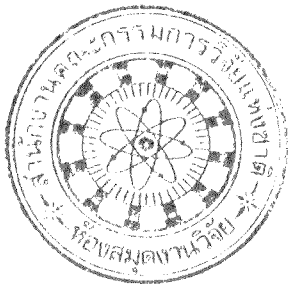


บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

โปรตีนถั่วเหลือง(Soy Protein)

โปรตีนเป็นหนึ่งในอาหารหลัก 5 หมู่ที่เป็นสิ่งจำเป็นต่อร่างกาย สำหรับการเจริญเติบโต เสริมสร้างภูมิต้านทานและซ่อมแซมส่วนที่บกพร่องของร่างกายให้เป็นปกติแหล่งของโปรตีนที่ได้จากพืชที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือถั่วเหลืองและปัจจุบันได้มีการสกัดเอาเฉพาะโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองหรือที่เรียกว่า Soy Protein Isolated มาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด เช่น อาจจะสกัดมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เพื่อให้รับประทานได้ง่าย เป็นต้น โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองจะมีคุณภาพสูง มีปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนต่างๆรวมทั้งกรดอะมิโนจำเป็น ซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างได้เอง จึงเหมาะกับผู้ที่ไม่ทานเนื้อสัตว์

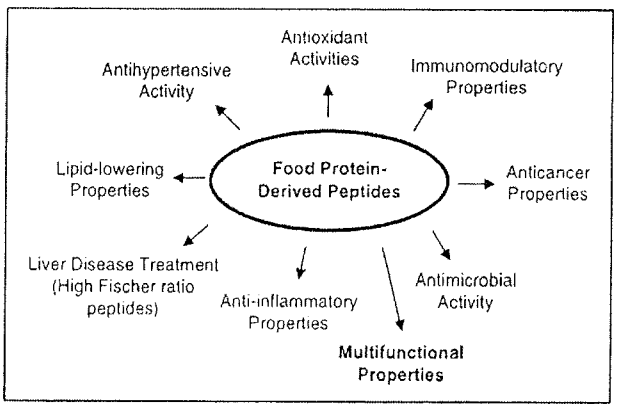
ในถั่วเหลืองมีสารไอโซฟลาโวน ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ในสตรีวัยทองเนื่องจากออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนแต่อ่อนมากถือเป็นฮอร์โมนจากพืช จะช่วยเพิ่มมวลกระดูกให้หนาแน่นขึ้น นอกจากนี้ นอกจากจะมีประโยชน์ในสตรีวัยหมดประจำเดือน เช่น อาการร้อนวูบวาบ เหงื่อตก ไขมันสูง อารมณ์ไม่ปกติ และยังช่วยในเรื่องการป้องกันหลอดเลือดแข็งตัวได้ องค์การอาหารและยาของอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) และสมาคมแพทย์โรคหัวใจในอเมริกา (American Heart Association, AHA)ได้แนะนำให้กินโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง 25 กรัม ต่อวันและให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนหนึ่งของอาหารที่มี ไขมันอิ่มตัวและโคเลสเตอรอลต่ำ ซึ่งจะลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด

โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองจะเป็นแหล่งรวมของกรดอะมิโนที่มีความเข้มข้นสูงสุด ซึ่งจะช่วยผู้ที่เสริมสร้างกล้ามเนื้อให้ยังคงได้รับโปรตีนคุณภาพสูงในระหว่างการควบคุมอาหาร และยังเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญที่ร่างกายจำเป็นจะต้องใช้ในระหว่างการออกกำลังกายอีกด้วย และนอกจากนี้ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองยังจะไปเพิ่มการผลิตไธรอยด์ฮอร์โมน ชื่อ ไธร็อกซิน (thyroxin) ที่ต่อมไธรอยด์ ซึ่งจะทำให้ร่างกายมีอัตราการเผาผลาญสารอาหารเพิ่มมากขึ้น ทำให้ไขมันที่สะสมอยู่ในร่างกายมีปริมาณลดลงจะเป็นตัวไปกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) จากต่อมใต้สมอง ซึ่งจะทำให้ร่างกายสามารถสร้างกล้ามเนื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยที่ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต จะไปกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์กล้ามเนื้อที่มีการใช้งาน ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง จะมีประโยชน์ในการบำรุงผิวของผู้หญิงโดยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ให้สารไอโซฟลาโวน มีสมบัติเช่นเดียวกับฮอร์โมนเพศหญิงอย่างอ่อนช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มความหนาของชั้น stratum corneum เพิ่มความ

