บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ถั่วเป็นพืชที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการโดยเฉพาะโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนโปรตีนจากนมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้แพ้นมวัว (Quaglia and Orban, 1990) ในขณะเดียวกันจังหวัดพัทลุงจัดเป็นพื้นที่ที่มีการส่งเสริมการปลูกพืชวงศ์ถั่ว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตควบคู่กับการพัฒนาคุณภาพผลผลิต ตลอดจนประชาสัมพันธ์และเชื่อมโยงผู้ผลิต เพื่อขยายการผลิตการตลาดภายในประเทศและเชื่อมโยงเพื่อการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ นอกจากนี้ แม้จะมีการใช้ประโยชน์จากถั่วสายพันธุ์ต่างๆในจังหวัดพัทลุงเพื่อเป็นอาหาร แต่การใช้ประโยชน์ก็ยังอยู่ในวงจำกัด เนื่องจากขาดข้อมูลเชิงพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ ทั้งๆที่มีข้อมูลรายงานว่าพืชวงศ์ถั่วมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีส่วนช่วยต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Slavin et al., 2009) ประกอบกับได้มีรายงานว่าการย่อยสลายโปรตีนเป็นสายสั้นๆ มีประโยชน์อย่างมากต่อสุขภาพเนื่องจากถูกดูดซึมได้เร็วทำให้ร่างกายสามารถในไปใช้ได้ทันที ยิ่งไปกว่านั้นการย่อยสลายยังสามารถปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ได้ (Kristinsson and Rasco, 2000) ได้แก่ สมบัติในการละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟอง การอุ้มน้ำและการจับกับไขมัน ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบอาหารโดยเป็นตัวกำหนดลักษณะต่างๆ ของอาหาร เช่น ลักษณะปรากฏ และลักษณะเนื้อสัมผัส (Kristinsson and Rasco, 2000) Jamdar et al. (2010) ได้ทำการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลต (Peanut protein isolate, PPI) และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง (Peanut protein hydrolysate, PPH) โดยพบว่าระดับการย่อยสลายมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เมื่อใช้เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) ย่อยสลายโปรตีนไอโซเลตที่ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, DH) ร้อยละ10 20 30 และ 40 พบว่าการย่อยสลายทำให้การละลายดีขึ้น (มากกว่าร้อยละ 80) ดังนั้น จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า ระดับการย่อยสลายมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วลิสง ในขณะที่ Chalamaiah et al. (2010) ได้ทำการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลา Meriga และประเมินจากสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลา meriga โดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสและปาเปน (papain) ทางการค้า การย่อยด้วยอัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 62 และเอนไซม์ปาเปนมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 17.1 หลังจากการย่อย 90 นาทีที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสและ 60-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากอัลคาเลสมีการละลายของโปรตีนร้อยละ 85 สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเอนไซม์ปาเปนซึ่งมีร้อยละ 70 ($p \leq 0.05$) การย่อยสลายโดยเอนไซม์ทั้งสองทำให้การละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลาเพิ่มขึ้นร้อยละ 72.4 ในช่วง pH 2-12 ผลการศึกษาพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีการดูดซับไขมันดี (0.9 และ 1.0 กรัมต่อกรัม) การเกิดโฟม (ร้อยละ70 และ ร้อยละ 25) และการเกิดอิมัลชัล (4.25 และ 5.98 มิลลิกรัมต่อกรัมของโปรตีนไฮโดรเสต) ตามลำดับ สำหรับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยอัลคาเลสและเอนไซม์ปาเปน เมื่อนำมาวิเคราะห์โดย SDS –PAGE จะแสดงการกระจายตัวของเปปไทด์ขนาดเล็ก และ Zhang et al. (2011) ได้ทำการศึกษา โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี โครมาโตกราฟี ที่กระทำอย่างต่อเนื่อง พบว่าเปปไทด์ที่ถูกย่อยคือ แฟรคชัน 7 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 717.37 Da และลำดับกรดอมิโน คือ Asn-Arg-Tyr-His-Glu ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 4700 proteomics สารต้านอนุมูลอิสระเปปไทด์จำแนกได้ครั้งแรกจากโปรตีนไฮโดรไลเสต มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-pycryl-hydrazyl (DPPH), hydroxyl และ superoxide ความสามารถในการจับโลหะ เปปไทด์ไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับ Cu_2 และ Fe^{2+} ได้ ร้อยละ 76.92 และร้อยละ 63.08 ตามลำดับ การยับยั้งของโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถยับยั้งได้ดีกว่าวิตามินอี

ดังนั้นการผลิตและศึกษากิจกรรมด้านต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ที่เหมาะสม อาจเป็นวิธีที่ทำให้ได้สารต้านออกซิเดชันและสารที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ในระบบอาหารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูง และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตผลทางการเกษตรอย่างเต็มศักยภาพ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุงที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มีคุณค่าทางอาหารสูง ปราศจากสารต้านโภชนาการบางชนิดเนื่องจากถูกทำลายด้วยความร้อนในกระบวนการผลิต ตลอดจนมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีและราคาถูก อาจสามารถผลิตและใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง

2. เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง

3. เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง

4. เพื่อศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง

3. ขอบเขตการวิจัย

นำถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุงชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่ง มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ด้วยวิธี pH-Stat (Adler-Nissen, 1986) จากนั้นนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเปรียบเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ศึกษากิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง โดยการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ได้แก่ DPPH, ABTS Radical Scavenging Activity และ Metal Chelating Activity ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุงในด้านสมบัติการละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟอง การอุ้มน้ำและการจับกับไขมัน ตลอดจนศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง

4. สมมุติฐานการวิจัย

พืชตระกูลถั่วจากหลายแหล่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งนี้เนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีส่วนช่วยต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Gordon, 2001) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในปัจจุบันสารต้านออกซิเดชันจากแหล่งธรรมชาติเป็นที่สนใจในหมู่ผู้บริโภคเนื่องจากผู้บริโภคคำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพอันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารที่เติมสารกันหืนสังเคราะห์มากขึ้น นอกจากนี้หากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุงมีสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านการละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟอง การอุ้มน้ำและการจับกับไขมัน ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อระบบอาหาร ประกอบกับหากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุงมีคุณค่าทางอาหารสูงอาจสามารถผลิตและใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีราคาถูก

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เผยแพร่ผลงานในวารสารทางวิชาการ และงานประชุมวิชาการ
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง
3. ได้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากธรรมชาติที่มีราคาถูกและมีความปลอดภัยสูง
4. ได้สารที่มีสมบัติเชิงหน้าที่จากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบในระบบอาหาร
5. ได้ทราบข้อมูลพื้นฐานของกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง

6. สามารถนำผลิตผลทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มศักยภาพ ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์ และเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่ว

ถั่ว คือ พืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae พืชวงศ์ถั่ว (Legume) จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Bean เป็นถั่วฝักที่มีเมล็ดไม่กลม เช่น ถั่วเหลือง ถั่วปากอ้า Pea เป็นถัวกินฝักสด แต่เมล็ดทีลักษณะกลม เช่น ถั่วลันเตา ถั่วชิกพี และLentil มีลักษณะเมล็ดแบนเล็กเหมือนนัยน์ตาคน มีหลายสี ถั่วเป็นพืชที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแป้ง ไขมันในถั่วมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ยกเว้นถั่วเหลืองที่มีไขมันสูงถึง 30-35% แต่เป็นไขมันคุณภาพดี เช่น ไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีนในเมล็ดถั่วเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ โดยในเมล็ดถั่วมีกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งสิบชนิดไม่แตกต่างจากเนื้อสัตว์ เมล็ดถั่วยังมีแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม ซึ่งพบมากในถั่วเหลือง (บัญชา สุวรรณานนท์ และคณะ, 2542) ถั่วหรั่ง (Bambarra Groundnut, *Voandzeia subterranea*) เป็นพืชไร่ที่นิยมปลูกกันมากในภาคใต้ เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่ายทนแล้งได้ดี สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ สามารถปลูกเป็นอาชีพเสริมรายได้ให้กับเกษตรกรก่อนที่พืชหลักจะได้ผล เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่มักปลูกถั่วหรั่งเป็นพืชแซมในสวนยางพารา สวนมะพร้าวและสวนไม้ผล ถั่วหรั่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ในจังหวัดปัตตานี ยะลาและนราธิวาส เรียกกาแจโป สงขลาเรียกถั่วไทรหรือถั่วโบ ภูเก็ต พังงาและกระบี่ เรียกถั่วปันหยี ส่วนพัทลุง สุราษฎร์ธานีและนครศรีธรรมราช เรียกถั่วเม็ดเดียวหรือถั่วหรั่ง (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ , 2548)

Slavin et al. (2009) ได้รายงานว่า กิจกรรมการต้านออกซิเดชันจากถั่วแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สมบัติเชิงหน้าที่ได้ (Functional properties) หมายถึง พฤติกรรมของสารนั้นในระบบอาหารระหว่างกระบวนการแปรรูป การเก็บรักษา การเตรียมอาหาร ตลอดจนการบริโภค (Kristinsson and Rasco, 2000) อันได้แก่ สมบัติในการละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟอง การอุ้มน้ำและการจับกับไขมัน ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบอาหารโดยเป็นตัวกำหนดลักษณะต่างๆ ของอาหาร เช่น ลักษณะปรากฏและลักษณะเนื้อสัมผัส Quaglia and Orban (1990) พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายมีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย Kristinsson and Rasco (2000) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีสมบัติเชิงหน้าที่ทางด้านการละลาย การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟองสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย อย่างไรก็ตาม Quaglia and Orban (1990) ได้สรุปว่าหากอัตราการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) เพิ่มขึ้นส่งผลให้สมบัติการเกิดอิมัลชัน และการเกิดฟองลดลง

Klompong et al. (2007) พบว่าชนิดของเอนไซม์และ DH มีผลต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันและสมบัติทางด้านการละลาย การเกิดอิมัลชันและการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากเนื้อปลา นอกจากนี้ Chiang et al. (1999) ได้รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันและการละลายสูงขึ้น

โปรตีนไฮโดรไลเสต

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยทั่วไปสารมารถผลิตได้ 3 วิธี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยสารเคมี การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และการเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ

1. การย่อยสลายด้วยสารเคมี คือ การย่อยสลายด้วยสารละลายกรดและเบส ซึ่งการย่อยสลายด้วยสารเคมีเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่ก็มีข้อจำกัดมากในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีการที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ (รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์, 2545)

1.1 การย่อยสลายด้วยกรด เช่นการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดโดยใช้วัตถุดิบผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล ทิ้งให้ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง โปรตีนจะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน กำจัดส่วนของฮิวมิน (humin) ซึ่งเป็นส่วนผสมของไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophane) ออกไป ส่วนที่เหลือนอกเหนือจากโปรตีน ทำให้เป็นกลางและนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยหรือใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 6-7 โมลาร์ ย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Peterson, 1974) ในประเทศสวีเดนจะใช้ส่วนผสมของกรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก pH 2.0 ทำการย่อยสลายโปรตีนแล้วไม่จำเป็นต้องทำให้เป็นกลางก่อนใช้สำหรับปลาที่มีไขมันน้อยจะทำการบด ผสมกับกรด ย่อยและเก็บรักษา แต่ถ้าปลาที่มีไขมันสูงต้องกำจัดไขมันออกก่อนการย่อยสลาย (Wignall and Tatterson, 1976) การย่อยสลายด้วยกรดนั้นพันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าพันธะเปปไทด์อื่นๆ ประมาณ 100 เท่า (Shih, 1992) วิธีการนี้จะทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟน ซีรีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซิสตีอีน และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย และยังทำให้กรดอะมิโนแอสปาราจีน และกลูตามีน ถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนแอสปาร์ติกและกลูตามิก (รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์, 2545)

1.2 การย่อยสลายด้วยเบส เช่น การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสจะเร็วกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด (Shih, 1992) ถ้าหากทำการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสมีสภาวะความรุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซีไมเซชัน (racemization) ของกรดอะมิโนขึ้นโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ

ของกรดอะมิโนจากรูปแบบแอล (L-form) เป็นรูปแบบดี (D-form) ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และยังทำให้เกิดปฏิกิริยาบีต้า-อิลิมิเนชัน (ß-elimination) ของกรด อะมิโนซีรีนและซิสตีน เป็นผลให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) ขึ้นซึ่งสารนี้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ซิสติอีนและไลซีน ทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิด เช่น แลนทิโอนีน (lanthionine) ไลซิโนอะลานีน (lysinoalanine) เกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญและเกิดสารพิษขึ้น (Howell, 1996) Opiacha และคณะ (1991) ศึกษากรรมวิธีการทำแห้งที่มีความสามารถในการย่อยของโปรตีนที่สกัดจากเศษกระดูกไก่โดยได้นำกระดูกไก่แช่ในสารละลายเบสที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 10 ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แยกส่วนของแข็งออกแล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสเป็น 6.8-7.0 นำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) ภายใต้แรงดันสุญญากาศ 0.5 มิลลิเมตรปรอท อีกส่วนหนึ่งทำแห้งแบบพ่นฝอย ใช้อัตราการป้อนอาหารเท่ากับ 30 มิลลิเมตรต่อนาที ลมร้อนเข้ามีอุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ลมร้อนออกมีอุณหภูมิ 85องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยได้ (digestibility) พบว่าโปรตีนสกัดจากกระดูกไก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีความสามารถในการย่อยได้สูงกว่าโปรตีนสกัดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) โดยมีค่าเป็นร้อยละ 87.30 และ 84.60 ตามลำดับ

2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและให้ปริมาณเปปไทด์สูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ค่าความเป็นกรดเบส ความคงทนต่อความร้อน มีความจำเพาะต่อตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งจึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ได้ตามความเหมาะสม ข้อเสียคือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับ ส่วนประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตได้แก่ ของแข็งทั้งหมดร้อยละ 97 ซึ่งเป็นเถ้าร้อยละ 45 (รวมโซเดียมคลอไรด์) และของแข็งอินทรีย์ร้อยละ 50 ซึ่งจำแนกเป็นไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 7.0 โมโนโซเดียมกลูตาเมทร้อยละ 19.8 แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 3.5 (โดยน้ำหนักแห้ง) และมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.2 (Perterson, 1974) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส เป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์โปรติเอส ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์คือเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งโดยปกติแล้วสามารถสลายย่อยโปรตีนจากเนื้อสัตว์ด้วยเอนไซม์โปรติ เอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในของสัตว์ เช่น เพปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และคาเทปซิน เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายดังกล่าวนี้เป็นวิธีการที่ซับซ้อนเนื่องจากเอนไซม์ โปรติเอสที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์และโครงกระดูกมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการเกิดการย่อยสลายของโปรตีนและใช้เวลาการย่อยสลายที่ยาวนาน ซึ่งผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จึงประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปัจจุบันนี้การย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นกำลัง

ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้ผลผลิตเปปไทด์ในปริมาณสูง และเอนไซม์โปรติเอสจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ความเป็นกรดเบส ความคงทนต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง อีกทั้งสภาวะการย่อยสลายก็ไม่รุนแรง สามารถควบคุมการย่อยสลายได้โดยเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ และสภาวะการย่อยสลายให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีคุณภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ (รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์, 2545) เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์โปรติเอสจะพบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นสามารถกำหนดขอบเขตการย่อยสลายและขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ (Adler-Nissen, 1986) ในขณะที่การย่อยสลายด้วยสารเคมีนั้นไม่สามารถระบุถึงการแตกตัวของ เปปไทด์และขนาดของเปปไทด์ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อาจมีรสขม ทำให้เกิดปัญหาในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

3. การเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ การเกิดโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยธรรมชาติ อาศัยกระบวนการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) (Klompong และคณะ, 2007)

คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสต

คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจจะพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยที่ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะที่ดีควรมีปริมาณโปรตีนสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในปริมาณสูงและมีปริมาณไขมันต่ำ (Hall and Ahmad, 1992) องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ เอนไซม์ที่เลือกใช้และกระบวนการผลิต ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณลักษณะที่สำคัญดังนี้คือ

1. องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าวัตถุดิบนั้นมีไขมันมากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ก็จะมีปริมาณไขมันสูง และอาจเกิดปฏิกิริยาการเหม็นหืนได้จึงต้องกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบก่อน หรือใช้สารยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาการเหม็นหืน Mackie (1982) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลาที่ปราศจากไขมันจะมีโปรตีนคิดเป็นร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้าร้อยละ 6-7

2. น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลมีความสำคัญในการบ่งบอกคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสต ถ้าระดับการย่อยสลายสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมากทำให้ละลายได้ดีแต่ขาดคุณสมบัติบางอย่างไป และถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ประกอบด้วย

เปปไทด์ขนาดใหญ่ อาจจะไม่สามารถละลายได้เพียงพอที่จะแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ออกมาได้ การกำจัดโมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจทำได้โดยการกรองด้วยเมมเบรน การกำหนดขนาดโมเลกุลที่ผ่านเมมเบรนได้จะระบุเป็น cut off No. กล่าวคือ cut off No. เท่ากับ 1000 หมายถึง สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1000 สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนออกไปได้ ดังนั้น จึงใช้การกรองด้วยเมเบรนในการคัดเลือกโปรตีนที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ตามที่ต้องการได้ (Greenberg and Ship, 1979)

3. ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis)

การวัดปริมาณการย่อยสลายโปรตีนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการย่อยสลายเพื่อแสดงถึงจำนวนพันธะที่ถูกทำลายระหว่างการเกิดปฏิกิริยา จึงมีการกำหนดค่าที่ใช้บ่งบอกถึงความก้าวหน้าของปฏิกิริยาในรูปของร้อยละของไนโตรเจนที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ (Greenberg and Ship, 1979) ระดับการย่อยสลายคือ เปอร์เซ็นต์เปปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเปปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ ถ้าค่าระดับการย่อยสลายสูงแสดงว่า โปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก ส่วนความยาวของสายเปปไทด์ (Peptide Chain Length) เป็นจำนวนเฉลี่ยของกรดอะมิโนในโพลีเปปไทด์ สามารถคำนวณได้จากระดับการย่อยสลาย (DH) กล่าวคือ ความยาวของสายเปปไทด์จะเท่ากับ 100/DH ถ้าระดับการย่อยสลายสูงเปปไทด์จะสั้นลง นั่นคือ โปรตีนถูกย่อยสลายจนเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ (Adler-Nissen, 1986) โดยค่าความยาวสายเปปไทด์ไม่ได้แสดงถึงขนาดโมเลกุลของเปปไทด์แต่เป็นการแสดงแนวโน้มในเชิงเปรียบเทียบเท่านั้น ในขณะที่องค์ประกอบของกรดอะมิโนมีความสำคัญ 2 ประการ คือ ให้กลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณปลายสายจะมีรสขม รสขมที่ได้อาจจะมาจากวัตถุดิบและชนิดของเอนไซม์ เช่นถ้าใช้เอนไซม์เพปทิเดสย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองหรือเคซีนจะได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีรสขม กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเปปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่ออยู่แบบอิสระ (Hall and Ahmad, 1992) เปปไทด์ทีมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีกรดอะมิโนที่เป็นกลางอยู่ปลายสายจะมีรสขม ถ้ามีกรดอะมิโนที่เป็นกรด อยู่ปลายสายจะให้รสหวานคล้ายน้ำซุป (Noguchi et al, 1975) เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลามีกรดอะมิโนไลซีนอยู่สูงดังนั้น จึงมีการใช้ควบคู่กับโปรตีนธัญพืช ได้แก่ ข้าวไรน์ ข้าวโพดและข้าวสาลี เพื่อเสริมให้เกิดความสมดุลของกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารที่บริโภคซึ่ง จากการรายงานพบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตจากปลาบางชนิดมีปริมาณกรดอะมิโนสูง และหรือปลาบางชนิดอาจมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นน้อยกว่ามาตรฐานของ FAO/WHO (1973) Satterlee และ Better (1973)

รายงานว่า โปรตีนในส่วนที่ละลายได้มีค่า Emulsifying capacity (EC) สูงกว่าโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้

คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต

1. คุณภาพทางเคมี

คุณภาพทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมี และ ปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีคุณภาพดีควรมีปริมาณโปรตีนสูงและมีชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนตามความต้องการของร่างกายในปริมาณสูง และมีไขมันต่ำ (Hall and Ahmad, 1992) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีและกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ เอนไซม์ และกระบวนการผลิต Mackie และคณะ (1982) ได้ทำการย่อยสลายเนื้อและเครื่องในปลาคอด (cod) ด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าในส่วนของเครื่องในปลาคอดนั้นให้ปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนและ โพรลีนสูงกว่าส่วนของเนื้อปลา ทั้งนี้เป็นเพราะว่าส่วนของเครื่องในปลาคอดนั้นมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงกว่าส่วนของเนื้อปลาคอด

2. คุณภาพทางกายภาพ

คุณภาพทางกายภาพที่สำคัญได้แก่ คุณภาพในด้านสี โดยสีของโปรตีนไฮโดร ไลเสตนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต การสกัดไขมัน และการทำแห้ง (Mahesh et al, 1993; Hoyle and Merritt, 1994) Hoyle และ Merritt (1994) นำเนื้อปลาเฮอร์ริงสด ปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยการบีบอัด และปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและปาเปน พบว่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาเฮอร์ริงสดและปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยวิธีบีบอัด และผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปน จะให้ค่าความสว่างมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตที่ได้จากการนำเนื้อปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยเอทานอลมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีค่าความสว่างมากที่สุด Surowka และ Fix (1992) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายหัวไก่ด้วยเอนไซม์นิวเทรสและผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีสีขาวครีม ในขณะที่การทำแห้งแบบสุญญากาศทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีสีน้ำตาล ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท

3. คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนปลาด้วยเอนไซม์ โปรติเอสนั้นมักจะมีรสขม ซึ่งเป็นคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งรสขมที่เกิดขึ้นนั้นมีสาเหตุจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ทริป

โตเฟน และวาลีน เป็นต้น กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเปปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่ออยู่แบบอิสระ (Hall and Ahmad, 1992) ความยาวของสายเปปไทด์มีความสำคัญต่อการเกิดรสขม คือเมื่อมีจำนวนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า 3 หมู่ในสายเปปไทด์จะทำให้รสขมลดลง นอกจากนั้นค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสายเปปไทด์ ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดรสขมด้วย คือ ถ้าสาย เปปไทด์มีค่าความไม่ชอบน้ำมากกว่า 5.85 กิโลจูลต่อโมลจะให้รสขม แต่ถ้าสายเปปไทด์มีค่าความไม่ชอบน้ำน้อยกว่า 5.43 กิโลจูลต่อโมล จะไม่ก่อให้เกิดรสขม ความเข้มของรสขมที่เกิดจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์และชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ชอบน้ำ เช่น เจลาติน จะให้รสขมน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เคซีนและถั่วเหลือง (Damodaran, 1996) Kristinsson และ Rasco, (2000) พบว่าการแก้ไขหรือการกำจัดรสขมที่เกิดขึ้นทำได้ โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นร่วมกับเอนไซม์เอนโดเพปทิเดสในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาพลาสติน (plastein) และอีกวิธีในการบดบังรสขมได้แก่การเติมน้ำตาลซูโครส (Mahesh *et al*, 1993)

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

โปรตีนนอกจากให้คุณค่าทางสารอาหารแล้ว โปรตีนยังมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional Proterties of Protein) ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะของอาหาร เช่น สี กลิ่นรส และเนื้อสัมผัส ซึ่งจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน หมายถึง คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่โปรตีนแสดงออกมาในอาหาร ระหว่างการเตรียม แปรรูป เก็บรักษาและบริโภคซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพและการยอมรับของอาหาร คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความชอบน้ำ และความไม่ชอบน้ำของโปรตีน เนื่องจากโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นแอมพิไฟล์ จึงมีส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำทั้งสองส่วนสามารถเกิดปฏิกิริยากับส่วนประกอบต่างๆในอาหารทำให้เกิดคุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆ ได้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ขนาด รูปร่าง องค์ประกอบและลำดับการเรียงของกรด อะมิโน ประจุรวม การกระจายของประจุ ความชอบน้ำ ความไม่ชอบน้ำ โครงสร้าง ความยืดหยุ่นหรือความคงตัวของโมเลกุลต่อสภาพแวดล้อม หรือปฏิกิริยาร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆในอาหาร (สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ , 2545)

1. การละลาย (solulity)

ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นคุณสมบัติที่มีผลต่อคุณสมบัติอื่นๆ มากมาย การละลายของโปรตีนขึ้นกับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายและชนิดและปริมาณของ

ตัวถูกละลายอื่นๆ ที่ผสมอยู่ด้วย ความสามารถในการละลายวัดในรูปของดัชนีการละลายของไนโตรเจน (Nitrogen Solubility Index, NSI) ซึ่งคำนวณจากร้อยละของไนโตรเจนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือ เทียบกับร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสต (Quaglia andOrban, 1987) ความสามารถในการละลายของโปรตีน เป็นคุณสมบัติที่สำคัญและมีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ เช่น ความหนืด การเกิดโฟม อิมัลชัน และการเกิดเจลของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารโดยส่วนใหญ่คือน้ำ โปรตีนที่สามารถยึดจับน้ำหรือละลายน้ำได้จึงสามารถรวมตัวเข้ากับอาหารและแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ได้ โปรตีนที่นำมาใช้ประโยชน์เชิงหน้าที่จึงควรจะมีความสามารถในการละลาย นักวิจัยส่วนมากจึงใช้ความสามารถในการละลายของโปรตีนบ่งชี้คุณภาพของโปรตีน หรือโครงสร้างของโปรตีนทางอ้อม การละลาย มีอิทธิพลมาจากกลุ่มมีขั้ว และกลุ่มไม่มีขั้วที่มีอยู่ในโปรตีนรวมทั้งการจัดเรียงตัวของกลุ่มเหล่านี้ในโมเลกุลด้วย โดยทั่วไปโปรตีนสามารถละลายได้เพียงในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ กลีเซอรอล ฟอร์มัลดีไฮด์ หรือกรดฟอร์มิค เป็นต้น ซึ่งสภาพละลายได้ของโปรตีนในน้ำจะขึ้นกับพีเอช ความเข้มข้นของเกลือ และความแรงของอิออน (อัญชลินทร์ สังคำ และ ทศพร นามโฮง, 2547)

ปัจจัยที่มีผลต่อการละลายของโปรตีนสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำที่ไม่ชอบน้ำของผิวหน้าโปรตีน

เนื่องจากลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนเกิดจากขดตัวของสายเปปไทด์ ดังนั้นความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงขึ้นกับ ขนาด รูปร่าง และลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ผิวหน้าของโปรตีน โปรตีนที่มีสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำ/ส่วนที่ไม่ชอบน้ำบริเวณผิวหน้าของโปรตีนสูงจะสามารถละลายได้ดี ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาน้ำที่แตกต่างกัน

1.) พีเอช

ในสภาวะที่สารละลายโปรตีนมีค่าพีเอชอยู่ที่ระดับ pI (Isoelectric point) ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลงต่ำสุด เนื่องจากประจุไฟฟ้ารวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์จึงไม่มีเกิดแรงผลักกันระหว่างประจุที่จะทำให้โปรตีนเกิดการกระจายในสารละลายในสภาวะนี้โปรตีนอยู่ชิดกันซึ่งอาจเกิดการรวมตัว และตกตะกอนในทันที ในสภาวะที่พีเอชมีระดับสูงกว่าหรือต่ำกว่า pI โปรตีนมีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบและบวกตามลำดับ ประจุไฟฟ้ารวมที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการผลักกันของโปรตีนทำให้เกิดการละลายได้ดีและคงตัวในสารละลาย อย่างไรก็ตามที่สภาวะที่มี

ความเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปจะมีผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและสูญเสียสภาพ ทำให้ส่วนที่ไม่มีขั้วภายในโปรตีนเผยออกมาภายนอก ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวและตกตะกอนในที่สุด

2.) อุณหภูมิ

โครงสร้างตามธรรมชาติของโปรตีนมีความสำคัญต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนมีความคงตัวจึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง โดยส่วนใหญ่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายของโปรตีนอยู่ในช่วง 5 – 24 องศาเซลเซียส หรือ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นกับชนิดของโปรตีน การเพิ่มอุณหภูมิให้ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง 40 – 50 องศาเซลเซียส จะทำให้โปรตีนจะสามารถละลายได้เพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายโปรตีนให้สูงกว่าระดับนี้เป็นระยะเวลาหนึ่ง โปรตีนจะเกิดการเสียสภาพทำให้ความสามารถในการละลายลดลง โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อพันธะ non-covalent เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะ hydrophobic และพันธะ electrostatic ในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในโครงสร้างโปรตีนเผยออกมา ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับกับน้ำก็จะลดลง และส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่เผยออกมานี้จะเหนี่ยวน้ำให้โปรตีนเกิดการรวมตัว จับตัวเป็นก้อน และตกตะกอนในที่สุด

