บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขิงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

1.1 การศึกษาระยะความแก่อ่อนของขิงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

โดยทั่วไปแล้ว การเก็บเกี่ยวขิงในประเทศไทยนั้นมี 2 ระยะ คือ การเก็บเกี่ยวระยะที่เป็นขิงอ่อน และการเก็บเกี่ยวในระยะที่เป็นขิงแก่ (พิทยา สรวมศิริ, 2529) ดังนั้น การศึกษาผลของระยะการเก็บเกี่ยวต่อปริมาณเอนไซม์โปรติเอสจึงเลือกขิงอ่อนและขิงแก่มาตรวจสอบปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ จากการสุ่มตัวอย่างแง่งขิงตามระยะความแก่อ่อน พบว่าปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะความแก่อ่อน กล่าวคือปริมาณโปรตีนในขิงแก่มีค่าเท่ากับ 437.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณโปรตีนในขิงอ่อนมีค่าเท่ากับ 341.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 8) และเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าขิงแก่มีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าขิงอ่อน โดยมีค่าเฉลี่ย 401.15 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ขณะที่ขิงอ่อนมีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสเฉลี่ย 242.35 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.71 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการสุ่มตัวอย่างขิงผงที่เตรียมจากขิงอ่อนและขิงแก่ พบว่าปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะความแก่อ่อนเช่นกัน โดยปริมาณโปรตีนในขิงผงที่เตรียมจากขิงแก่มีค่าเท่ากับ 71.87 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณโปรตีนในขิงผงที่เตรียมจากขิงอ่อนมีค่าเท่ากับ 58.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 9) และเมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าขิงผงที่เตรียมจากขิงแก่นั้น มีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าขิงผงที่เตรียมจากขิงอ่อน โดยมีค่าเฉลี่ย 41.56 ยูนิตต่อกรัมน้ำ

หนักแห้ง และ 0.58 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ขณะที่ขิงผงที่เตรียมจากขิงอ่อนมีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสเฉลี่ย 24.85 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.42 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ฉะนั้นอายุหรือความแก่อ่อนจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์และความจำเพาะของเอนไซม์ โปรติเอส ทั้งในลักษณะที่เป็นขิงสดและลักษณะที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นขิงผงแล้วก็ตาม โดยเอนไซม์จะมีมากในขิงที่แก่และมีปริมาณน้อยในขิงที่ยังอ่อนอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Thompson และคณะ (1973) ที่พบว่าขิงที่เจริญเต็มที่แล้วจะมีเอนไซม์โปรติเอสปริมาณที่สูงกว่าขิงที่ยังเจริญไม่เต็มที่ เช่นเดียวกับ อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ (2527) ที่ศึกษาผลของอายุสับปะรดต่อปริมาณเอนไซม์โบรมิเลน พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีมากที่สุดในลำต้นที่แก่จัด โดยลำต้นที่แก่จัดอายุประมาณ 3 และ 2 ปี จะมีปริมาณเอนไซม์โบรมิเลนเป็น 2.6 และ 1.7 เท่าของปริมาณเอนไซม์ในลำต้นสับปะรดอายุ 1 ปี โดยเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุลำต้นสับปะรด (ทนง ภัครัชพันธุ์, 2529) นอกจากนี้ได้มีการรายงาน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระยะการเจริญเติบโตในอีกหลายผลิตผล เช่น กระเทียม (Lin and Yau, 1995) ถั่วพู (Usha and Singh, 1996) และ ผลกีวี (Boyse *et al*., 1997) เป็นต้น อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ในวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆ อาจมีความแตกต่างกันไปบ้าง ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากชนิดและพันธุ์ของวัตถุดิบ สภาพดินฟ้าอากาศ การให้น้ำ การบำรุงดูแลรักษา ส่วนของพืชที่ใช้ในการสกัด ตลอดจนอายุการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกันออกไป (จริงแท้ ศิริพานิช, 2542) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสของผลิตภัณฑ์ขิงผงสำเร็จรูปที่จำหน่ายในท้องตลาด (ตารางที่ 10) ปรากฏว่าปริมาณเอนไซม์และความจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในขิงผงสำเร็จรูปมีค่าน้อยกว่าขิงสดและขิงผงที่เตรียมขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากขิงผงสำเร็จรูปที่จำหน่ายในเชิงการค้ามีกรรมวิธีการผลิต เพื่อให้เหมาะกับการใช้ประโยชน์และยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าขิงแก่สามารถให้ปริมาณเอนไซม์และความจำเพาะของเอนไซม์ โปรติเอสได้มากกว่าขิงอ่อนและผลิตภัณฑ์ขิงผงสำเร็จรูปทาง

การค้า ดังนั้นจึงคัดเลือก ขิงแก่มาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับศึกษาขนาดของขิงผงและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์ ที่เหมาะสมในข้อต่อไป

ตารางที่ 8 ผลของความแก่อ่อนของขิงต่อปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส

The effect of ginger maturity on protein content, protease activity and specific activity

Type	Protein content (mg/g dry basis)	Total activity (unit/g dry basis)	Specific activity (unit/mg protein)
Young ginger	341.35 ± 6.71	242.35 ± 4.37	0.71 ± 0.01
Mature ginger	437.18 ± 6.25	401.15 ± 4.55	0.92 ± 0.01

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

ตารางที่ 9 ผลของความแก่อ่อนของขิงต่อต่อปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในขิงผง

The effect of ginger maturity on protein content, protease activity and specific activity of dried ginger powder

Type	Protein content (mg/g dry basis)	Total activity (unit/g dry basis)	Specific activity (unit/mg protein)
Dried young ginger powder	58.57 ± 1.43	24.85 ± 1.17	0.42 ± 0.01
Dried mature ginger powder	71.87 ± 1.22	41.56 ± 1.35	0.58 ± 0.01

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส ในขิงผงสำเร็จรูปทางการค้า

The protein content, protease activity and specific activity of commercial dried ginger powder

Type	Amount		
	Protein content (mg/g dry basis)	Total activity (unit/g dry basis)	Specific activity (unit/mg protein)
Commercial 1[1]	47.42 ± 0.31	6.38 ± 0.11	0.13 ± 0.01
Commercial 2[1]	33.33 ± 0.27	3.82 ± 0.08	0.11 ± 0.01
Commercial 3[1]	37.74 ± 0.24	2.32 ± 0.06	0.06 ± 0.01

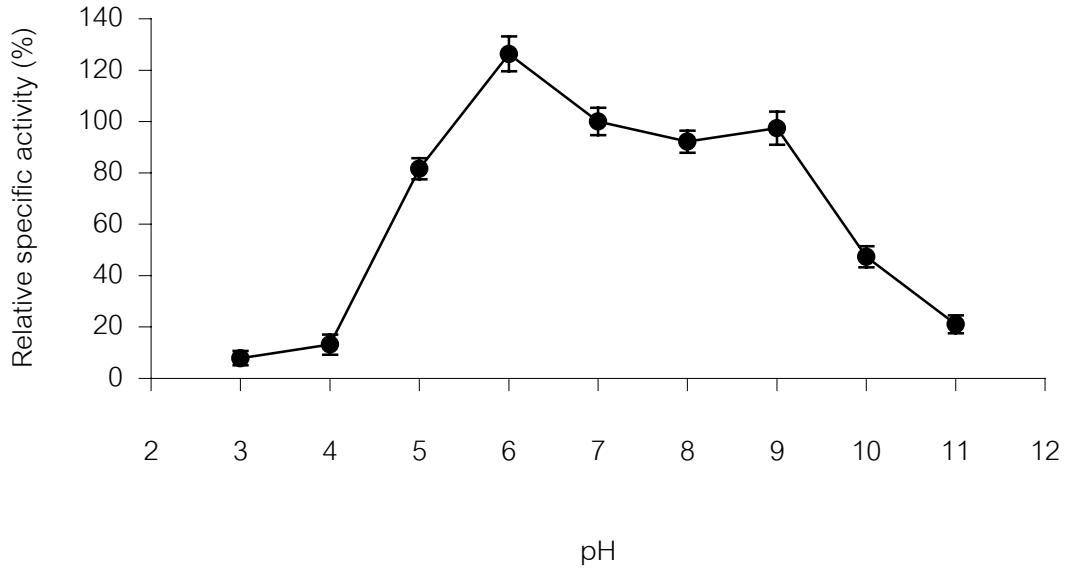
[1] 100% instant ginger drink

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

1.2 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ของขิง

จากการศึกษาระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ 6 ดังภาพที่ 3 โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลงที่ความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำเกินไป เนื่องจากในสารละลายที่มีความเป็นกรดหรือด่างมากๆ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย โดยที่ความเป็นกรดด่างจะไปมีผลต่อการแตกตัวของอิออน (ionization) ของหมู่โพรโททรอพิค (prototropic group) ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ อันส่งผลให้เอนไซม์เกิด

