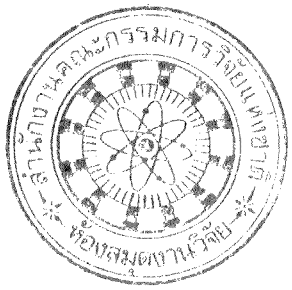


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นถึงภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอส 2 ชนิดคือ ปาเปนและไฟเซน ซึ่งปาเปนและไฟเซนที่ใช้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 13,144.15 และ 2,905.98 CDU/มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยปริมาณปาเปนที่ใช้เท่ากับ ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 มิลลิกรัม ที่ปริมาตร 200 และ 400 ไมโครลิตร ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำคำนวณร้อยละของการย่อยโปรตีน พบว่า ภาวะที่ดีที่สุดในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ปาเปนคือ ใช้ปาเปน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 7,302 ซีดียู/มิลลิกรัม สารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร เวลาการย่อยเหมาะสม 90 นาที มีร้อยละการไฮโดรซีสสูงที่สุดเท่ากับ 28.63 ส่วนเอนไซม์ไฟเซนพบว่าภาวะที่ดีที่สุดคือ การใช้เอนไซม์ไฟเซน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 11,624 CDU/มิลลิกรัม สารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร เวลาการย่อยเหมาะสม 90 นาที มีร้อยละการไฮโดรซีสสูงที่สุด คือร้อยละ 28.56 จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้ทราบว่าในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ 90 นาที ส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 50 มิลลิกรัม จะให้ร้อยละการไฮโดรซีสสูงที่สุด

เนื่องจากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น เราจะประเมินความสามารถในการย่อยด้วยการคำนวณหาร้อยละการไฮโดรซีส ซึ่งเราจะไม่สามารถทราบได้ว่าการย่อยดังกล่าวมันได้เพปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงใด คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาโดยได้ทำการย่อยที่ระยะเวลาต่างๆ แล้วนำไปทำ SDS-PAGE และ MALDI-TOF MS เพื่อดูขนาดของเพปไทด์ดังการทดลองในข้อ 4.2 ต่อไป

ตารางที่ 4.1 ร้อยละการย่อยสลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่ปริมาตร 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิลิตร เมื่อใช้เอนไซม์ปาเปน 20 มิลลิกรัม ปริมาตร 200 และ 400 ไมโครลิตร ที่เวลาต่างๆ

		% Hydrolysis	
Isolated soy protein (ml)	Time (min)	200(µl)	400 (µl)
2.50	30	1.42	8.96
	60	3.36	9.36
	90	4.23	9.49
3.00	30	4.10	10.4
	60	5.88	9.87
	90	10.05	9.78
3.50	30	12.68	13.12
	60	23.51	14.85
	90	24.04	17.24

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการย่อยสลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่ปริมาตร 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิลิตร เมื่อใช้เอนไซม์ปาเปน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 200และ 400 ไมโครลิตร ที่เวลาต่างๆ

		% Hydrolysis	
Isolate soy protein (ml)	Time (min)	200(µl)	400 (µl)
2.5	30	21.86	6.06
	60	21.74	7.16
	90	21.86	7.99
3.0	30	21.14	14.71
	60	24.38	14.71
	90	24.9	15.27
3.5	30	24.83	20.17
	60	28.09	21.31
	90	28.63	23.15

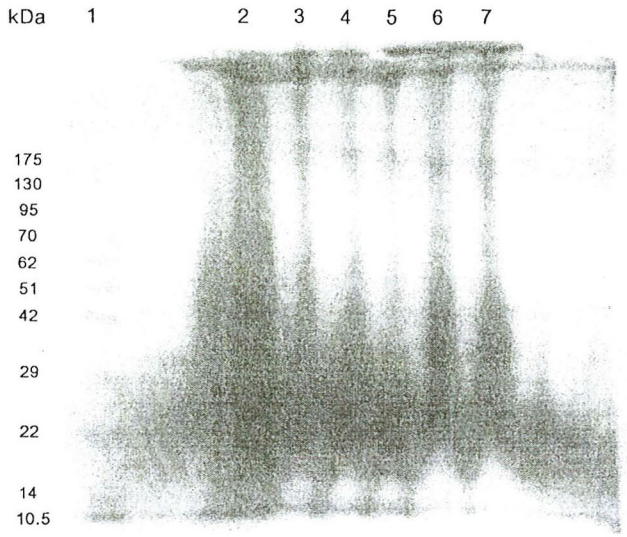
ตารางที่ 4.3 ร้อยละการย่อยสลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่ปริมาตร 2.5 3.0 และ 3.5 มิลลิลิตร เมื่อใช้เอนไซม์ไฟเซน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 200 และ 400 ไมโครลิตร ที่เวลาต่างๆ

		%Hydrolysis	
Isolated soy protein (ml)	Time (min)	200(µl)	400 (µl)
2.5	30	13.23	10.71
	60	14.44	12.69
	90	14.59	12.85
3.0	30	15.33	18.75
	60	15.63	20.11
	90	15.92	24.71
3.5	30	15.96	25.11
	60	17.02	26.03
	90	17.02	28.56

4.2 การศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเนสชนิดต่างๆ โดยการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

4.2.1 เอนไซม์ไฟเซน

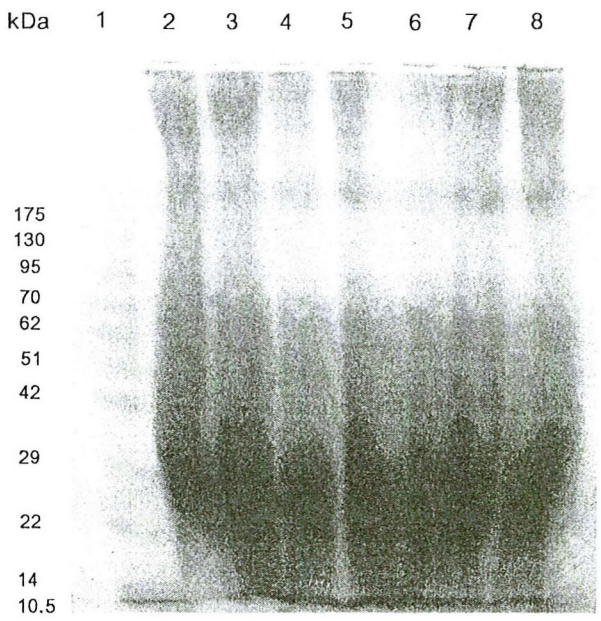
เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนสชนิดต่างๆ ได้แก่เอนไซม์ไฟเซน เพปซิน ทริปซิน ปาเปน โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* และโปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ที่เวลาต่างๆ กัน พบว่าขนาดโมเลกุลของ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองก่อนที่จะย่อยด้วยเอนไซม์ มีปริมาณมากและหนาแน่น ขนาดโมเลกุลจะมีขนาดใหญ่ แต่เมื่อนำมาย่อยเอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงอยู่ในช่วงไม่เกิน 51kDa อย่างเห็นได้ชัดเจน แสดงว่าเอนไซม์ไฟเซนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้ดี โดยเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนที่ให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 120 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1) Soy Isolate Prptein (Lane 2) การทำปฏิกิริยาที่ 180 นาที(Lane 3), 150 นาที (Lane 4), 120 นาที (Lane 5), 90 นาที(Lane 6),และ 60 นาที(Lane 7)