3.) ค่า Ionic strength

การเติมเกลือที่สมบัติเป็นกลางจำนวนเล็กน้อยประมาณ 0.1-1 โมลาร์ อาจจะทำให้โปรตีนสามารถละลายได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อโปรตีนจับตัวกับเกลือจะให้โปรตีนมีประจุเพิ่มลบก่อให้เกิดแรงผลักกันระหว่างสายของโปรตีนทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้มากขึ้น ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า "Salting in" โปรตีนจะละลายได้สูงสุดที่ความเข้มข้นเกลือระดับหนึ่ง หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือจะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง หรือเรียกปรากฏการณ์ นี้ว่า “Salting out” ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างเกลือและโปรตีนในการทำปฏิกิริยากับน้ำ นอกจากนี้เกลือยังมีผลทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนรวมตัวกันระหว่างโปรตีน-โปรตีนและเกิดการตกตะกอนในที่สุด

4.) ค่าความเข้มข้นของโปรตีน

5.) สารประกอบอื่นๆ

ส่วนประกอบต่างๆที่มีอยู่ในอาหารอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ที่มีอยู่ในอาหารอาจทำให้เกิดการเชื่อมประสานกันเกิดเป็นสารประกอบระหว่าง โปรตีน-โปรตีน โปรตีน-ไขมัน หรือ โปรตีน-คาร์โบไฮเดรต ส่งผลกระทบต่อการละลายและคุณสมบัติต่างๆของโปรตีน สารประกอบอื่นๆที่มีอยู่ในสารละลาย เช่น โลหะ หรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ ก็อาจส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการละลายของโปรตีนโดยโลหะ

บางชนิด เช่น Zn^{2-1} $Cd2^{2-1}$ และ Ba^{2-1} จะทำให้สามารถทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน และในอาหารที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากค่า dielectric constant ตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำกว่าน้ำทำให้ความเป็นขั้วของสารละลายลดลง

2. การเกิดอิมัลชัน (emulsion)

ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying capacity) หมายถึง ความสามารถของสารที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการรวมตัวของน้ำกับไขมันโดยหุ้มรอบเม็ดไขมันเอาไว้ทำให้อิมัลชันคงตัว เมื่อย่อยสลายโปรตีนจนเกิดเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วนั้นสามารถที่จะทำให้เกิดอิมัลชันได้ โดยการที่เปปไทด์เหล่านี้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณพื้นผิวเม็ดน้ำมัน หันโมเลกุลทางด้านที่ไม่มีขั้วเข้าหาเม็ดน้ำมันและหันโมเลกุลที่มีขั้วเข้าหาโมเลกุลน้ำหรือโมเลกุลมีขั้วซึ่งมีส่วนช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างเม็ดน้ำมันและน้ำ จึงทำให้เกิดสภาพอิมัลชันขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลาย ความเป็นกรดเบสเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย และsurface hydrophobicity เป็นต้น โดยที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะมีค่าต่ำ ณ จุด pI (Nielsen, 1997) Quaglia and Orban (1990) พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยสลายจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ20 ความยาวของสายเปปไทด์จะสั้นลง และความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะลดต่ำลงด้วย และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีค่า surface hydrophobicity สูง จะมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีค่า surface hydrophobicity ต่ำ

คุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของอาหารประเภทอิมัลชัน ซึ่งมีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่ไม่มีความคงตัวจะไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เช่น น้ำสลัดที่ไม่มีความคงตัวของระบบอิมัลชันจะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการแยกชั้น หรือไส้กรอกอิมัลชันที่ไม่มีความคงตัวจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัมผัสหยาบ เมื่อทำการผสม น้ำ น้ำมัน และโปรตีน ให้เป็นเนื้อเดียวกัน สายของโปรตีนจะเกิดการคลายตัวและแทรกไปอยู่ที่ผิวระหว่างอนุภาคของน้ำมันและน้ำบางส่วนของโปรตีนจะเข้าไปดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคไขมันส่งผลแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและน้ำลดลงทำให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคของน้ำมันได้ดีขึ้น โดยโครงสร้างของโปรตีนจะป้องกันไม่ให้อนุภาคของน้ำมันเกิดการรวมตัวกันได้

สายโปรตีนบริเวณส่วนหาง (tail) ที่เป็นปลายโมเลกุลด้านหมู่อะมิโนและปลายโมเลกุลด้านหมู่คาร์บอกซิลจะทำหน้าที่กระจายตัวหรือละลายในน้ำ บางส่วนของสายที่มีลักษณะเป็นห่วง (loop) จะทำหน้าที่ละลายน้ำและป้องกันไม่ให้อนุภาคของไขมันรวมตัวกัน และส่วนของโปรตีนที่เป็นสายยาว (train) จะทำหน้าที่กระจายตัวหรือละลายในน้ำมัน

การเกิดอิมัลชันได้ต้องอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน

ขั้นแรก คือ การทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็กๆ โดยอาศัยการให้พลังงานซึ่งอาจใช้ในรูปของความร้อน (Heat) การคนหรือเขย่า (Mechanical agitation) การสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (Untrasonic vibration) หรือไฟฟ้า (Electricity)

ขั้นสอง คือ การทำให้หยดเล็กๆที่กระจายตัวอยู่นั้นคงสภาพอยู่ได้ซึ่งอาศัยตัวทำอิมัลชันดังกล่าว

กลไกการทำงานของตัวทำอิมัลชัน คือ ลดแรงตรึงระหว่างผิวของของเหลวทั้งสองเป็นการลดพลังงานอิสระที่พื้นผิว ทำให้โอกาสที่หยดวัฏภาค ซึ่งกระจายตัวอยู่นั้นรวมตัวกันได้น้อยลงเป็นการเพิ่มความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ จากการเกิดฟิล์มที่แข็งแรง และยืดหยุ่นโดยรอบหยดวัฏภาคภายในความแข็งแรง และลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลของฟิล์มนี้แตกต่างกันออกไป แล้วแต่ชนิด และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันที่ใช้ฟิล์มอาจเลียงตัวเป็นโมเลกุลเดี่ยว (Monomolecuar film) โดยหันด้านมีประจุเข้าหาวัฏภาคน้ำ ด้านไม่มีประจุจะหันเข้าหา วัฏภาค น้ำมัน ฟิล์มชนิดนี้มักเกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำอิมัลชันหรือมีการเรียงตัวซ้อนกันเป็นโมเลกุล (Multimolecular film) ซึ่งเกิดจากการใช้คอลอยด์ ที่ชอบน้ำเป็นตัวทำอิมัลชันหรือมีการเรียงตัวของอนุภาคเล็กละเอียดของของแข็ง (Solid preticle film) ซึ่งเกิดจากการใช้ของแข็งเล็กละเอียดบางชนิดซึ่งดูดซับหน้าประจันของวัฏภาคทั้งสองได้

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน

1.) พีเอช

ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะขึ้นกับระดับพีเอชของสารละลาย ที่ pI โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นศูนย์ ดังนั้นโปรตีนจะละลายน้ำได้น้อยเพราะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน-โปรตีน มากกว่าโปรตีน-น้ำ ในระดับพีเอชสูงหรือต่ำกว่าไอโซอิเล็กทริกพีเอชโปรตีนจะมีประจุรวมเป็นลบและบวกตามลำดับ ทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น

2.) อุณหภูมิ

โดยปกติตัวถูกละลายส่วนใหญ่จะสามารถละลายได้ดีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ แต่สำหรับโปรตีนซึ่งเป็นสารไบโอพอลิเมอร์นั้น ความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิ เนื่องจากความร้อนจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและเกิดการคลายเกลียว ส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโปรตีนเกิดการเผยออกมาและอาจเกิดการจับตัวกัน ทำให้เกิดการตกตะกอน

3.) ชนิดของอิออนและความเข้มข้นของอิออน

การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของอิออนจะทำให้สมดุลระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลายเปลี่ยนไป เช่น การเพิ่มการละลายหรือการตกตะกอนของโปรตีน การใช้ความเข้มข้น

ของอิออนต่ำ ๆ จะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น แต่ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือหรือ อิออนที่มากเกินไปจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อยลงหรืออาจตกตะกอน (สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ, 2545)

3. การเกิดฟอง (Formation of foam)

โครงสร้างของโฟมเป็นระบบคอลลอยด์ซึ่งประกอบด้วยเฟสของฟองอากาศขนาดเล็กซึ่งกระจายอยู่ในเฟสของของเหลว โดยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารจะทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ช่วยในการเกิดฟองและรักษาความคงตัวของอากาศที่กระจายอยู่ได้

ขนาดของฟองอากาศที่กระจายอยู่จะมีผลต่อลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร ถ้าหากฟองอากาศที่กระจายอยู่มีขนาดใหญ่จะทำให้อาหารมีเนื้อสัมผัสเบาและมี รูพรุน ในขณะที่ฟองอากาศมีขนาดเล็กจะทำให้เนื้อสัมผัสเนียนเรียบและแน่นกว่า การเกิดฟองเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของโปรตีนที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายๆประเภทที่มีลักษณะขึ้นฟูและเบา เช่น Whipped cream ไอศกรีม เค้ก เมอร์แรง Souffle Mousse และ Marshmallow

กลไกในการเกิดฟองของโปรตีน ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1.โปรตีนในสารละลายจะเกิดการเคลื่อนที่ไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศโดยอาศัยกระบวนการแพร่ หรือการพา

2.โปรตีนที่เคลื่อนที่มาจะเกิดการแทรกตัวไปยังระหว่างชั้นของน้ำและอากาศซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นที่ผิวหน้าเพิ่มขึ้น แรงตึงผิวลดลง

3.โปรตีนจะเกิดการคลายคัว และเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ทำให้เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มอากาศไว้โดยโปรตีนจะหันส่วนที่ชอบน้ำไปยังเฟสของน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปยังเฟสของอากาศเนื่องจากโครงสร้างของฟองที่เกิดขึ้นนี้ยังคงไม่มีความคงตัวมากนัก ดังนั้นในระบบการผลิตอาหารจำเป็นต้องรักษาความคงตัวของฟองไว้โดยการทำให้โครงสร้างโปรตีนของฟองเกิดการเสียสภาพ ซึ่งอาจทำได้โดย การใช้ความร้อน การผสมกับส่วนประกอบอาหารอื่น การเติมสารเจือปน หรือการปรับค่าพีเอช (สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ, 2545)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิดฟอง

1.) ขนาดของโมเลกุลโปรตีน

ขนาดของโมเลกุลจะมีผลต่อความคงตัวและความยืดหยุ่นของสายเปปไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างพองอากาศของโมเลกุลโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่มีความยืดหยุ่น

สูง สามารถเกิดการคลายตัวของโมเลกุล ที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำเพื่อสร้างฟองได้ง่ายและรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดฟองเพิ่มขึ้น

2.) การละลาย

สมบัติการสร้างฟองของโปรตีนสัมพันธ์กับความสามารถในการละลาย เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่สามารถละลายได้ในส่วนที่เป็นของเหลวจะสามารถแพร่กระจายไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำและอากาศได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อเพิ่มสมบัติด้านการละลายของโปรตีนคือการใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลาย

3.) ความหนืด

โดยปกติฟองจะมีความคงตัวเพิ่มมากขึ้นเมื่อสารละลายโปรตีนมีความหนืดเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำให้การละลายของโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้นนั้นจะส่งผลให้ความหนืดของสารละลายโปรตีนลดลง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีการเกิดฟองเพิ่มขึ้นแต่ความคงตัวของการเกิดฟองลดลง

4.) แรงตึงผิว

ในการเกิดฟองนั้นจำเป็นที่จะต้องเพิ่มพื้นที่ผิว ดังนั้นการลดแรงตึงผิวจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟองของโปรตีน เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการดูดซับได้อย่างรวดเร็วที่ผิวหน้าระหว่างน้ำกับอากาศ ทั้งยังมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นโดยเมื่อความเข้มข้นที่ผิวหน้าเพิ่มขึ้นจะทำให้แรงตึงผิวมีค่าลดลง

5.) ความเข้มข้น

การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนเป็นผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฟองมีความคงตัวเพิ่มขึ้นทั้งนี้เพราะฟิล์มโปรตีนที่ห่อหุ้มอากาศไว้มีความหนาของลามิล่าร์เพิ่มขึ้น และในขณะผสมสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงจะได้ปริมาตรฟองอากาศเพิ่มขึ้นเนื่องจากโปรตีนสามารถดูดซับที่ผิวหน้าได้อย่างรวดเร็ว ประกอบกับมีความเข้มข้นเพียงพอเพื่อสร้างฟิล์มห่อหุ้มอากาศไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.) หมู่ไฮโดรโฟบิลที่ผิว

คุณสมบัติในการเกิดฟองจะเพิ่มขึ้น เมื่อบริเวณผิวหน้าของโปรตีนมีกลุ่มไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการการเกิดฟองนั้น การคลายตัวของโปรตีนจะทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างโปรตีนเผยออกมาทำให้มีบริเวณส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนผิวโปรตีนมากขึ้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่เกิดขึ้นนี้จะจับกับส่วนที่เป็นฟองอากาศ และในขณะส่วนที่ชอบน้ำที่มีอยู่จะจับกับส่วนที่เป็นของเหลว ทำให้เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มรอบๆฟองอากาศไว้ได้

7.) พีเอช

โดยทั่วไป การสร้างฟิล์มจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและได้ฟิล์มที่แข็งแรงที่ระดับ พีเอชของสารละลายเท่ากับ pI ของโปรตีนชนิดนั้นๆ ทั้งนี้เนื่องจากค่า Electrostatic attraction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีค่าสูงสุดที่ pI ทำให้เกิด Electrostatic bonding สูงเป็นผลให้มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีน-โปรตีนเพิ่มขึ้น แรงตึงผิวลดลง ได้ฟิล์มที่มีความหนามากขึ้นและมีความยืดหยุ่นสูง ในขณะที่ระดับพีเอชที่สูงหรือต่ำกว่า pI โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบหรือบวกตามลำดับ ทำให้มีแรงผลักระหว่างประจุภายในโครงสร้าง (สุปราณี มนูรักษ์ชินากร และคณะ, 2545)

4. การอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity)

โปรตีนมีสมบัติในการอุ้มน้ำ ดังนั้นจึงทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีลักษณะนุ่ม มีรสชาติที่ดี (อัญชลินทร์ สังคำ และ ทศพร นามโฮง, 2547)

5. การดูดซับไขมัน

การดูดซับไขมันเป็นอีกสมบัติหน้าที่ของโปรตีนซึ่งส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร (Kristinsson and Rasco, 2000)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) USA) ได้ซื้อจาก Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) Iron (II) chloride tetrahydrate ($FeCl_2 4H_2O$) ซื้อจาก Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan) และ Protamex และ Flavourzyme 500L ได้จาก Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark)

วิธีการ

1. การเตรียมถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง

จัดหาถั่วหรั่ง ถั่วเหลือง และถั่วลิสงในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง นำถั่วที่ได้มาทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งปลอมปนจากนั้นนำมาคัดเมล็ดที่สมบูรณ์ ทำการปอกเปลือกถั่ว เพื่อแยกเมล็ดถั่วออกจากเปลือกถั่ว จากนั้นจึงนำมาผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 การลดความชื้น

นำเมล็ดถั่วที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบดด้วย grinder จากนั้นนำถั่วบดมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 mesh

1.2 การสกัดไขมัน

นำถั่วบดมาผสมกับไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 1:4 (w/v) นำไป Homogenize ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการกำจัดตัวทำละลายด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และทำการวางถั่วที่ผ่านการกำจัดไขมันไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อระเหยตัวทำละลายที่ยังตกค้าง ตามวิธีของ Klompong et al. (2007a) โดยการดัดแปลงบางส่วน

1.3 การสกัดแป้ง

นำถั่วบดที่ผ่านการสกัดไขมัน แล้วนำมาเติมสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 N ปริมาตร 10 เท่าของตัวอย่าง (w/v) ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ไปที่ 8 ด้วย NaOH เข้มข้น 6 N จากนั้นนำไป

หมุนเหวี่ยงที่ 3500 g เป็นเวลา 10 นาที ปรับ pH ของส่วนใส เป็น 4.0 ด้วย 1 หรือ 6 N HCl เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในน้ำแล้วปรับ pH เป็น 7 ตามวิธีของ Hwang et al. (2010)

1.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) ตามวิธีของ AOAC (2000)

2. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง

นำถั่วมาบดที่ผ่านการกำจัดความชื้น ไขมัน และแป้ง มา 5 กรัมโปรตีนผสมน้ำ 250 มิลลิลิตร นำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และโปรตาเมกซ์ โดยกำหนดให้มีระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นระดับร้อยละ 1 2 และ 5 ทำการย่อยสลายและวัดอัตราการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis: DH) ด้วยวิธี pH-Stat (Adler-Nissen, 1986) โดยใช้สารละลาย NaOH เข้มข้น 2 N ในการปรับ pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลา 120 นาที DH (%) สามารถคำนวณได้ดังสมการดังต่อไปนี้

$$DH\ (\%) = \frac{B\ Nb}{Mp\ (1/\alpha)\ htot} \times 100$$

เมื่อ B คือ ปริมาณของด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Nb คือ ค่าความเข้มข้นของด่าง (normality)

Mp คือ มวลของโปรตีน (กรัม)

$1/\alpha$ คือ ค่าCalibralion factor สำหรับ pH stat ที่อุณหภูมิ50 องศาเซลเซียส และ pH = 7 มีค่า 2.27

htot คือ ปริมาณพันธะเปปไทด์ในโปรตีนจากถั่ว มีค่า = 7.8

พล็อตกราฟระหว่าง log10 (ความเข้มข้นของเอนไซม์) กับ DH จากสมการถดถอยนั้น ทำให้ทราบความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วหรั่งให้มีระดับ DH (ร้อยละ 1 3 และ 5) ตามต้องการได้จากการคำนวณ ได้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง เมื่อได้ DH ตามต้องการ นำบีกเกอร์ใส่ใน water bath อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการปรับ pH ให้ได้ 7 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 1 หรือ 6 N หรือสารละลาย NaOH แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และโปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) ตามวิธี Kjeldahl's (AOAC, 2000)

4. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง

นำถั่วสายพันธุ์พื้นเมืองพัทลุง ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่ง ซึ่งเพาะปลูกในท้องถิ่นเขตจังหวัดพัทลุงมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปเตรียมโปรตีนไอโซเลตซึ่งปราศจากแป้งและน้ำมัน และเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ โดยกำหนดให้มีระดับการย่อยสลาย ที่ระดับร้อยละ 1 3 และ 5 ด้วยวิธี pH-Stat (Adler-Nissen, 1986) ได้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่ง

5. ศึกษาผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

การดำเนินการทดสอบหลายวิธี เนื่องจากแต่ละวิธีได้อธิบายกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ได้แก่ การทดสอบที่อธิบายถึงการ scavenge อนุมูลอิสระชนิด DPPH, ABTS, hydroxyl และ superoxide anion และการทดสอบที่อธิบายถึงการ chelate โลหะ ซึ่งทุกปัจจัยล้วนมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งสิ้น และยังสามารถบ่งบอกได้ว่าเป็น primary และ/หรือ secondary antioxidant

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) ร้อยละ 1 3 และ 5 มาตรวจสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ได้แก่

5.1 DPPH Radical Scavenging Activity (Yen and Wu, 1999)

โดยการนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตมาละลายในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต (Robinson and Hodgen, 1940) จากนั้นเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง และ DPPH radical scavenging activity คำนวณได้ดังนี้

DPPH radical scavenging activity (%) = (1- (A_{517} ตัวอย่าง/ A_{517} ควบคุม)) x 100

5.2 ABTS Radical Scavenging Activity (Smith et al., 1985)

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย ABTS+ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มไว้ 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 735 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer

% inhibition = ((A735 ควบคุม – A735 ตัวอย่าง)/A735 ควบคุม) x 100

5.3 Metal Chelating Activity (Decker and Welch, 1990)

โดยการนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่น 3.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับ $FeCl_2$ เข้มข้น 2 mM ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ Ferrozine เข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer สำหรับชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง และ Metal chelating activity คำนวณดังนี้

Metal chelating activity (%) = (1- (A_{562} ตัวอย่าง/ A_{562} ควบคุม)) x 100

5.4 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Lee et al., 2005)

เตรียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.3 โมลาร์ (pH 3.6) โดยการนำ $C_2H_3O_2Na.3H_2O$ ปริมาณ 3.1 กรัม มาละลายในกรดอะซิติก ปริมาณ 16 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน 1 ลิตร การเตรียมสารละลาย TPTZ ทำโดยการนำ TPTZ 10 มิลลิโมล มาทำการละลายในสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์ของไฮโดรคลอริก ปริมาณ 1 ลิตร การเตรียมสารละลาย Ferric 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ FeCl3.6H2O สาร FRAP ต้องจัดเตรียมแล้วใช้ทันที โดยการทำผสมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ TPTZ และสารละลาย Ferric ในอัตราส่วน 10:1:1 ในการเตรียมแบลงค์ของสารละลายทำได้โดยนำสาร FRAP 500 ไมโครลิตร มาทำการผสมกับน้ำกลั่น 480 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร แล้วบันทึกค่าที่ได้ จากนั้นนำไปเติมสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 20 ไมโครลิตร พักไว้ 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างตัวอย่างและแบลงค์สามารถแปรผลเป็นจำนวนมิลลิโมลต่อลิตรของ Ferric ที่ถูกรีดิวซ์เป็น Ferrous

5.5 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities (Chung et al., 1997)

นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 2-deoxyribose ความเข้มข้น 2.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม 0.2 มิลลิลิตรของสารละลายผสมระหว่างสารละลาย $FeCl_3.6H_2O$

ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 104 ไมโครโมล ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เติมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย L-ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย TBA ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เตรียมจากสารละลาย TCA ร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 5 นาที เซนตริฟิวจ์ 12000 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5.6 ระบบ Lecithin liposome

ทำการเตรียมสารแขวนลอย liposome เข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วและ sonicator เป็นเวลา 15 นาที เติมตัวอย่างปริมาณ 200 พีพีเอ็ม ลงในระบบ Lecithin liposome 30 มิลลิลิตร แล้ว sonicate เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม Cupric acetate เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางในเครื่องเขย่า (120 rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มัวอย่าง) และระบบที่มี α-tocopherol วัดการเกิดออกซิเดชันของ liposome ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยวัด conjugated dienes ตามวิธีของ Frankel et al. (1997) และวัด thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ตามวิธีของ Lee และ Hendricks (1997)

6. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเม็กซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 20 30 และ 40 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร มาตรวจสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ได้แก่

6.1 DPPH Radical Scavenging Activity (Yen and Wu, 1999)

6.2 ABTS Radical Scavenging Activity (Smith et al., 1985)

6.3 Metal Chelating Activity (Decker and Welch, 1990)

6.4 Superoxide Anion Radical-Scavenging Activity (Nakai et al., 2001)

6.5 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities (Chung et al., 1997)

7. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน เพื่อศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่

7.1 DPPH Radical Scavenging Activity (Yen and Wu, 1999)

7.2 ABTS Radical Scavenging Activity (Smith et al., 1985)

7.3 Metal Chelating Activity (Decker and Welch, 1990)

8. ศึกษาผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) ร้อยละ 1 3 และ 5 มาศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่เปรียบเทียบกับถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ได้แก่

8.1 การละลาย (Solubility)

8.2 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Properties) (Pearce and Kinsella, 1978)

8.3 การเกิดฟอง (Foaming properties) (Sathe and Salunkhe, 1981)

8.4 การอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) (Shahidi et al., 1995)

8.5 การจับกับไขมัน (Fat Adsorption) (Kristinsson and Rasco, 2000)

9. ศึกษาผลของพีเอชต่อต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ไปอยู่ในระบบที่มีค่าพีเอช 2 7 12 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นมาตรวจสอบสมบัติเชิงหน้าที่ เพื่อศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่พีเอชต่างๆได้แก่

9.1 การละลาย (Solubility)

9.2 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Properties) (Pearce and Kinsella, 1978)

9.3 การเกิดฟอง (Foaming properties) (Sathe and Salunkhe, 1981)

9.4 การอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) (Shahidi et al., 1995)

9.5 การจับกับไขมัน (Fat Adsorption) (Kristinsson and Rasco, 2000)

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ (Completely Randomized Design) CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลตามวิธี ANOVA (Analysis of Variance) (Steel and Torrie, 1980) ด้วยโปรแกรม SPSS (เวอร์ชัน 11.0)

11. สถานที่ทำวิจัย

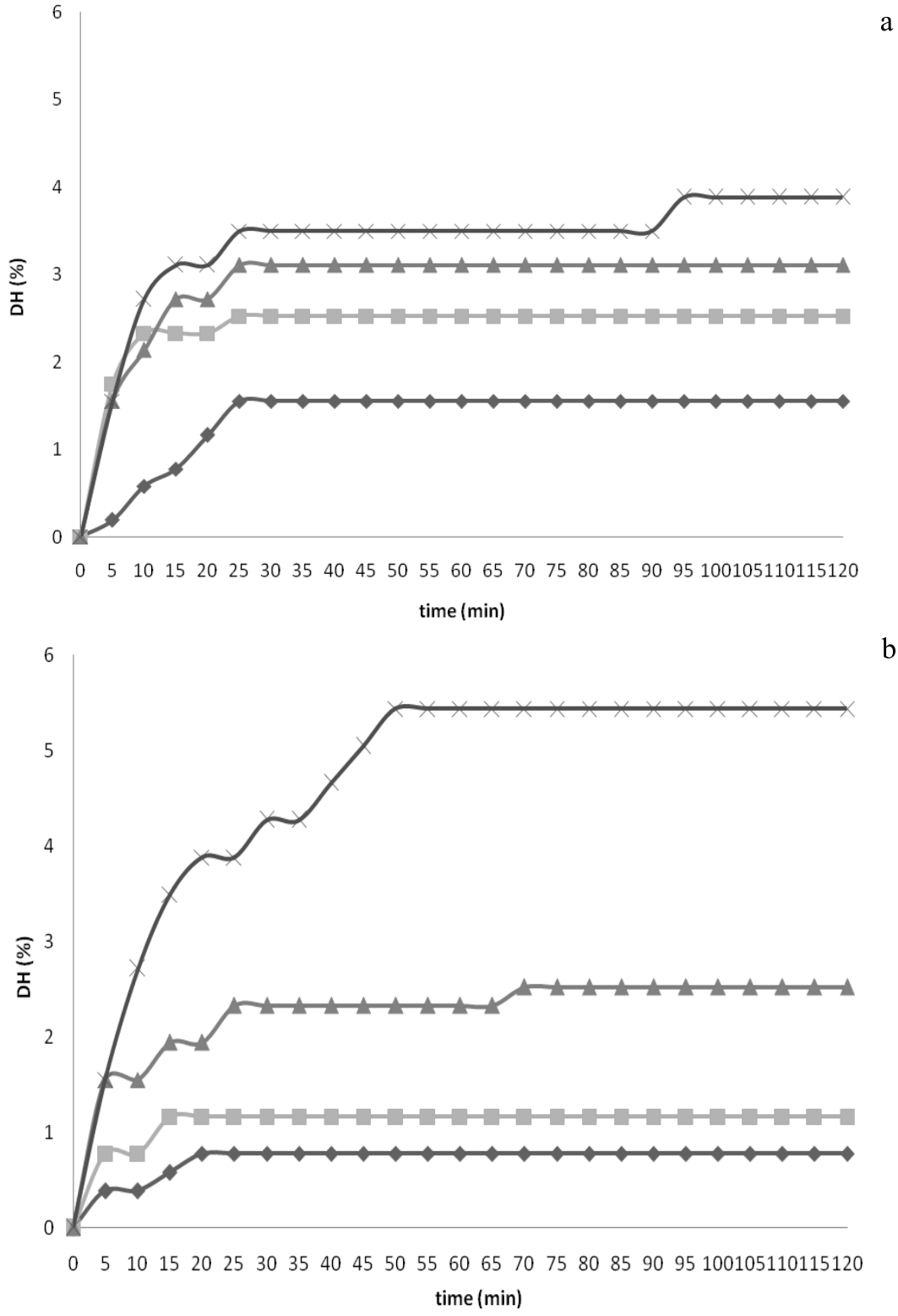
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ 222 หมู่ 2 ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110 โทรศัพท์ 074-693996 โทรสาร 074-693996