การเปลี่ยนแปลงโครงรูปสามมิติ ซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรตและโคแฟกเตอร์ ส่งผลให้การจับกับเอนไซม์เปลี่ยนไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์และชนิดของสับสเตรต จากการศึกษาของ Adulyatham (2001) พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากขิง จะอยู่ในช่วง 6-7 เมื่อใช้โบไวนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) เป็นสับสเตรต แต่เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรต พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มี 2 ช่วงคือที่ความเป็นกรดด่าง 6-7 และความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 Yamaguchi และคณะ (1982) พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอสจากหน่อไม้ฝรั่งและผลกีวี เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรตมีค่าเท่ากับ 7.8-8.3 และ 7.3-7.6 ตามลำดับ ขณะที่บุษยา ขุนแผ้ว (2547) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากฟักเขียวและมะแว้ง เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรต เท่ากับ 6.0 และ 6.6 ตามลำดับ

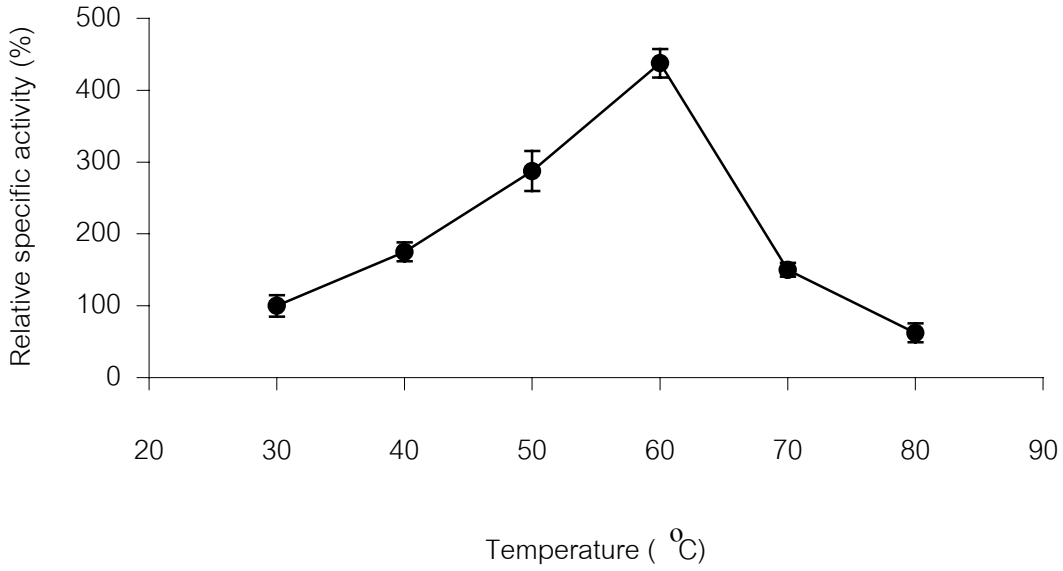


ภาพที่ 3 ผลของความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากขิง (ให้ความเป็นกรดด่าง 7 มีค่าเท่ากับ 100)

The pH-activity profile for fresh ginger protease. (at pH 7 = 100)

1.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิง

จากการศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิงมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น และมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นั่นคืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิงมีค่า 60 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4 และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่านี้ กิจกรรมของเอนไซม์จะมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในสภาวะที่เป็นอิสระ ทำให้มีความคงตัวต่ำ แต่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้น มีผลให้การแตกตัวของสับสเตรตและการเกิดเอนไซม์-สับสเตรตคอมแพกซ์เพิ่มมากขึ้น ความคงตัวของเอนไซม์จึงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ และมีผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไปด้วย เนื่องจากความร้อนทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายไป (Garcia *et al*., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Adulyatham (2001) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากขิง อยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับรายงานของ Yamaguchi และคณะ (1982) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากหน่อไม้ฝรั่งและผลกีวี มีค่า 38-43 องศาเซลเซียส และ 58-62 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Whitaker (1957) ได้ศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฟิซินจากมะเดื่อ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 62.6 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอีก จะส่งผลให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพ โดยเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดที่อุณหภูมิ 80.6 องศาเซลเซียส



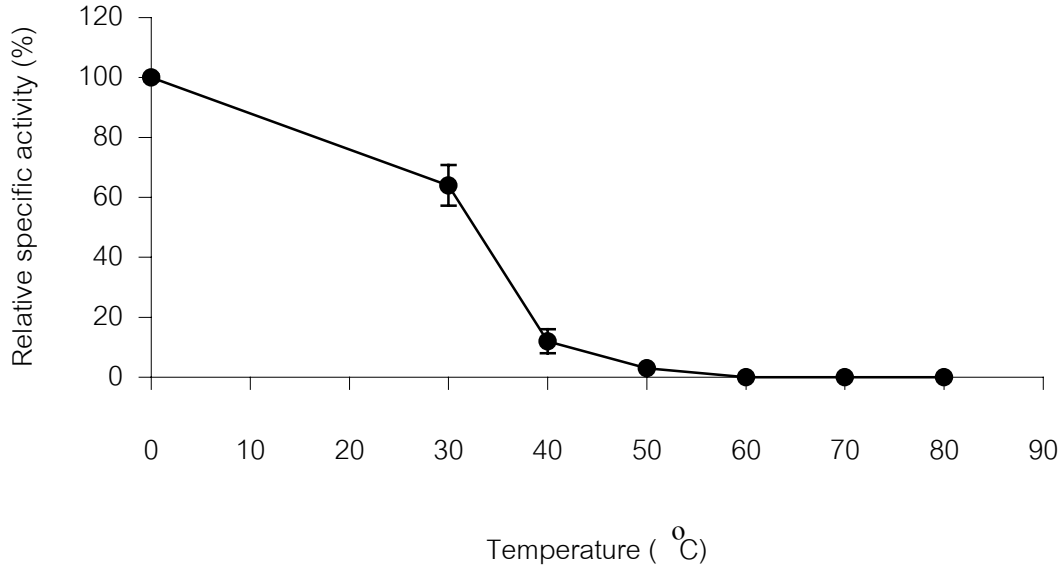
ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากขิง (ให้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 100)

The temperature-activity profile for fresh ginger protease. (at 30^0C = 100)

1.4 การศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสของขิง

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสของขิง พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังภาพที่

5 อย่างไรก็ตามการที่เอนไซม์สามารถทนร้อนได้ระดับหนึ่งอาจเกิดเนื่องจากพันธะภายในของสายเปปไทด์ อันได้แก่ พันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่แข็งแรง ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ไม่เกิดการเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อนในระดับหนึ่ง (Nissen, 1993) จากการศึกษาของ Sayed และ Tanboly (2003) ถึงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากขนุน พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 3 นอกจากนี้ Yamaguchi และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาถึงความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เอนไซม์โปรติเอสจากหน่อไม้ฝรั่ง จะมีกิจกรรมเหลืออยู่เพียงร้อยละ 17 การไม่คงตัวต่อความร้อน อาจเป็นเพราะเอนไซม์ยังไม่ถูกทำให้บริสุทธิ์ จากการศึกษาของ Adulyatham (2001) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากขิงสดมีความคงตัวของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น พบว่าความคงตัวของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นด้วย



