance to disinfectants of samples collected from seafood processing plants. 1st International Conference on Biodiversity, Food Security and Health. November 22-23, 2016. Gadjah Mada, Indonesia.

Kasaw, W., **Sumpavapol, P.** and Hiranvarachat, B. 2016. Comparison between conventional, ultrasonic-assisted, microwave-assisted and combination methods for extraction of bioactive compounds from stink bean (*Parkia speciosa* Hassk.) pod. The proceeding of The 18th Food Innovation Asia Conference 2016. June 16-18, 2016, Bangkok, Thailand.

Pongsetkul, J., **Sumpavapol, P.** and Benjakul, S. 2016. Effect of post-mortem storage prior to salting on quality of salted shrimp paste (*Kapi*) produced from *Acetes vulgaris*. International Conference on Food and Applied Bioscience 2016. February 4-5, 2016, Chiang Mai, Thailand.

Maha, R., Kaewmanee, T., **Sumpavapol, P.** and Karrila, T.T. 2015. Effect of smoking materials on quality of fish cracker. The proceeding of The 17th Food Innovation Asia Conference 2015. June 18-19, 2015, Bangkok, Thailand.

Khunthongpan, S., H-Kittikun, A., Tanasupawat, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2014. Phenotypic and genotypic characterization of a transglutaminase-producing bacterium isolated from seafood processing wastewater in Thailand. The proceeding

- of 2014 The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference (AMBC 2014), February 19-21, 2014, Thailand.
- Sai-Ut S., **Sumpavapol, P.** and Benjakul, S. 2013. Optimization of gelatinolytic enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* H11 through statistical design approach. 13th ASEAN Food Conference (AFC2013), September 9-11, 2013. Singapore.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. Screening of gelatinolytic enzyme producing bacteria for production of hydrolysate with antioxidative activity. The proceeding of 2013 2nd International Conference on Nutritional and Food Sciences (ICNFS 2013), July 27-28, 2013. Moscow, Russia.
- Wonghirundecha, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. Study on optimal condition for the extraction of phenolic compounds and antimicrobial agent from *Parkia speciosa* Hassk. pods. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. June 13-14, 2013, Bangkok, Thailand.
- Wonghirundecha, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. Total phenolic content and antimicrobial activity of stink bean (*Parkia speciosa* Hassk.) pods. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. June 13-14, 2013, Bangkok, Thailand.
- Senthong, R. and **Sumpavapol, P.** 2013. Effect of growth phase and cryoprotectant on survival of selected probiotic strains subjected to freeze-drying. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. June 13-14, 2013, Bangkok, Thailand.
- Dangkhaw, N., Maneerat, S. and **Sumpavapol, P.** 2013. Effect of growth phase and cryoprotectants on viability of *Enterococcus hirae* K34 and *Lactobacillus pentosus* K39 subjected to freeze-drying. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. June 13-14, 2013, Bangkok, Thailand.
- Ayama, H., **Sumpavapol, P.** and Chanthachum, S. 2013. Effect of encapsulation of selected probiotic lactic acid bacteria on survival in simulated gastrointestinal tract condition. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. June 13-14, 2013, Bangkok, Thailand.
- Sumpavapol, P.** 2012. Antibacterial activity of selected Thai indigenous plants against food-borne pathogenic bacteria. The proceeding of 2012 International Conference on Nutrition and Food Science (ICNFS 2012), July 23-24, 2012, Singapore.
- Khunthongpan, S., H-Kittikun, A., Bourneow, C., Tanasupawat, S and **Sumpavapol, P.** 2012. Identification of transglutaminase-producing bacterium isolated from seafood