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ถั่วหรั่ง

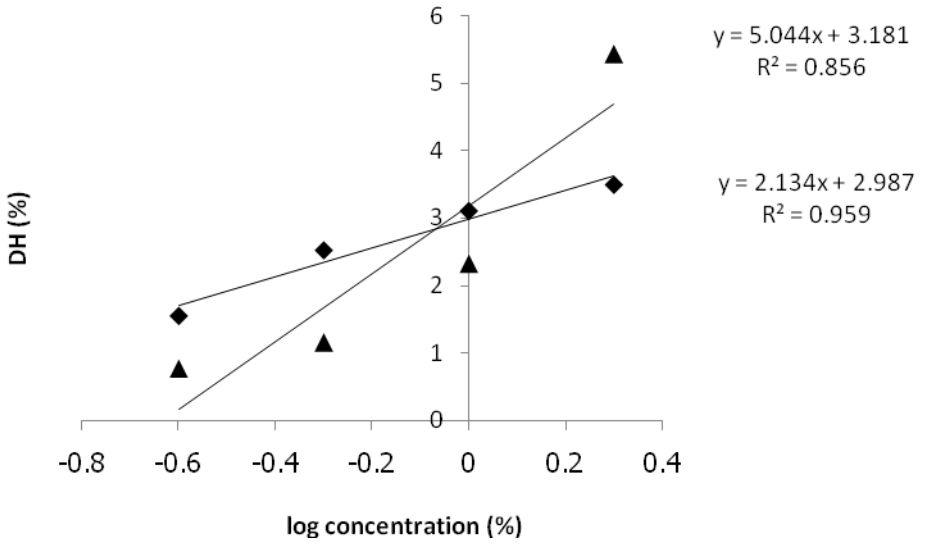
4.1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยสลายต่ออัตราการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์และระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) โปรตีนจากถั่วหรั่ง พบว่า การย่อยสลายโปรตีนจากถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันและระดับความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ เอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 1 และ 2 โดยใช้วิธี pH-stat นั้นส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีอัตราการย่อยสลายที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งจะพบการย่อยสลายอย่างรวดเร็วในช่วง 30 นาทีแรก หลังจากนั้นอัตราการย่อยสลายช้าลง โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีระดับการย่อยสลายต่ำกว่าโปรตีนถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ฟลาโวไซม์ ที่ระยะเวลาการย่อยสลายเดียวกัน ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ในขณะที่เอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็น exo และ endo peptidase ซึ่งตัดพันธะเปปไทด์จากปลายสายรวมทั้งสามารถตัดภายในสายเปปไทด์แบบสุ่มในขณะที่เอนไซม์โปรตาเมกซ์เป็น endopeptidase (novozymes. 2007) และยังพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ มีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลืองเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้น ทั้งในระบบที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และอัลคาเลสโดยอัตราการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 1 อัตราการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ( ) 0.5 ( ) 1 ( ) และ 2 ( )ที่ pH 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที

เมื่อทำการพล็อตกราฟ $\log_{10}$ (ความเข้มข้นของเอนไซม์) กับ DH พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้น (ภาพที่ 2) ทั้ง 2 ระบบ จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้สามารถกำหนด DH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007)

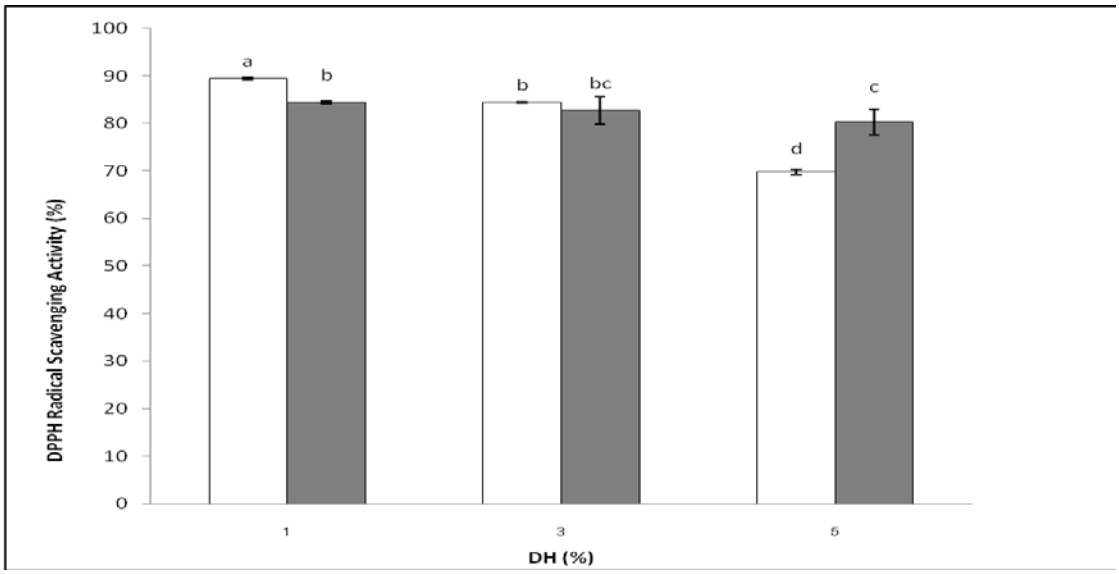


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง DH กับ log ความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (◆) และฟลาโวไซม์ (▲) ในการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่ง เป็นเวลา 60 นาที ที่ pH 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.1.2 ผลผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง

เมื่อศึกษาผลของกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) และเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ลดลงตามลำดับ ตั้งแต่ร้อยละ 1-5 ($p \leq 0.05$) และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ลดลงตามระดับการย่อยสลายเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติในที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 และ 5 ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้ดีกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งในระหว่างการย่อย

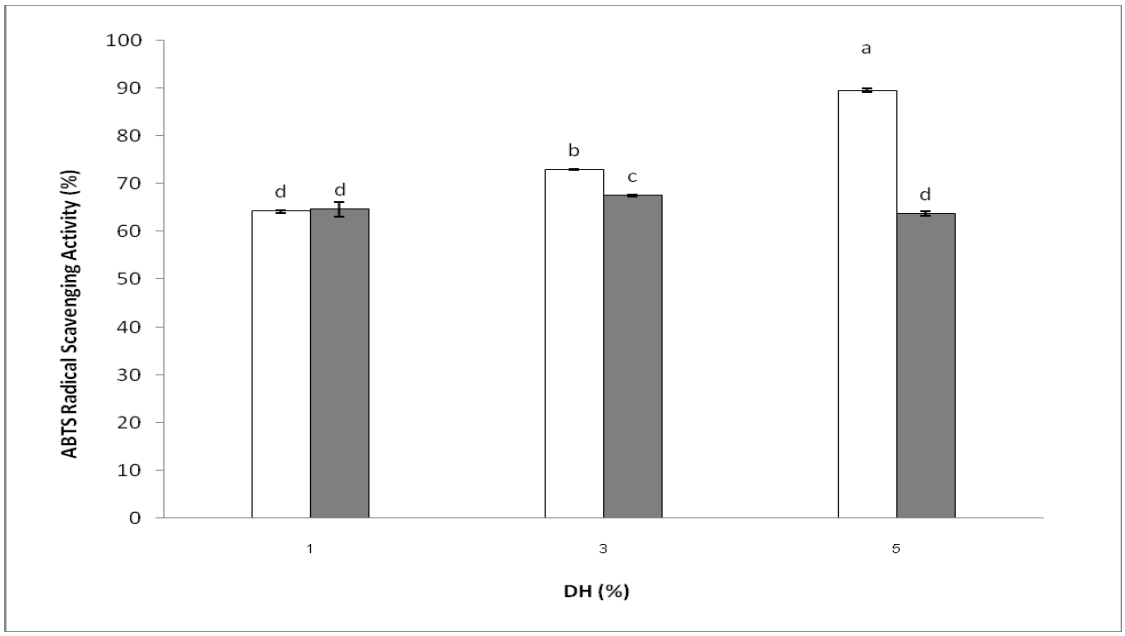
สลาย เกิดพันธะเปปไทด์ขนาดเล็กเป็นจำนวนมากและกรดอะมิโนอิสระที่ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงของขนาด ระดับและองค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Wu et al., 2003) DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 517 นาโนเมตรในเอทานอล (Shimada et al., 1992) เมื่อโปรตีนไฮโดรไลเสตให้โปรตอนแก่ DPPH จะทำให้การดูดกลืนแสงมีค่าลดลง เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Shimada et al., 1992) และจากงานวิจัยของ Jun และคณะ (2004) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา yellow fin ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินที่ DH ร้อยละ 22 มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต จากปลา yellow fin ผลิตโดยใช้เอนไซม์อื่น ๆ เช่น Alcalase, chymotrypsin, ปาเปน, เปปซิน, Pronase E, Neutrase และเอนไซม์ทริปซิน



ภาพที่ 3 DPPH Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)
[a-d] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อศึกษาผลของกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 4 จากการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลาย 5 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS มากที่สุด และกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ ABTS นั้น จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของเอนไซม์โปรตาเมกซ์เพิ่มมากขึ้น ($p \leq 0.05$) ในขณะที่

กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS สูงสุดที่ระดับการย่อยสลาย 3 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์โปรตาเมกซ์กับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน พบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์นั้นมีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระที่สูงกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละระดับการย่อยสลายระหว่างชนิดของเอนไซม์ โดยที่ระดับการย่อยสลาย 1 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม ที่ระดับการย่อยสลาย 3 และ 5 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) Klompong และคณะ (2009)ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS เปรียบเทียบกับ Trolox ในโปรตีนไฮโดรเลตจากปลาสีกุนข้างเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 ตามด้วยการแยกส่วนด้วยวิธี Gelfiltration ion-exchange chromatography และ HPLC ตามลำดับ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลืองที่ผ่านการย่อยสลาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS อย่างไรก็ตาม กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า Trolox

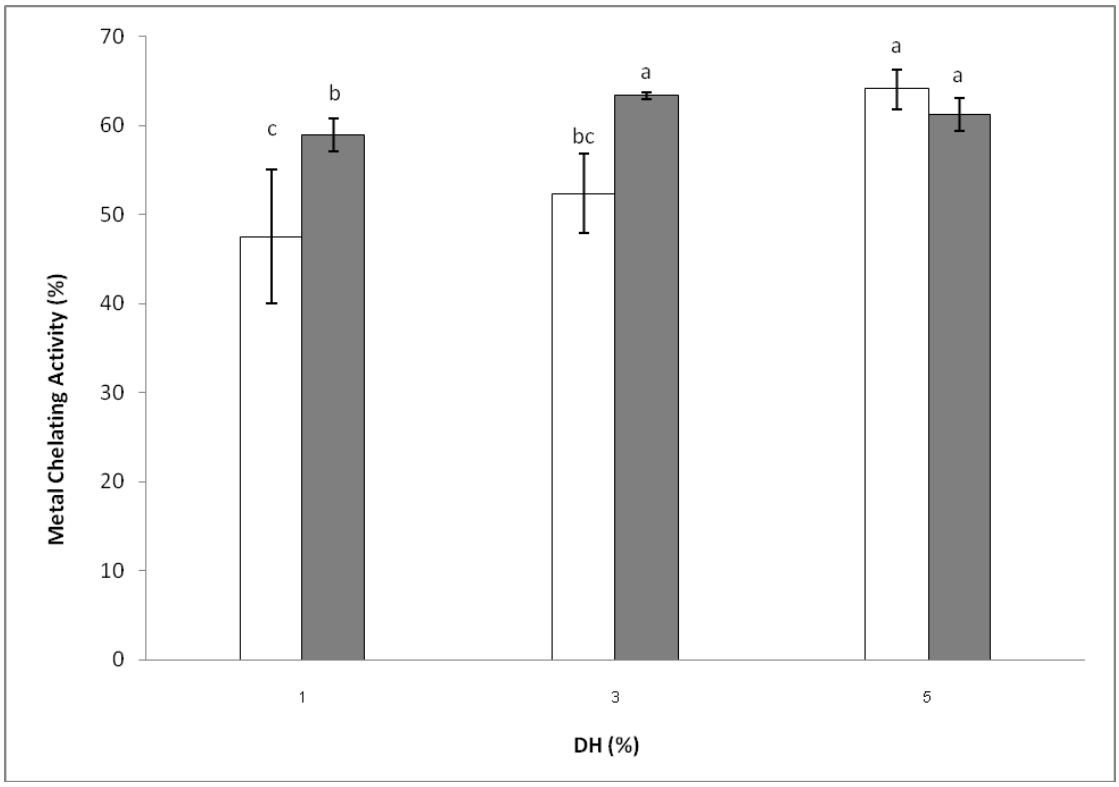


ภาพที่ 4 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-d] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อศึกษาผลของกิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีกิจกรรมการจับโลหะสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการจับโลหะจะเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบผลของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 และ 3 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีการจับโลหะดีกว่าเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ในขณะที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 ซึ่งพันธะเปปไทด์จากการย่อยสลายสามารถจับโลหะซึ่งเป็นโปรออกซิเดนท์ และยังช่วยลดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โลหะทรานซิชั่นในอาหาร เช่น เหล็ก คอปเปอร์ โคบอลต์ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเกิดออกซิเดชันและหยุดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของสารระเหยไอออนของโลหะทรานซิชั่นจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับเปอร์ออกไซด์โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็คตรอนเพื่อสร้างอนุมูลแอลโคซิลด์ (Gordon, 2001) ดังนั้นการจับไอออนของโลหะทรานซิชั่นโดยเปปไทด์เป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระจึงสามารถชะลอปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันได้ (Sherwin,1990) และจากการทดลองของ Klompong และคณะ (2007) พบว่ากิจกรรมการจับโลหะของทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกันโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ($p \leq 0.05$) ซึ่งการสลายของพันธะเปปไทด์นั้นมีผลต่อกิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลือง (Klompong et al., 2007a)

เมื่อศึกษาผลของความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 6 โดยอาศัยหลักการที่ Ferric (Fe^{3+}) รับอิเลคตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วกลายเป็น Ferrous (Fe^{2+}) จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+} จากการทดลอง พบว่า เอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น FRAP มีค่าลดลง ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยฟลาโวไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและระดับการย่อยสลายมีผลต่อความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

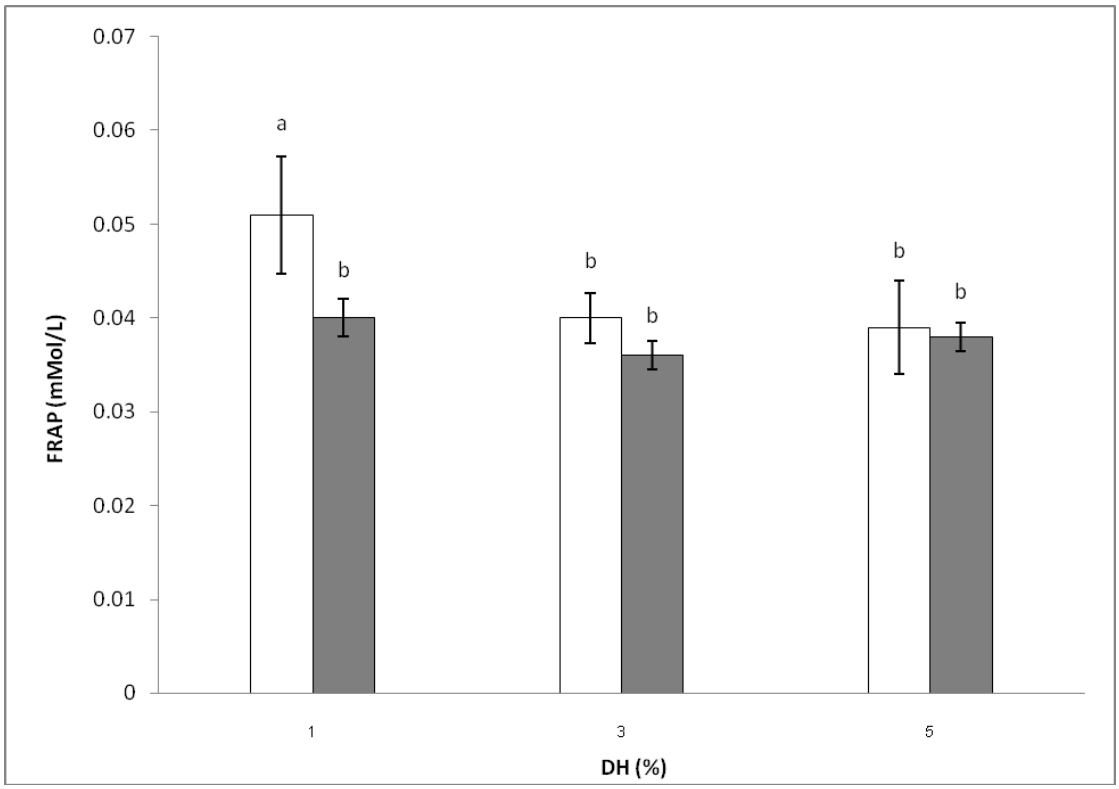


ภาพที่ 5 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-c] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

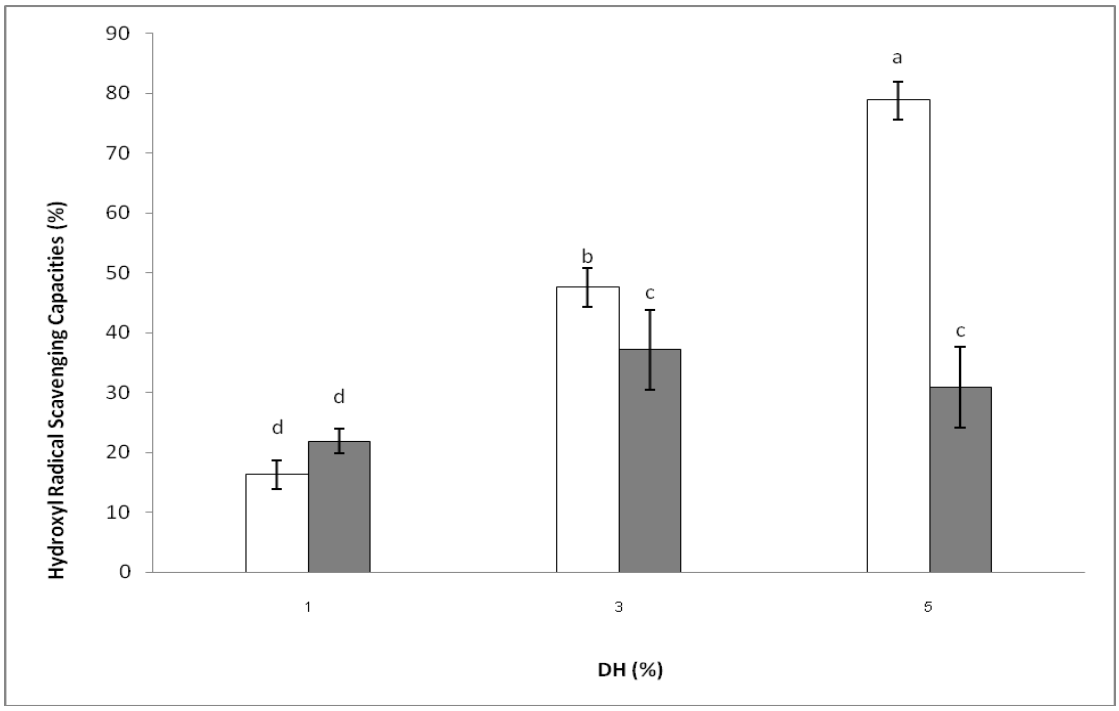
กิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 7 จากการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลจะเพิ่มมากขึ้น ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน ในขณะที่กิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีกิจกรรมสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 ($p>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ พบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟ

ลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลสูงกว่าโปรตาเมกซ์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งอนุมูลออกซิเจนและอนุมูลไฮดรอกซิลจะเป็นตัวการสำคัญและมีความสามารถในการทำลายได้สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการจับอนุมูลอิสระ ไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง Sakanaka และคณะ (2004) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่แดงเตรียมที่ผ่านการกำจัดไขมันอิสระก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ โดยอนุมูลไฮดรอกซิลนั้นเกิดจากปฏิกิริยา Fenton ซึ่งอนุมูลไฮดรอกซิลมีบทบาทสำคัญในการทำลาย DNA ทำให้ DNA คลายเกลียวและเสียสภาพ



ภาพที่ 6 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-b] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



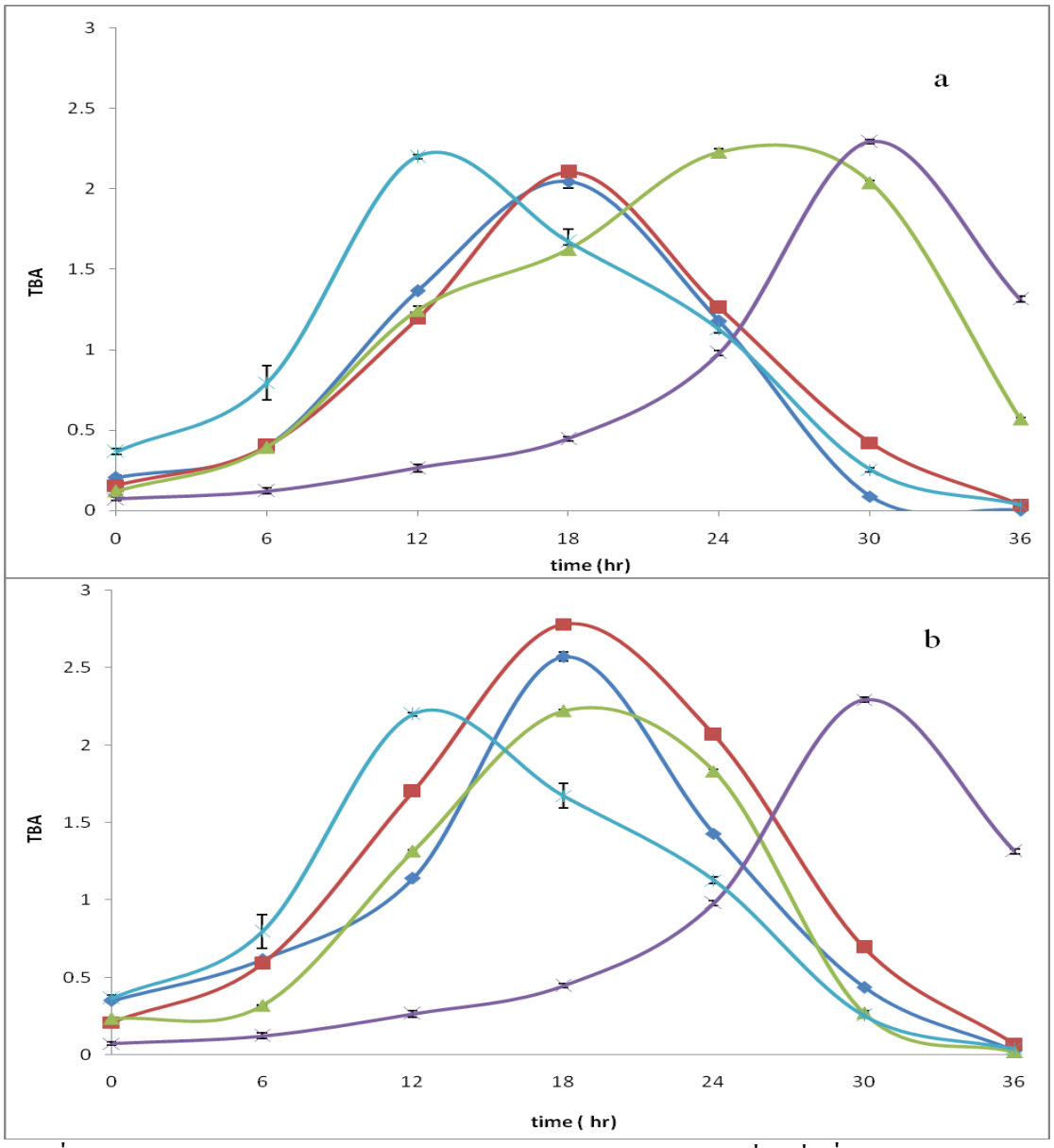
ภาพที่ 7 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-d] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 เข้าไปทดลองในระบบ Lecithin liposome เปรียบเทียบกับ α-Tocopherol (ภาพที่ 8) พบว่าระบบที่มีการเติม α-Tocopherol สามารถชะลอการเกิด TBA ได้มากที่สุด และระบบที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์สามารถชะลอการเกิด TBA ได้สูงกว่ากับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบอีกว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 สามารถชะลอได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเดียวกันที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ1 ($p \leq 0.05$) ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์สามารถชะลอได้นานกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ($p \leq 0.05$) ก่อนการสร้าง TBA จากการทดลองจะเห็นได้ว่าชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและระดับการย่อยสลายมีผลต่อความเร็วการเกิด TBA ในระบบ Lecithin liposome Sakanaka และคณะ (2004) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่แดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ที่เกิดขึ้นในเนื้อวัวบดและเนื้อปลาทูน่าบด

นอกจากนี้ Klompong และคณะ (2007b) ยังพบว่า TBARS ในระบบเลซิทิน-ลิโพโซม นั้นลดลงในชั่วโมงที่ 36 หลังจากปริมาณ TBARS ขึ้นถึงจุดสูงสุด

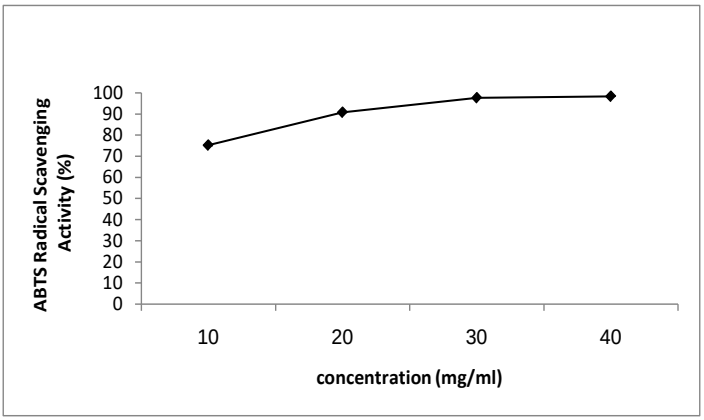
จากขั้นตอนนี้จึงคัดเลือกโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากมีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันสูงและมีความคุ้มทุนในการผลิต



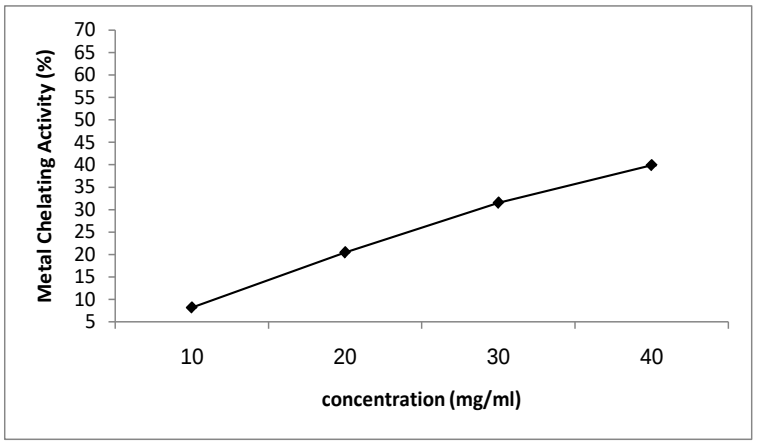
ภาพที่ 8 ระบบ Lecithin liposome ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลาย 1 ( ), 3 ( ), และ 5 ( ), α-Tocopherol ( ), ชุดควบคุม ( )

4.1.3 ผลของความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

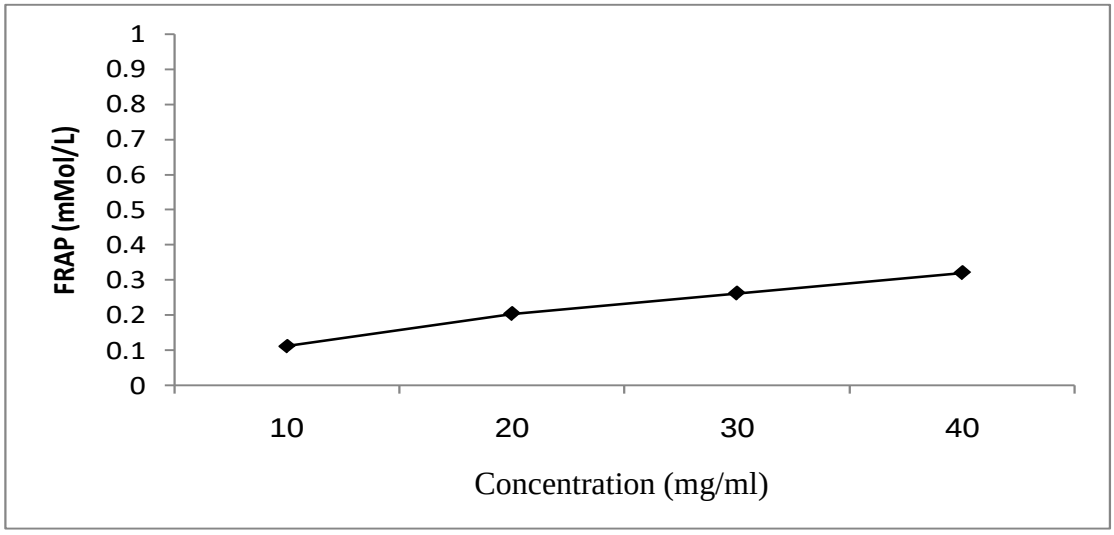
เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งเพิ่มขึ้น กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 9-12) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007b) ซึ่งทำการทดลองในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง



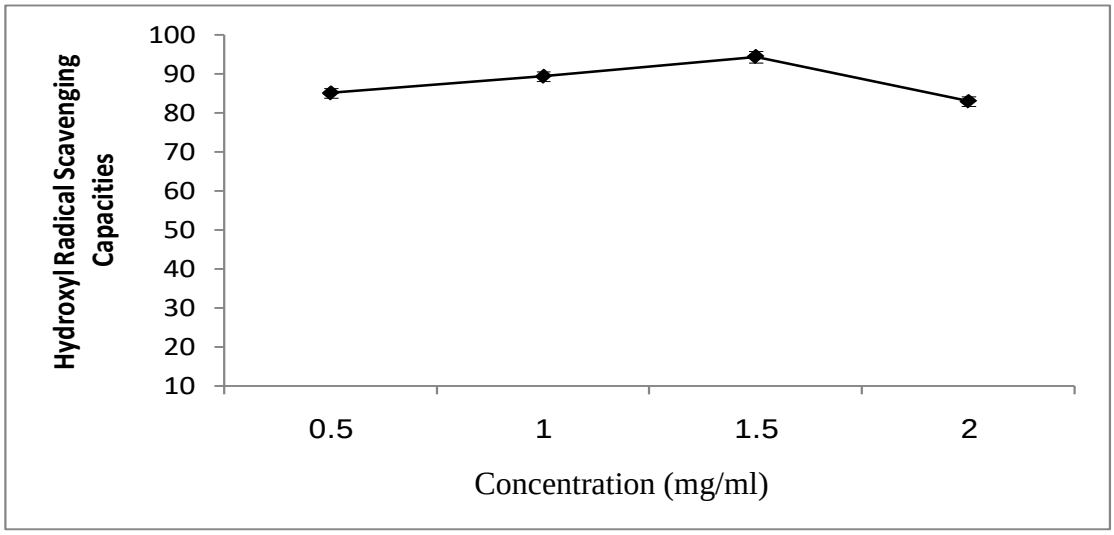
ภาพที่ 9 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 10 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 11 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

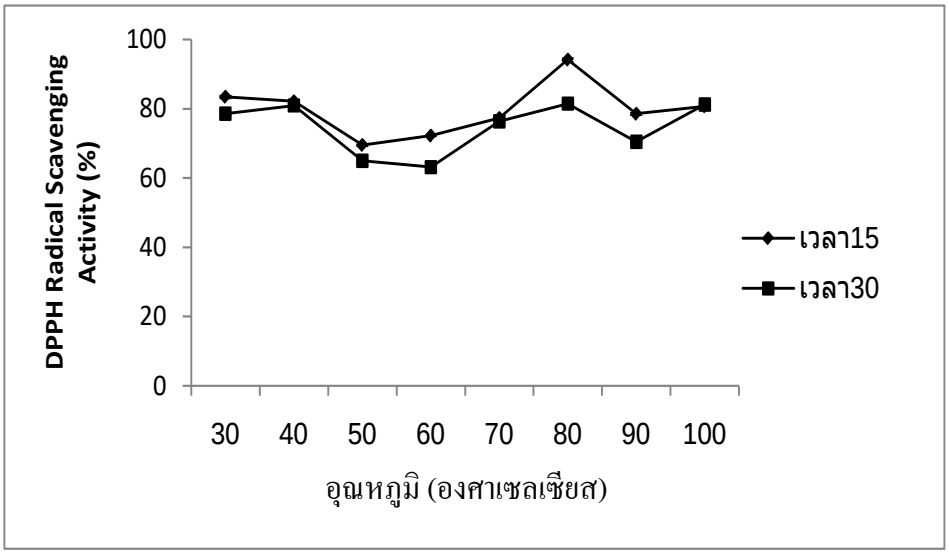


ภาพที่ 12 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

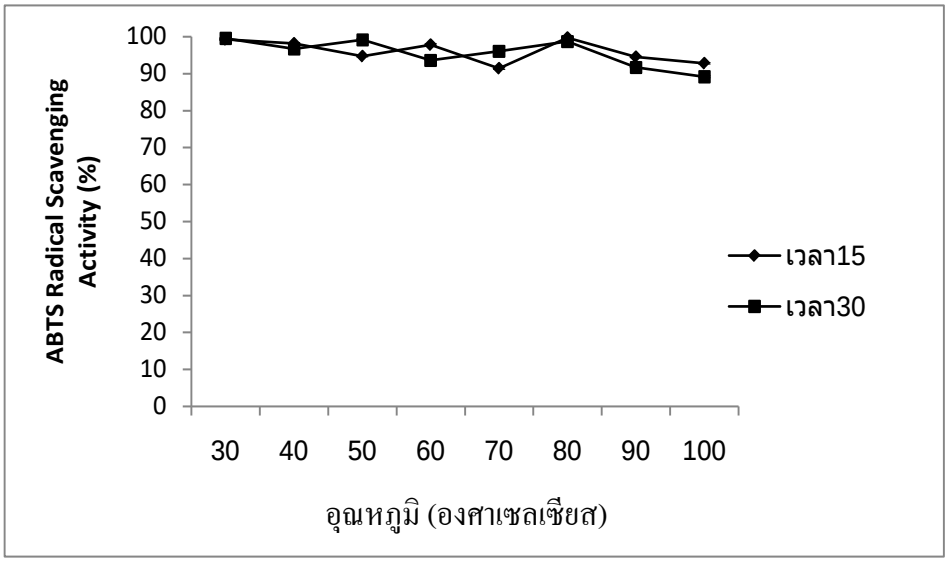
4.1.4 ความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งต่ออุณหภูมิ

จากการศึกษาความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ค่อนข้างคงตัวต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส ทั้งที่ให้

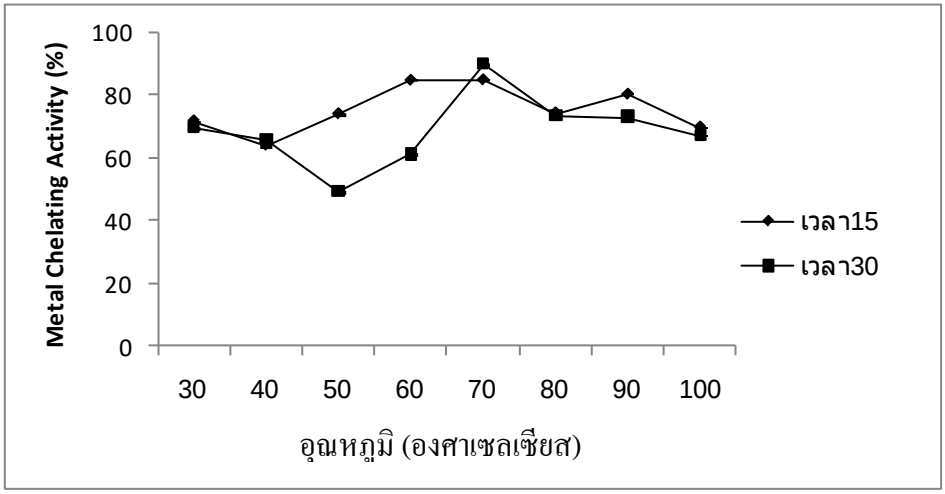
ความร้อนนาน 15 และ 30 นาที (ภาพที่13-15) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007b) ซึ่งทำการทดลองในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง



ภาพที่ 13 DPPH Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่อุณหภูมิต่างๆ



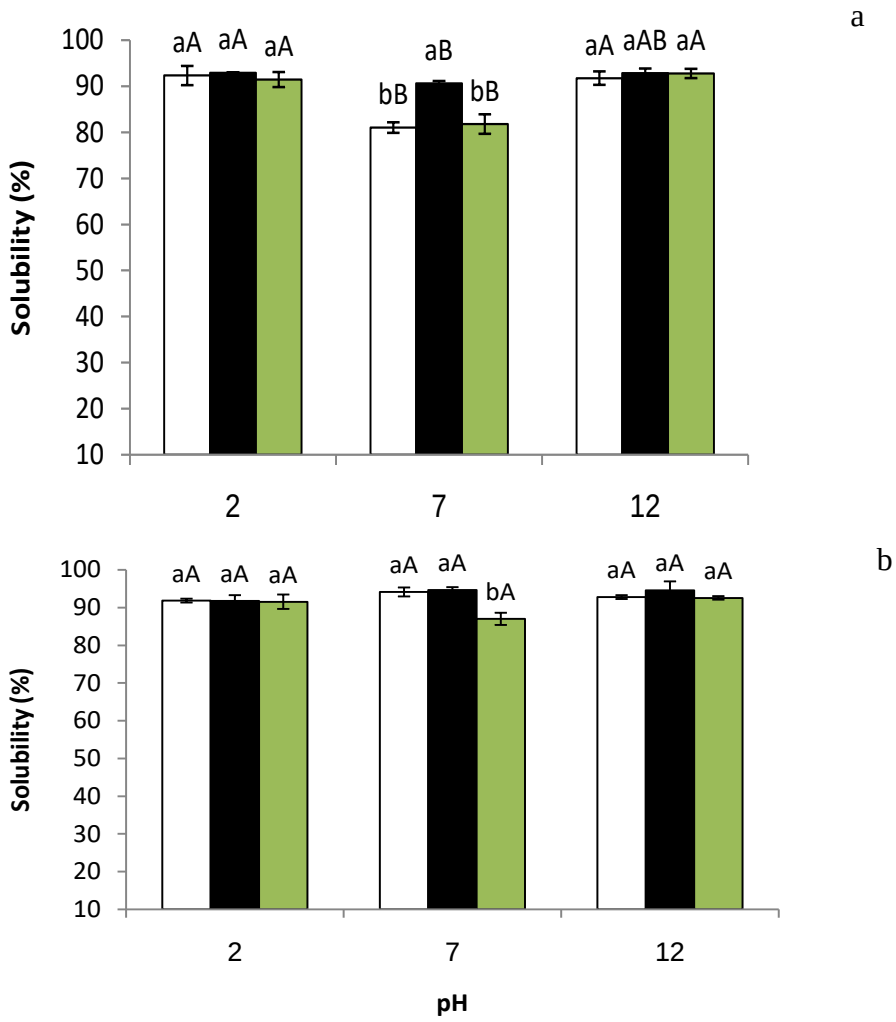
ภาพที่ 14 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 15 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.1.5 ผลของพีเอชที่ทีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโลไลเลตจากถั่วหรั่ง

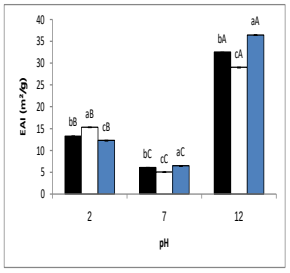
จากการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์โดยวิธี pH-stat ที่ระดับการย่อยสลายที่แตกต่างกัน ในด้านการละลาย (Solubility) การเกิดอิมัลชัลได้แก่ Emulsion activity index (EAI) และ Emulsion stability index (ESI) ความสามารถในการเกิดฟอง ได้แก่ Foaming capacity และ Foam stability การอุ้มน้ำ (Water holding capacity) และการจับกับไขมัน (Fat adsorption) (ภาพที่ 16-20) พบว่า การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ มีค่าสูงกว่าช่วงร้อยละ 80 โดย EAI ESI Foaming capacity และ Foam stability การอุ้มน้ำ และการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์มีค่าแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ที่ระดับการย่อยสลายต่างกัน เมื่อศึกษาผลพีเอชต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ พบว่า ที่ระดับพีเอชสูง (pH 12) การละลาย มีค่าสูงกว่าที่ระดับพีเอช 2 และ 7 ($P \leq 0.05$)



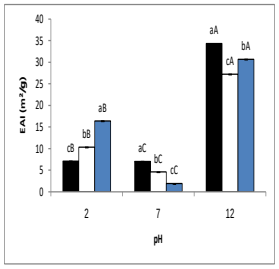
ภาพที่ 16 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▢) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

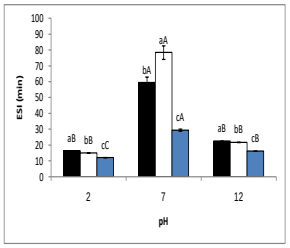
[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน



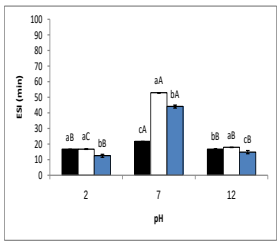
a



c



b

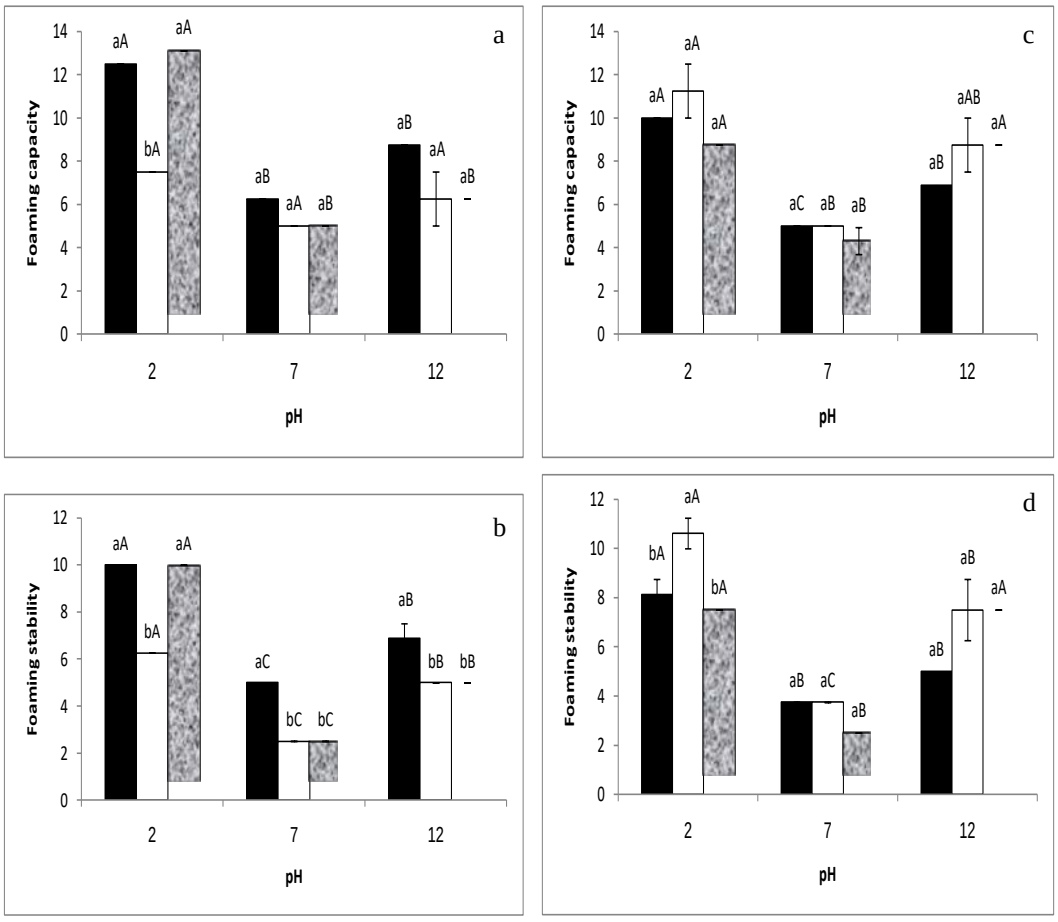


d

ภาพที่ 17 Emulsion activity index (EAI) และ Emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a, b) และฟลาโวไซม์ (c, d) ที่ระดับการย่อย สลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▬) ที่ pH 2 7 และ 12

^{a,b,c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

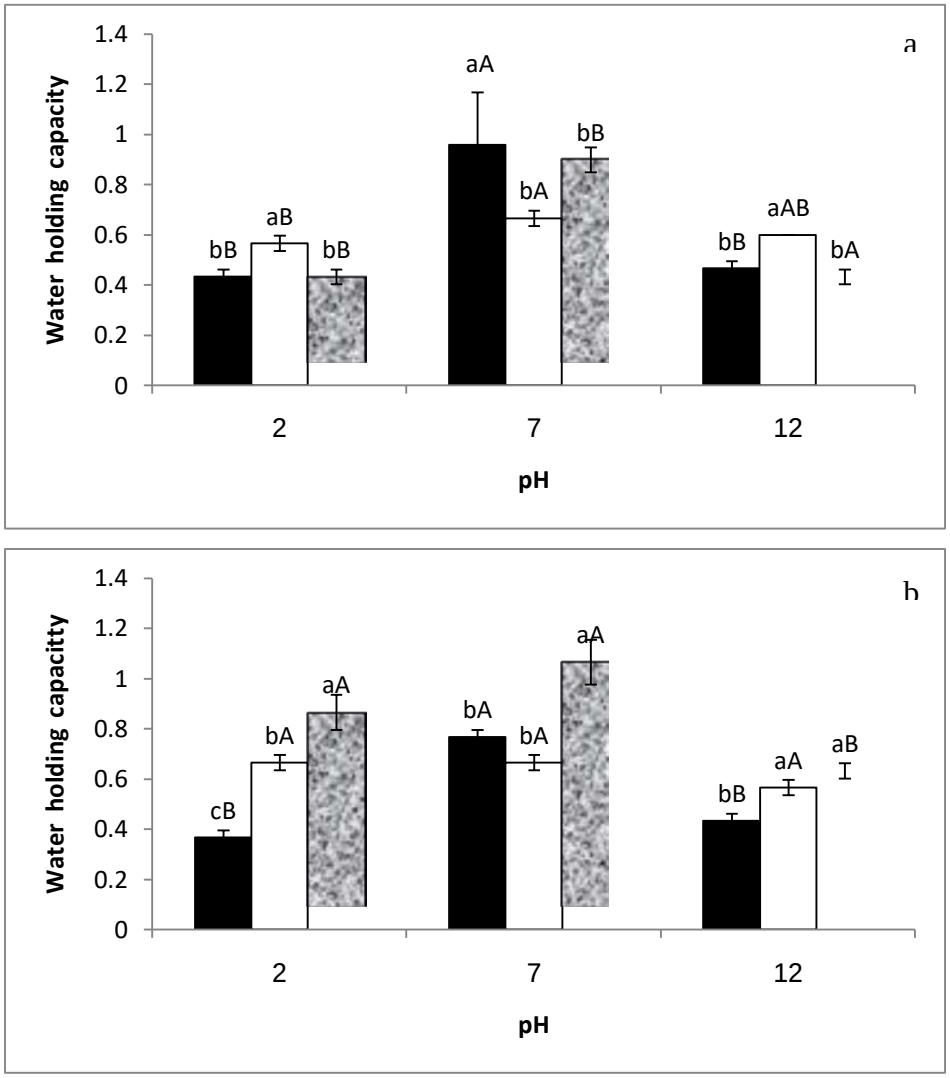
^{A,B} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน



ภาพที่ 18 Foaming capacity และ Foam stability ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลาย ด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a, b) และฟลาโวไซม์ (c. d) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

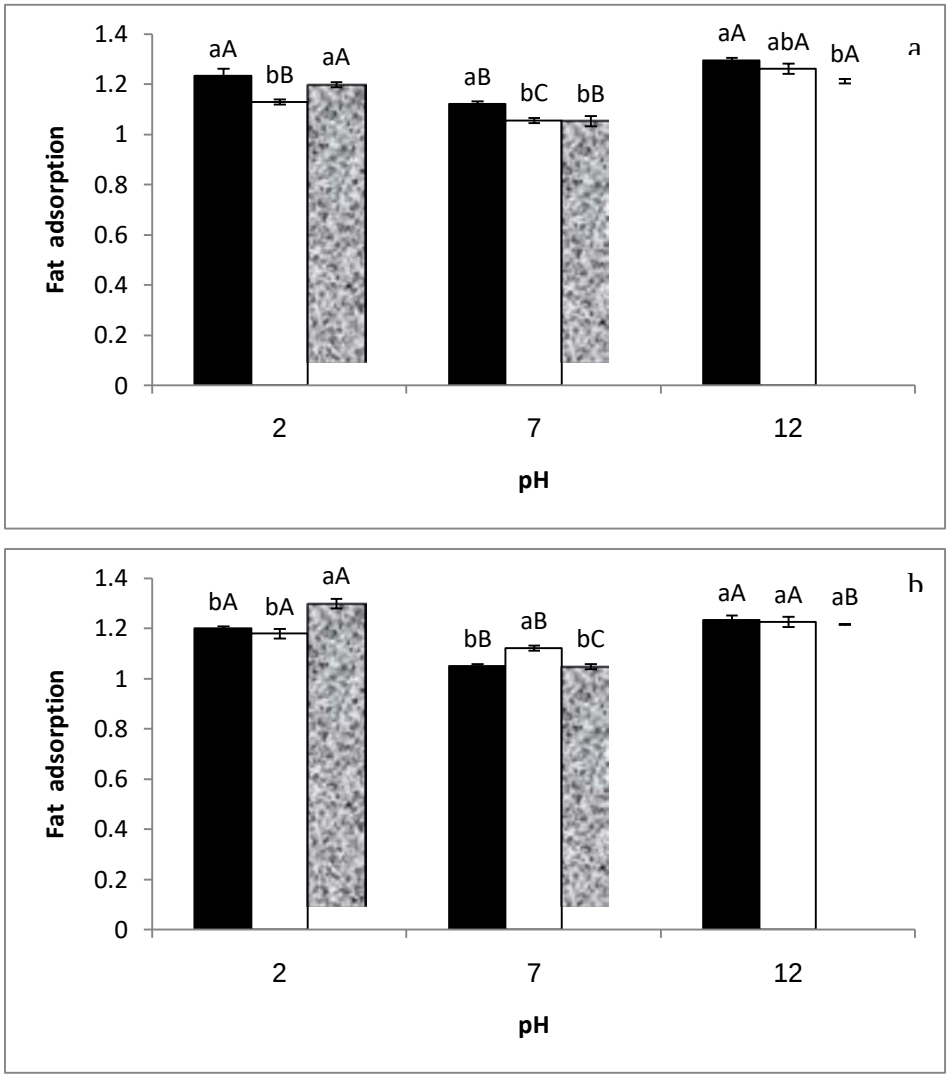
[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน



ภาพที่ 19 การอุ้มน้ำ (กรัมน้ำ/กรัมตัวอย่าง) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตา เมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน



ภาพที่ 20 การจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง (กรัมไขมัน/กรัมตัวอย่าง) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

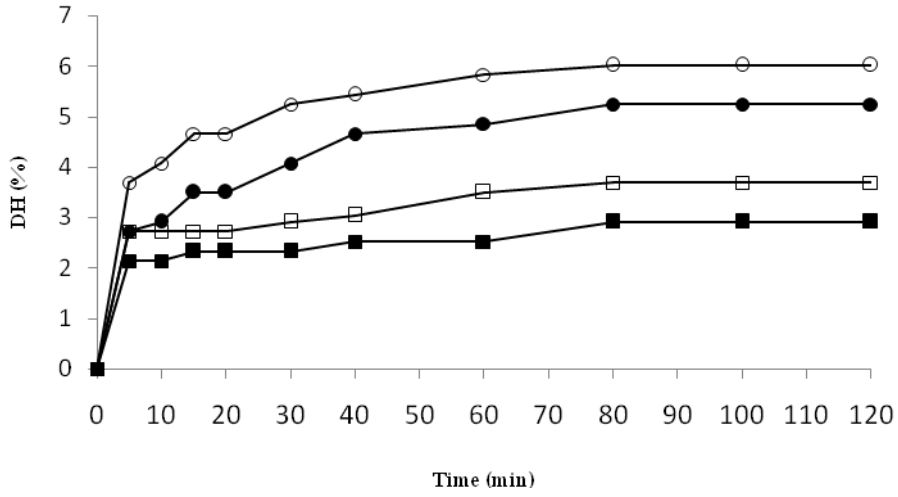
[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

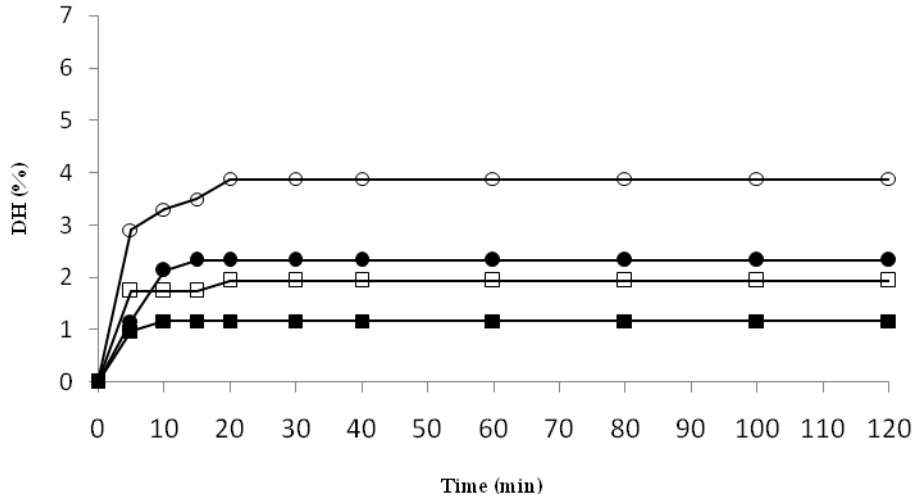
4.2 ถั่วเหลือง

4.2.1 ผลของชนิด ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาต่ออัตราการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลือง

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) โปรตีนจากถั่วเหลือง พบว่าการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน ได้แก่ เอนไซม์ฟลาโวไซม์และโปรตาเมกซ์นั้นส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีอัตราการย่อยสลาย แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 21 และ 22 ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีระดับการย่อยสลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์โปรตาเมกซ์เป็น endo-peptidase ซึ่งสามารถตัดพันธะเปปไทด์แบบสุ่ม ทำให้ระดับการย่อยสลายสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งเป็น exo-peptidase ซึ่งตัดพันธะเปปไทด์จากปลายสายเปปไทด์ และเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเอนไซม์โปร ตาเมกซ์ (novozymes. 2007) และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์เพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$)



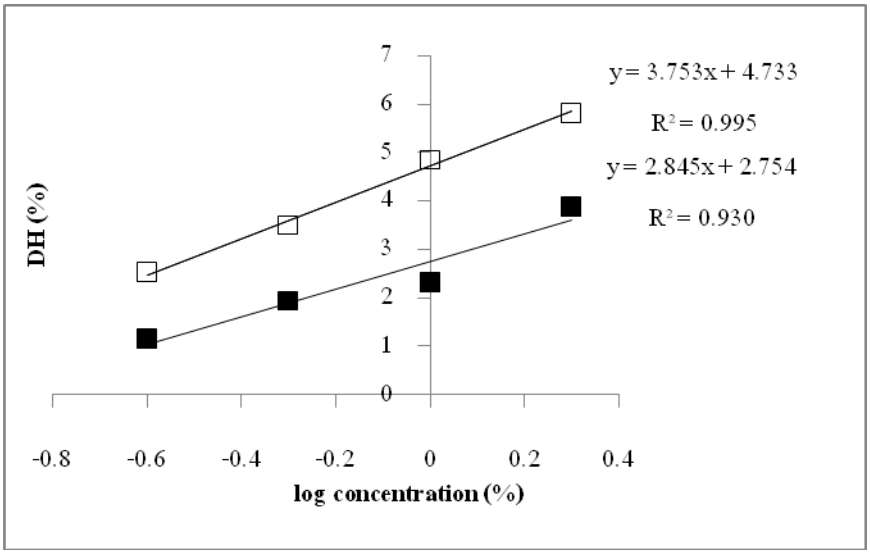
ภาพที่ 21 อัตราการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ร้อยละ 0.25 ( ) 0.5 ( ) 1 ( ) และ 2 ( ) เป็นเวลา 120 นาที



ภาพที่ 22 อัตราการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 0.25 (—■—) 0.5 (—□—) 1 (—●—) และ 2 (—○—) เป็นเวลา 120 นาที

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้นทั้งในระบบที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยอัตราการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

เมื่อพล็อตกราฟ $\log_{10}$ (ความเข้มข้นของเอนไซม์) กับระดับการย่อยสลายของเอนไซม์แต่ละชนิด แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงดังภาพที่ 23 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองให้มีระดับกาย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