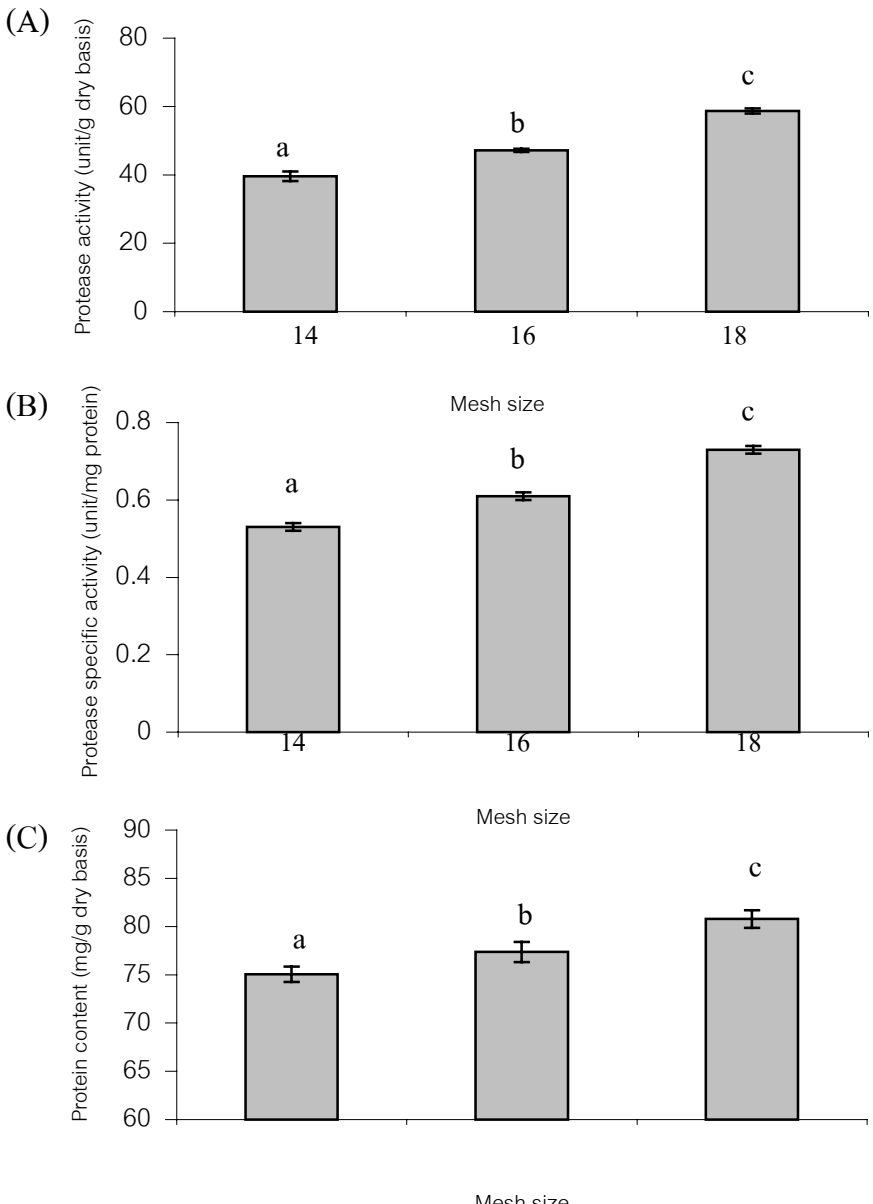
ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสจากขิง

The temperature-stability profile for fresh ginger protease.

2. ผลของขนาดขิงผง วิธีการและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากขิงผง

2.1 ผลของขนาดขิงผงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของขิงผง โดยศึกษาขิงผงที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 14, 16 และ 18 เมช พบว่าขิงผงที่ร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดเมชแตกต่างกันนั้นมีผลต่อค่ากิจกรรม กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส และปริมาณโปรตีน ดังภาพที่ 6 จากผลการทดลองเมื่อเพิ่มขนาดเมชของตะแกรงร่อน ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) โดยตัวอย่างที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 18 เมช มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 58.65 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 14 เมช มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพียง 39.58 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 6A) และเมื่อพิจารณากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 18 เมช มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.73 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 14 เมช มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสเพียง 0.53 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ภาพที่ 6B) สำหรับปริมาณโปรตีนก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเมชของตะแกรงร่อนที่เพิ่มขึ้น ($p<0.05$) (ภาพที่ 6C) ทั้งนี้เนื่องจากการร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดเมชเพิ่มขึ้น ขิงจะแตกเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กที่มีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับสารละลายได้มากขึ้น ทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนละลายออกมากับสารละลายได้มากกว่าการร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดเมชน้อย จากผลการทดลองข้างต้นจึงคัดเลือกขิงผงที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 18 เมช สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป


(A)
Protease activity (unit/g dry basis)
80
60
40
20
0
a
b
c
14
16
18
Mesh size
(B)
Protease specific activity (unit/mg protein)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
a
b
c
14
16
18
Mesh size
(C)
Protein content (mg/g dry basis)
90
85
80
75
70
65
60
a
b
c
Mesh size

ภาพที่ 6 ผลของขนาดขิงผงต่อค่ากิจกรรม (A) กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส (B) และปริมาณโปรตีน (C)

The effect of size of ground dried ginger on protease activity (A), specific activity (B) and protein content (C).

Letters show significant differences of mean among treatment ($p<0.05$).

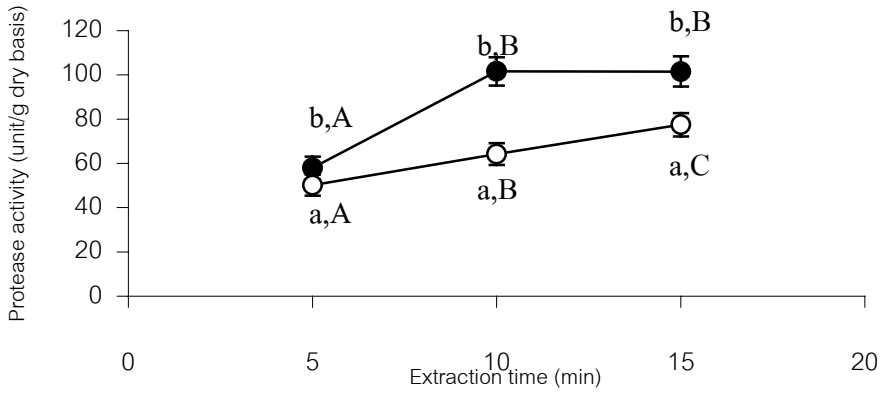
Bar represent the standard deviation of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

2.2 ผลของวิธีการและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากขิงผง

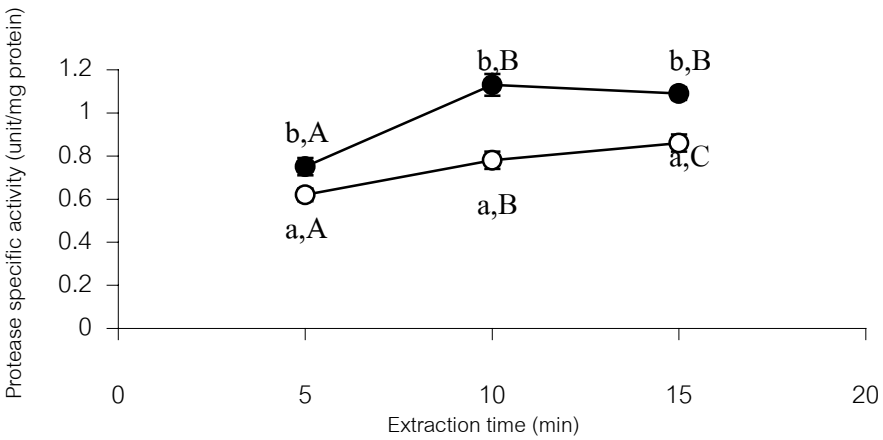
จากการศึกษาวิธีการและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์โปรติเอส โดยการนำขิงผงที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 18 เมช มาแช่ในน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 5, 10 และ 15 นาที ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 พบว่าการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่น กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสกัด ($p<0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดประมาณ 77.48 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลาการสกัด 15 นาที ขณะที่การสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสกัดจาก 5-10 นาที ซึ่งให้กิจกรรมสูงสุดประมาณ 101.59 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มคงที่แม้จะเพิ่มระยะเวลาในการสกัด (ภาพที่ 7A) เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสกัด ($p<0.05$) โดยจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ระยะเวลาการสกัดเอนไซม์นาน 15 นาที ขณะที่การสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.13

ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ระยะเวลาการสกัด 10 นาที (ภาพที่ 7B) ส่วนปริมาณโปรตีนพบว่าทั้งการสกัดเอนไซม์โปรติเอสด้วยน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 7C) การที่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสกัดเอนไซม์เนื่องจากโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์อาจละลายปนลงมา อันส่งผลให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ระยะเวลาการสกัดนาน 10 นาที จึงเป็นวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากขิงผงที่ใช้ในการทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเล็กน้อยจะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนละลายได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า salting in (อาภัสรา ชมิดส์, 2537) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Yousif และคณะ (1996) ที่ศึกษาระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากผลจูบีน โดยแช่ผลจูบีนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, 3 วัน, 7 วัน และ 14 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อแช่ผลจูบีนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นระยะเวลานานขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อแช่ผลจูบีนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นระยะเวลานาน 7 วัน แต่เมื่อระยะเวลาการแช่ผลจูบีนนานขึ้น (แช่นาน 14 วัน) พบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลง เช่นเดียวกับงานทดลองของ Seizen (1969) ซึ่งสกัดแยกเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด พบว่าการสกัดแยกเอนไซม์ที่เวลานานเกินไป จะส่งผลให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดน้อยลง โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อทำการสกัดเอนไซม์เป็นระยะเวลานาน 2 นาที

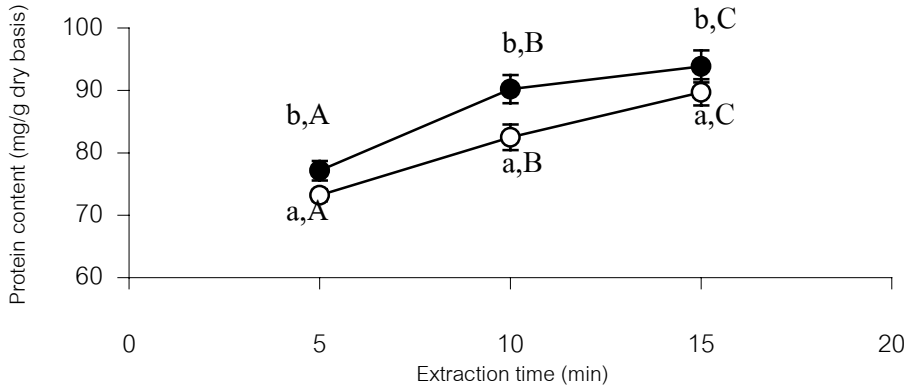
(A)


Protease activity (unit/g dry basis)
120
100
80
60
40
20
0
b,B
b,B
b,A
a,C
a,B
a,A
0
5
10
15
20
Extraction time (min)

(B)


Protease specific activity (unit/mg protein)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
b,B
b,B
b,A
a,C
a,B
a,A
0
5
10
15
20
Extraction time (min)

(C)



ภาพที่ 7 ผลของวิธีการและระยะเวลาการสกัดต่อกิจกรรม (A) กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส (B) และปริมาณโปรตีน (C) ของขิงผง

The effect of method and extraction time on protease activity (A), specific activity (B) and protein content (C) of dried ginger powder. (●NaCl and ○Distilled water) The first and second superscripts show significant differences of mean among method and extraction time, respectively ($p<0.05$).

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

3. ผลของแอสคอร์เบตและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิงผง

จากการศึกษากรรมวิธีในการผลิตขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยการเติมแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือร้อยละ 0, 0.1 และ 0.2 จากนั้นนำมาอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ กัน แปรเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าการอบแห้งขิงที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการอบแห้งนาน 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยจากการศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งคือที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่การอบแห้งที่

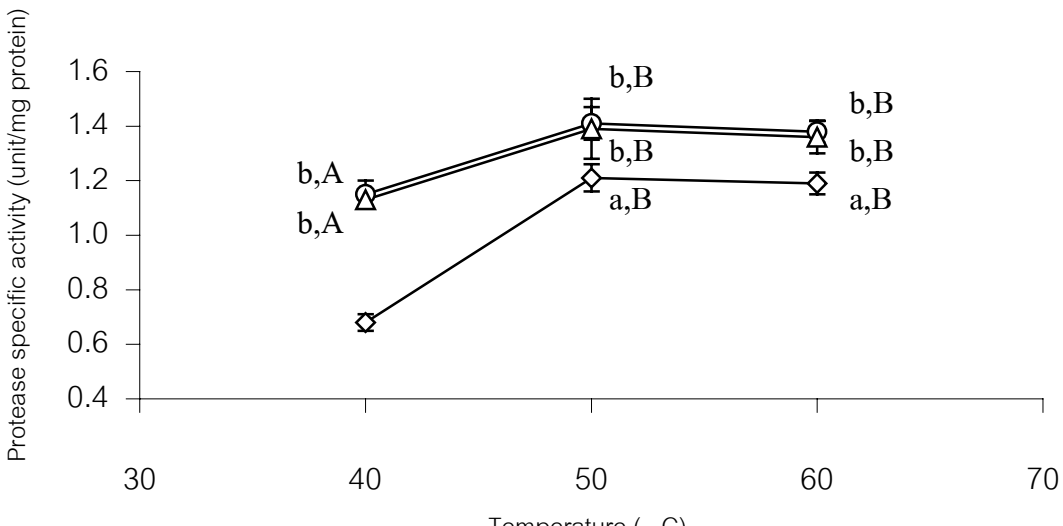
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และการอบแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้น (60 องศาเซลเซียส) กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 1.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 8) การที่เอนไซม์สามารถทนร้อนได้ระดับหนึ่ง เนื่องจากพันธะที่เชื่อมโยงกรดอะมิโนให้เป็นสายเปปไทด์และพันธะไดซัลไฟด์ที่ช่วยยึดกรดอะมิโนซิสเตอีนสองตัวในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายกันให้อยู่ใกล้ชิดกันนั้น จัดเป็นพันธะที่แข็งแรง ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนระดับหนึ่ง (Nissen, 1993) แต่อย่างไรก็ตามนอกจากพันธะในสายเปปไทด์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีพันธะอื่นๆ ที่ช่วยยึดโครงสร้างเปปไทด์ อันได้แก่ แรงดึงดูดอย่างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลล์ และพันธะไฮโดรโฟบิก โดยแรงดึงดูดอย่างอ่อนเหล่านี้มีเป็นจำนวนมาก และการที่โครงสร้างของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดชนิดอ่อน ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้ เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป เช่นการที่เอนไซม์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงเกินไป (Garcia *et al*., 2000) นอกจากนี้การอบแห้งที่อุณหภูมิสูง ความชื้นจะระเหยได้เร็วและใช้ระยะเวลาการอบแห้งสั้น แต่เอนไซม์จะมีความเสถียรลดลง ส่วนการอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งความชื้นระเหยช้ามาก ต้องใช้เวลาในการทำแห้งนาน ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ นิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ (2530) ที่ศึกษาการทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรมเหลืออยู่สูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ประมาณร้อยละ 9, 11 และ 14 ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานทดลองของ บุษยา ขุนแผ้ว (2547) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากฟักเขียวและมะแว้งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมลดลง และเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อน

ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 4 นาทีตามลำดับ ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Tamer, 1993) Yousif และคณะ (1996) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากผลจูบีน พบว่าผลจูบีนที่ได้รับความร้อน (ลมร้อน) ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีนั้น กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงร้อยละ 28 และ 86 ตามลำดับ เมื่อผลจูบีนได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาสกัดเอนไซม์ พบว่าสารสกัดที่ได้จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ทั้งหมด

การศึกษาผลของแอสคอร์เบตต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้แอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการใช้แอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 8) โดยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าระหว่าง 1.15-1.36 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามการเติมแอสคอร์เบตส่งผลให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงกว่าการไม่เติมแอสคอร์เบตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Adulyatham (2001) ที่พบว่าการเติมแอสคอร์เบตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-1.0 จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงกว่าการไม่เติมแอสคอร์เบตถึง 4 เท่า ทั้งนี้แอสคอร์เบตเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดสีน้ำตาลและลดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากกลไกการเกิดสีน้ำตาลอันเป็นผลมาจากการที่สารประกอบฟีนอลที่มีในเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่มีก๊าซออกซิเจน โดยมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้สารออโท-ไดฟีนอล (o-diphenol) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นออโท-ควิโนน (o-quinone) (Wakayama, 1995) ซึ่งต่อมาจะรวมตัวกันเอง หรือรวมตัวกับกรดอะมิโนหรือกลุ่มซัลฟ์ไฮดริลของเอนไซม์เป็นโมเลกุลใหญ่เกิดเป็นสารสีน้ำตาลในที่สุด (Ozoglu and Bayindirli, 2002; Maltheis, 1983) อันจะส่งผลให้กิจกรรม