4.2.2 เอนไซม์เพปซิน

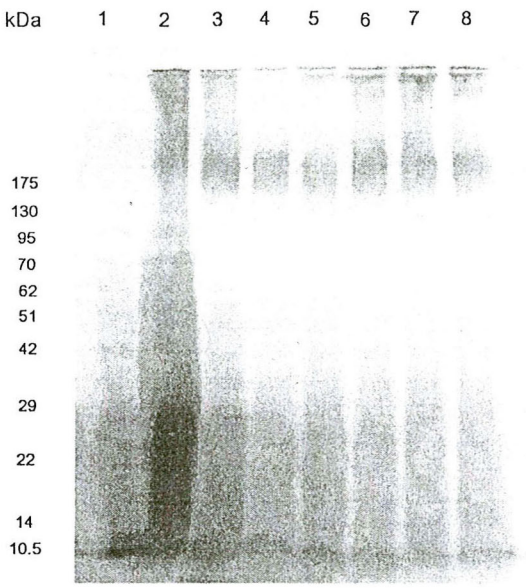
เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน ที่เวลาต่างๆ พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงอยู่ในช่วงไม่เกิน 51kDa แสดงว่าเอนไซม์เพปซินมีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้เล็กน้อยโดยเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์เพปซินที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1) Soy Isolate Protein (Lane 2),การทำปฏิกิริยาที่ 30 นาที (Lane 3), 60 นาที(Lane 4), 90 นาที(Lane 5), 120 นาที (Lane 6),150 นาที (Lane 7) และ 180 นาที (Lane 8)

4.2.3 เอนไซม์ทริปซิน

เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง(Lane 2) มีขนาดโมเลกุลของมีอยู่ในช่วงต่ำกว่า 42, 70 และช่วง 175 kDa ซึ่งมีปริมาณมากและหนาแน่นมากว่าเมื่อเทียบกับ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Lane 3-8) จะเห็นว่าเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินจะทำให้โปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุล 70 kDa ถูกย่อยหายไป และโปรตีนที่มีอยู่ในช่วงต่ำกว่า 42 kDa ถูกย่อยได้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 29- 42 kDa และโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 10.5 kDa แสดงว่าเอนไซม์ทริปซินมีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด

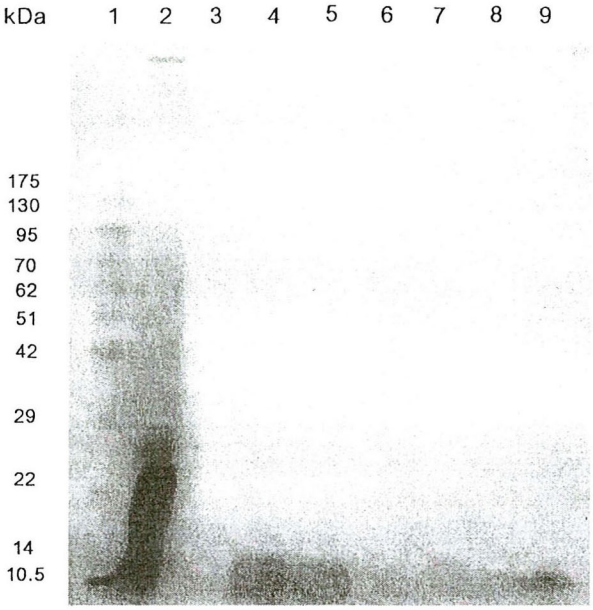


รูปที่ 4.3 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ทริปซินที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1) Soy Isolate Protein (Lane 2),การทำปฏิกิริยาที่ 30 นาที (Lane 3), 60 นาที(Lane 4), 90 นาที(Lane 5), 120 นาที (Lane 6),150 นาที (Lane 7) และ 180 นาที (Lane 8)

4.2.4 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*

เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง(Lane 2) มีโมเลกุลปริมาณมากและหนาแน่นมากว่าเมื่อเทียบกับ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* เข้าไปทำปฏิกิริยาทำให้โปรตีนถูกย่อยหายไป เหลือโปรตีนอยู่ในช่วงต่ำกว่า 14 kDa (Lane 3-8) นอกจากนี้เมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลงแสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* มีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้ โดย

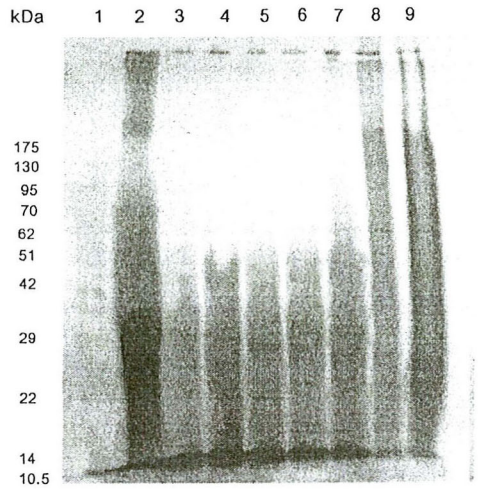
เวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด



รูปที่ 4.4 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1) Soy Isolate Protein (Lane 2),การทำปฏิกิริยาที่ 30 นาที (Lane 3), 60 นาที(Lane 4), 90 นาที(Lane 5), 120 นาที (Lane 6),150 นาที (Lane 7), 180 นาที (Lane 8) และ เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* (Lane 9)