- processing wastewater. The proceeding of 2012 International Conference on Nutrition and Food Science (ICNFS 2012), July 23-24, 2012, Singapore.
- Wonghirundecha, S. and **Sumpavapol, P.** 2012. Antibacterial activity of selected plant by-products against food-borne pathogenic bacteria. The proceeding of 2012 International Conference on Nutrition and Food Science (ICNFS 2012), July 23-24, 2012, Singapore.
- Senthong, R., Chanthachum, S. and **Sumpavapol, P.** 2012. Screening and identification of probiotic lactic acid bacteria isolated from *Poo-Khem*, a traditional slated crab. The proceeding of 2012 International Conference on Nutrition and Food Science (ICNFS 2012), July 23-24, 2012, Singapore.
- Dangkhaw, N., Maneerat, S. and **Sumpavapol, P.** 2012. Characterization of lactic acid bacteria isolated from *Kung-Som*, a traditional fermented shrimp, in respect of their probiotic properties. The proceeding of 2012 International Conference on Nutrition and Food Science (ICNFS 2012), July 23-24, 2012, Singapore.
- Ngafa, L., Kaewmanee, T. and **Sumpavapol, P.** 2012. Functionality and antioxidant properties of protein hydrolysate from Bambara groundnut (*Voandzeia subterranean*) protein concentrate treated with alcalase. The 14th Food Innovation Asia Conference 2012. June 14-15, 2012, Bangkok, Thailand.
- Sumpavapol, P.**, Benjakul, S., Tanasupawat, S. and Visessanguan, W. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of Bacillus strains isolated from soy sauce fermentation. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29-31, 2011, Kosa Hotel, Khon kaen, Thailand.
- Sumpavapol, P.**, Sirichote, A., Chanthachum, S., Benjakul, S., Tanasupawat, S., and Visessanguan, W. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of longkong seed extract. International Conference on Food Innovation (FoodINNOVA 2010), October 25-29, 2010, Valencia, Spain.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Kingcha, Y., Tapingkae, W., Lertprakobkit, W., **Sumpavapol, P.**, Punjaisee, C., Tanasupawat, S. and Valyasevi, R. 2010. Technological development of traditional fermented foods in Thailand: Quality, Safety and Health Benefits. Jeonju International Symposium on Fermented Foods –Fermentation, Source of Vitality -, October 22-23, 2010. Jeonbuk, Korea.

- Saru, S., **Sumpavapol, P.**, Benjakul, S., Visessanguan, W. 2010. Microbial quality of salted crab sold in local markets in Songkhla province. BioScience for the Future 2010, October 7-8, 2010, Prince of Songkla University, Thailand.
- Sumpavapol, P.**, Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Visessanguan, W. 2008. Optimization of Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus* sp. THY-C1. TSB 19th Annual Meeting: Biotechnology for Global care, October 14-17, 2008, Takasila Hotel, Maha sarakhem, Thailand.
- Sumpavapol, P.**, Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Visessanguan, W. 2007. Isolation and Screening of Fibrinolytic Enzyme-Producing Bacteria from Thai Fermented Foods. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 31 (Suppl), Chulalongkorn University, Thailand.
- Sumpavapol, P.**, Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Visessanguan, W. 2007. Screening and Identification of Fibrinolytic Enzyme-Producing Bacteria from Thai Fermented Foods. The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”, October 9-12, 2007, Thammasat University, Pathum Thani, Thailand.

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล: ดร.ธรรมรัตน์ แก้วมณี

หน่วยงานและคณะ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ที่อยู่/สถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์:

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

181 ต.รูสะมิแล อ.เมือง จ.ปัตตานี 94000

โทรศัพท์ : 0-7331-2160

โทรสาร : 0-7333-4609

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ : thammarat.k@psu.ac.th

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ: Food chemistry / Protein hydrolysate

ผลงานตีพิมพ์

Kaewmanee, T., Karrila, T.T. and Benjakul, S. 2015. Effects of fish species on the characteristics of fish cracker. *International Food Research Journal*. 22(5), 2078-2087.

Kaewmanee, T., Ngafa, L., Sumpavapol, P. and Benjakul, S. 2015. Functional and antioxidative properties of bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) protein hydrolysates. *International Food Research Journal*. 22(4), 1584-1595.

Chusri, S., Singthong, P. and **Kaewmanee, T.** 2015. Antioxidant, anticancer, and cytotoxic effects of Thai traditional herbal preparations consumed as rejuvenators. *CyTA – Journal of Food*. 13 (1): 40-48.

Ganesan. P., **Kaewmanee, T.,** Benjakul, S. and Baharin, B.S. 2014. A review: Comparative study on the nutritional value of pidan and salted duck egg. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 34 (1): 1-6.

Kaewdang, O., Benjakul, S., **Kaewmanee, T.** and Kishimura, H. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. 155: 264–270.