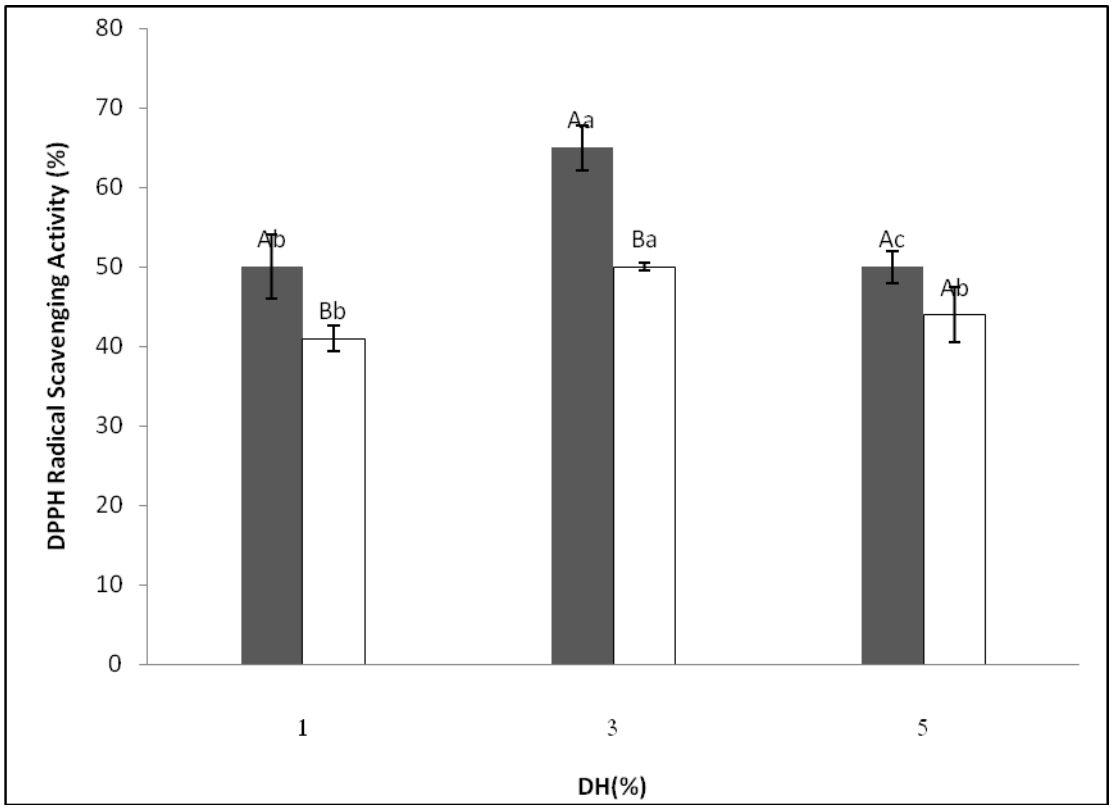
ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลายและ log ความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และ ฟลาโวไซม์ (■) ที่ pH 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.2.2 ผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง

4.2.2.1 DPPH Radical Scavenging Activity

กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์แสดงในภาพที่ 24 ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) และยังพบว่า เอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกันมีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้ดีกว่าเอนไซม์ฟลาโวไซม์ แต่ไม่พบความแตกต่างที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ($p>0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด DPPH มีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย Jun และคณะ (2004) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา yellow fin ที่ผ่านการย่อยสลายด้วย

เอนไซม์เปปซินที่ DH ร้อยละ 22 มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา yellow fin ที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น Alcalase, chymotrypsin, ปาเปน, เปปซิน, Pronase E, Neutrase และ เอนไซม์ ทริปซิน



ภาพที่ 24 DPPH Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)

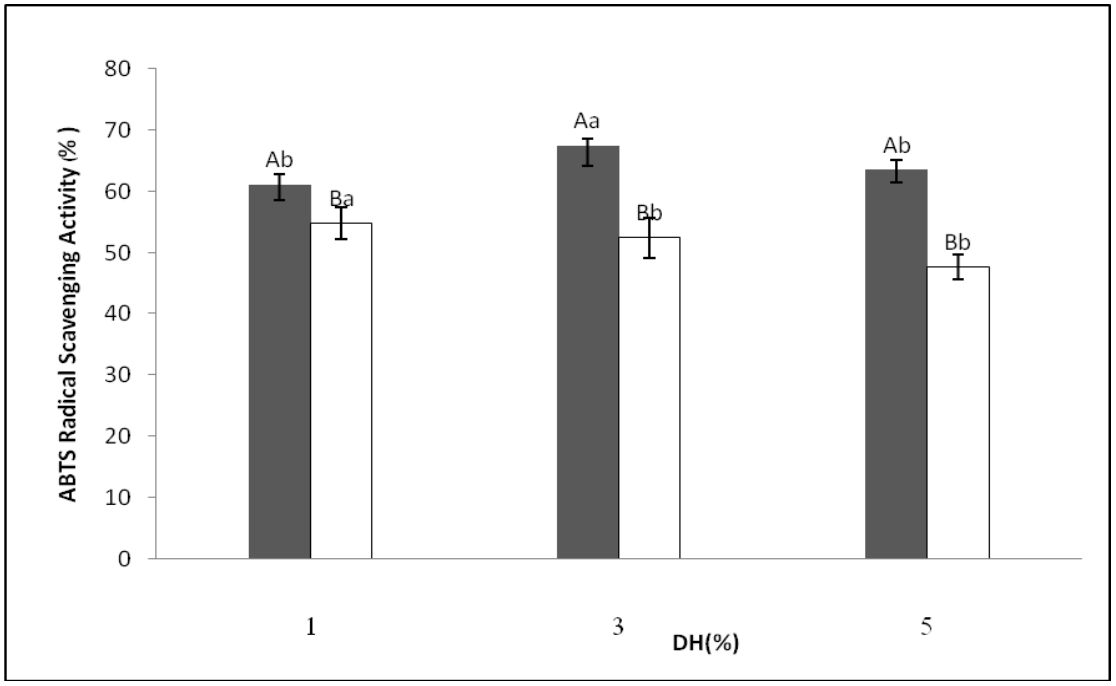
$^{A-B}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์

$^{a-c}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.2.2.2 ABTS Radical Scavenging Activity

กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์แสดงในภาพที่ 25 จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS มากที่สุด และเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS มีแนวโน้มลดลง ($p \leq 0.05$) ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเส

ตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงสุด และมีค่าลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบแต่ละระดับการย่อยสลายระหว่างชนิดของเอนไซม์ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระชนิด ABTS ที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ($p \leq 0.05$) Klompong และคณะ (2009)ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS เปรียบเทียบกับ Trolox ในโปรตีนไฮโดรเลตจากปลาสีกุนข้างเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 ตามด้วยการแยกส่วนด้วยวิธี Gelfiltration ion-exchange chromatography และ HPLC ตามลำดับ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลือง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลออิสระชนิด ABTS อย่างไรก็ตามกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า Trolox



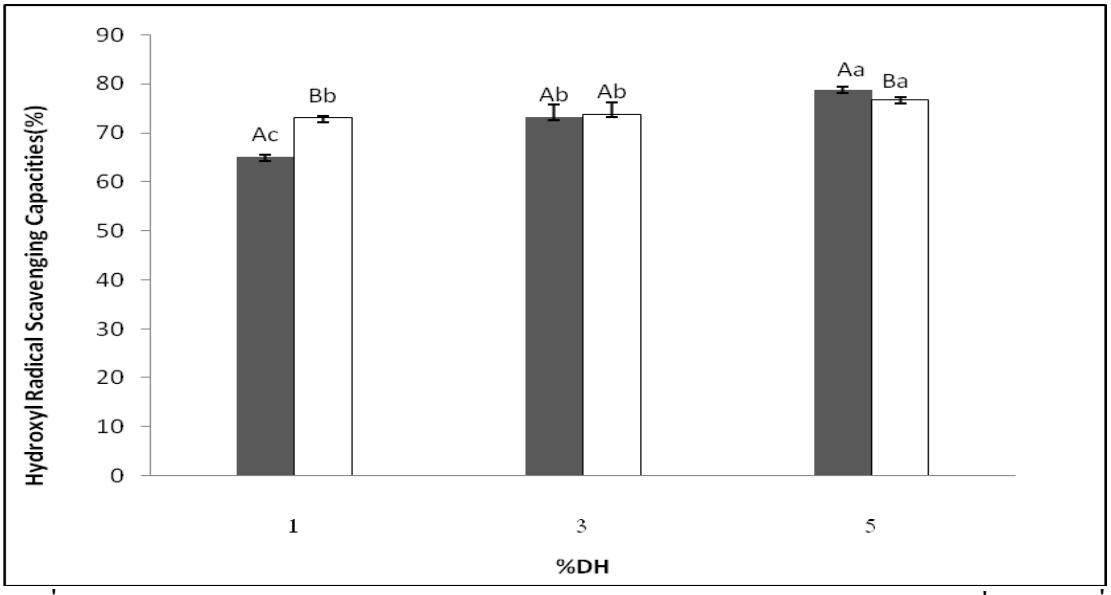
ภาพที่ 25 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)

$^{A-B}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์

$^{a-c}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.2.2.3 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities

อนุมูลไฮดรอกซิลนั้นเกิดจากปฏิกิริยา Fenton ซึ่งอนุมูลไฮดรอกซิลมีบทบาทสำคัญในการทำลาย DNA ทำให้ DNA คลายเกลียวและเสียสภาพ (ปิยศิริ สุทรนนท์) กิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์แสดงในภาพที่ 26 จากการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลจะเพิ่มมากขึ้น ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ พบว่า ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ อย่างไรก็ตามที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีกิจกรรมการจับอนุมูลไฮดรอกซิลสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ($p \leq 0.05$)



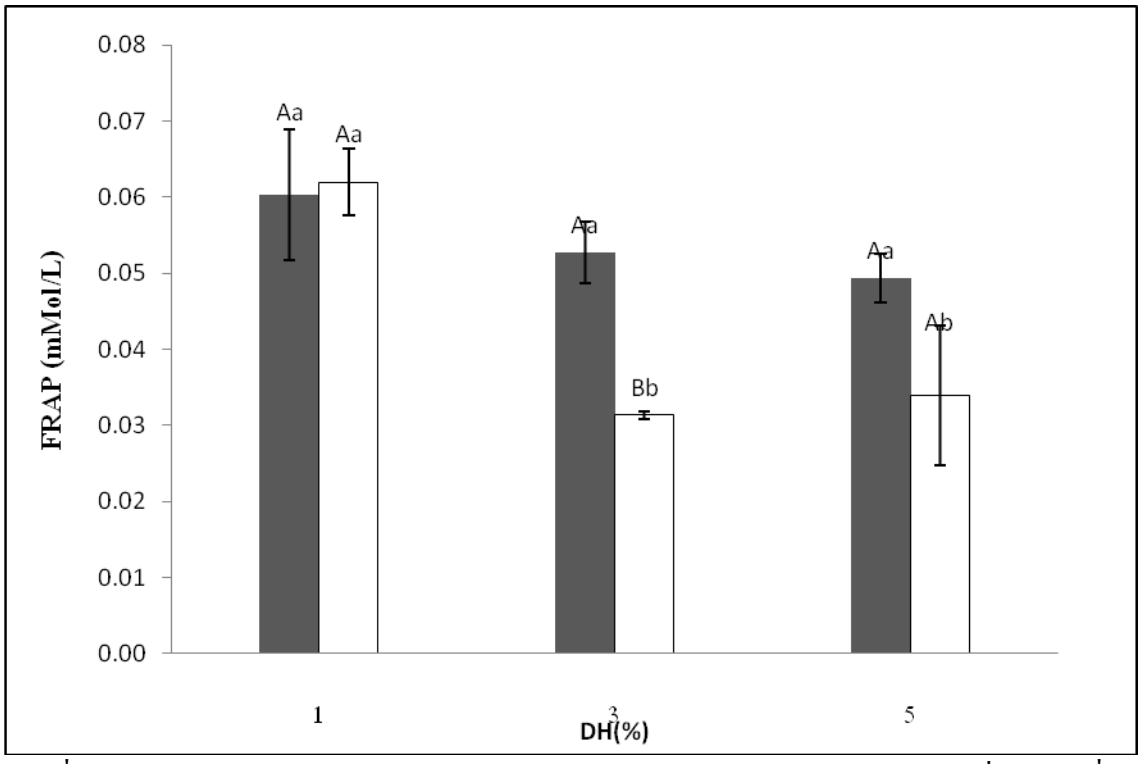
ภาพที่ 26 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)

$^{A-B}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์

$^{a-c}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.2.2.4 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์แสดงในภาพที่ 27 โดยอาศัยหลักการที่ Ferric (Fe^{3+}) รับอิเลคตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วกลายเป็น Ferrous (Fe^{2+}) (มหาวิทยาลัยศิลปากร ,2554) จากการทดลอง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) และเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น FRAP มีค่าลดลง ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สูงกว่าที่อัตราการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกได้สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 ($p \leq 0.05$)



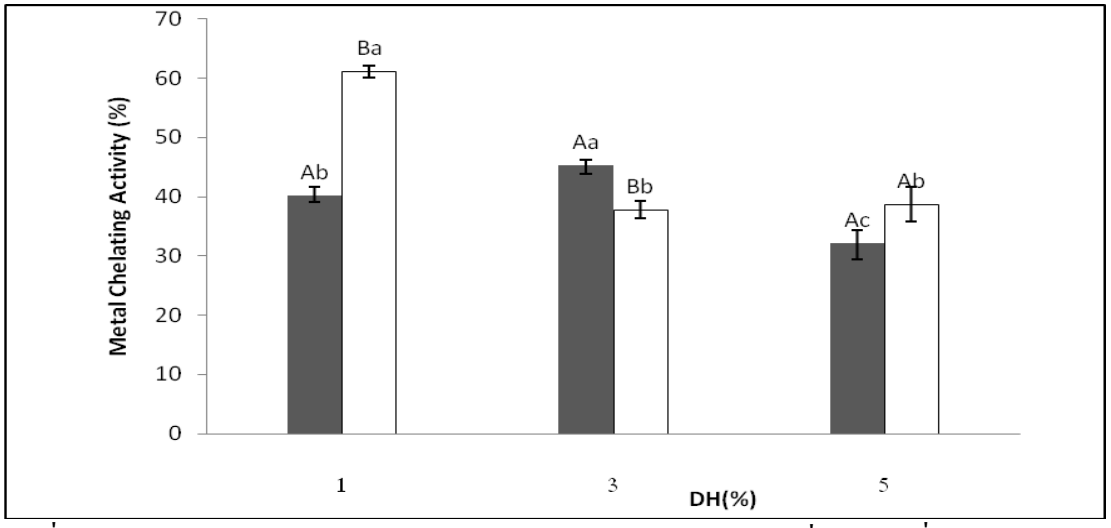
ภาพที่ 27 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)

$^{A-B}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์

$^{a-c}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.2.2.5 Metal Chelating Activity

กิจกรรมการจับโลหะมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจาก โลหะเป็นตัวเร่งที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากการศึกษากิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีกิจกรรมการจับโลหะสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 28) ส่วนกิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เมื่อมีการเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์ พบว่าโปรตีนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับโลหะสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ($p \leq 0.05$) ยกเว้นที่ระดับการย่อยร้อยละ 3 Klompong และคณะ (2007) พบว่ากิจกรรมการจับโลหะของทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกันโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ($p \leq 0.05$) ซึ่งการสลายของพันธะเปปไทด์นั้นมีผลต่อกิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลือง (Klompong et al, 2007)



ภาพที่ 28 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)

$^{A-B}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดเอนไซม์

$^{a-c}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.2.2.6 กิจกรรมการต้านออกซิเดชันในระบบ Lecithin liposome

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองในระบบ Lecithin liposome เปรียบเทียบกับ α-Tocopherol และชุดควบคุมที่ไม่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยการวัดปริมาณ conjugated dienes (ภาพที่ 29) และThiobarbituric acid (TBA) (ภาพที่ 30) พบว่าระบบที่มีการเติม α-Tocopherol สามารถชะลอการเกิดออกซิเดชันได้มากที่สุด และระบบที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ไม่สามารถชะลอการเกิด conjugated dienes และ TBA ได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองอาจเป็น prooxidant ในระบบที่มี Lecithin liposome ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shahidi และ Amarowicz (1996) ที่ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากแมวน้ำใน β-carotene-linoleate model system พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากแมวน้ำ เป็น prooxidant ซึ่งกรดอะมิโนชนิด cysteine ไม่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอะมิโนชนิด histidine สามารถต้านการเกิดออกซิเดชันได้แต่ถ้าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นก็จะเปลี่ยนเป็น prooxidant

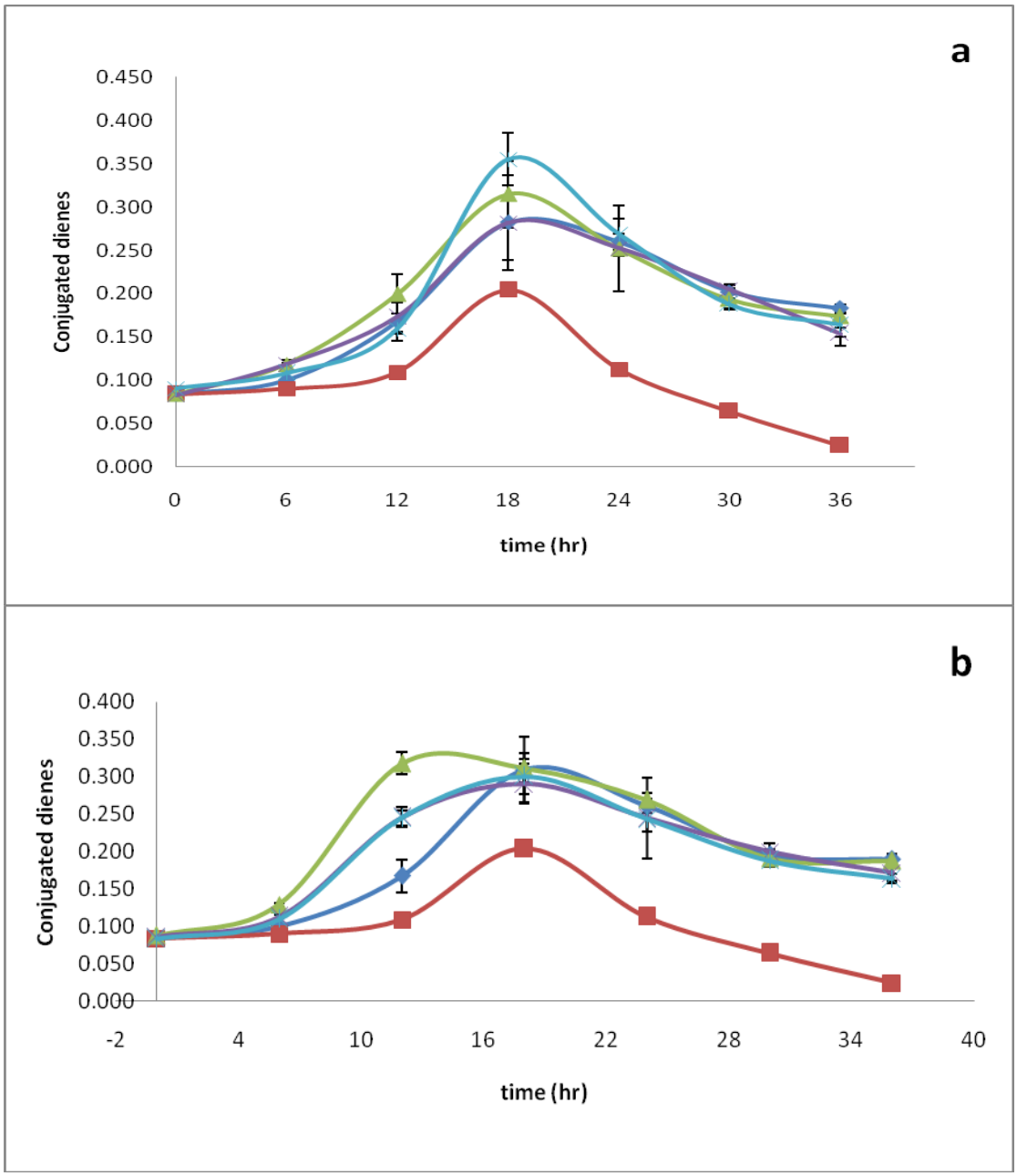
4.2.3 ผลของความเข้มข้นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเลตจากถั่วเหลือง

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 31-34) ซึ่งสอดคล้องกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง และการทดลองของ Klompong และคณะ (2007b) ซึ่งทำการทดลองในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง ยกเว้น Hydroxyl radical scavenging activity ที่มีกิจกรรมลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$)

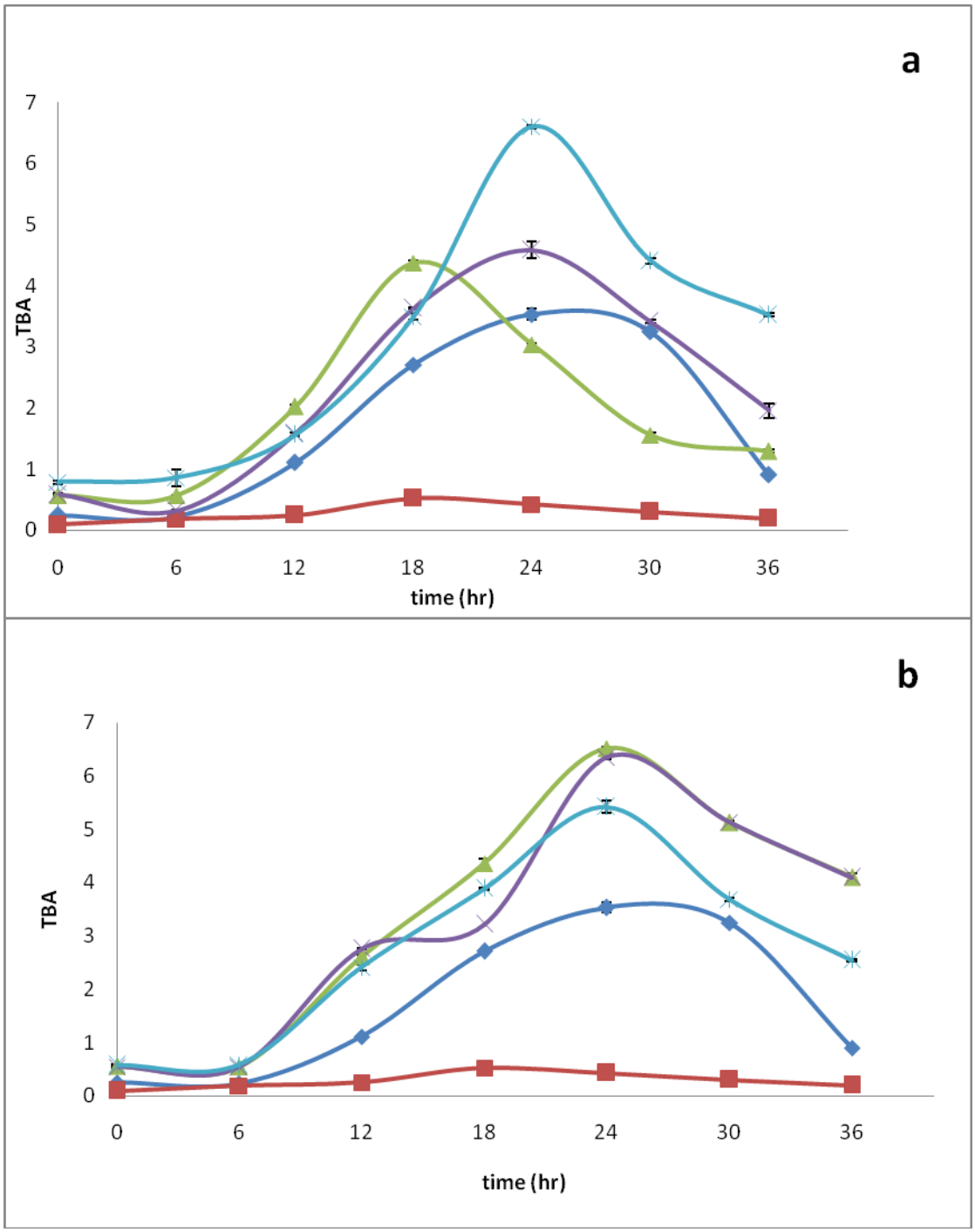
4.2.4 ความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองต่ออุณหภูมิ

จากการศึกษาความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองค่อนข้างคงตัวต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส ทั้งที่ให้ความร้อนนาน 15 และ 30 นาที (ภาพที่ 35-37) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในถั่งหรั่ง และผลการทดลองของ Klompong และคณะ

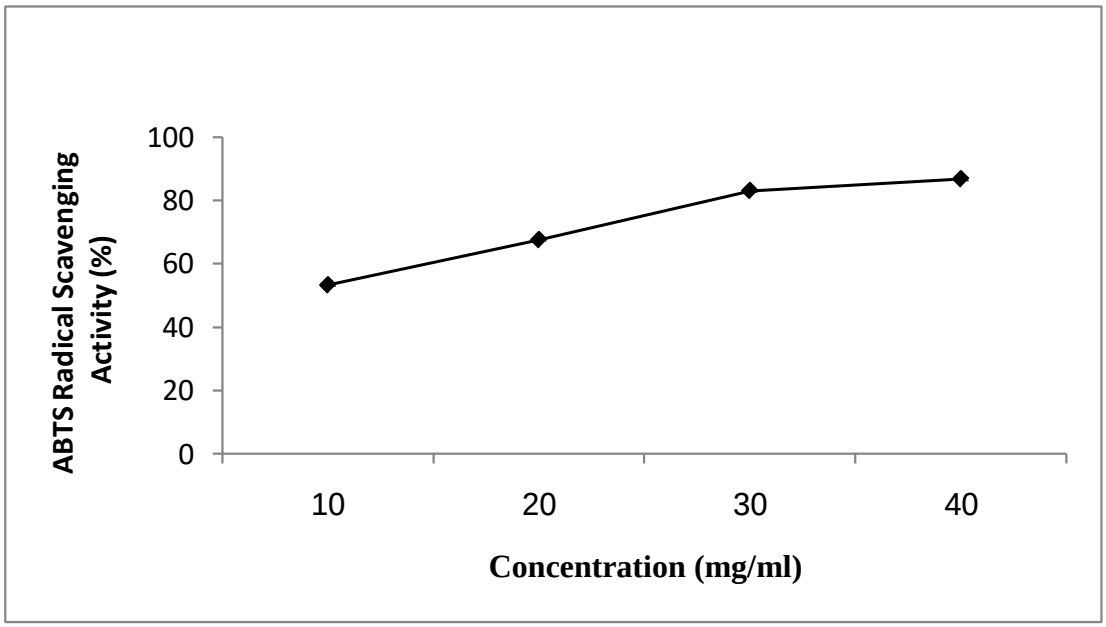
(2007b) ซึ่งทำการทดลองในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง ยกเว้น DPPH radical scavenging activity ที่มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ($p \leq 0.05$)



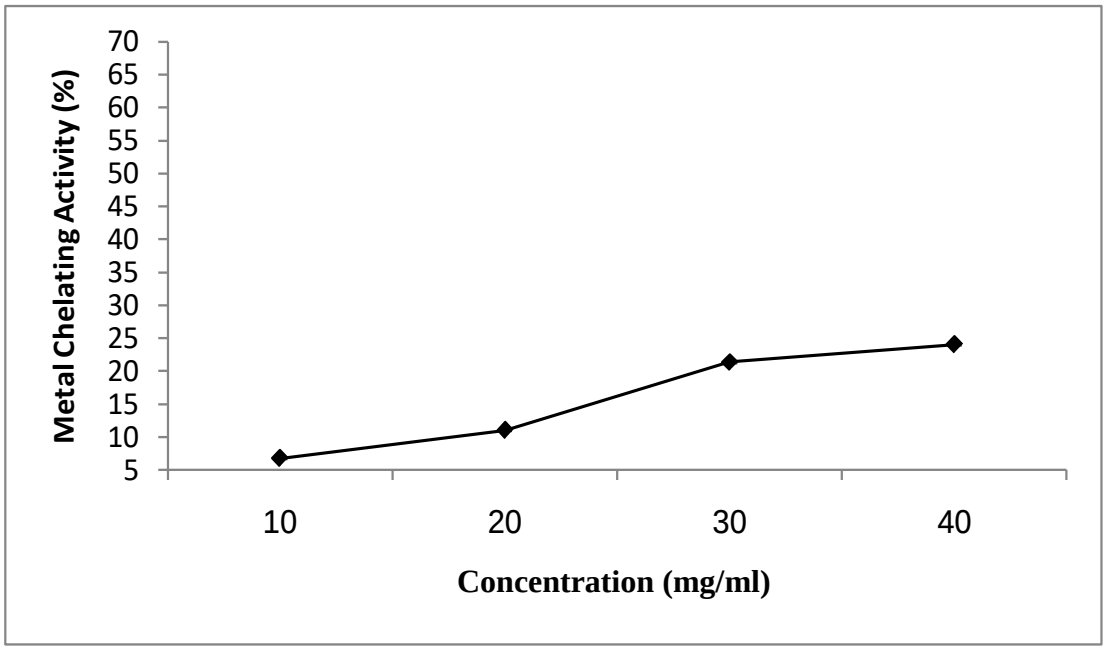
ภาพที่ 29 Conjugated dienes ในระบบ Lecithin liposome ที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) 200 ppm ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 ( )ระดับการย่อยสลายร้อยละ3 ( ),ระดับการย่อยสลายร้อยละ5 ( ) เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม ( ) และระบบที่มี α-Tocopherol ( ) 200 ppm