4.2.5 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae*

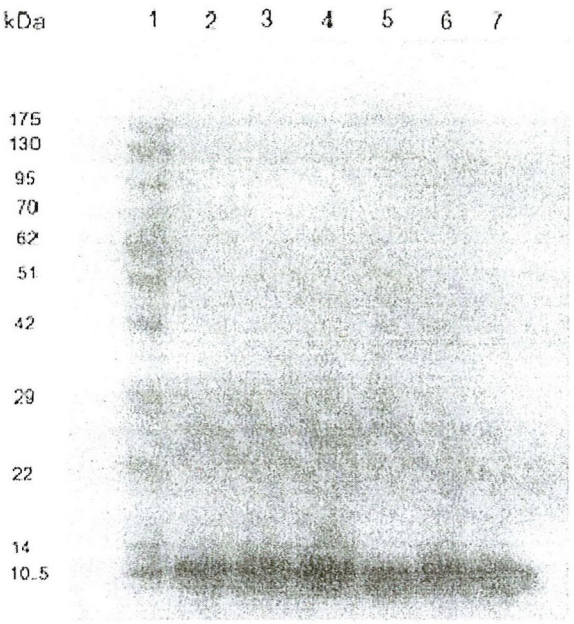
เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากจาก *Aspergillus oryzae* จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าขนาดโมเลกุลของ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง มีอยู่ในช่วงต่ำกว่า 51 kDa ช่วง 70 kDa และ ประมาณ 175 kDa ซึ่งมีปริมาณมากและหนาแน่นมากว่าเมื่อเทียบกับ โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* เข้าไปทำปฏิกิริยา ทำให้โปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุล 70 kDa ถูกย่อยหายไป และโปรตีนที่มีอยู่ในช่วงต่ำกว่า 51 kDa ถูกย่อยได้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 29- 51 kDa และโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 10.5 kDa นอกจากนี้โปรตีนของตัวเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ก็ถูกย่อยหายไปด้วยเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* มีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้โดยเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง โดยเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 90 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด



รูปที่ 4.5 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส จาก *Aspergillus oryzae* ที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1), Soy Isolate Prptein (Lane 2), การทำปฏิกิริยาที่เวลา 180 นาที (Lane 3), 150 นาที(Lane 4) , 120 นาที(Lane 5) , 90 นาที(Lane 6), 60 นาที(Lane 7), 30 นาที (Lane8) และเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* (Lane 9)

4.3 การคัดแยกเพปไทด์สายสั้นที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ได้ทำการทดลองนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ และนำมาคัดเลือกเพปไทด์ที่ต้องการด้วย Ultramembrane ขนาด 3K จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าขนาดโมเลกุลเมื่อเติมเอนไซม์ไฟเซนลงใน โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง แล้วทำการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาดโมเลกุล 3K cut off ทำให้โปรตีนที่ได้มีขนาดโมเลกุลเล็กอยู่ในช่วงต่ำกว่า 14 kDa แสดงว่าเอนไซม์ไฟเซนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3000 Dalton ซึ่งการคัดแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ทำให้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 3000 Dalton ไม่ผ่าน membrane ออกมา



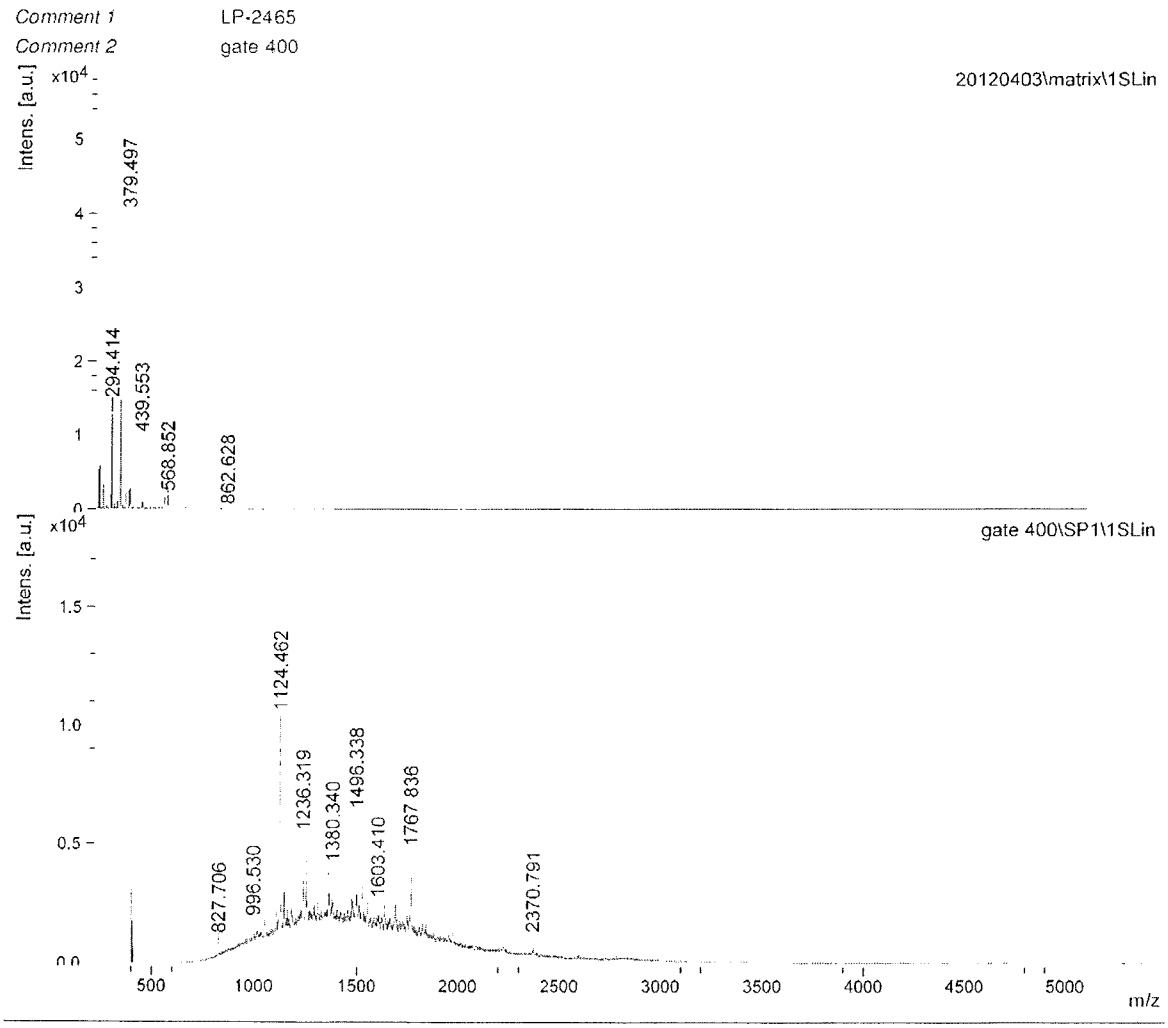
รูปที่ 4.6 รูปแบบของโปรตีนจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไฟเซนที่เวลาต่างๆ และผ่านการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดยใช้ Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, โปรตีนมาตรฐาน (Lane 1), การทำปฏิกิริยาที่เวลา 30 นาที(Lane 2), 60 นาที(Lane 3), 90 นาที(Lane 4), 120 นาที(Lane 5), 150 นาที(Lane 6) และ 180 นาที(Lane 7)