ยืดหยุ่นแก่ผิว เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว ลดเลือนริ้วรอยและเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) และช่วยฟื้นฟูสุขภาพผิวให้กลับมาชุ่มชื้นนุ่มนวลสดใส ดูอ่อนวัยและยังมีส่วนช่วยเสริมสร้างให้เล็บมีสุขภาพดีแข็งแรงไม่เปราะหักง่าย นอกจากนี้สารไอโซฟลาโวนมีสาร phytoestrogen และยังช่วยให้ร่างกายคงได้รับโปรตีนคุณภาพสูงในระหว่างการออกกำลังกาย หรือการควบคุมอาหารอีกด้วย (www.Hi-Balanz.com)

เปปไทด์ออกฤทธิ์ (bioactive peptides)

Bioactive peptides (BAPs) เป็นเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนให้ได้สายสั้นที่มีฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานส่วนต่างๆของร่างกาย อาทิเช่น ออกฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต ลดโคเลสเตอรอล การต้านการเกิดทรอมบิน การต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลชีพ การเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุอาหารหรือการนำอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกระตุ้นสภาพชีวิตของเซลล์ การออกฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหารและระบบประสาทคล้ายกับการติดยา เป็นต้น เพปไทด์ออกฤทธิ์ที่มีการศึกษาในปัจจุบันจะศึกษาในแหล่งอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น นม เห็ด ถั่วเหลือง เป็นต้น ตัวอย่างรายงานวิจัยที่ศึกษาในด้านนี้ได้แก่ Udenidwe และ Aluko (2012) ได้ศึกษา BAPs ในอาหารประเภทโปรตีนจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ นม ไข่และเนื้อ อาหารทะเลจำพวกปลาต่างๆ โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสในการไฮโดรไลซ์เพื่อให้ได้ BAPs จากนั้นได้ทำการศึกษาสมบัติของ BAPs ในด้านต่างๆ เช่น inflammatory anticancer และการลดความดันโลหิต จะเห็นว่า BAPs จะมีการศึกษาในด้านผลต่อสุขภาพและการรักษาโรคต่างๆ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 Bioactive peptides (BAPs) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนให้ได้สายสั้นที่มีฤทธิ์สุขภาพและการรักษาโรคต่างๆ (ที่มา Udenidwe และ Aluko (2012))

Nakahara และคณะ (2012) ได้ศึกษาและผลิต Fermented soybean seasoning (FSS) เป็นซอสปรุงรสที่มีความเข้มข้นของโปรตีนและเพปไทด์ปริมาณสูงกว่าซอสทั่วไป 2.7 เท่า ได้ศึกษาแอคติวิตีการยับยั้ง angiotensin I-converting enzyme (ACE) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 454 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ซอสทั่วไปมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1620 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ศึกษา ACE จากเพปไทด์ของ FSS ได้แก่ Ala-Trp(IC50=10μg/ml), Gly-Try (30 μg/ml), Ala-Try (48 μg/ml), Ser-Try (67 μg/ml) เป็นต้น

Chen และ Chi (2012) ได้ศึกษาการต้านสารอนุมูลอิสระ แอคติวิตีการยับยั้ง angiotensin I-converting enzyme (ACE) และหน้าที่ของ BAPs จาก egg white protein hydrolysate (EWPH) โดยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้นและ pH ที่ต่างกัน พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ EWPH เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น ในขณะที่เมื่อเพิ่ม pH ขึ้นจะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง ในขณะที่ pH ที่เปลี่ยนแปลงไม่มีผลต่อค่า ACE