ของเอนไซม์มีค่าลดลงจากปฏิกิริยาเอนไซม์-ฟีนอล (enzyme-phenol reaction) (Harshadrai *et al*., 2001; Robinson, 1987) การใช้แอสคอร์เบตซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) จะสามารถรีดิวซ์สารควิโนนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลให้กลับมาอยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลตามเดิม ก่อนที่สารควิโนนจะทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของโปรตีนหรือรวมตัวกันจนกลายเป็นสารสีน้ำตาลและส่งผลต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในที่สุด (Baldwin *et al*., 1996; Lozano *et al*., 1994; McEvily *et al*., 1992; Santerre *et al*., 1988) จากผลการทดลองข้างต้นจึงคัดเลือกชุดการทดลองที่มีการเติมแอสคอร์เบตร้อยละ 0.1 ร่วมกับการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป



a,A

o

ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของแอสคอร์เบตต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสของขิงผง

The effect of temperature and ascorbate on protease specific activity of dried ginger powder.

The first and second superscripts show significant differences of mean among ascorbate dosage and temperature, respectively ($p<0.05$).

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).

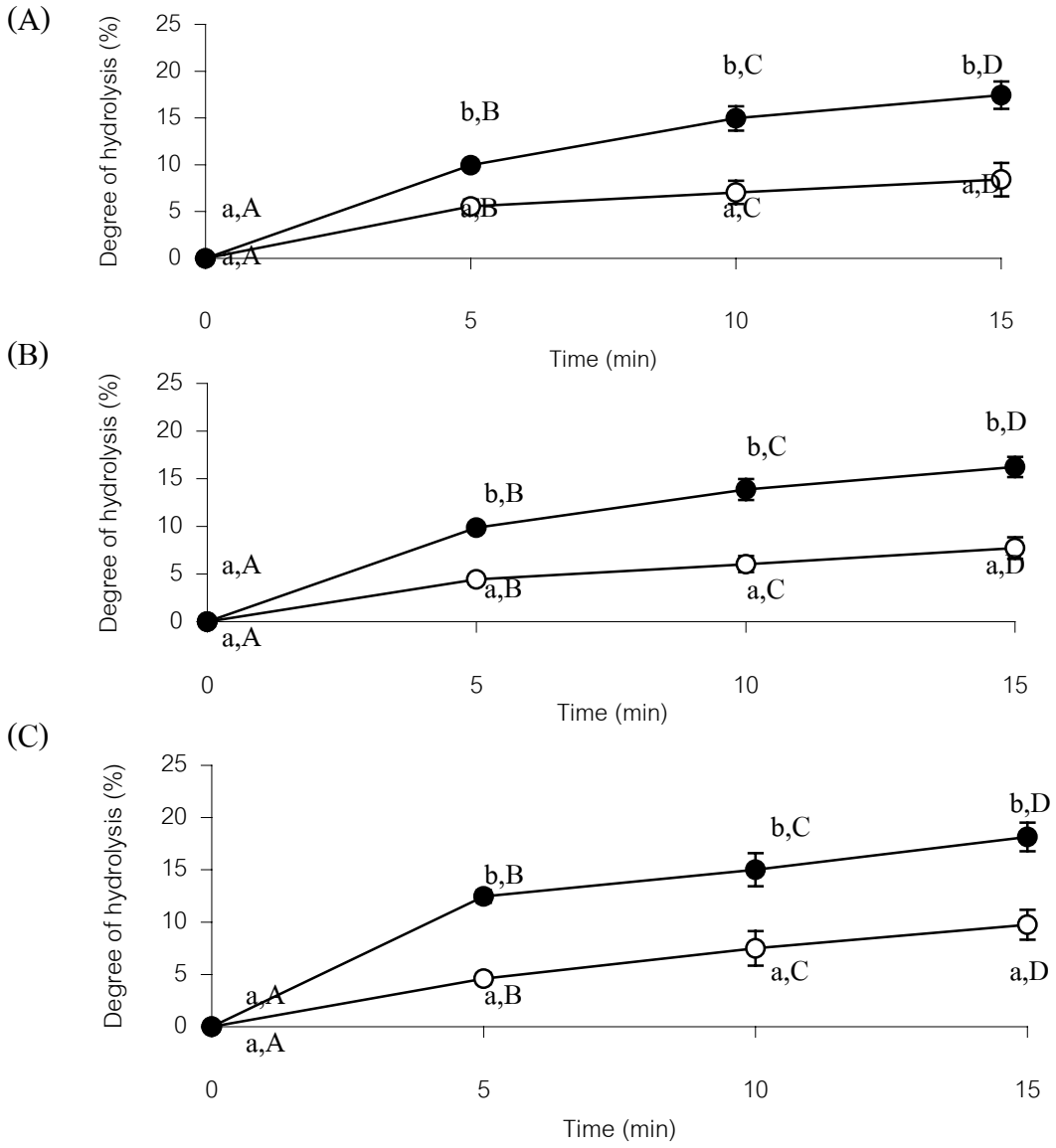
4. ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการย่อยโปรตีนบางส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารประเภท

โปรตีนบางชนิด

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อระดับการย่อยโปรตีนบางส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโปรตีนบางชนิด โดยการคัดเลือกตัวอย่างขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามกรรมวิธีการผลิตที่คัดเลือกจากข้อ 3 ปริมาณร้อยละ 1 มาผสมในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโปรตีน 3 ชนิด คือ น้ำนมโค (ปริมาณโปรตีนร้อยละ 55.61) น้ำนมถั่วเหลือง (ปริมาณโปรตีนร้อยละ 55.42) และน้ำซุปไก่ (ปริมาณโปรตีนร้อยละ 55.25) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกันคือ อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ พบ

ว่าอุณหภูมิและเวลาในการดำเนินกิจกรรม มีผลต่อการย่อยโปรตีนของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโปรตีนทั้ง 3 ชนิดที่ผสมขิงผงดังกล่าวลงไป ภาพที่ 9 แสดงผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยโปรตีนต่อระดับการย่อยโปรตีนบางส่วนของน้ำนมโค น้ำนมถั่วเหลือง และน้ำซุปไก่ที่มีการผสมขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยน้ำนมโคที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส มีการย่อยโปรตีนไปร้อยละ 5.57-8.42 และ 9.97-17.45 ตามลำดับ (ภาพที่ 9A) น้ำนมถั่วเหลืองมีการย่อยโปรตีนไปร้อยละ 4.42-7.74 และ 9.86-16.23 ตามลำดับ (ภาพที่ 9B) และน้ำซุปไก่มีการย่อยโปรตีนไปร้อยละ 4.61-9.74 และ 12.45-18.16 ตามลำดับ (ภาพที่ 9C) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ichikawa และคณะ (1973) และ Adulyatham (2001) ที่พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากขิงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการดำเนินกิจกรรม พบว่าที่ระยะเวลาในการดำเนินกิจกรรมนานขึ้น ส่งผลให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ด้วยเช่นกัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Gallangher และคณะ (1994) และ Sanogo และคณะ (1990) ที่ศึกษาผลของการย่อยโปรตีนเคซีนด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจากสับปะรด พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการดำเนินกิจกรรมให้นานขึ้น ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มมากขึ้นด้วย เช่นเดียวกับงานทดลองของ ภากร ปราชญากิจ (2547) ที่พบว่านมผสมน้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรส์ที่เวลาในการย่อยโปรตีนนาน 5 และ 10 นาที ระดับการย่อยโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นเดียวกับที่เวลา 15 และ 20 นาที ก็มีระดับการย่อยโปรตีนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างที่เวลาในการดำเนินกิจกรรมสั้น (5 และ 10 นาที) กับเวลาในการดำเนินกิจกรรมยาว (15 และ 20 นาที) พบว่าเวลาในการดำเนินกิจกรรมยาว ระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าเวลาในการดำเนินกิจกรรมสั้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีสของน้ำนมโค น้ำนมถั่วเหลือง และน้ำซุปไก่ที่มีการผสมขิงผงที่มีกิจกรรม