4.4 การตรวจวิเคราะห์เพปไทด์โดย เครื่อง MALDI-TOF MS

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ แล้ว จึงทำการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองในภาวะต่างๆ จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilize ก่อนนำไปวิเคราะห์โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.4.1 เอนไซม์ไฟเซน

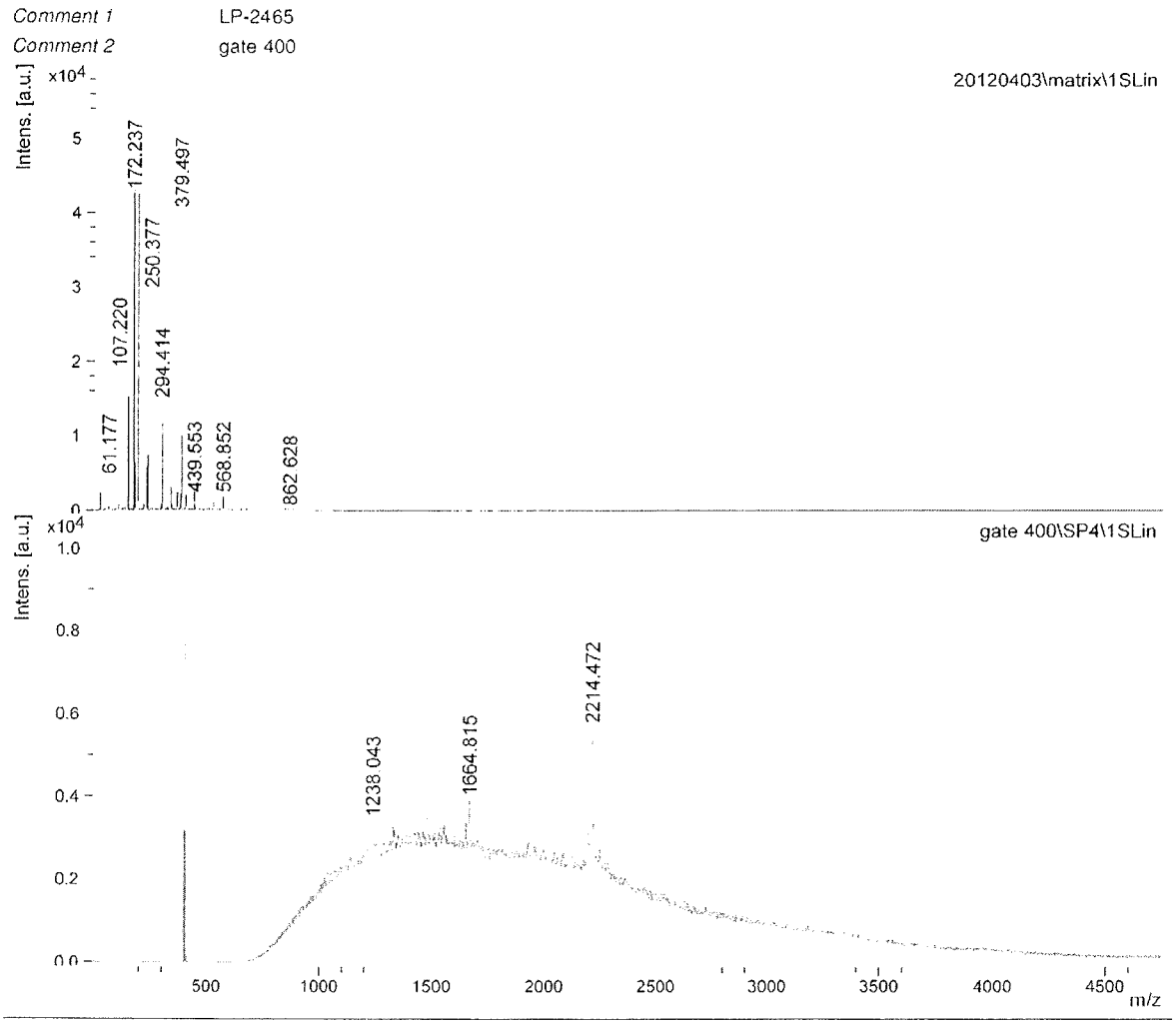
เมื่อนำเพปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ไฟเซนไปวิเคราะห์โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS พบเพปไทด์ทั้งหมด 13 ชนิด โดยเพปไทด์ขนาดเล็กสุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 294.414 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 2 ชนิด เรียกว่าไดเพปไทด์ และเพปไทด์ขนาดใหญ่สุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,370.791 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 23 ชนิด ส่วนเพปไทด์ชนิดที่ตรวจพบปริมาณมากที่สุดมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 294.414 Dalton (รูปที่ 4.7) แสดงว่าเอนไซม์ไฟเซนสามารถย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้ดี ทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นที่ดีสามารถนำไปศึกษาสมบัติต่างๆ ของเพปไทด์ได้ต่อไป



รูปที่ 4.7 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไฟเซน ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่นำไปวิเคราะห์เพปไทด์โดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.4.2 เอนไซม์เพปซิน