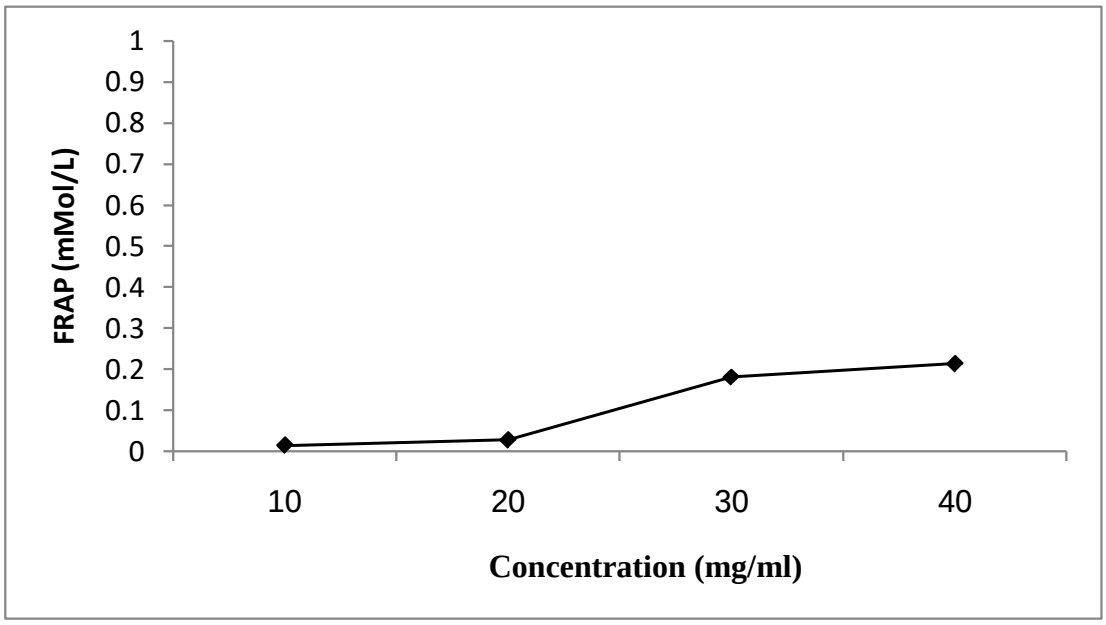
ภาพที่ 30 TBA ในระบบ Lecithin liposome ที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) 200 ppmที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 ( )ระดับการย่อยสลายร้อยละ3 ( ),ระดับการย่อยสลายร้อยละ5 ( ) เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม ( ) และระบบที่มี α-Tocopherol ( ) 200 ppm



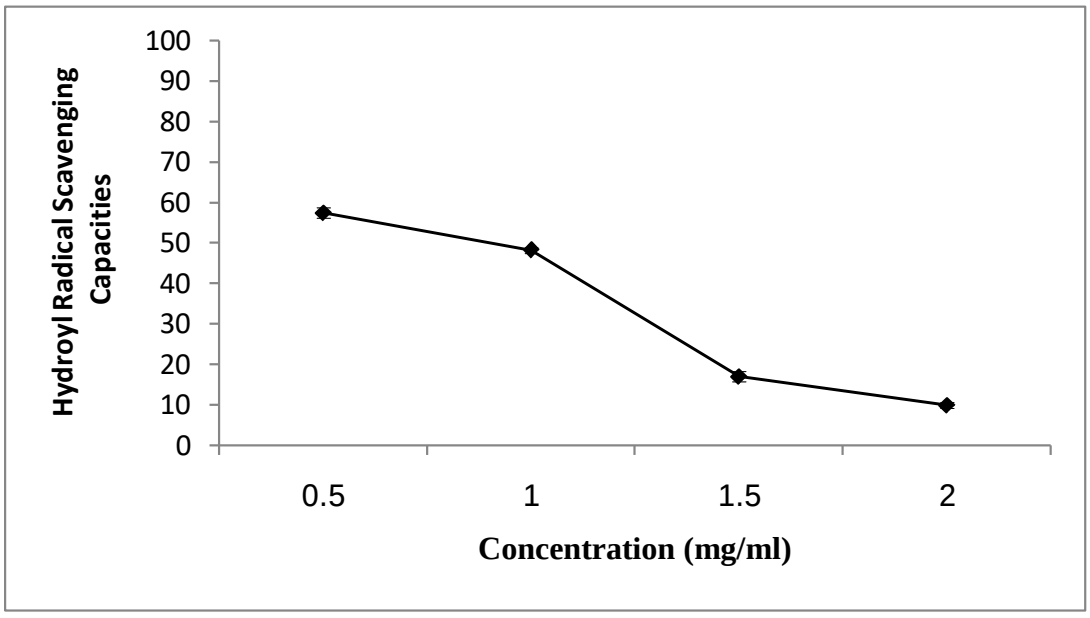
ภาพที่ 31 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



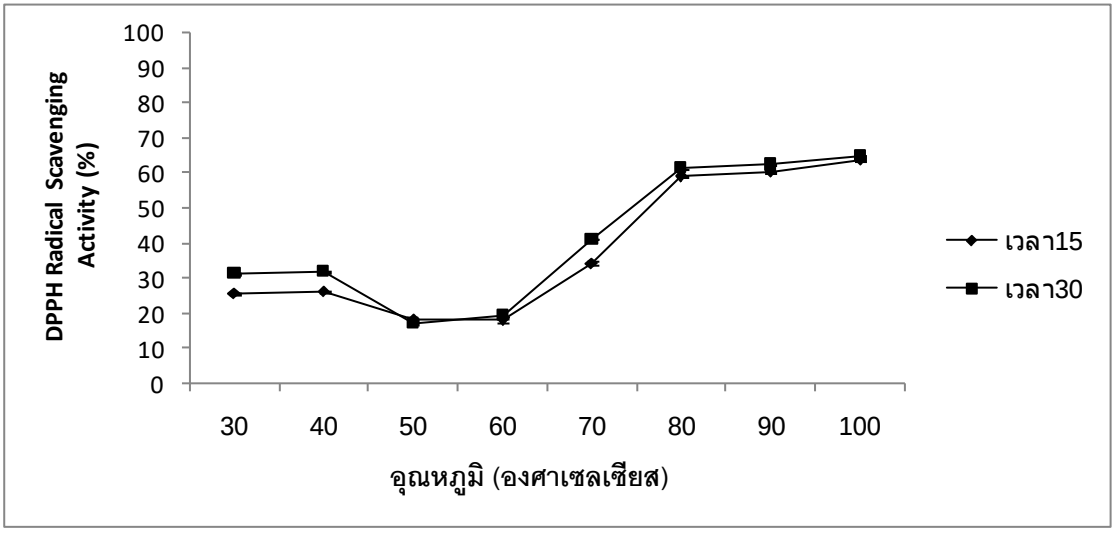
ภาพที่ 32 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



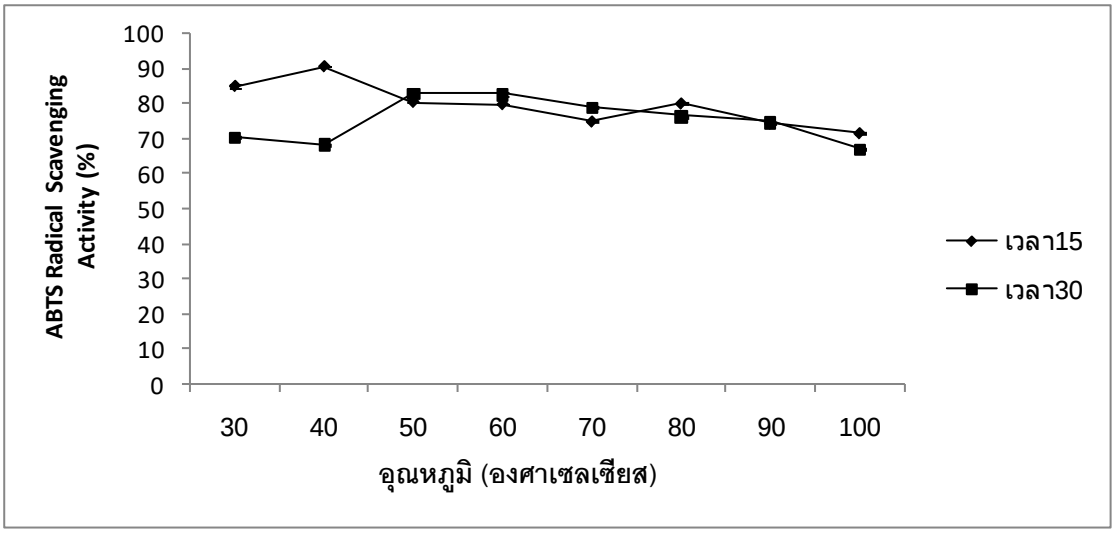
ภาพที่ 33 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



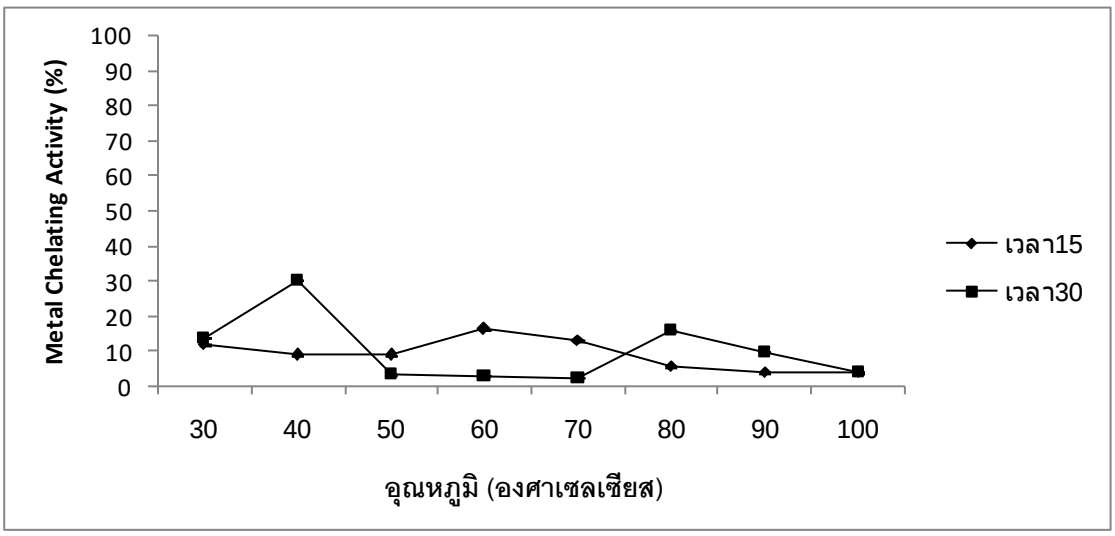
ภาพที่ 34 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 35 DPPH Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิต่างๆ



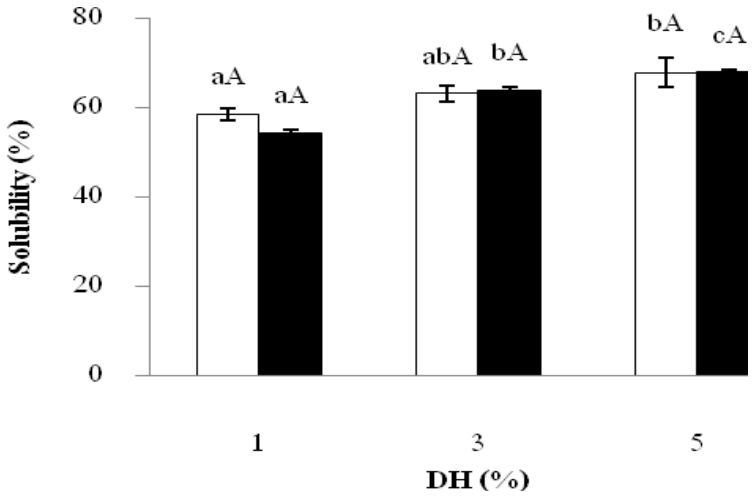
ภาพที่ 36 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 37 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิต่างๆ

4.2.5 ผลของอัตราการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง

การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 38 ถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ร้อยละ 5 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 5 จะมีค่าการละลายสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) รองลงมาคือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 ในขณะที่โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 นั้นมีค่าการละลายต่ำสุด ($P \leq 0.05$) การที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ระดับการย่อยสลายสูงมีความสามารถในการละลายสูงสุดอาจเนื่องมาจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายสูงโปรตีนถูกย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีขนาดเล็กและสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี และการย่อยพันธะเปปไทด์ยังช่วยให้มีปริมาณหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้น (Adler-Nissen, 1979) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลืองที่ระดับการย่อยสลายสูงมีความสามารถในการละลายสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำ และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตเนื่องจากเอนไซม์ต่างชนิดกันมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทจึงทำให้เปปไทด์ที่ได้มีคุณสมบัติต่างกัน



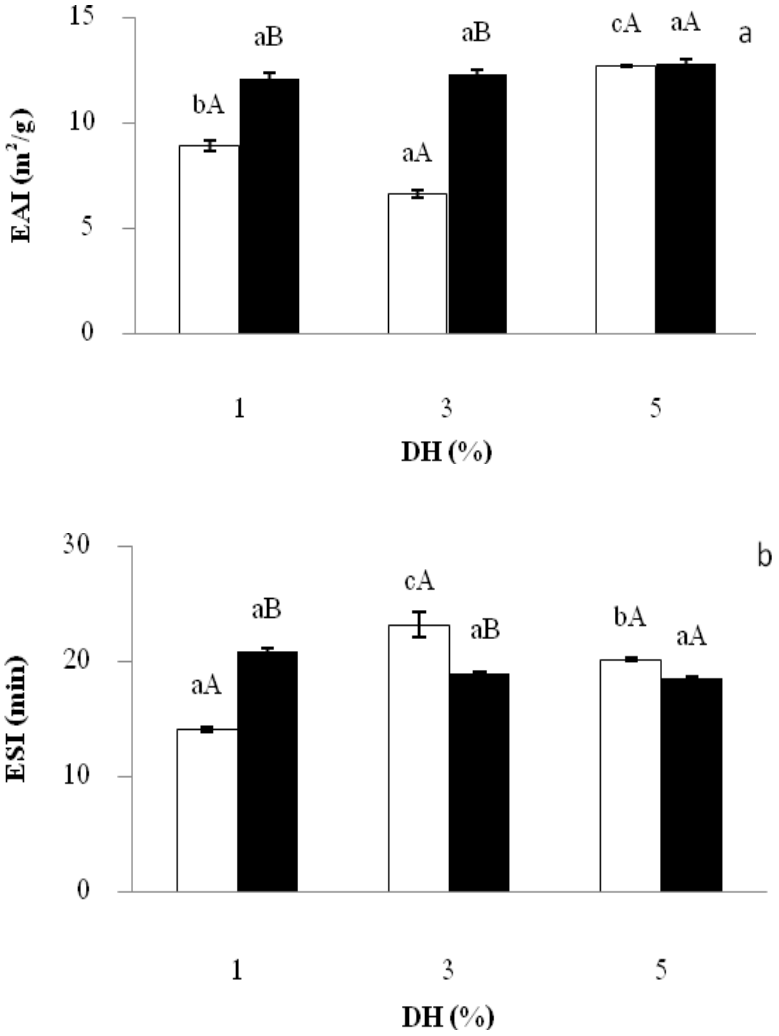
ภาพที่ 38 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเม็กซ์ (□ และฟลาโวไซม์ (■) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

^{a,b,c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

^{A,B} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

จากการศึกษาการเกิดอิมัลชัน พบว่า Emulsion activity index (EAI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่าสูงที่สุด (ภาพที่ 39) คือ 12.82 รองลงมาโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 1 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่า EAI สูงที่สุดคือ 12.71 ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ Emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีค่าสูงที่สุดคือ 20.21 ($P \leq 0.05$) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่า ESI สูงที่สุดคือ 20.8 รองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า EAI และ ESI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยทั่วไปแล้วค่า EAI จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากขนาดโมเลกุลเล็กลง จึงสามารถเคลื่อนที่ไปที่ interface ได้อย่างรวดเร็ว จึงมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีแต่ขนาดโมเลกุลที่เล็กไม่สามารถ

ทำให้เกิดความคงตัวของระบบอิมัลชันได้ ดังนั้นที่ระดับการย่อยสลายต่ำคือ มีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงมีค่า ESI สูงกว่า (Keerati-u-rai, 2009)



ภาพที่ 39 Emulsion activity index (EAI) (a) และ Emulsion stability index (ESI) (b) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ( ) และฟลาโวไซม์ (■) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

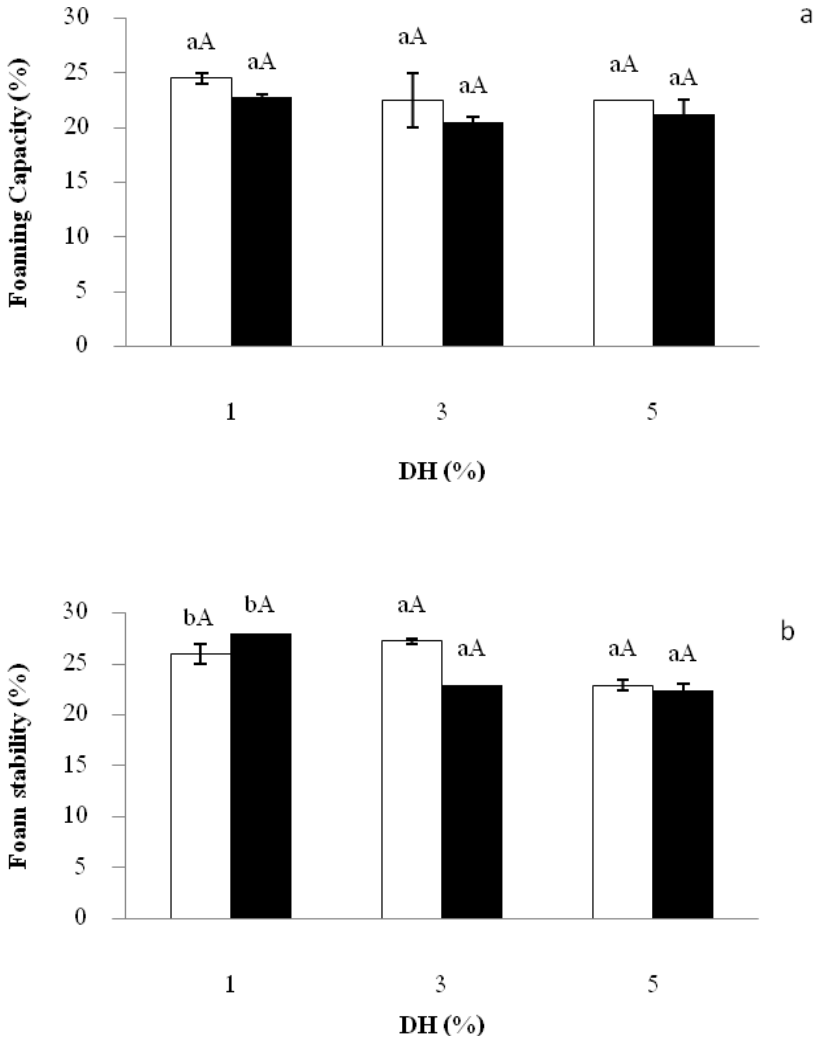
^{a,b,c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

^{A,B} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

จากการศึกษาการเกิดฟอง พบว่า Foaming capacity ของถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) รองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 40 ส่วน Foam stability ของถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วย ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเกิดฟองที่ดีที่สุดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 แต่ที่ระดับการย่อยสลายสูงสุดกลับทำให้ความคงตัวของฟองลดลงเนื่องมาจากที่ที่ระดับการย่อยสลายต่ำจะมีเปปไทด์สายใหญ่ทำให้การเกิด Foaming satability จะสูง Martínez และคณะ (2009) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างของโปรตีนจากถั่วเหลือง เนื่องมาจากกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและ surface hydrophobicity พบว่ากระบวนการย่อยสลายจะทำให้เกิดลักษณะของผิวหน้าที่เปลี่ยนไปและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่เปลี่ยนไป

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าการอุ้มน้ำสูงสุด ($P \leq 0.05$) แต่ระดับการย่อยสลายไม่มีผลต่อการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยโปรตาเมกซ์ ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยทั่วไปแล้วโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อมีขนาดโมเลกุลเล็กลง (Klompong et al., 2009) นอกจากนี้ความสามารถในการอุ้มน้ำยังขึ้นอยู่กับหมู่ hydrophillic ของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Kristinsson and Rasco, 2000)

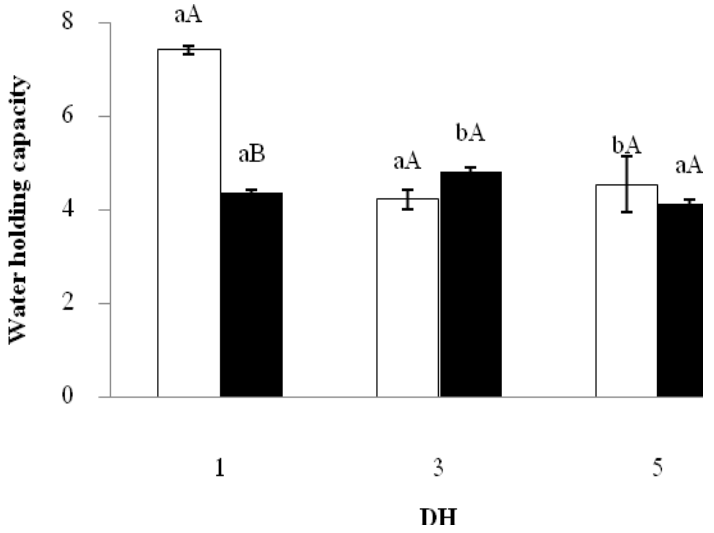
เมื่อศึกษาผลของถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าการจับกับไขมันสูงสุด รองลงมาคือถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 ส่วนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 ของทั้งสองเอนไซม์ที่มีค่าการจับกับไขมันต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ระดับการย่อยสลายต่ำได้มีการตัดเปปไทด์ซึ่งจะแสดงหมู่ amino acid ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ในเปปไทด์ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการจับกับไขมันซึ่งส่วนที่จับไขมันได้ดีจะเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Kristinsson and Rasco, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 11 นอกจากนี้การจับกับไขมันยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายด้วย จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองมีความสามารถในการจับกับไขมันสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายสูง ดังนั้นความสามารถในการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย



ภาพที่ 40 Foaming capacity (a) และ Foam satability (b) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■) ที่ระดับการย่อยสลายร้อย ละ 1 3และ 5

^{a,b,c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

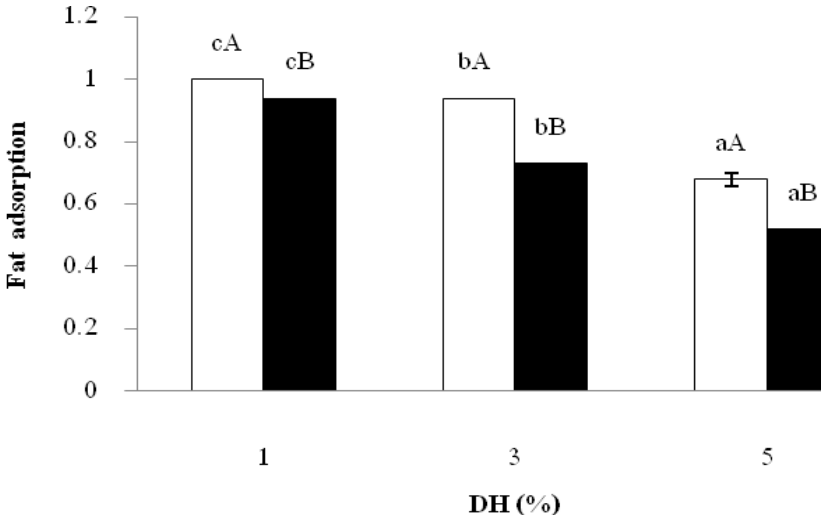
^{A,B} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์



ภาพที่ 41 การอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ระหว่างชนิดของเอนไซม์



ภาพที่ 42 การจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

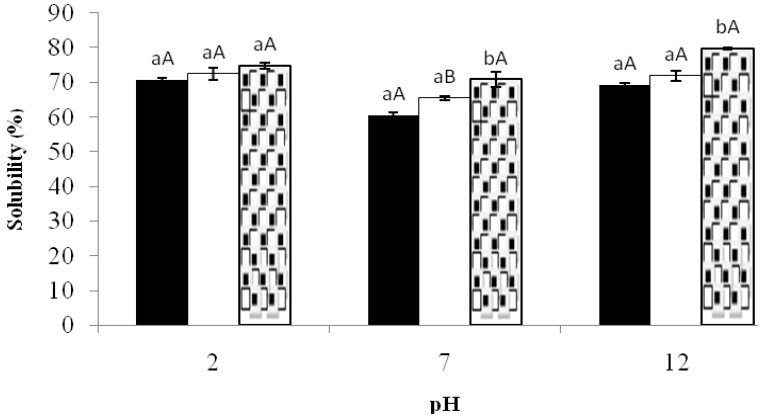
[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

4.2.6 ผลของพีเอชต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง

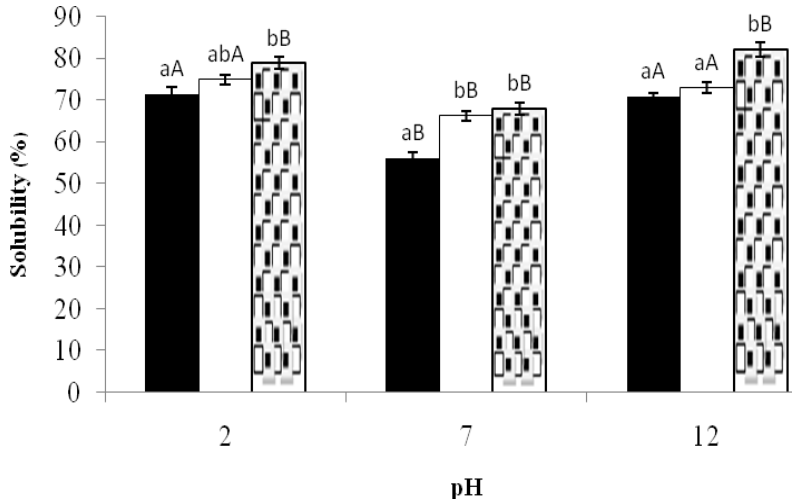
โปรตีนไฮโดรไลเสตจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 มีการละลายใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงร้อยละ 56.19 ถึง 79.71 ดังแสดงในภาพที่ 43 โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่าการละลายสูงที่สุด รองลงมาที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 1 ตามลำดับ โดยที่ pH 12 มีค่าการลละลายสูงที่สุดที่ระดับการย่อยสลายสูงขึ้นความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตสูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนถูกย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กจึงสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และมีปริมาณหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้น (Adler-Nissen, 1979) อย่างไรก็ตามที่ pH 7 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่าที่ pH 2 ในสภาวะกรด และที่ pH 12 ในสภาวะด่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนสามารถละลายได้ดีในสภาวะกรดและด่างซึ่งเป็นสภวะที่มีประจุและความสามารถในการละลายลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางหรือในสภาวะที่เข้าใกล้ isoelectric point (pI) ซึ่งส่งเสริมการตกตะกอนโปรตีน (Adler-Nissen and Olsen, 1979)

จากการศึกษาการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ พบว่า ที่ระดับพีเอชสูง คือ pH 12 ค่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ที่สภาวะกรดและสภาวะเป็นกลาง โดยที่สภาวะเป็นกลาง (pH 7) ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีค่าสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 และ 1 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับ ค่า EAI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ซึ่งมีค่า EAI สูงที่ pH 12 โดยทั่วไปแล้วที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่า EAI สูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 และร้อยละ 3 ที่ pH 7 ส่วนค่า ESI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีค่าสูงสุดที่ pH 12 เช่นกัน โดยทั่วไปแล้วโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่า ESI สูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ ส่วนค่า ESI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโซม์นั้นแตกต่างกัน ขึ้นกับพีเอชและระดับการย่อยสลาย ดังแสดงในภาพที่ 44 การที่ pH มีผลต่อคุณสมบัติของอิมัลชันนั้นเนื่องจากความสมดุลของโปรตีนกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และกลุ่มโปรตีนที่ชอบน้ำมัน (lipophilic) สำหรับอิมัลชัลชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) โปรตีนกลุ่มที่ละลายในน้ำมันจะหันไปจับกับส่วนที่เป็น hydrophilic กับชั้นส่วนที่เป็นของเหลวทำให้เกิดการรวมตัว โดยหุ้มเอาเม็ดน้ำมันเอาไว้และในทางตรงกันข้ามโปรตีนส่วนที่ละลายในน้ำจะหันไปจับส่วนที่เป็น lipophilic กับชั้นส่วนที่เป็นน้ำมันทำให้เกิดการรวมตัวโดยหุ้มเอาเม็ดน้ำเอาไว้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะดังกล่าวต้องอาศัยคุณสมบัติของโปรตีนเป็นหลัก หากในสภาวะ pH ที่เข้าใกล้ pI ทำให้การละลายของโปรตีนต่ำ เนื่องจากประจุสุทธิเป็นศูนย์