ซึ่งจะเห็นได้ว่า BAPs ที่ได้มาจากแหล่งธรรมชาติและไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับคนมีศักยภาพสูงที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณค่าต่อสุขภาพ หรือเป็นยารักษาโรค ดังนั้นการผลิตเพปไทด์ออกฤทธิ์จากพืชและวัสดุเหลือทิ้งหลายชนิดจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตร และสามารถนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ด้านโภชนาการเสริมและทางการแพทย์ต่อไป

เอนไซม์

เอนไซม์คือตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งสารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน (reaction)เรียกว่าซับสเตรต (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีซับสเตรตชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น โดยเอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรต เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อน (globular protein) ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับโครงรูป (conformation) ของโปรตีน เอนไซม์บางชนิดจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อมีโคแฟกเตอร์รวมอยู่ด้วยซึ่งเรียกว่าโฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) โดยส่วนซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เรียกว่า อะโพเอนไซม์ (apoenzyme) การเร่งปฏิกิริยา (catalysis) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายใต้การทำงานของสารที่เรียกว่าตัวเร่งปฏิกิริยา ในการเร่งปฏิกิริยาตัวเร่งจะเข้าร่วมทำปฏิกิริยาเกิดเป็นปฏิกิริยาขั้นมูลฐานต่างๆ (elementary step) และในปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายจะให้ตัวเร่งที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลับคืนมานอกจากนี้ตัวเร่งจะไม่ทำให้ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปโดยตัวเร่งเพียงแต่ไปทำให้อัตราเร็วคงที่ของปฏิกิริยาไป

ทางขวาและปฏิกิริยาทวนกลับเพิ่มขึ้นในปริมาณที่เท่าๆกัน และเมื่อพิจารณาการทำงานของเอนไซม์จะเห็นว่าเอนไซม์คือตัวเร่งของปฏิกิริยาเคมีต่างๆที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต

เอนไซม์โปรติเนส

โปรติเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปบไทด์ของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและ oligopeptide ต่างๆ ซึ่งโปรติเนสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยในระยะแรกๆ นั้นศึกษาการผลิตโปรติเนสในพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โปรติเนสที่ผลิตจากพืช เช่น โบรมีเลนจากสับปะรด ปาเปนจากยางมะละกอ โปรติเนสที่ผลิตจากสัตว์ เช่น เรนนินจากกระเพาะลูกวัว อย่างไรก็ตามโปรติเนสที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือ โปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตโปรติเนสได้มีทั้งเชื้อแบคทีเรียและรา โปรติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถ่ายรูป การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้าง มีปริมาณการใช้และคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (Helle และ Boyce, 1990; Kumar และ Takagi, 1999)

ได้มีการจัดแบ่งชนิดของโปรติเนสไว้หลายวิธี เช่น แบ่งตามจุดกำเนิดได้เป็นสามชนิดคือ จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ หรือแบ่งตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเพปไทด์ได้เป็นสองชนิดคือ exopeptidase ซึ่งทำหน้าที่ตัดที่ปลายสายโพลีเพปไทด์ และ endopeptidase ซึ่งทำหน้าที่ตัดภายในระหว่างสายโพลีเพปไทด์ หรือถ้าแบ่งตามลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็นสี่ชนิด และทุกชนิดเป็น endopeptidase ดังนั้นอีกชื่อหนึ่งที่ใช้เรียกเอนไซม์ที่เป็น endopeptidase นี้ว่า proteinase ได้แก่ metalloproteinase, acid proteinase, cystein proteinase และ serine proteinase