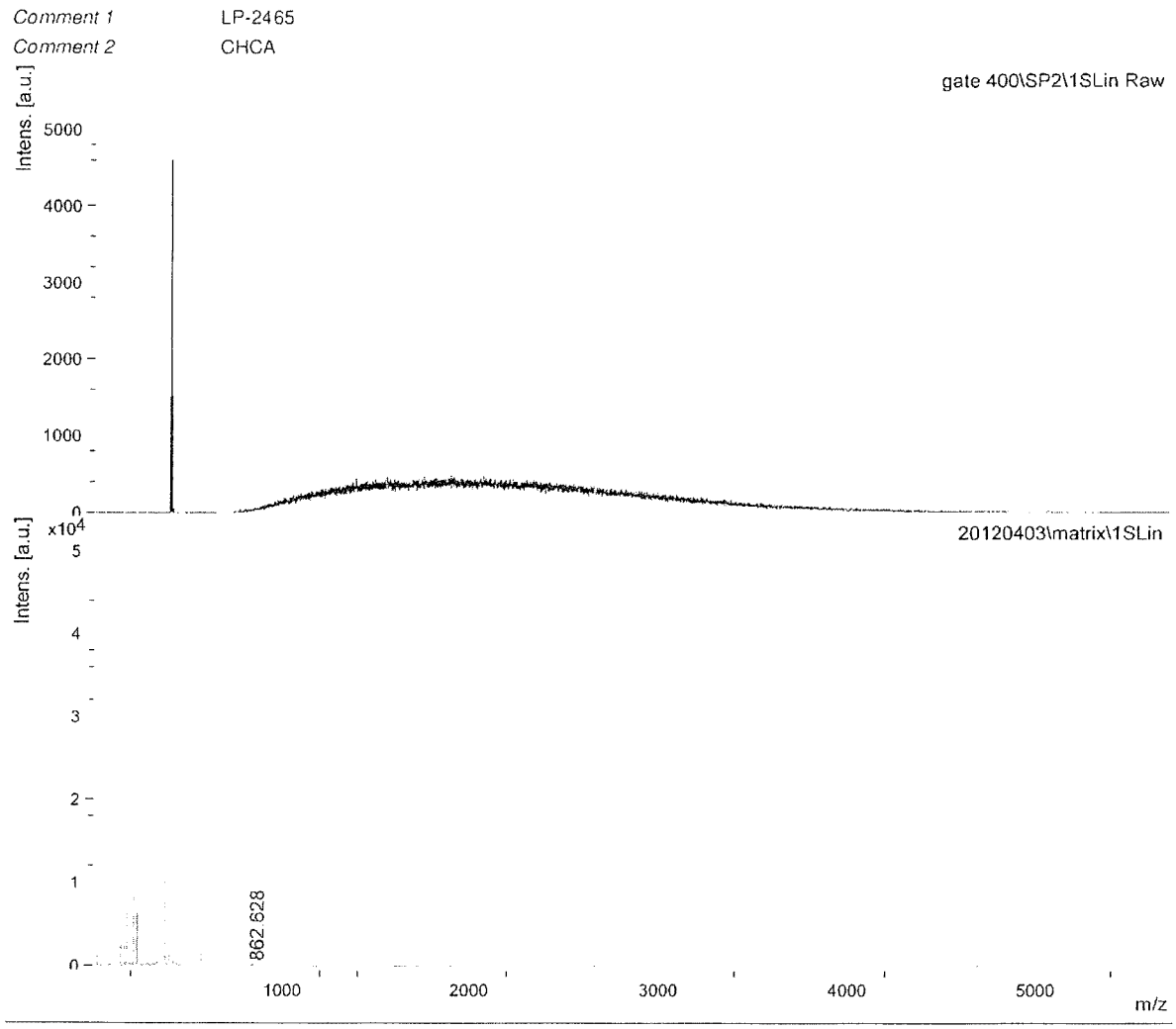
เมื่อนำเพปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์เพปซินไปวิเคราะห์โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS พบเพปไทด์ทั้งหมด 12 ชนิด โดยเพปไทด์ขนาดเล็กสุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 61.177 Dalton เป็นกรดอะมิโนชนิดเดียว และเพปไทด์ขนาดใหญ่สุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,214.472 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 22 ชนิด ส่วนเพปไทด์ชนิดที่ตรวจพบปริมาณมากที่สุดมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 172.237 Dalton เป็นกรดอะมิโนตัวเดียว(รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์เพปซิน ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่นำไปวิเคราะห์เพปไทด์โดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.4.3 เอนไซม์ทริปซิน

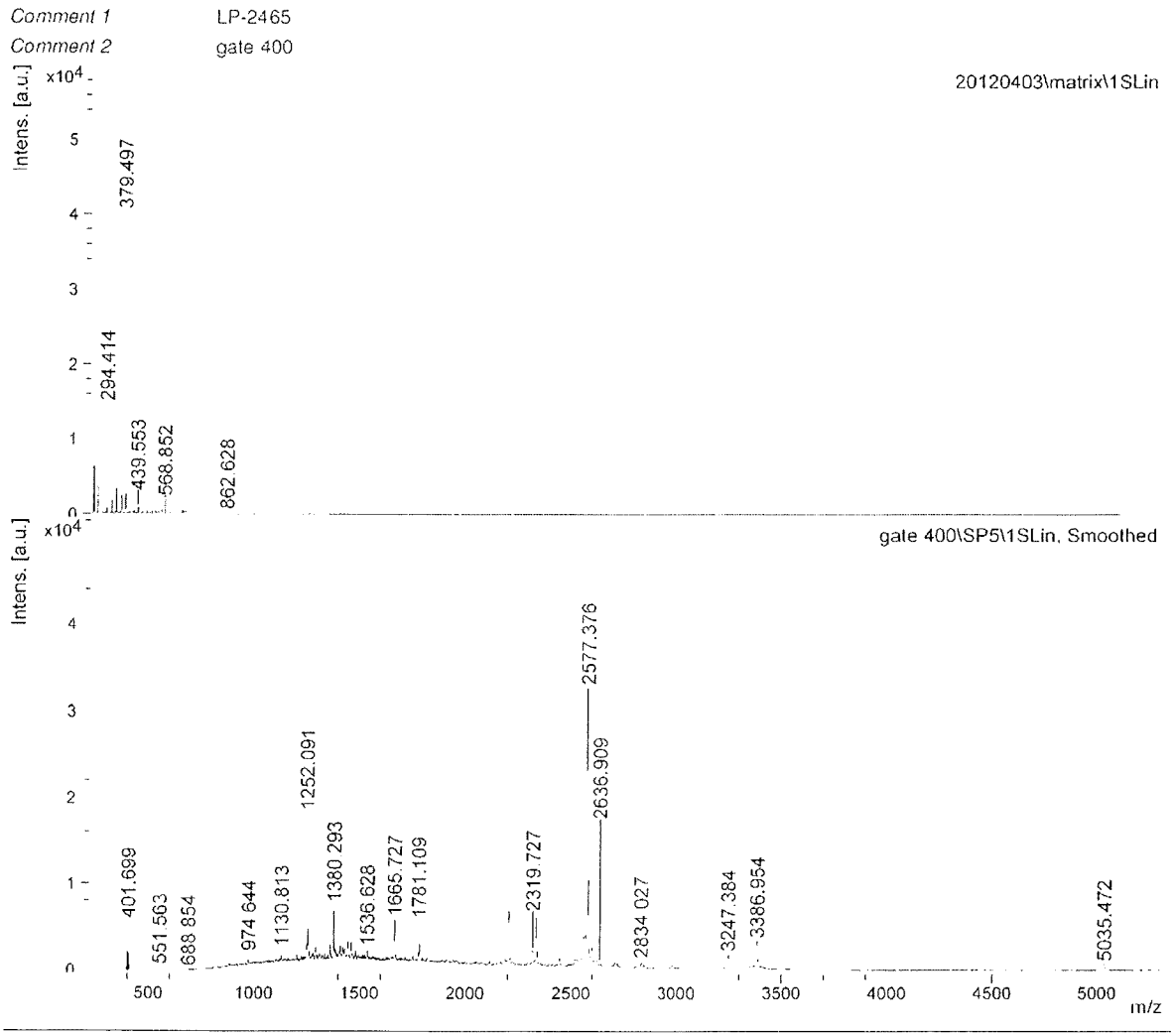
เมื่อนำเพปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ทริปซินไปวิเคราะห์โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS จากรูปเอนไซม์ทริปซินที่ใช้มีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองได้ดีมากทำให้เหลือเพปไทด์เพียงชนิดเดียวที่สามารถตรวจพบได้ โดยเพปไทด์ที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 892.628 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 8 ตัว(รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่นำไปวิเคราะห์เพปไทด์โดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.4.4 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*