โปรตีนจะเกิดการรวมตัวกันและความคงตัวจะเสียไปซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดคุณสมบัติอิมัลชัน (Kristinsson and Rasco, 2000)



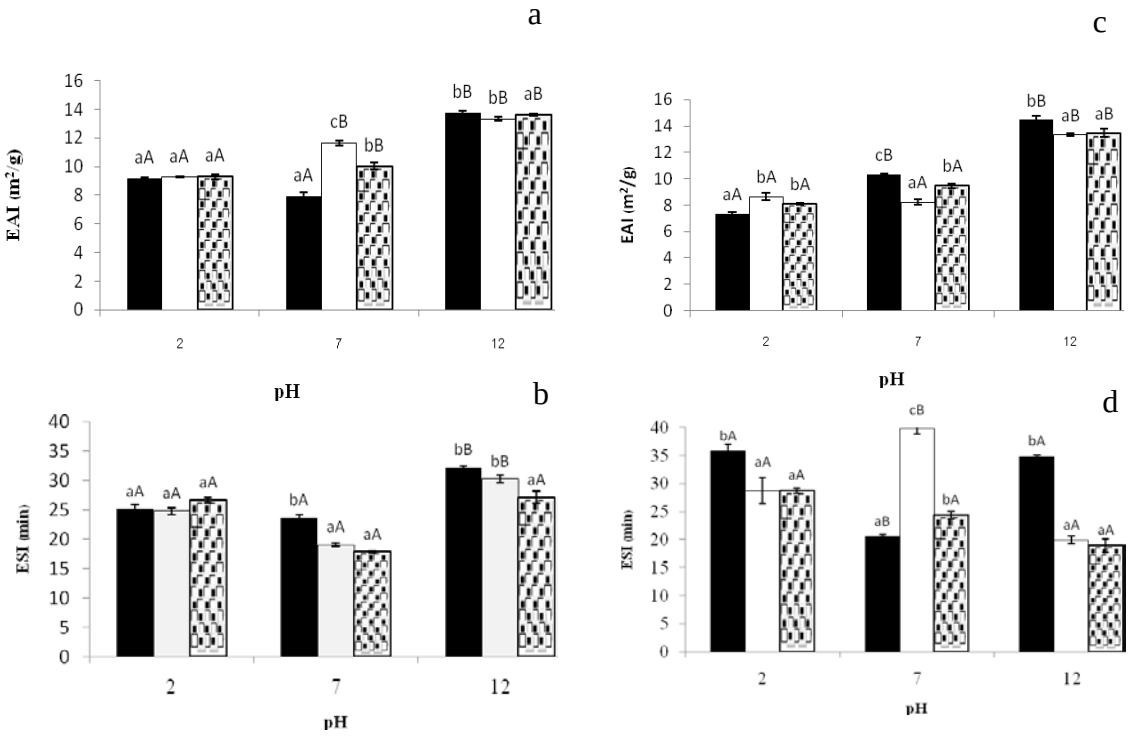
b



ภาพที่ 43 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

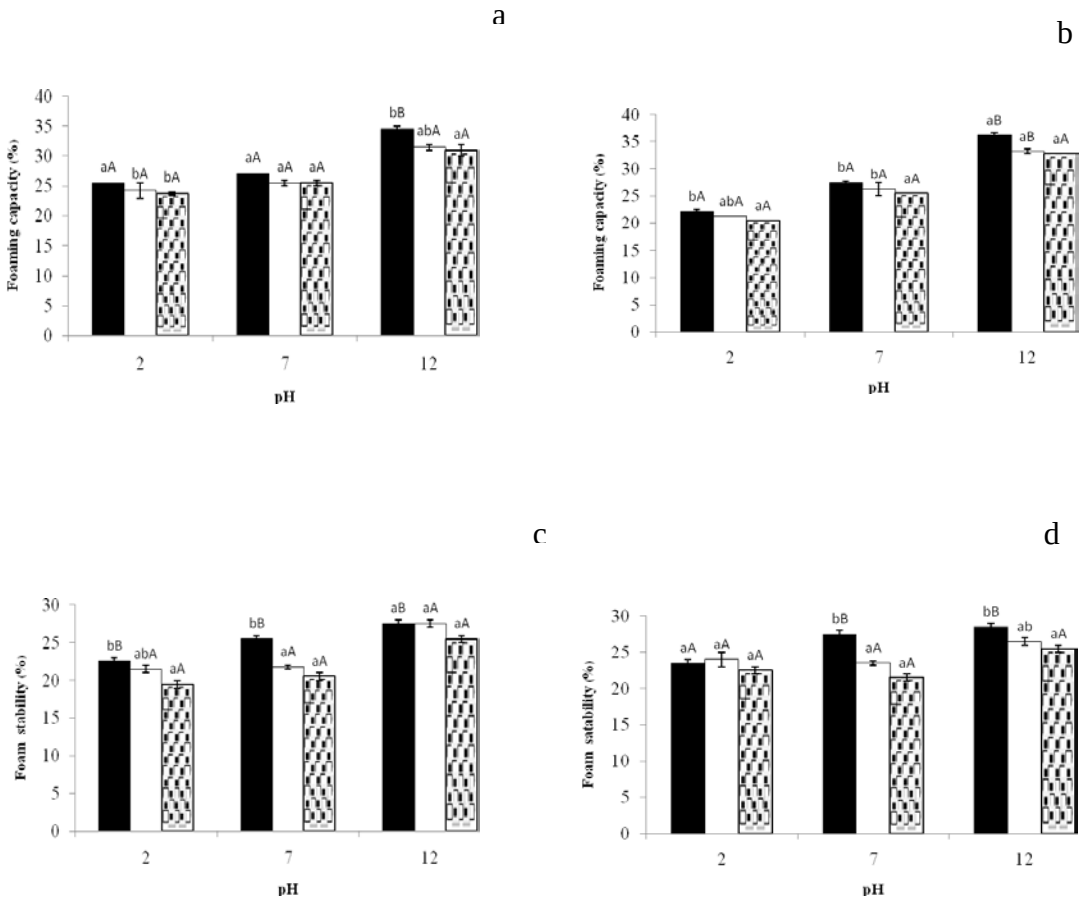


ภาพที่ 44 Emulsion activity index (EAI) และ Emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a, b) และฟลาโวไซม์ (c, d) ที่ระดับการย่อย สลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

เมื่อศึกษาสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 ซึ่งทำการศึกษาที่สภาวะต่างกันคือที่ pH 2 7 และ 12 ดังแสดงในภาพที่ 45 ซึ่งพบว่า pH มีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง โดยที่ pH 12 Foaming capacity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีค่าสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) คือร้อยละ 36.5 รองลงมาคือที่ pH 7 และ 2 คือร้อยละ 25.5 และ 20 ตามลำดับ ส่วน Foam stability pH 12 มีค่าสูงสุดคือร้อยละ 28.5 รองลงมาที่ pH 7 และ 2 คือร้อยละ 27.5 และ 22.5 ตามลำดับ เช่นเดียวกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ซึ่งแสดงผลการทดลองที่สอดคล้องกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากที่สภาวะ pH เพิ่มขึ้นมีผลทำให้โปรตีนสามารถละลายได้ดี[a] เนื่องจาก



ภาพที่ 45 Foaming capacity และ Foam stability ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลาย ด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a,b) และฟลาโวไซม์ (c.d) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▚) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

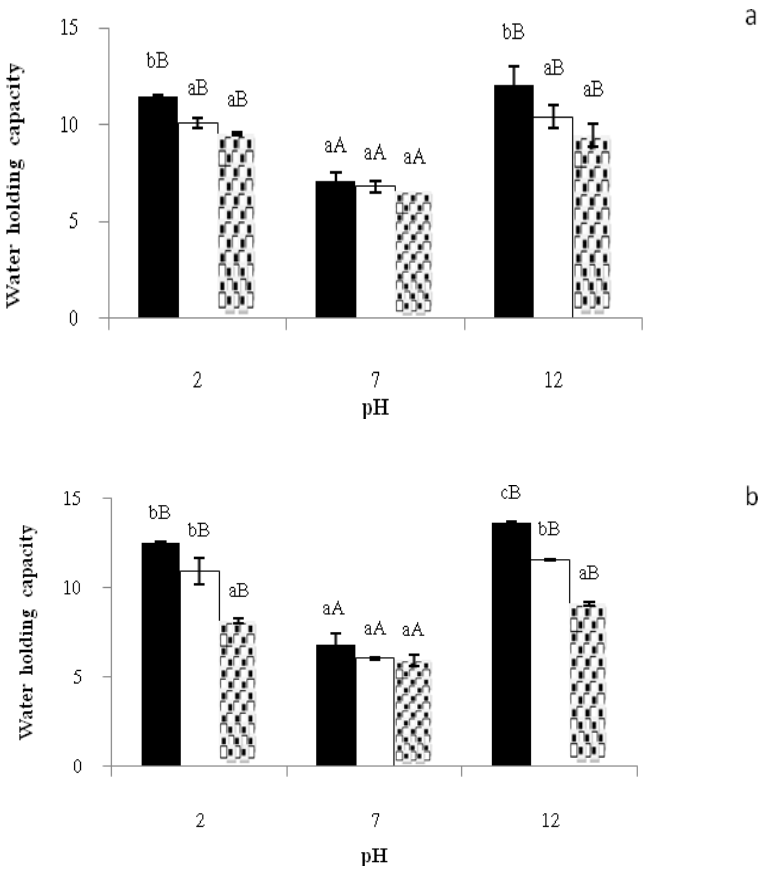
โปรตีนละลายได้ดีในสภาวะด่างซึ่งมีประจุโดยโมเลกุลของโปรตีนจะสัมพันธ์กับประจุสุทธิทำให้เกิด electrostatic repulsion หรือการผลักกันของประจุ ซึ่งมีผลทำให้แรงไฮโดรโฟบิกอ่อนแรงลง ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนยืดหยุ่นและละลายได้มากขึ้นและคุณสมบัติการมีขั้ว และชอบน้ำของโปรตีนไฮโดรไล เสตจึงทำให้ Foaming capacity สูง เมื่อเทียบกับสภาวะที่ pH 2 และ 7 พบว่าโปรตีนอาจเกิดการตกตะกอนส่งผลให้ Foaming capacity มีค่าต่ำ ส่วน Foam stability ของโปรตีน

ไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลในด้านการละลายเช่นเดียวกับ Foaming capacity อย่างไรก็ตาม Foam stability นั้นได้รับอิทธิพลจากระดับการย่อยสลายค่อนข้างมากโดยที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 Foam จะมีความคงตัวสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด เนื่องจากเปปไทด์ขนาดใหญ่จะสามารถช่วยให้โฟมคงตัวได้ดีกว่าเปปไทด์ขนาดเล็กหรือเปปไทด์สายสั้น (Klompong et al., 2009)

จากการศึกษาการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ pH ต่างๆมีค่าที่แตกต่างกันโดยที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าการอุ้มน้ำสูงสุดรองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบการอุ้มน้ำ pH 2 7 และ 12 พบว่าที่ pH 7 ค่าการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่สภาวะกรดและด่างโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถละลายได้ดี ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งความสามารถในการละลายนั้นเป็นคุณสมบัติขั้นต้นในการทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ซึ่งรวมถึงสมบัติการอุ้มน้ำด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000) จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษาที่ระดับการย่อยสลายต่ำอาจมีหมู่ที่ชอบน้ำหันออกมาด้านนอกโมเลกุล และการที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองมีความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง ที่ระดับการย่อยสลายสูงอาจเป็นเพราะโปรตีนที่ถูกย่อยมีโมเลกุลเล็กลงทำให้สามารถเก็บกักน้ำได้น้อยลง (Diniz and Martin, 1997)

เมื่อศึกษาผลของความสามารถในการจับกับไขมันแสดงค่าของปริมาณน้ำมันที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น ขนาดของอนุภาคของโปรตีน (bulk density) ระดับการย่อยสลายและความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อซับสเตรท จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงสุด รองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 47 โดยมีค่าสูงสุดที่ pH 7 ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ ที่ pH 2 และ 12 มีค่าใกล้เคียงกัน ($P \leq 0.05$) สำหรับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ pH 12 ที่ pH 2 และ 7 มีค่าใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) กลไกการจับกับไขมันเกี่ยวกับการจับไขมันที่เกิดจากโครงสร้างทางกายภาพและและขนาดอนุภาคของโปรตีน (bulk density) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายต่ำจะมีขนาดโมเลกุลใหญ่ทำให้สามารถจับกับไขมันได้ดี (Kinsella, 1976)

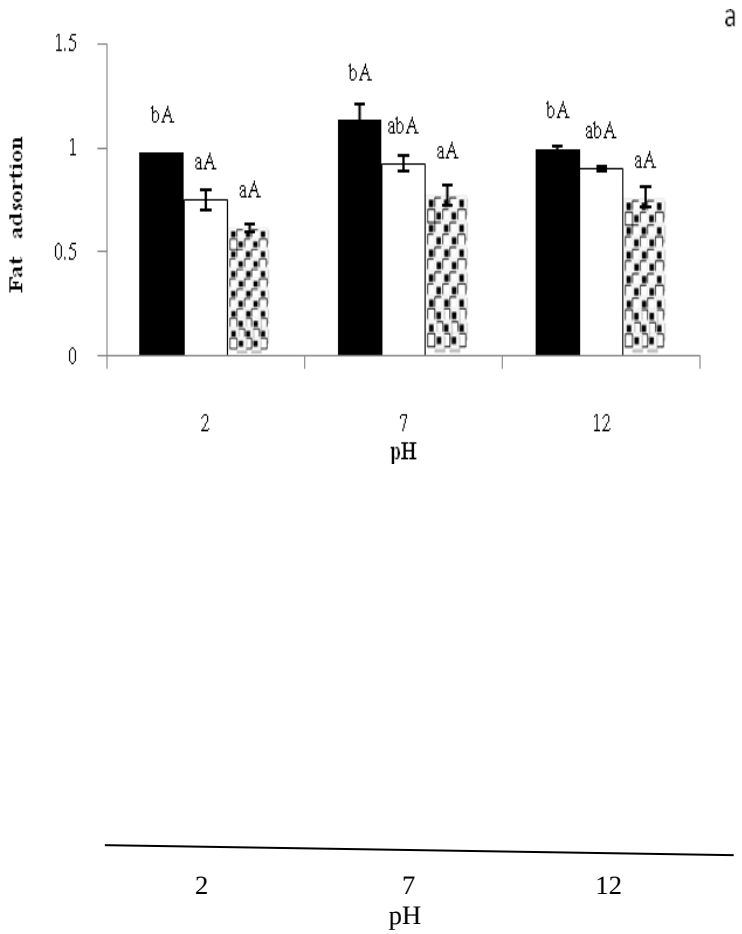
Souissi และคณะ (2007)ได้อธิบายไว้ว่า กระบวนการย่อยทำให้เปปไทด์ถูกปล่อยออกมาจากโปรตีน ซึ่งจะช่วยเสริมความยืดหยุ่นของโมเลกุล การย่อยเปปไทด์จำนวนมากทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตจับกับน้ำมันได้น้อยลง



ภาพที่ 46 การอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ1 ■) 3 (□) และ 5 (▪) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b,c] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน



ภาพที่ 47 การจับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▦) ที่ pH2 7 และ 12

^{a,b,c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

^{A,B} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

4.3 ถั่วลิสง

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยสลายต่ออัตราการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) โปรตีนจากถั่วลิสง พบว่าการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน ได้แก่ เอนไซม์ฟลาโวไซม์และเอนไซม์โปรตาเมกซ์นั้นส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีอัตราการย่อยลายแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 48 และ 49 ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีระดับการย่อยสลายสูงกว่าโปรตีนถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์โปรตาเมกซ์เป็น endo-peptidase ซึ่งสามารถตัดพันธะเปปไทด์แบบสุ่ม ทำให้ระดับการย่อยสลายสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งเป็น exo-peptidase ซึ่งตัดพันธะเปปไทด์จากปลายสายเปปไทด์ และเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเอนไซม์โปรตาแมกซ์ (novozymes, 2007) และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์เพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วลิสงเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$)

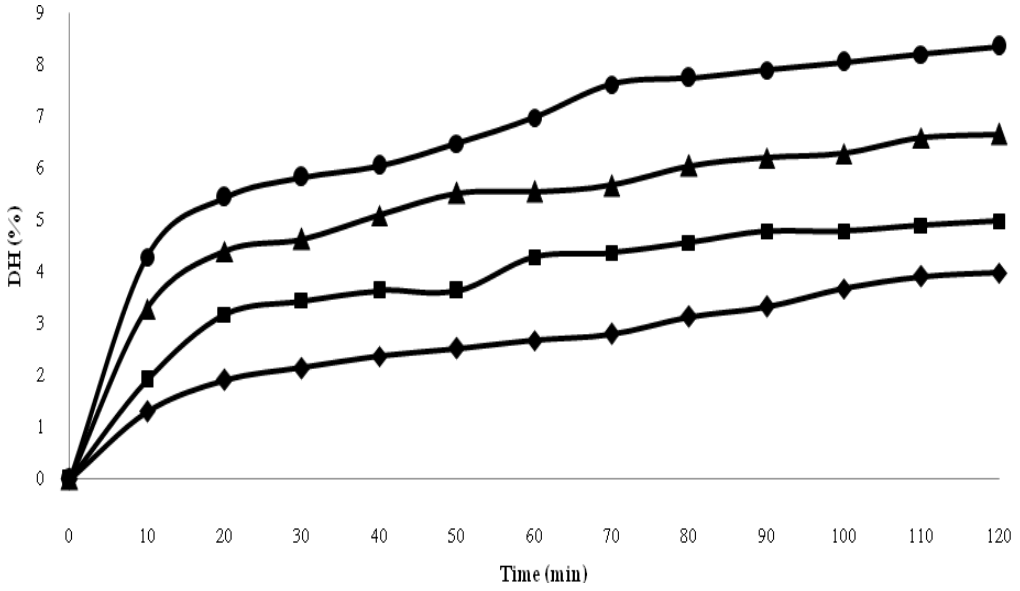
โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเอนไซม์โปรตาเมกซ์ มีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Klompong และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้น ในระบบที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยอัตราการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

เมื่อพล็อตกราฟ log 10 (ความเข้มข้นของเอนไซม์) กับระดับการย่อยสลายของเอนไซม์แต่ละชนิด แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงดังภาพที่ 50 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามรถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงให้มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

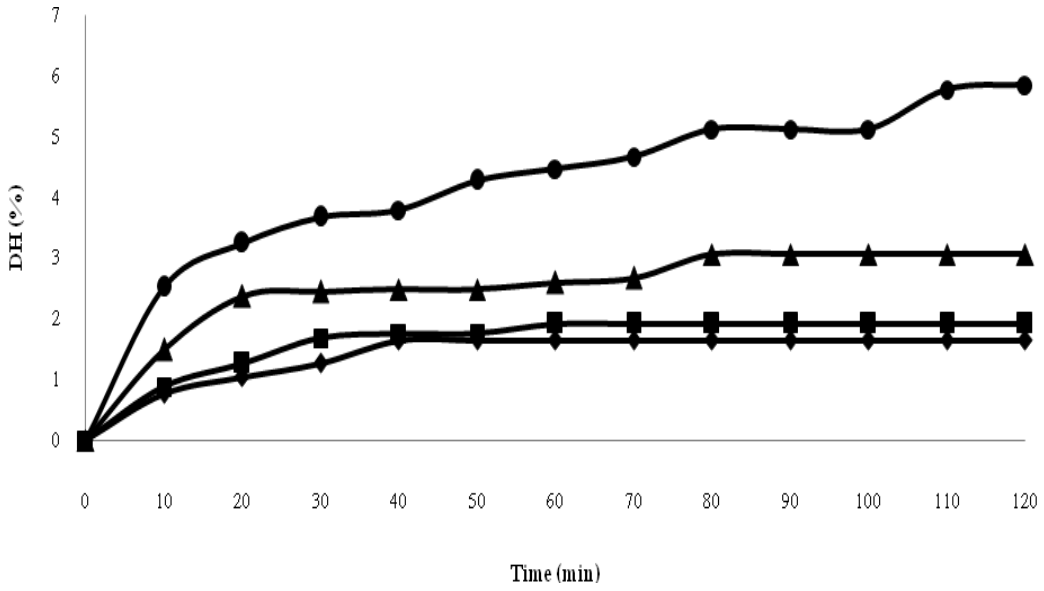
4.3.2 ผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง

จากการศึกษาผลของระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง พบว่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

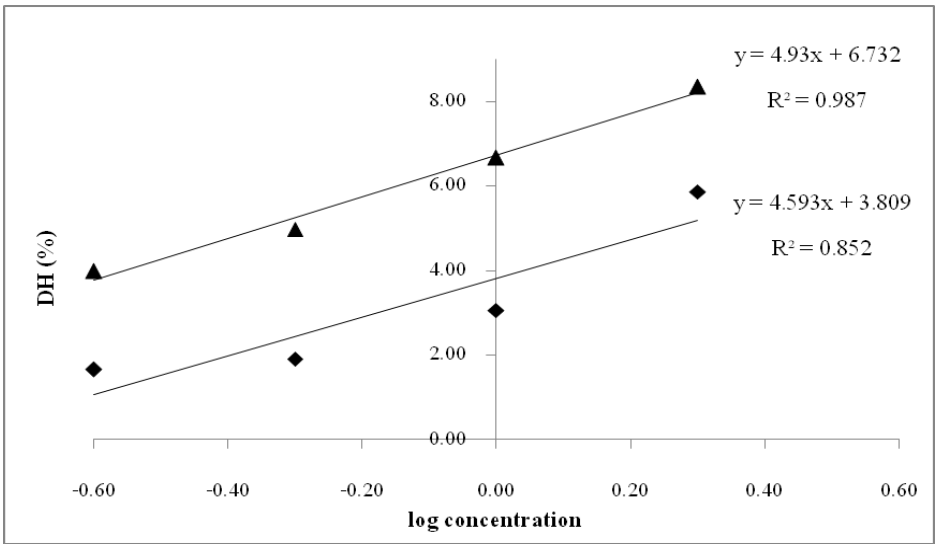
(ภาพที่ 51-55) ซึ่งสอดคล้องกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งและถั่วเหลือง ($p \leq 0.05$) และการทดลองของ Klompong และคณะ (2007a)



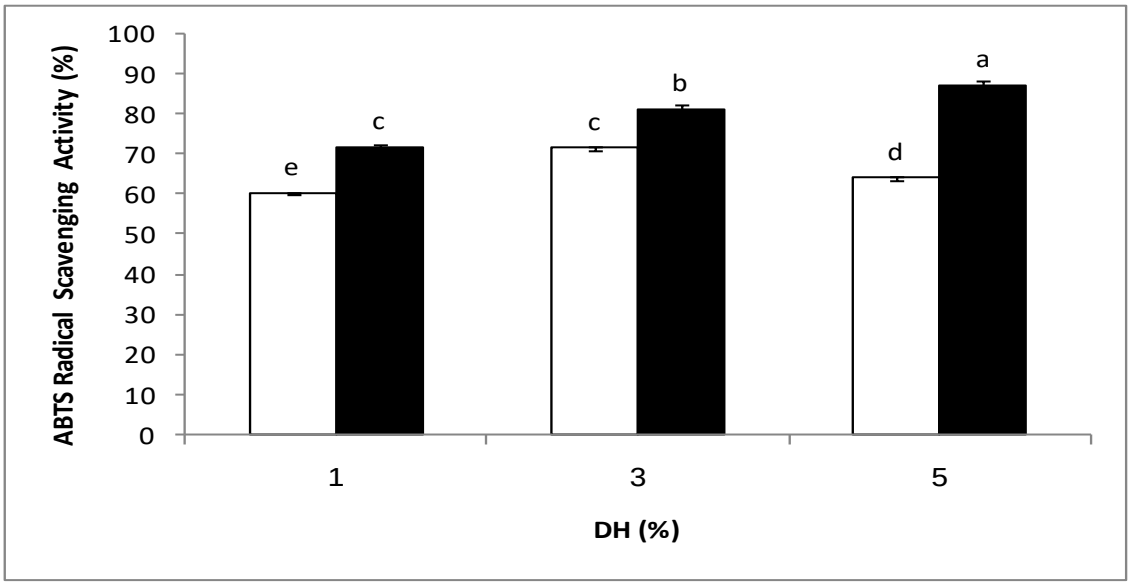
ภาพที่ 48 อัตราการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ร้อยละ 0.25 (◆) 0.5 (■) 1 (▲) และ 2 (●) เป็นเวลา 120 นาที



ภาพที่ 49 อัตราการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 0.25 (◆) 0.5 (■) 1 (▲) และ 2 (●) เป็นเวลา 120 นาที

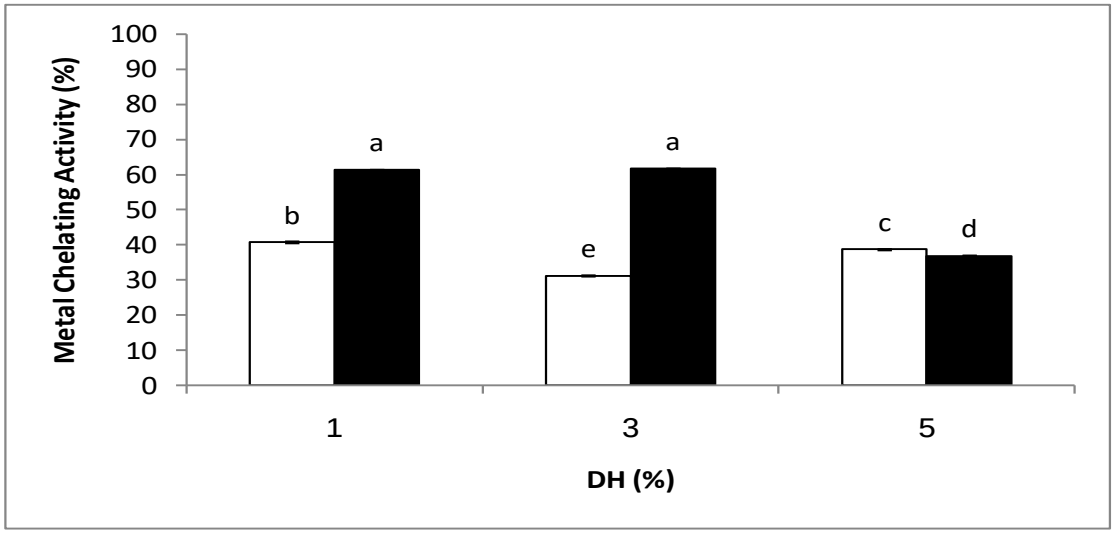


ภาพที่ 50 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลายและ log คามเข้มข้นของเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (▲) และฟลาโวไซม์ (◆) ที่ pH 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



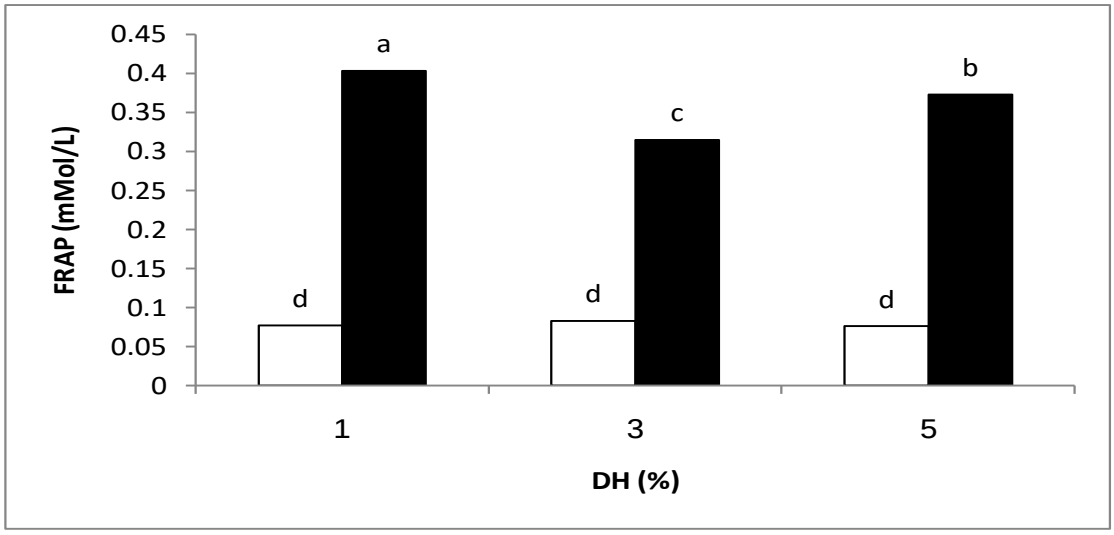
ภาพที่ 51 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-e] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