Kaewmanee, T., Bagnasco, L., Benjakul, S., Lanteri, S., Morelli, C.F., Speranza, G., and Cosulich, M.E. 2014. Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chemistry*. 148: 60–69.

- Bagnasco, L., Pappalardo, V.M., Mereaglia, A., **Kaewmanee, T.**, Ubiali, D, Speranza, G. and Cosulich, M.E. 2013. Use of food-grade proteases to recover umami protein-peptide mixtures from rice middlings. *Food Research International* 50 (1)
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. Gamonpilas, C. 2012. Effect of sodium chloride and osmotic dehydration on viscoelastic properties and thermal-induced transition of duck egg yolk. *Food and Bioprocess Technology*. Article in press.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2012. Effect of acetic acid and commercial protease pretreatment on salting and characteristics of salted duck egg. *Food and Bioprocess Technology*. 5(5): 1520-1510.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2011. Effect of NaCl on thermal aggregation of egg white proteins from duck egg. *Food Chemistry*. 125(2): 706-712.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2009. Effect of salting processes and time on chemical composition, textural properties and microstructure of cook duck egg. *Journal of Food Science*. 76(2): 139-147.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2009. Protein hydrolysate of salted duck egg white as a substitute of phosphate and its effect on quality of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science*. 74(8): 351-361.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2009. Effect of salting processes on chemical composition, textural properties and microstructure of duck egg. *Journal of Food Science and Agriculture*. 89(4): 625-633.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2009. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. *Food Chemistry*. 112(3): 560-569.

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

- Kaewmanee, T.**, Gansesan, P. Baharin, B.S. 2015. Antioxidant activities of *Moringa oleifera* leaves extract using ultrasound assisted extraction. Food Ingredient Asia Conference. September 10-11, 2015, BITEC, Bangkok, Thailand.
- Tohyalay, P., K-da, S. and **Kaewmanee, T.** Effect of fish skin addition on functional properties of reduced-salt surimi gel. 5th International Symposium on Wellness, Healthy Lifestyle and Nutrition. December 2-3, 2014, Songkhla, Thailand.

- Maha, R., **Kaewmanee, T.**, Sumpavapol, P. and Karrila, T.T. 2015. Effect of Smoking Materials on the Qualities of Fish Crackers. 17th Food Innovation Asia Conference (FIAC 2015). 2015. June 18-19, 2015, Bangkok, Thailand.
- Maha, R., **Kaewmanee, T.**, Sumpavapol, P. and Karrila, T.T. 2014. Quality changes of fish cracker during low-temperature storages. 5th International Symposium on Wellness, Healthy Lifestyle and Nutrition. 2014. Lee Gardens Plaza Hotel, Hat Yai, Thailand.
- Kaewmanee, T.** and Karrila, T.T. 2013. Effect of fish type on characteristics of fish cracker. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. BITEC Bangna, Bangkok, Thailand
- Ngafa, L., **Kaewmanee, T.** and Sumpavapol, P., Benjakul, S. 2012. Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from Bambara groundnut protein concentrate using flavourzyme. 3th International symposium on wellness, healthy lifestyle and nutrition 2012. Kelantan, Malasia.
- Ngafa, L., **Kaewmanee, T.** and Sumpavapol, P. Benjakul, S. 2012. Functionality and antioxidant properties of protein hydrolysate from Bambara groundnut (*Voandzeia subterranean*) protein concentrate treated with Alcalase. Food Innovation Asia 2012: The International Food Conference. BITEC Bangna, Bangkok.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2009. Quality improvement of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by protein hydrolysate from salted egg white and mixed phosphates. 11th ASEAN Food Conference 2009. Bandar Seri Begawan. Brunei Darussalam.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2008. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. IFT Annual Meeting. New Orleans, USA.
- Kaewmanee, T.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2008. Effect of salting processes on chemical composition, textural properties and microstructure of duck egg. Food Innovation Asia 2008: The International Food Conference. BITEC Bangna, Bangkok.

ผลงานการแต่งตำรา

- Benjakul, S. and **Kaewmanee, K.** 2017. Innovation and strategies for improvement sodium chloride preservation in duck eggs. In Egg innovation and Strategies for Improvement, P. Hester, editor. Oxford: Academic Press, pp. 415-426.