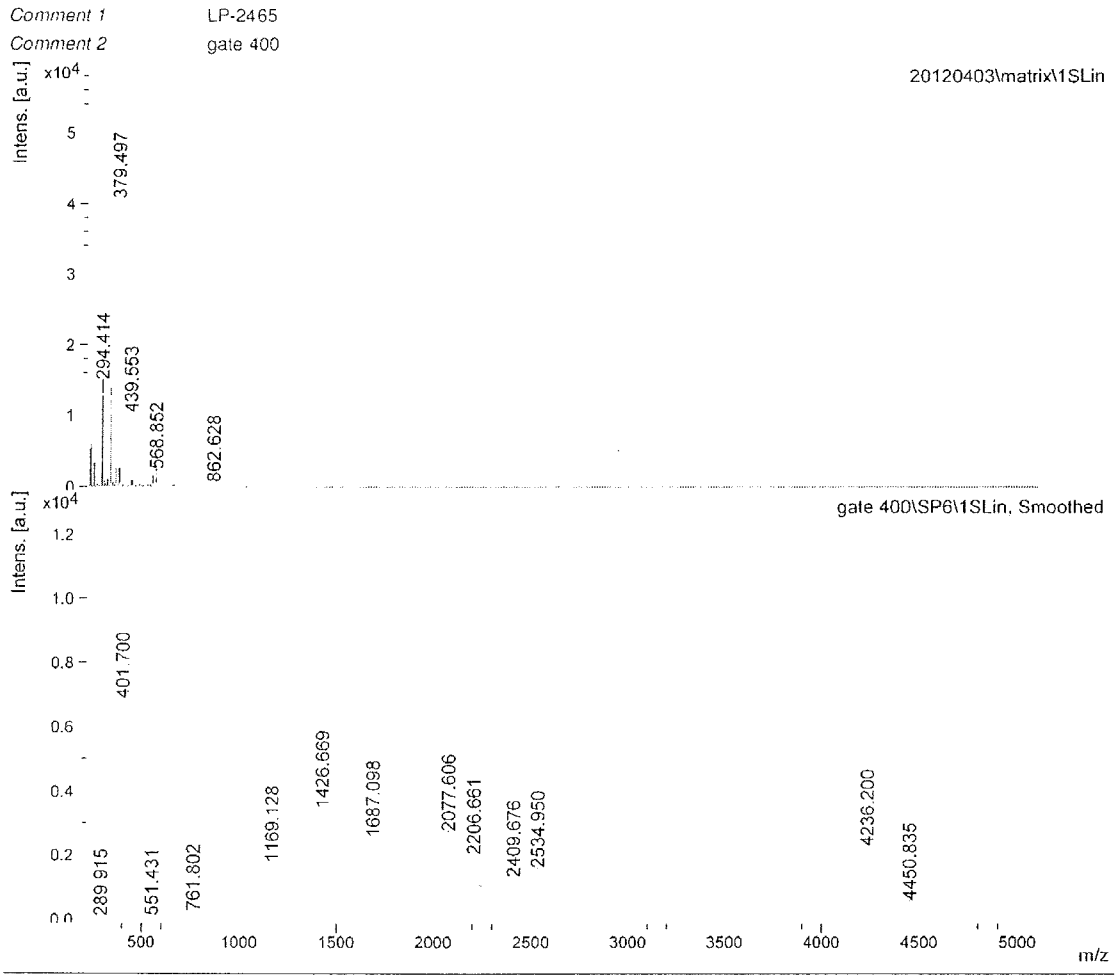
เมื่อนำเพปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ไปวิเคราะห์ โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS พบเพปไทด์ทั้งหมด 19 ชนิด โดยเพปไทด์ขนาดเล็กสุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 294.414 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 2 ชนิด และเพปไทด์ขนาดใหญ่สุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,636.909 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 26 ชนิด ไม่นับรวมที่ขนาดโมเลกุล 2,834.027 Dalton เนื่องจากปริมาณที่พบมีน้อยมากแทบไม่เห็นเลยจึงเริ่มนับที่ 2,636.909 Dalton ส่วนเพปไทด์ชนิดที่ตรวจพบปริมาณมากที่สุดมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,636.909 Dalton (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่นำไปวิเคราะห์เพปไทด์โดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.4.5 เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae*