1. Metalloproteinase (EC 3.4.24) เป็นโปรติเนสที่อิออนของโลหะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และพบอิออนของโลหะที่บริเวณเร่ง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 Neutral proteinase เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของสังกะสี (Zn) อยู่ที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีที่ pH เป็นกลางเมื่อใช้ซับสเตรตสังเคราะห์ FAGLA (furylacrolylglycylleucinamide) และถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารพวก chelating agent เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ 1,10-phenantroline โมเลกุลของเอนไซม์จะมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมอิออน ตัวอย่างของนิวทรัลโปรติเนสที่สำคัญ ได้แก่ thermolysin ที่ผลิตจาก *B. thermoproteolyticus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นสายโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 316 residues ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โมเลกุลพับกัน (fold) ทำให้เกิด lobe 2 lobe แยกจากกันโดยร่องลึก (deep cleft) ซึ่งมีอะตอมของสังกะสีอยู่ บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 residues ใกล้อะตอมสังกะสี และมีบริเวณที่แคลเซียม 6 อะตอมจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ได้ ซึ่ง

จะทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความร้อน นิวทรัลโปรติเนส นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมยา

1.2 Alkaline-metalloproteinase เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0 ถึง 9.0 ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย EDTA นั้น ต้องใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10^{-2} โมลาร์ จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับนิวทรัลโปรติเนส ที่ใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นเพียง 10^{-3} โมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้เมื่อบ่มโปรติเนสจาก *B. subtilis* ที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่ายังคงมีแอคติวิตีสมบูรณ์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังทนต่อสารยับยั้งพวกสารประกอบฟอสเฟต และสารออกซิไดซ์ เช่น เปอร์บอเรตได้ดี จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก

2. Acid proteinase (EC 3.4.23) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า aspartic protease เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนนิน และเพปซิน ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานด้วยสาร diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร EDTA และ diisopropyl fluorophosphate (DFP) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 kDa สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. และ *Edothia* spp. การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็งด้วย

3. Cysteine proteinase (EC 3.4.22) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า sulphydryl protease เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ค่อนข้างเป็นกลาง ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือ กรดอะมิโนซีสตีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารจำพวก sulphydryl reagent ได้แก่ *p*-chloromercury benzoate (PCMB) ส่วนสาร DFP มีผลยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30 ถึง 50 kDa เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้จากพืชชั้นสูง เช่น ปาเปน และโบรมีเลน และผลิตได้จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Clostridium* spp. และ *Streptococcus* spp.

4. Serine proteinase (EC 3.4.21) เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนเซรีน และฮีสทิดีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสาร DFP และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) โดยทั่วไปเอนไซม์มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างกว้างระหว่าง 4.0 ถึง 11.0 อะตอมของโลหะแคลเซียมอิออนอาจช่วยทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 15 ถึง 30 kDa อัลคาไลน์โปรติเนสส่วนใหญ่ผลิตจาก *Bacillus* spp. ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ alkaliphilic *Bacillus* sp. โดยเอนไซม์จะถูก

สร้างและปล่อยออกอย่างอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ และอาจรวมกับโปรติเนสชนิดอื่นด้วย เช่น นิวทรัลโปรติเนส โดยอาจมีการสร้างอัลคาไลน์โปรติเนสไปพร้อมๆ กับนิวทรัลโปรติเนส หรืออาจสร้างนิวทรัลโปรติเนสก่อนอัลคาไลน์โปรติเนสก็ได้

ในปัจจุบันข้อมูลจากฐาน MEROPS ได้มีการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์โปรติเนสออกเป็น 7 ชนิดได้แก่ aspartic proteinase (1993), cysteine proteinase (1993), serine proteinase (1993), metallo proteinase (1993), threonine proteinase (1997), glutamic proteinase (2004) และ asparagines (2010) (http://merops.sanger.ac.uk)

Exopeptidase

เป็นเอนไซม์โปรติเนสที่ตัดอนุพันธ์ของโปรตีนจากปลายสาย polypeptide ซึ่งแบ่งได้เป็น 8 ชนิด คือ

1. Dipeptidase
2. Dipeptidyl dipeptidase
3. Peptidyl dipeptidase
4. Aminopeptidase
5. Serine carboxypeptidase
6. Metallo carboxypeptidase
7. Cysteine carboxypeptidase

เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Adler-Nissen (1978) ได้ศึกษาถึงสมบัติที่สำคัญในอาหารโปรตีน pH ต่ำ ของนมถั่วเหลือง พบปัญหาส่วนใหญ่ที่เกิดจากการย่อยเอนไซม์จากถั่วเหลืองคือรสชาติที่ขมของกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อย รสชาติที่ขมเกี่ยวข้องกับปริมาณของการย่อยที่มากเกิน จึงได้นำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรุงสุกมาใช้เป็นวัตถุดิบและทำการเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ที่นำมาย่อย โดยใช้เอนไซม์ Alcalase 0.6 L. ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตที่มีความเข้มข้นของโปรตีนปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 8 ในอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรตร้อยละ 2 ที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละการไฮโดรไลซีส(degree hydrolysis) ที่เหมาะสมที่สุดต่อรสชาติความขมของเอนไซม์อยู่ที่ร้อยละ 10 โดยระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย นาน 2 ชั่วโมง การหยุดปฏิกิริยาของการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองโดยการเติมกรดซิตริกและกรดมาลิกจนกระทั่ง pH เท่ากับ 4.2

Loper และคณะ (1998) ศึกษาโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นที่ได้จากการเตรียมโดยการนำแป้งถั่วเหลืองมาสกัดไขมันออกโดยแอลกอฮอล์ นำมาย่อยโดยใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ได้จากพืช 3 ชนิด การทำงานที่ดีที่สุดของ

เอนไซม์อยู่ระหว่างร้อยละ 5-15 ของการย่อยทั้งหมด เอนไซม์โปรติเอสเข้าไปย่อยพอลิเพปไทด์ตรงตำแหน่ง 7S

Debroas และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์และ ตัวแปรทางเคมีกายภาพระหว่างการย่อยเพปไทด์ถั่วเหลือง โดยเชื้อแบคทีเรีย *Prevotella ruminicola* โดยพบว่าการสลายเพปไทด์ถั่วเหลืองด้วยเชื้อสองสายพันธุ์ มีการสลายตัวร้อยละ 30.8 และการสลายตัวด้วย S17/3 ร้อยละ 14.3 การแยกเพปไทด์ด้วย HPLC พบว่าขนาดลดลง 2-3 kDa ระหว่างการหมัก การวิเคราะห์เพปไทด์หลังจาก 0 และ 16 ชั่วโมง ของการบ่มด้วยเชื้อแบคทีเรีย S17/3 แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มของเพปไทด์ด้วยน้ำหนักโมเลกุล 1-2 kDa โดยแสดงให้เห็นว่า การเจริญของ *P. ruminicola* ขึ้นอยู่กับ เพปไทด์ขนาดเล็ก และการศึกษา กิจกรรมของเพปทิเดส พบว่า dipeptidyl amino peptidase type I (DAP-1) มีผลต่อ กิจกรรมของ *P. ruminicola* ทั้งสองสายพันธุ์ ในทางตรงกันข้าม การไฮโดรไลซิสเพปไทด์ด้วยเชื้อ S17/3 โดยไม่มี alanine amino peptidase นั้นมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของ DAP-1 การวิเคราะห์กรดอะมิโนมีความสอดคล้องกับการย่อยเพปไทด์ถั่วเหลืองด้วย *P. ruminicola* 23 แสดงให้เห็นถึงการลดลงของสัดส่วนของ Glu และการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของ Ala, Val และ Thr ระหว่างการหมัก ส่วนองค์ประกอบของเพปไทด์ถั่วเหลืองที่ทำการย่อยด้วย *P. ruminicola* S17/3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