ของเอนไซม์ โปรติเอสที่อุณหภูมิและเวลาในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการดำเนินกิจกรรมให้นานขึ้น แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะลดลง ขณะที่ขนาดของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการดำเนินกิจกรรมเพิ่มมากขึ้น พันธะเปปไทด์ก็จะถูกตัดย่อยมากขึ้น ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำแถบโปรตีนที่ได้มาทดสอบด้วยเครื่อง Densitometer เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทั้ง 3 ชนิดที่ผสมขิงผงดังกล่าวลงไป แล้วนำมาบ่มที่ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน โปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่มีปริมาณลดลงในระดับที่ต่างกัน โดยน้ำนมโคที่ผ่านการดำเนินกิจกรรมเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 29,000-35,000 ดาลตัน) ลดลงร้อยละ 20, 24 และ 27 เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส และลดลงร้อยละ 31, 35 และ 41 เมื่อบ่มที่ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนน้ำนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดำเนินกิจกรรมเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 29,000-35,000 ดาลตัน) ลดลงร้อยละ 20, 23 และ 25 เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส และลดลงร้อยละ 28, 32 และ 37 เมื่อบ่มที่ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ขณะที่น้ำซุปไก่ที่ผ่านการดำเนินกิจกรรมเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที ปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 43,000-66,000 ดาลตัน) ลดลงร้อยละ 24, 31 และ 36 เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส และลดลงร้อยละ 40, 45 และ 52 เมื่อบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

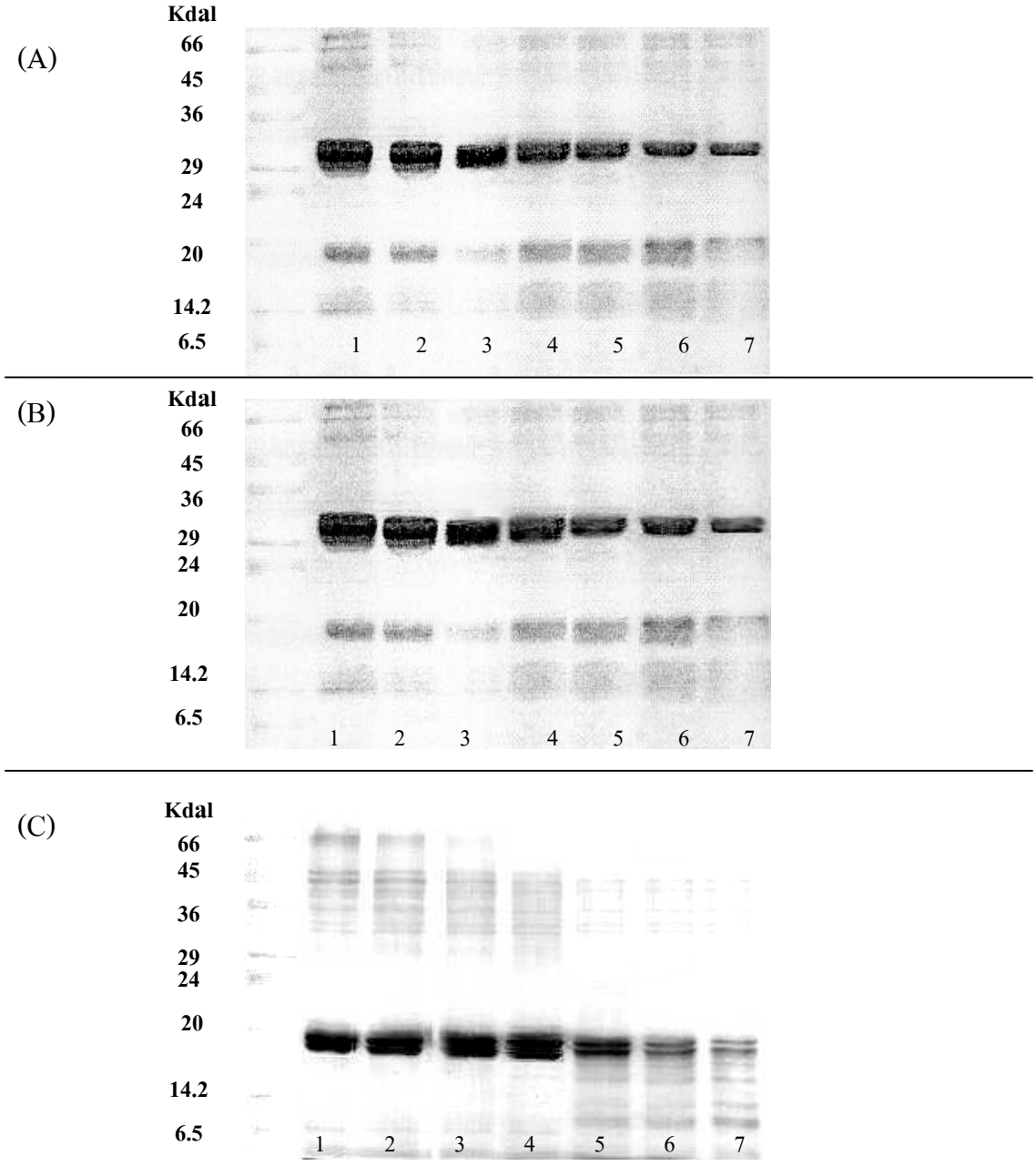


ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อระดับการย่อยโปรตีนของน้ำนมโค (A) น้ำนมถั่วเหลือง (B) และน้ำซุปไก่ (C) โดยขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

The effect of temperature and reaction time on degree of hydrolysis in cow milk (A) soybean milk (B) and chicken soup (C) treated with ginger powder. (● 60^0C and ○ 40^0C)

The first and second superscripts show significant differences of mean among temperature and reaction time, respectively ($p<0.05$).

All values are the means of 6 determinations (3 determinations on each of duplication).



ภาพที่10 รูปแบบโปรตีนโดย SDS-PAGE ของตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากขิง [ชุดควบคุม (แถบ 1) 5 (แถบ 2) 10 (แถบ 3) 15 (แถบ 4) นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส หรือ 5 (แถบ 5) 10 (แถบ 6) 15 (แถบ 7) นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส]โดย A เป็นตัวอย่างน้ำนมโค B เป็นตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง และ C เป็นตัวอย่างน้ำซุปไก่

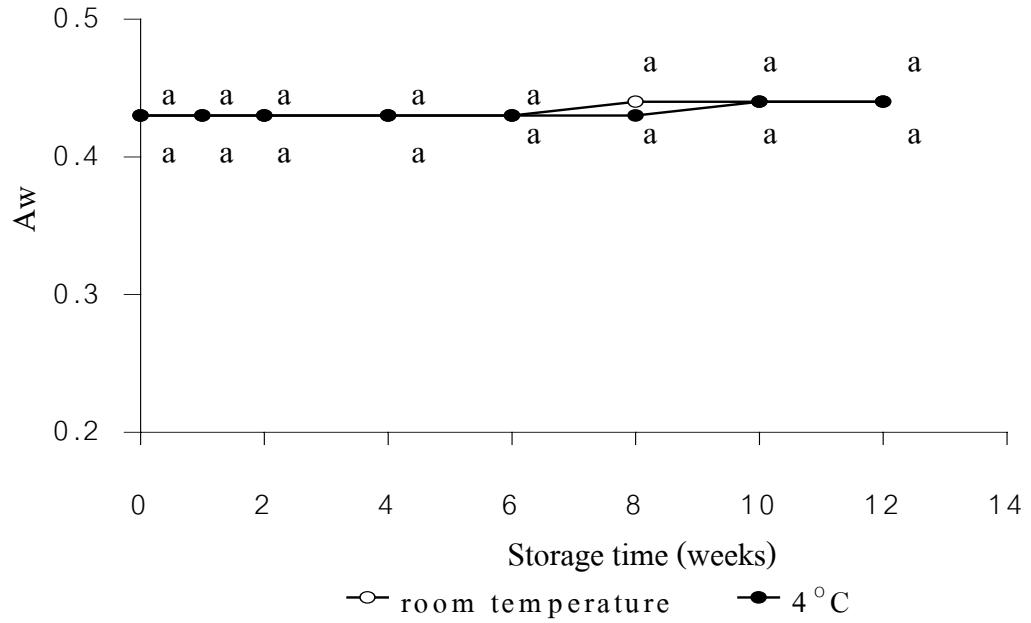
SDS-PAGE pattern of protein in the cow milk (A), soybean milk (B) and chicken soup (C) which treated with ginger powder at difference reaction time and temperature [control (lane 1), 5 (lane 2), 10 (lane 3), 15 (lane 4) min at 40^0C or 5 (lane 5), 10 (lane 6), 15 (lane 7) min at 60^0C.]