เมื่อนำเพปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ไปวิเคราะห์ โมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS จากรูปพบเพปไทด์ทั้งหมด 16 ชนิด โดยเพปไทด์ขนาดเล็กสุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 294.414 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 2 ชนิด และเพปไทด์ขนาดใหญ่สุดที่พบมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,534.950 Dalton มีกรดอะมิโนต่อกัน 23 ชนิด ส่วนเพปไทด์ชนิดที่ตรวจพบปริมาณมากที่สุดมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 294.414 Dalton (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ผ่าน Amicon Centrifuge Ultramembrane ขนาด 3K ที่นำไปวิเคราะห์เพปไทด์โดยเครื่อง MALDI-TOF MS

4.5 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นด้วยวิธี DPPH

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไฟเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากไฟเซนมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 58.5-75.7 โดยพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับร้อยละ 1.95 และมีค่ายับยั้งสูงสุดร้อยละ 75.7 (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH

Soy peptide (%)	% Inhibition				
	ficain	pepsin	trypsin	*B. licheniformis*	*A. oryzae*
100	75.77 ± 0.38	84.36 ±0.22	75.77 ±0.42	65.14 ±1.58	67.50 ±0.42
50	75.3 ± 0.22	82.4 ± 0.22	75.3 ±0.24	59.6 ±0.42	51.5 ±0.24
25	74.6 ± 0.38	80.0 ±0.38	74.6 ± 0.64	52.4 ± 0.24	46.7 ±0.42
12.5	70.0 ± 0.77	58.1 ±0.38	72.4 ± 0.24	50.3 ±0.24	44.4 ±0.24
6.25	58.5 ± 0.38	37.2 ±0.22	62.2 ±0.64	35.1 ±1.05	29.3 ±0.24
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ส่วนเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์เพปซินพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับร้อยละ 8.07 (ภาคผนวก ง)และมีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 84.36 สำหรับเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ทริปซินมีค่า IC_{50} เท่ากับ ร้อยละ 1.40 และมีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 75.77 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* มีค่า IC_{50} เท่ากับร้อยละ 5.30 และมีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 65.14 เพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* มีค่า IC_{50} เท่ากับร้อยละ 8.06 และมีค่าการยับยั้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 67.50

4.6 การทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ไปทดสอบสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินสามารถยับยั้งเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ได้โดยให้ inhibition zone เท่ากับ 16.5 มิลลิเมตร ในขณะที่เพปไทด์สายสั้นจากเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เลย (ตารางที่ 4.5)

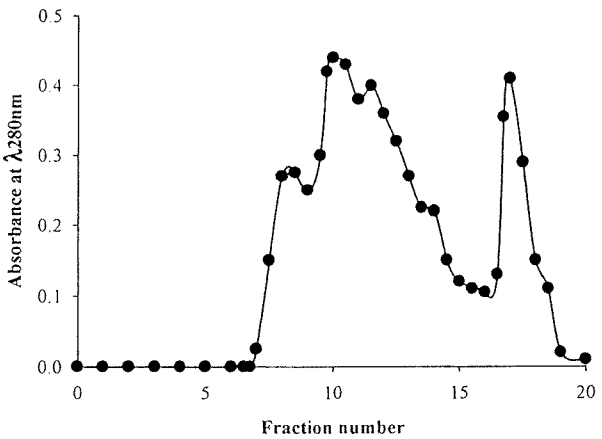
ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเพปไทด์ที่ได้จากการย่อย โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K

peptide	Inhibition Zone (mm.)			
	Staphylococcus aureus	*Bacillus subtilis*	*Enterobacter aerogenes*	*Escherichia coli*
soy peptide from ficain	-	-	-	-
soy peptide from pepsin	-	-	-	-
soy peptide from trypsin	-	-	16.5	-
soy peptide from *Bacillus licheniformis*	-	-	-	-
soy peptide from *Aspergillus oryzae*	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งได้

4.7 **การแยกเพปไทด์โดยวิธี** Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากเอนไซม์ทริปซิน ที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose™ 12 โดยใช้น้ำกลั่นในการชะโปรตีน Flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าได้โปรตีนทั้งหมด 3 พีค คือแฟรกชั่นที่ 8 11 และ 18 (รูปที่ 4.12) จึงได้นำโปรตีนในแต่ละแฟรกชั่นไปวิเคราะห์ แอคติวิตี angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEi) และ LC/MSMS ต่อไป



รูปที่ 4.12 รูปแบบของ soy peptide ที่ผ่าน FPLC โดยใช้คอลัมน์ Superose™ และชะด้วยน้ำกลั่น และวัดโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm

4.8 **การวิเคราะห์** angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi)

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นจากข้อ 3.10 มาวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting พบว่าเมื่อนำเพปไทด์พีคที่ 11 และ 18 ที่ผ่าน FPLC มาวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting พบว่า เพปไทด์ที่ได้จากสารสกัดถั่วเหลืองมีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin I-converting ได้ร้อยละ 80-91 ในขณะที่เพปไทด์ที่ผ่าน 3 K ให้ค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 92.65 (ตารางที่ 4.6) โดยการยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting เป็นผลให้เกิดการหยุดการเปลี่ยน angiotensin I ไปเป็น angiotensin II ในขณะเดียวกัน ACEi ก็มีผลลดการสลายตัวของ bradykinin สรุปแล้ว ACEi มีผลทำให้ความดันโลหิตต่ำ(Vermeirssen และคณะ, 2002; Ching และคณะ 2011)

ตารางที่ 4.6 การยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting ของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

Sample	Protein (mg/ml)	ACEi(%)
Peptide concentrate with Ultramembrane filtration 3 K	112.4	92.65±0.54
Fraction 11	0.37±0.00	80.69±0.53
Fraction 18	0.15±0.02	91.79±0.10

4.9 **การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน** (amino acid profile)

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากเอนไซม์ทริปซิน และเพปซินที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า ชนิดของกรดอะมิโนที่พบในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง จะพบทั้งหมด 15 ชนิด โดยพบกรดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 1098.94 มิลลิกริม/100 กรัม และพบกรดอะมิโนชนิด ทริปโตเฟนน้อยที่สุดเท่ากับ 73.07 มิลลิกริม/100 กรัม (ตารางที่ 4.7)