Martina และคณะ (2002) ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออก โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส 3 ชนิด และศึกษาผลของสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้ ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Flavourzyme 1000 L MG (exopeptidase ผสมกับ endopeptidase), Novozym FM 2.0 L (โปรติเอส จาก *Bacillus licheniformis*) , และ Alcalase 2.4L (endopeptidase จาก *Bacillus licheniformis*) ย่อยโปรตีนที่สกัดไขมันออกแล้ว จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ Flavourzyme จะให้ร้อยละการไฮโดรไลซีสสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 39.5 และพบว่าเอนไซม์ Alcalase และ Novozym สามารถย่อยแป้งถั่วเหลืองได้ปริมาณกรดอะมิโน Histidine ร้อยละ 30 Leucine ร้อยละ 24 และ Tyrosine ร้อยละ 19 ส่วนเอนไซม์ Flavourzyme จะให้กรดอะมิโนอิสระ Arginine ร้อยละ 22.1 Leucine ร้อยละ 10.6 และ Phenylalanine ร้อยละ 12.9

Constantinides และ Adu-Amankwa (2004) ได้ทำการศึกษาการตัดแปลงการย่อยด้วยเอนไซม์ในโปรตีนพืช กลไกในการเร่งปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ และ การผลิตโปรตีนละลายน้ำ และ โปรตีนที่ละลายน้ำบางส่วน พบว่า กลไกของการละลายของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำ โดยเอนไซม์จากเชื้อรา *Penicillium duponti* K 1104

Kasai และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงการใช้เอนไซม์ในการการแยกและทำการย่อยโครงสร้างภายในของเมล็ดถั่วเหลือง โดยใช้เมล็ดถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกโดยการใช้ความร้อนอบให้แห้ง พบว่าถั่ว

เหลืองประกอบด้วยโปรตีนถึงร้อยละ 76.5 และน้ำตาลแมนโนสและปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพียงร้อยละ 3.2 และการใช้ Sodium carbonate bufferความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 10.0 สามารถสกัดโปรตีนภายในเมล็ดถั่วเหลืองได้เร็วขึ้น

Miroljub และคณะ (2006) ศึกษาผลกระทบและข้อจำกัดในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองที่เข้มข้น พบว่าความแตกต่างที่สำคัญในการสกัดโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างกันโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสกัดโปรตีนที่มากขึ้นได้ และดีกว่าการนำเอนไซม์ทริปซิน มาใช้ในการสกัดรวมด้วย

Stephanie และคณะ (2006) ศึกษาถึงการการย่อยในระดับต่ำของเอนไซม์ Proteases เพื่อใช้ในการปรับปรุงสมบัติพื้นฐานของโปรตีนถั่วเหลืองและสมบัติทางเคมีกายภาพ โดยการใช้แป้งถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดไขมันมาศึกษาและทำการวิจัยและพบว่าโครงสร้างเพปไทด์ ที่ผ่านการย่อยมีสมบัติในการรวมตัวกับสารประกอบที่มีลักษณะเป็น Hydrophobic และนำมาตรวจสอบ น้ำหนักโมเลกุลจากการย่อยสลายโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamind gel electrophoresis (SDS – PAGE)

Hae และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงรสชาติความขมที่เกิดจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง และการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ Lysine Isolated Soy Protein (ISP) ที่ได้จะถูกเก็บรักษาด้วย N-acetylimidazole เติมหมู่ Acetyl ของไลซีน และ ไทโรซีน ที่ pH 11.0 โดยใช้เอนไซม์โบรมีเลน เป็นตัวควบคุมในการย่อย ที่ระดับร้อยละ 10 คำนวณหาค่าความขมที่ได้จากการย่อยผลที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสแสดงให้เห็นว่า รสชาติความขมที่เกิดจากการย่อย ของ Lysine-acetylated ISP มีค่าความขมที่ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม

Feng และ Xiong (2006) ศึกษาการสกัดโปรตีนถั่วเหลืองวิธีพื้นฐานนำมาบ่มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และทำการย่อยที่ค่าร้อยละการไฮโดรไลซีส (degree hydrolysis) ร้อยละ 10 โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® และ Flavourzyme®

Tsumura และคณะ (2006) ได้เสนอและแนะนำเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนถั่วเหลือง พบการทำงานของเอนไซม์ เพปซิน ที่ pH 1.5 -4.0 ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ปาเปนที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37-80 องศาเซลเซียส และโปรตีนไกซินินถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปบซอนที่ pH 1.5-2.5 ส่วนเอนไซม์ β-conglycinin จะสามารถย่อยได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