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสในระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ใน ถุงพลาสติกไนลอนชนิดโพลีเอทธิลีนภายใต้สภาวะสูญญากาศที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน คืออุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน โดยตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ได้ผลการทดลองดังนี้

5.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สภาวะอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าค่าวอเตอร์แอกติวิตีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เนื่องจากถุงพลาสติกไนลอนชนิดโพลีเอทธิลีนที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำได้ดี (อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน เท่ากับ 2.6 cm^3-mil/100 in^2-day-atm อัตราการซึมผ่านของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 4.7 cm^3-mil/100 in^2-day-atm และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ เท่ากับ 1.2 g-mil/100 in^2-day) ส่งผลให้ก๊าซและไอน้ำซึมผ่านถุงพลาสติกได้ในอัตราที่ต่ำ (Hernandez and Giacin, 1999) ค่าวอเตอร์แอกติวิตีจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในระหว่างการเก็บรักษา (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ค่าวอเตอร์แอกติวิตีของขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสระหว่างการเก็บรักษา

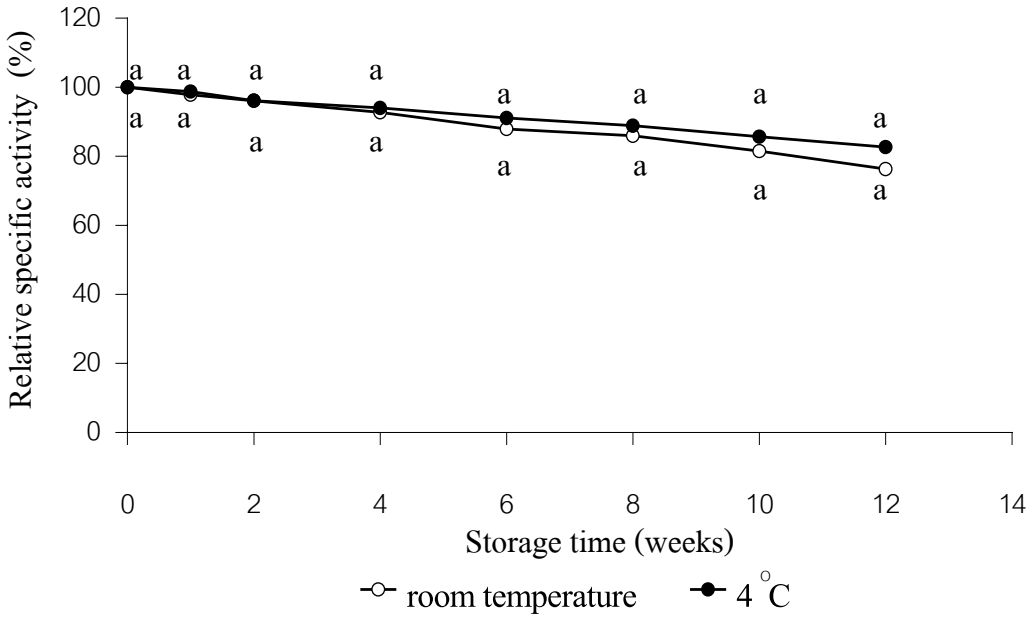
Aw of dried ginger powder during storage

Letters show significant differences of mean ($p<0.05$)

5.2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปติเอสในระหว่างการเก็บรักษา พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์แรกของการเก็บรักษา และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มลดลงมากขึ้น อย่างไร ก็ตามผลิตภัณฑ์ขิงผงสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 12 สัปดาห์ ทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส โดยในสัปดาห์ที่ 12 ของการเก็บรักษา กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าลดลงร้อยละ 23.71 เมื่อเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง และลดลงร้อยละ 17.36 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 12) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Adulyatham (2001) ที่พบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ย่อย

โปรตีนจากขิงที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 สัปดาห์ กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงเพียงร้อยละ 20 เช่นเดียวกับงานทดลองของ อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ (2527) ที่เก็บรักษาเอนไซม์โบรมิเลนผงไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยในสัปดาห์แรก และภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน เอนไซม์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะสูญเสียปฏิกิริยาไปร้อยละ 39.75 ขณะที่เอนไซม์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะสูญเสียปฏิกิริยาเพียง ร้อยละ 26.98 นั่นแสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษาเอนไซม์ จะช่วยลดการสูญเสียปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้



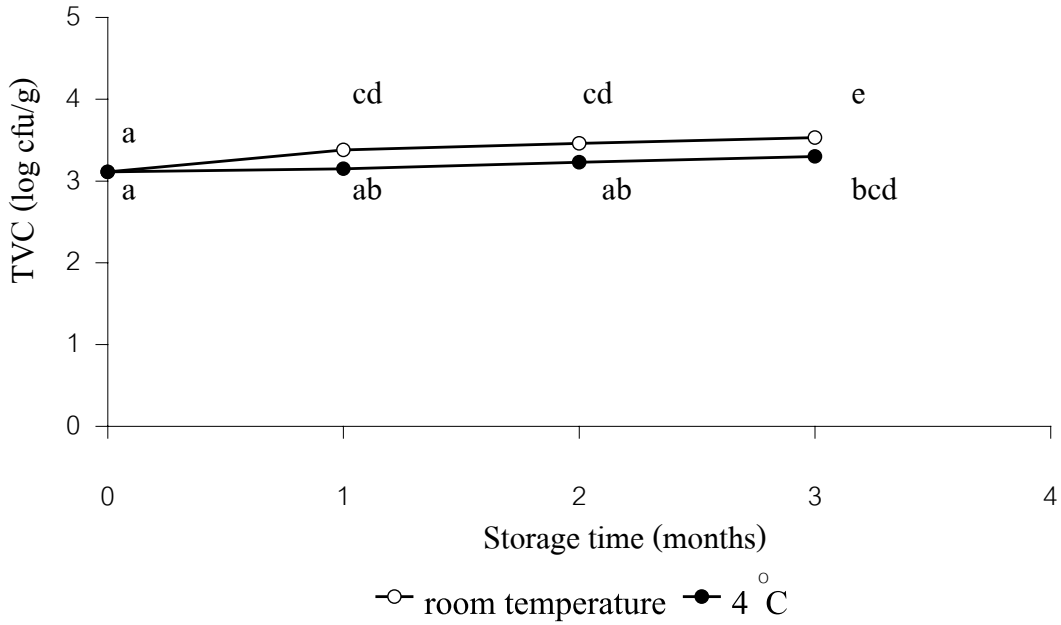
ภาพที่ 12 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในขิงผงระหว่างการเก็บรักษา

Protease specific activity of dried ginger powder during storage

5.3 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีแนวโน้ม

เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 13) และผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ประเภทโคลิฟอร์ม, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และยีสต์และรา ทั้งนี้เนื่องจากในขิงมีส่วนประกอบของสารต้านจุลินทรีย์ (anti microbial agents) อันได้แก่ สารประกอบฟีนอลและน้ำมันหอมระเหย ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ (Onyeagba *et al*., 2004) นอกจากนี้ขิงผงยังจัดเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทอาหารแห้งที่มีค่าวอเตอร์แอกติวิตีต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ด้วย (Rockland and Beuchat, 1987 อ้างโดย Rahman, 1999)



ภาพที่ 13 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสระหว่างการเก็บรักษา

Total viable count of dried ginger powder during storage

5.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมาทดสอบทางประสาทสัมผัสในรูปของน้ำนมถั่วเหลืองรสขิง ด้านกลิ่นรสขิงและการยอมรับ พบว่า

คะแนนเฉลี่ยความชอบผลิตภัณฑ์ด้านกลิ่นรสและการยอมรับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 11) โดยทุกชุดการทดลองได้รับคะแนนการยอมรับมากกว่า 3 คะแนน ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างยังคงเป็นที่ยอมรับตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 3 เดือน

ตารางที่ 11 คะแนนเฉลี่ยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขิงผงในน้ำนมถั่วเหลืองระหว่างการเก็บรักษา

The mean score of sensory evaluated of ginger powder during storage in soy bean milk

Storage temperature	Storage time (months)	Mean score	
		Flavor[1]	Overall[1]
Room temperature	Control	4.2[a]	4.3[a]
	1	4.0[a]	4.1[a]
	2	3.9[a]	4.1[a]
	3	3.8[a]	3.9[a]
4^0C	Control	4.2[a]	4.3[a]
	1	4.1[a]	4.1[a]
	2	4.1[a]	4.1[a]
	3	3.9[a]	4.1[a]

The different superscripts in the same column denote the significant difference ($p<0.05$).