จากตารางที่ 4.7 พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เพปซินตัดโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองพบกรดอะมิโนทั้งหมด 9 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 298.10 มิลลิกริม/100 กรัม และพบ ฟีนิลอลานิน น้อยที่สุดเท่ากับ 68.65 มิลลิกริม/100 กรัม ในขณะที่เพปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์ทริปซินจะพบกรดอะมิโนทั้งหมด 13 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 553.03 มิลลิกริม/100 กรัม และพบไทโรซิน น้อยที่สุดเท่ากับ 50.12 มิลลิกริม/100 กรัม จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเมื่อเราใช้เอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง จะได้จำนวนและชนิดของกรดอะมิโนแตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีบริเวณเร่ง (active site) ที่แตกต่างกันทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเอนไซม์จะ

มีสมบัติที่แตกต่างกันไป โดยพบว่าเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีสมบัติที่เปลี่ยนไป เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือมีสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระ เป็นต้น

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง เพปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์เพปซิน และ ทริปซิน

Amino acid	peptide		
(มิลลิกรัม/100กรัม)	Soy isolated protein	pepsin	trypsin
Alanine	175.6	94.86	115.91
Arginine	331.92	-	158.79
Aspartic acid	483.94	187.35	282.13
Cysteine	-	-	-
Glutamic acid	1098.94	298.10	553.03
Glycine	188.77	98.21	96.52
Histidine	-	-	-
Hydroxylysine	-	-	-
Hydroxyproline	-	-	-
Isoleucine	98.63	-	-
Leucine	253.21	90.2	118.91
Lysine	269.01	74.8	93.63
Methionine	-	-	-
Phenylalanine	184.22	68.65	79.84
Proline	238.50	80.48	141.98
Serine	244.83	90.29	130.42
Threonine	148.16	-	61.00
Tryptophan	73.07	-	95.30
tyrosine	114.77	-	50.12
valine	111.33	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง not detected

4.10 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี LC/MS-MS

เมื่อนำเพปไทด์สายสั้นจากข้อ 4.7 แฟรกชั่นที่ 11 และ 18 ที่ผ่าน FPLC มาวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้วิธี LC/MSMS พบว่าโปรตีนจากแฟรกชั่นที่ 11 และ 18 เมื่อนำไปเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล MATRIX SCIENCE แล้วพบว่าแฟรกชั่นที่ 11 มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys (รูปที่ 4.13) ส่วนแฟรกชั่นที่ 18 มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys (รูปที่ 4.14)

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: gi\|147799470

hypothetical protein VITISV_040198 [Vitis vinifera]

Database: NCBInr

Score: 63

Nominal mass (M_r): 128971

Calculated pI: 9.19

Taxonomy: Vitis vinifera

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi\|147799470 against nr.

Search parameters

MS data file: F11.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 0%

Matched peptides shown in *bold red*.

1	MGPVGGSPLE	TAFKGDLVEG	RDRNTGFFHR	MASAHRRNNA	MDRIKVNGEW
51	LVEEQEVREG	VVNSFQQLLS	EDMGWQADIG	SIQEIMEMFK	EFHEHNSFVK
101	SLNNTFLVLI	PKKSGAENLG	DFRXISLVGG	LYKLLAKVLA	NRLKKVIGKV
151	VXYAQNAFVM	GRQILDASLI	ANEVIDSWQK	KKEKGLVCKL	DIEKAYDSIN
201	WNFLMKVLKK	MGFGTKWMRW	MWSCVFSAKF	SILVNGVPAG	FFPSTRGLRQ
251	GDPLSPYLFV	MGMEVLDVLI	RRAVEGGYLS	GCNIRGGSRT	SLNISHLFFA
301	DDTIVFCEAS	KEQVSHLSWI	LFWFEAASGL	RINLAKSEII	PIGEVEDSLE
351	LAAELGCRVX	SLPSHYLGLP	LGVPNRATSM	WDGVXERIRR	RLALWKRQYI
401	SKGGXITLIK	STLASLPTYQ	MSIFRMPKSV	AKRVEKTQRD	FLWGGGNLEG
451	KVHLVKWDAV	CTEKHKGGLG	LRRIATLNRA	LLGKWIWRFA	CEKNNFWNQV
501	ITTKYGQEDY	GWRPKKVRGP	AGVGVWKEIM	KEDDWCWDNL	AFRVGKGSKI
551	KFWKDCWCTD	TPLSQCFNQL	FVLAVHRDAT	IEEMWDHDAG	QGDWKLVFVR
601	DFNDWEMDMV	GELLHTLRGQ	RPSLEDDSVV	WRQGRNGIFK	IKEAYRLLDK
651	XNAXVFPARK	IWVDRVPTKV	CFFAWEATWG	KVLTLDRLQL	RGVQLPNCCY
701	LCGCEEENVH	HILLHCIVTR	ALWEIIFGLI	DVKWVHPETV	KEALISWRGS
751	FVGKKRKRIW	KSIPLCIFWT	VWKERNSQQR	VFAVQVFELH	RLIKVQRLIA
801	GSPHLMVDES	AYLGKPSLKS	SPAKKLPLEY	VVKPPPNMVM	HKDDYERASH
851	QLECSAENAV	GKTHLPSVKN	GNPPSNYGPY	IGNPPPAPAP	TDSKMGPWCY
901	PQPPGHQWLV	PVMSPSEGLV	YKPYPGPGFM	STVCGGCGPM	GPAPMTGSFI
951	NPAYGVPSSH	HHQGIGVHPG	TPPIGHGYFP	PYGMSVMNHP	TISGSAVEQM
1001	NRFAGHGSLS	QSGQLSGGGA	SFNMQHQNSC	NVPTPKRAIP	QGVKFPMSKD
1051	SEFQGSTASS	PSEREQQVGT	GDTAEGRDPL	PLFPMAPAAI	PAGDPQPNGT
1101	DQPTRVIRVV	PHNPRSATES	AARIFQSIQD	ERKQLDST	

รูปที่ 4.13 โปรตีนจากแฟรกชั่นที่ 11 เทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล MATRIX SCIENCE

MASCOT Search Results

Protein View: gi\|205830697

RecName: Full=Unknown protein 18

Database: NCBInr

Score: 130

Nominal mass (M_r): 1393

Calculated pI: 5.80

Taxonomy: Pseudotsuga menziesii

This protein sequence matches the following other entries:

- gi\|218551721 from Vitis rotundifolia

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi\|205830697 against nr.

Search parameters

MS data file: F18.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 100%

Matched peptides shown in ***bold red***.

1 TNAENEFVTI KK

รูปที่ 4.14 โปรตีนจากแฟรกชั่นที่ 18 เทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล MATRIX SCIENCE