Tomohiro และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงสมบัติในการลดความขมของการทำย่อยโปรตีนถั่วเหลืองจากเอนไซม์โปรตีเอส ดี 3 จากถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ชนิดอื่น พบว่าความขมจากการย่อยโปรตีน มีความขมน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดอื่น อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ตัวชี้วัดคือผลิตภัณฑ์มีรสชาติอ่อนลงมากพอจนสามารถยอมรับให้สามารถเป็นส่วนผสมในอาหารเพปไทด์ได้

Fang และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษา ถึงการชักนำให้เกิดเจลของ Soy Glycinin จากปาเปน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนใน Soy Glycinin (11S) นั้นสร้างเจลอย่างบางแต่แข็งแรงขึ้นมาด้วยปาเปนที่สกัดแบบหยาบ อัตราการเกิดเจลแสดงถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความแข็งแรงของเจลลดลง ความแข็งแรงของเจลระดับสูงสุดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของการเกิดเจล ระดับของโปรตีนไฮโดรไลซิส ที่ความแข็งแรงที่สุดของเจลมีความใกล้เคียงกัน สำหรับเจลที่เกิดขึ้นจากอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

Seo และคณะ (2008) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของสารสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ และศึกษาถึงสมบัติทางกายภาพที่มีบทบาทต่อการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองและแสดงให้เห็นถึงรสชาติความขมของกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โดยเทียบกับค่าร้อยละการไฮโดรไลซีส (degree hydrolysis)

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spec trometry (MALDI-TOF MS)

เป็นเทคนิคทำให้สารเกิดไอออไนเซชัน หรือ แตกตัวเป็นไอออน ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องวัดมวลโมเลกุล (mass spectrometry) MALDI เป็นเทคนิคการทำให้สารเกิดการไอออไนเซชันแบบ soft ionization คือจะไม่เห็น pattern การแตกหักของสเปคตรัม แต่จะเห็น molecular ion ที่ชัดเจน ซึ่งเทคนิค soft ionization เช่น ESI, APCI ส่วนใหญ่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ชีวโมเลกุล (biopolymers เช่น โปรตีนเพปไทด์ และน้ำตาล) และโมเลกุลอินทรีย์ขนาดใหญ่ (เช่นโพลิเมอร์ dendrimers และโมเลกุลอื่น ๆ) หลักการทำงานของ MALDI ใช้หลักการ bombardment โดยการผ่านแสง Laser ไปยังตัวอย่างทำให้สารตัวอย่างเกิดการแตกตัวเป็นไอออน M คือ Matrix ซึ่ง Matrix ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับสารที่เราต้องการวิเคราะห์ เช่น sinapinic acid ใช้สำหรับวิเคราะห์โปรตีน, alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid สำหรับวิเคราะห์เพปไทด์

จากนั้นนำสารละลายของ matrix ผสมกับ analyte นำสารละลาย spot บน MALDI plate ส่วนที่เป็นตัวทำละลายจะถูกระเหยออกไป จะคงเหลือไว้เฉพาะ crystallized matrix โดยที่โมเลกุลของ analyte จะแพร่กระจายอยู่บน crystals ซึ่งจะเป็นแบบ co-crystallized เมื่อได้ matrix แล้วต่อไปเป็นส่วนของ laser สำหรับเทคนิค MALDI จะใช้ UV lasers เช่น nitrogen lasers ที่ความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร โดยให้แสงเลเซอร์ผ่านไปยัง crystals ใน MALDI spot เมื่อ matrix ได้พลังงาน จากแสงเลเซอร์ทำให้เกิดการไอออไนเซชันและมีการถ่ายเทประจุไปยังตัว analyte ทำให้ analyte เกิดกระบวนการไอออไนเซชัน จากนั้นไอออนก็จะผ่านไปยัง analyser ซึ่งเป็นแบบ Time of Flight (TOF) และไปยังตัวตรวจวัดมวลสาร