[1] All values are the means of 30 panelists.

6. การทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมาทดสอบการยอมรับในรูปของผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองรสขิง โดยทำการทดสอบการยอมรับโดยรวมของกลุ่มตัวอย่างผู้บริโภคในพื้นที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 100 คน ออกแบบสอบถามที่เกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม พฤติกรรมการบริโภค และความชอบผลิตภัณฑ์ ซึ่งแบบสอบถามแสดงในภาคผนวก ง2

6.1 ลักษณะทางประชากรของผู้บริโภค

ผู้บริโภคเป็นเพศชายร้อยละ 50 เพศหญิงร้อยละ 50 มีอายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป การศึกษาของผู้บริโภคส่วนใหญ่ร้อยละ 46 อยู่ในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายหรือ ป.ว.ช. รองลงมาร้อยละ 39 อยู่ในระดับปริญญาตรี โดยผู้บริโภคส่วนใหญ่มีอาชีพประกอบธุรกิจส่วนตัวและข้าราชการคิดเป็นร้อยละ 28 และ 26 ตามลำดับ และส่วนใหญ่มีรายได้ต่ำกว่า 5,000 บาท (ภาคผนวก จ)

6.2 พฤติกรรมการซื้อและการบริโภค

ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการซื้อและการบริโภคเครื่องดื่มขิงผงสำเร็จรูปของผู้บริโภค พบว่าผู้บริโภคร้อยละ 73 ชอบบริโภคขิง ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภคขิงในรูปเครื่องดื่ม ปรุงอาหาร และรับประทานสด ตามลำดับ ผู้บริโภคร้อยละ 100 รู้จักผลิตภัณฑ์ขิงผงสำเร็จรูป โดยผู้บริโภคส่วนใหญ่ร้อยละ 62 ชอบบริโภคเครื่องดื่มขิงผงสำเร็จรูป และร้อยละ 38 รู้สึกเฉยๆ ผู้บริโภคส่วนใหญ่ร้อยละ 72 มีความถี่ในการบริโภคเครื่องดื่มขิงผงสำเร็จรูปนานๆ ครั้ง โดยผู้บริโภคมีเหตุผล 3 อันดับแรกในการเลือกซื้อคือ ต้องการคุณค่าทางอาหาร ดื่มเพื่อดับกระหาย และความสะดวกในการซื้อ สำหรับสถานที่ที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ซื้อผลิตภัณฑ์ขิงผงสำเร็จรูป คือซุปเปอร์สโตร์ ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 12 พฤติกรรมการซื้อและการบริโภค

Buying and consuming behavior

Questions	Age (year)						Total
	15-20	21-25	26-30	31-35	36-40	>40	

Do you like to consume ginger?							
like	18	3	3	8	18	23	73
neither like nor unlike	19	1	1	4	1	1	27
dislike	0	0	0	0	0	0	0
What type of ginger do you consume?							
fresh ginger	1	0	0	1	4	10	16
cookery	21	3	2	7	8	13	54
drink	19	1	2	10	11	16	59
others	0	0	0	0	0	0	0
Do you know dried ginger powder?							
know	37	4	4	12	19	24	100
don’t know	0	0	0	0	0	0	0
Do you like to consume dried ginger powder?							
like	18	1	2	8	11	22	62
neither like nor unlike	19	3	2	4	8	2	38
dislike	0	0	0	0	0	0	0
How often you consume product?							
< 1 time/week	32	3	4	7	10	16	72
1 time/week	4	1	0	1	1	2	9
2-3 times/week	1	0	0	4	7	5	17
> 3 times/week	0	0	0	0	1	1	2

ตารางที่ 12 (ต่อ)

(Continued)

Questions	Age (year)						Total
	15-20	21-25	26-30	31-35	36-40	>40	

Why do you purchase the dried ginger powder?							
convenience for buying	12	1	0	4	6	8	31
price	8	0	0	3	0	4	15
nutrition	22	2	3	4	11	15	57
refreshment	11	2	4	9	11	13	50
new taste	15	1	0	2	5	4	27
package	1	0	0	0	0	0	1
others	0	0	0	0	0	0	0
Where do you purchase product?							
convenient store	18	1	2	5	8	10	44
grocer's store	15	1	1	4	7	13	41
whole seller	17	3	4	7	12	11	54
supermarket	9	1	2	2	5	8	27
others	0	0	0	0	0	0	0

6.3 การยอมรับผลิตภัณฑ์ที่ใช้ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การทดสอบชิมผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกระทำในรูปของน้ำนมถั่วเหลืองรสขิง โดยการนำขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แช่ในน้ำนมถั่วเหลืองอุ่น เป็นเวลา 5 นาที แล้วทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13 พบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้คะแนนความชอบเฉลี่ยต่อลักษณะปรากฏเท่ากับ 4.16 คะแนน สีเท่ากับ 3.94 คะแนน กลิ่นเท่ากับ 4.30 คะแนน เนื้อสัมผัสเท่ากับ 3.96 คะแนน รสชาติเท่ากับ 4.31 คะแนน และความชอบรวมเท่ากับ 4.27 คะแนน โดยผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์ร้อยละ 92 ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งผู้บริโภคที่ให้การยอมรับผลิตภัณฑ์มีเหตุผล 3 อันดับแรก คือ อร่อย กลิ่นรส แปลกใหม่และมีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น ขณะที่ผู้บริโภคที่ไม่ให้การยอมรับผลิตภัณฑ์คิดเป็นร้อยละ 8 ซึ่งให้เหตุผลว่าไม่คุ้นเคย ไม่มีรสชาติ และมีกลิ่นรสผิดปกติ โดยผู้บริโภคยินดีซื้อ

ผลิตภัณฑ์หากมีการวางจำหน่ายในท้องตลาดในราคา 35 บาทต่อกล่อง (กล่องละ 10 ซอง) คิดเป็นร้อยละ 96

ตารางที่ 13 ความเห็นของผู้บริโภคเกี่ยวกับความชอบผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองรสขิง

Consumers attitude on liking of soy bean milk treated with ginger powder

Characteristics	Liking level					Mean score
	Like very much	Like	Neither like nor unlike	Dislike	Dislike very much	
Appearance	36	45	18	1	0	4.16
Color	24	46	30	0	0	3.94
Flavor	47	36	17	0	0	4.30
Texture	25	49	23	3	0	3.96
Taste	48	37	13	2	0	4.31
Overall liking	42	44	13	1	0	4.27

ตารางที่ 14 การยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค

Consumers acceptance on the product

Questions	Age (year)						Total
	15-20	21-25	26-30	31-35	36-40	>40	
Do you accept the product?							
accept	32	4	4	11	18	23	92
not-accept	5	0	0	1	1	1	8
Why do you accept the product?							
delicious	15	2	1	2	5	15	36
new taste	10	1	1	5	8	10	35
nutrition	8	1	3	3	4	5	24
convenient consumption	3	1	1	1	5	2	13
others	0	0	0	0	0	0	0
Why do you not-accept the product?							
not-familiar	4	0	0	1	1	0	6
tasteless	0	0	0	0	0	1	1
off-flavor	1	0	0	0	0	0	1
others	0	0	0	0	0	0	0
Do you want to buy the dried ginger powder at the price of 35 bahts/pack (pack per 10 sachets)?							
buy	36	3	4	12	18	23	96
not-buy	1	1	0	0	1	1	4