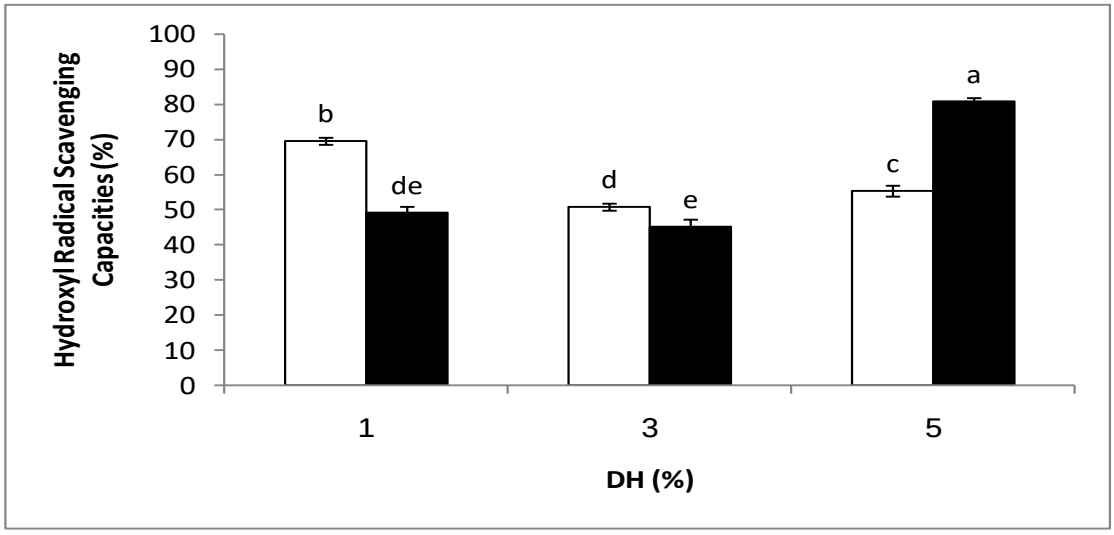
ภาพที่ 52 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-e] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



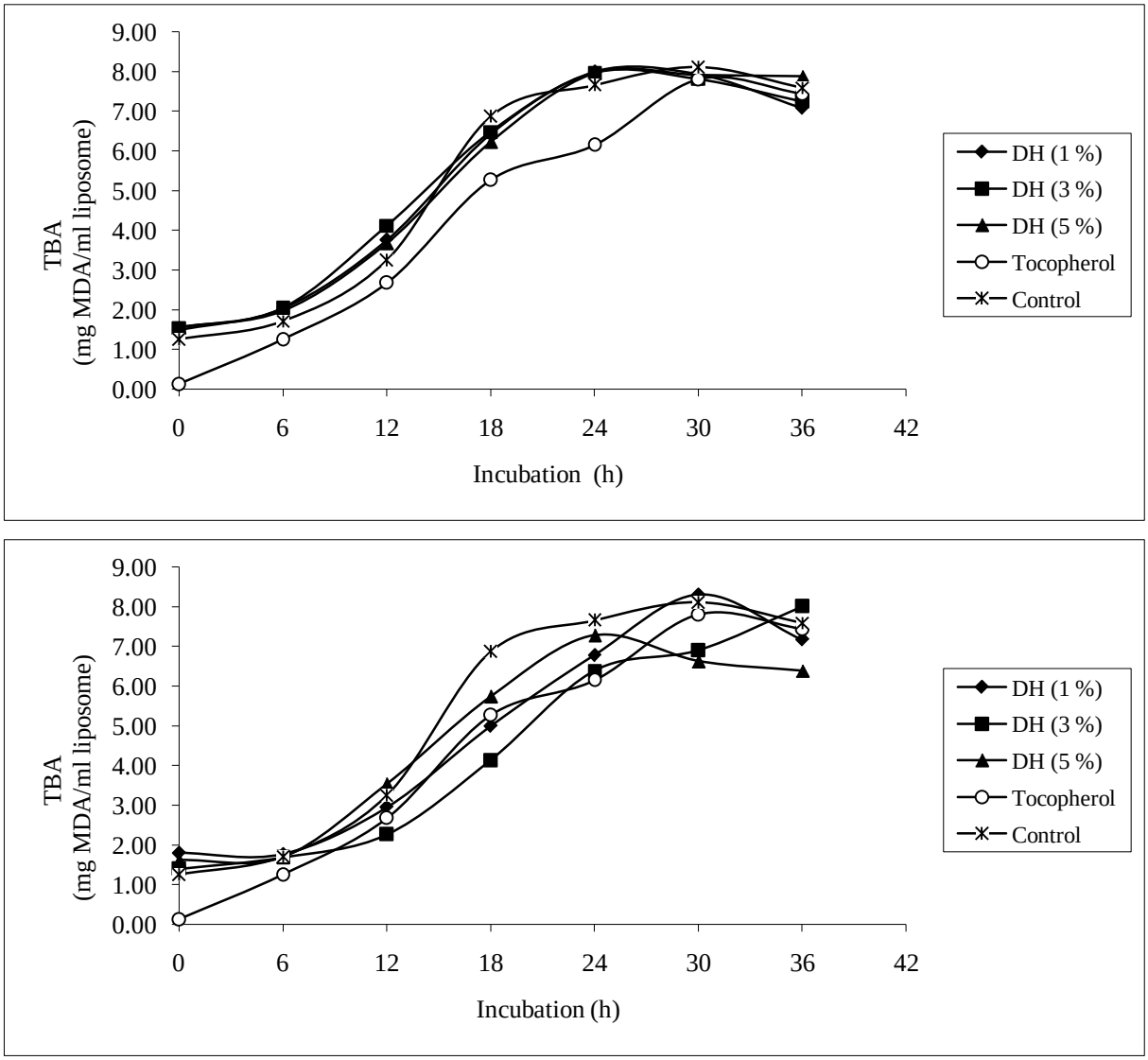
ภาพที่ 53 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

[a-e] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 54 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (□) และฟลาโวไซม์ (■)

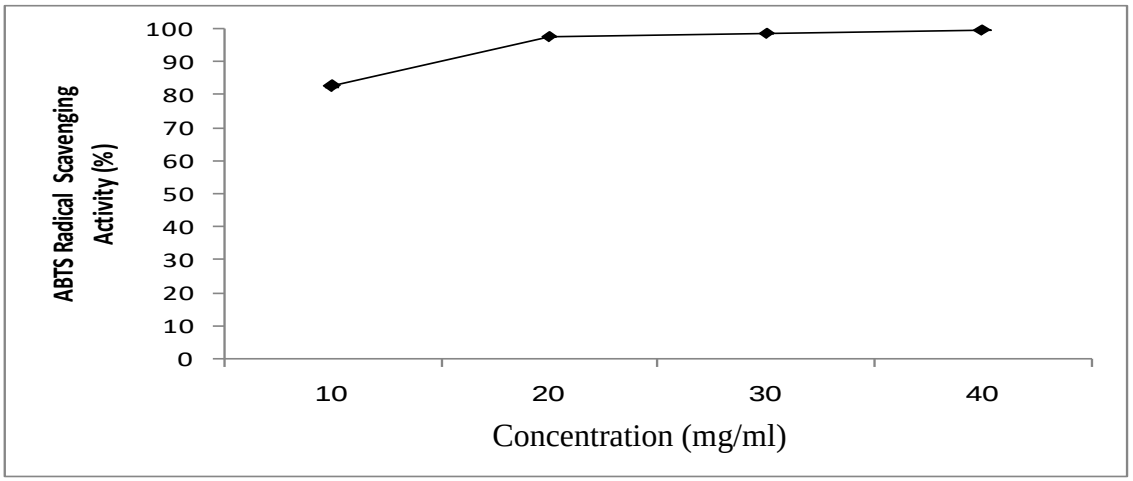
[a-e] แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



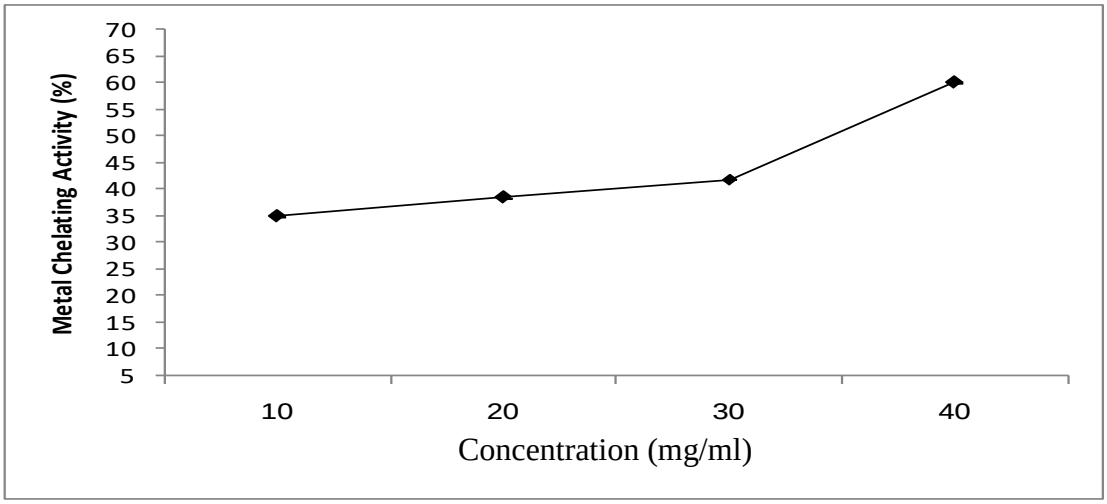
ภาพที่ 55 ระบบ Lecithin liposome ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลาย 1 ( ), 3 ( ), และ 5 ( ), α-Tocopherol ( ), ชุดควบคุม ( )

4.3.3 ผลของความเข้มข้นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง

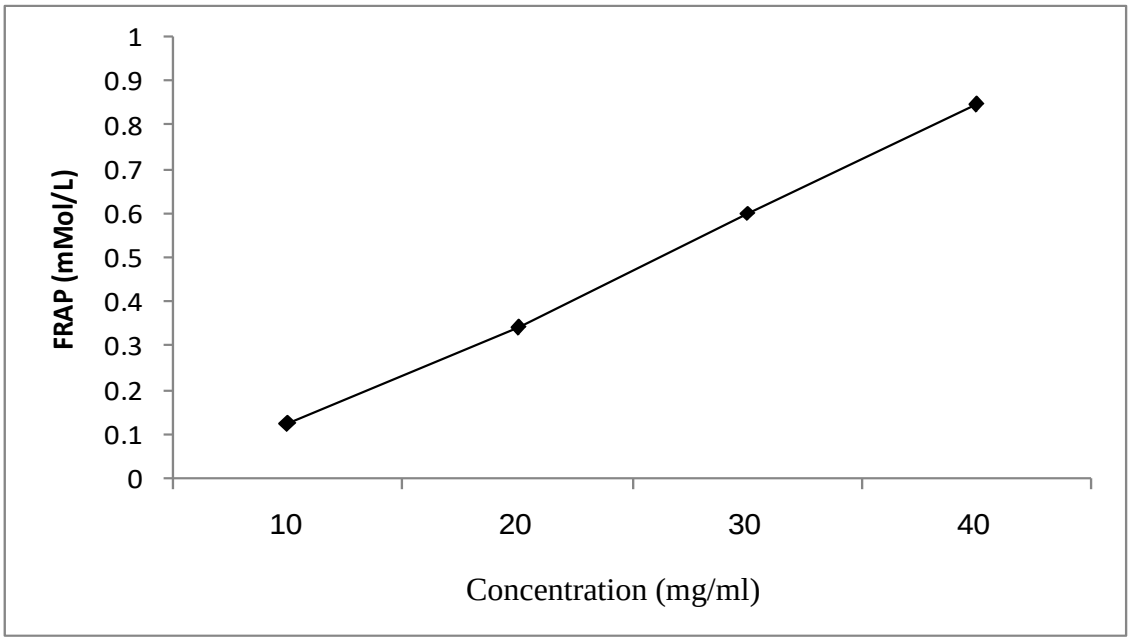
เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงต่อกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงเพิ่มขึ้น กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 56-59) ซึ่งสอดคล้องกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่งและถั่วเหลือง ยกเว้น Hydroxyl radical scavenging activity ที่มีกิจกรรมลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$)



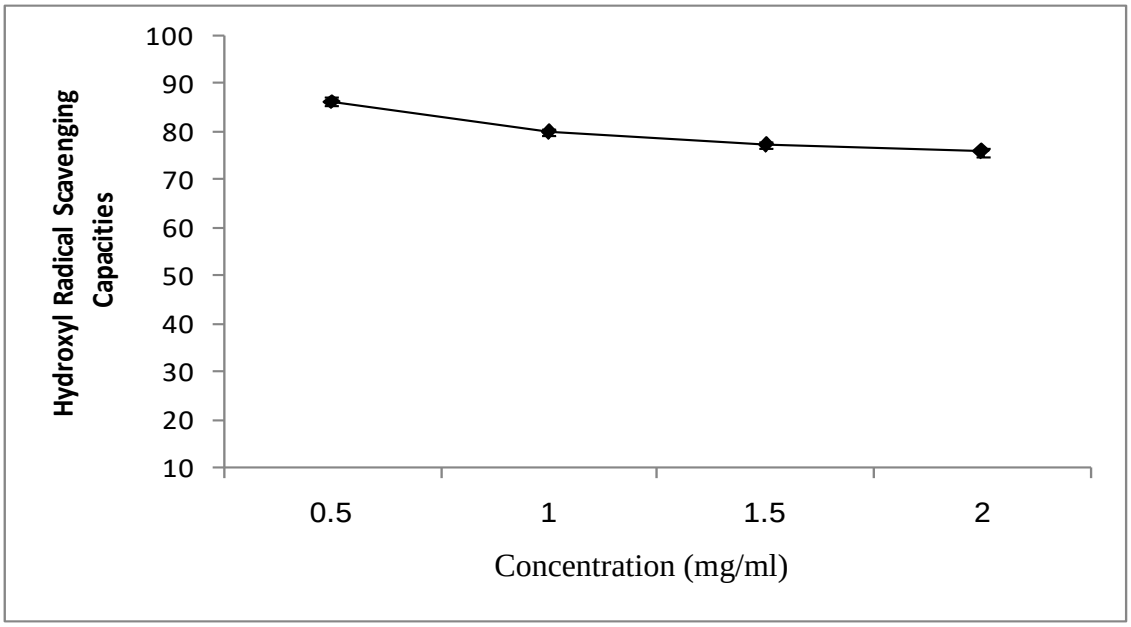
ภาพที่ 56 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 57 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



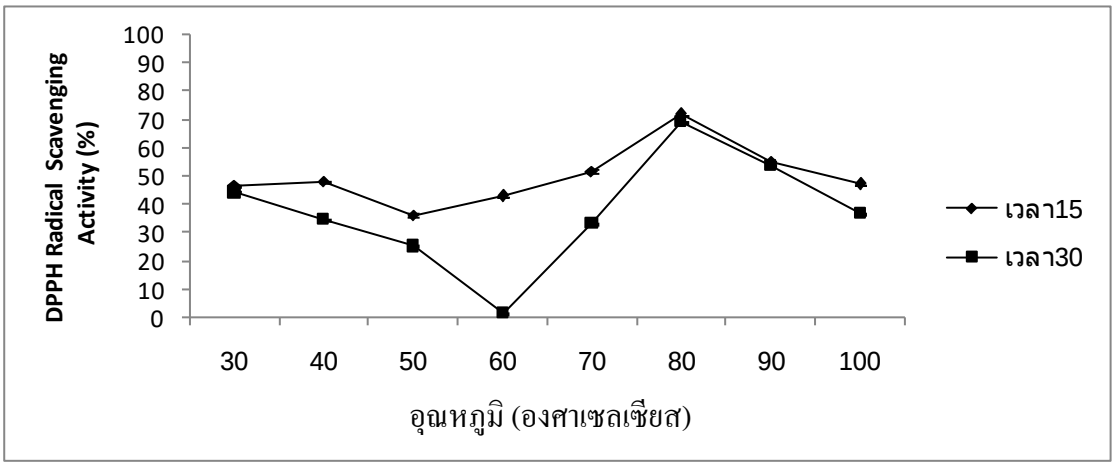
ภาพที่ 58 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



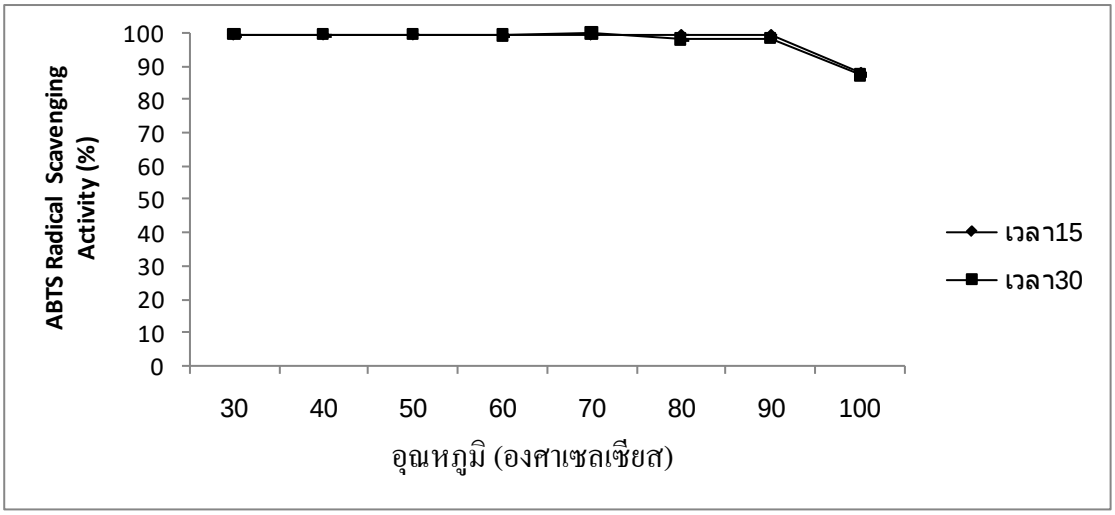
ภาพที่ 59 Hydroxyl Radical Scavenging Capacities ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ซ์ที่ระดับความเข้นต่างๆ

4.3.4 ความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงต่ออุณหภูมิ

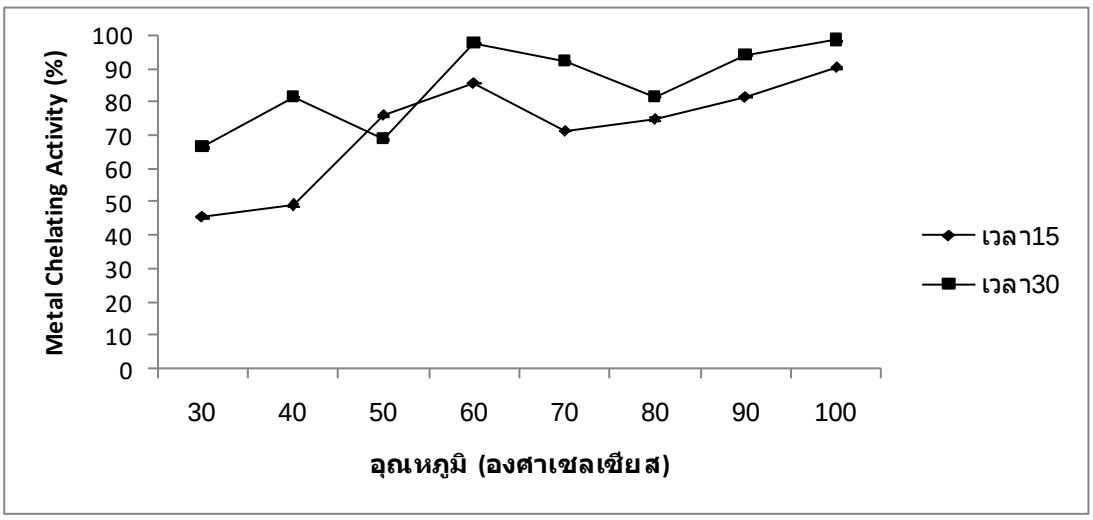
จากการศึกษาความคงตัวของกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงมีค่าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส ทั้งที่ให้ความร้อนนาน 15 และ 30 นาที (ภาพที่ 60-62)



ภาพที่ 60 DPPH Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 61 ABTS Radical Scavenging Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่อุณหภูมิต่างๆ

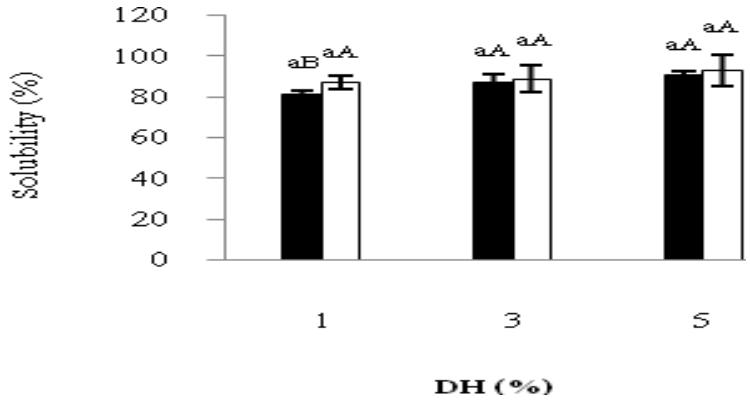


ภาพที่ 62 Metal Chelating Activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่อุณหภูมิต่างๆ

4. 3.5ผลของอัตราการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง

4.3.5.1 การละลาย

การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 63 ถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ร้อยละ 5 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 5 จะมีค่าการละลายสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) รองลงมาคือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 ในขณะที่โปรตีนถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 นั้นมีค่าการละลายต่ำสุด ($P \leq 0.05$) การที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ระดับการย่อยสลายสูงมีความสามารถในการละลายสูงสุดอาจเนื่องจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายสูงโปรตีนถูกย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอมิโนอิสระจำนวนมาก ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีขนาดเล็กและสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี และการย่อยพันธะเปปไทด์ยังช่วยให้มีปริมาณหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้น (Adler-Nissen, 1979) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Klompong และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสีกุนข้างเหลืองที่ระดับการย่อยสลายสูงมีความสามารถในการละลายสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำ และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตเนื่องจากเอนไซม์ต่างชนิดกันมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทจึงทำให้เปปไทด์ที่ได้มีคุณสมบัติต่างกัน



ภาพที่ 63 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

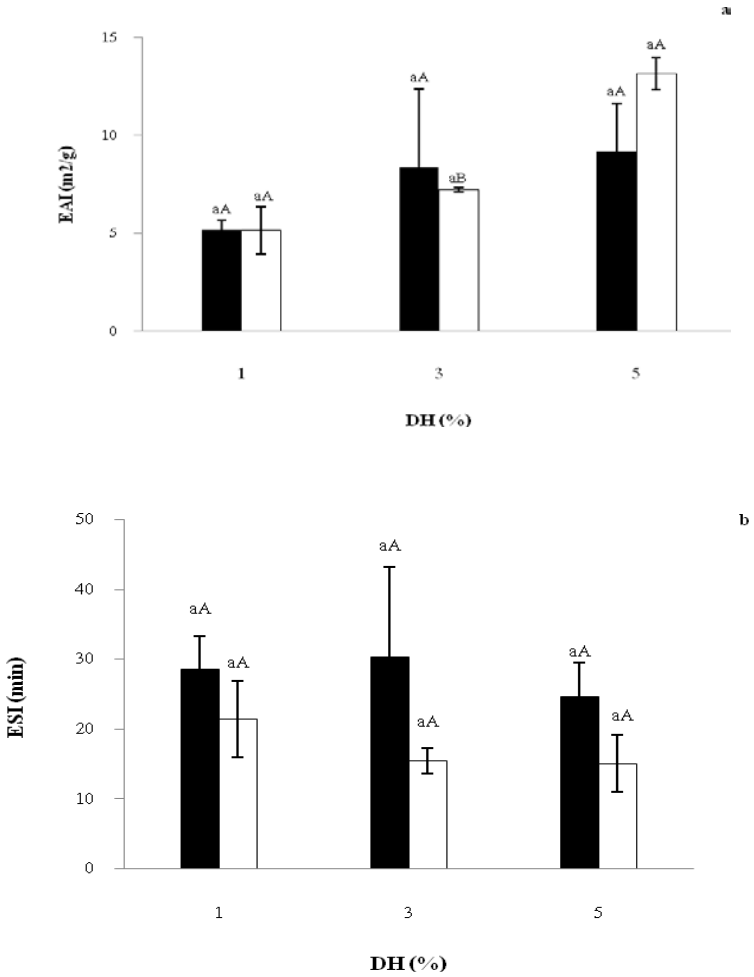
[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.3.5.2 การเกิดอิมัลชัน

จากการศึกษาการเกิดอิมัลชัน พบว่า Emulsion activity index (EAI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่าสูงที่สุด (ภาพที่ 64) คือ 13.15 รองลงมาโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 1 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่า (EAI) สุงที่สุด คือ 9.19 ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ Emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 มีค่าสูงที่สุดคือ 30.23 ($P \leq 0.05$) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่า ESI สูงที่สุดคือ 21.44 รองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า EAI และ ESI ของโปรตีนไอโดรไลเสจากถั่วลิสงนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยทั่วไปแล้วค่า EAI จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากขนาดโมเลกุลเล็กลง จึงสามารถเคลื่อนที่ไปที่ interface ได้อย่างรวดเร็ว จึงมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีแต่ขนาดโมเลกุลที่มีขนาดเล็กไม่สามารถทำให้เกิด

ความคงตัวของระบบอิมัลชัน ดังนั้นที่ระดับการย่อยสลายต่ำคือ มีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงมีค่า ESI สูงกว่า (Keerati-u-rai, 2009)



ภาพที่ 64 Emulsion activity index (EAI) (a) และ Emulsion stability index (ESI) (b) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□)ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

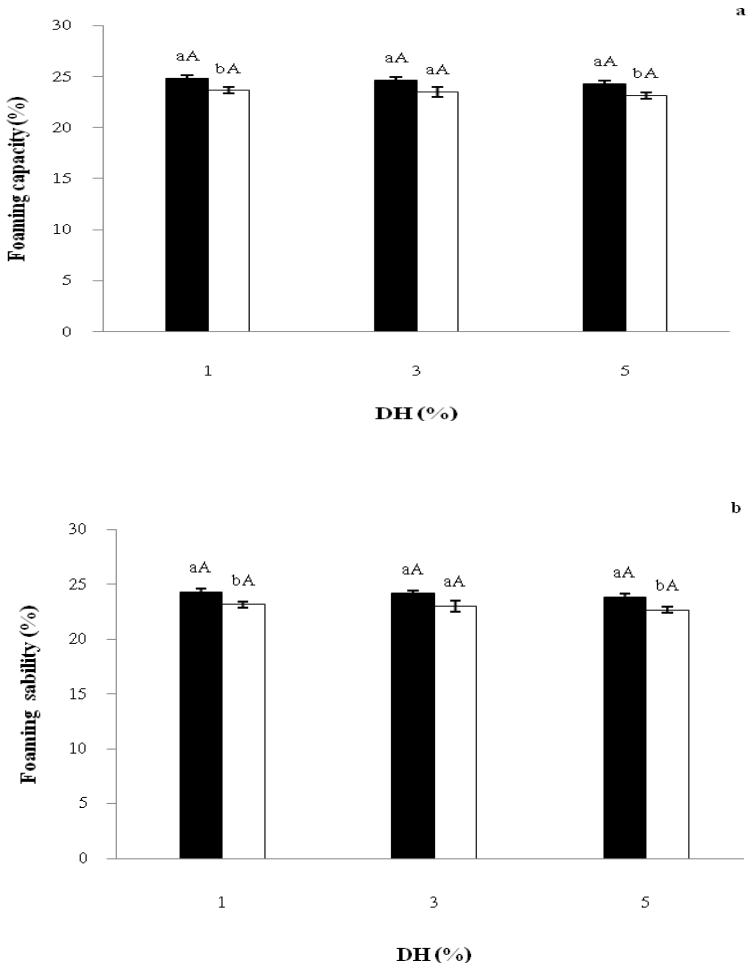
[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.3.5.3 การเกิดฟอง

จากการศึกษาการเกิดฟอง พบว่า Foaming capacity ของถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 65) รองลงมาคือที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (P>0.05) ส่วน Foaming satability ของถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วย



ภาพที่ 65 Foaming capacity (a) และ Foam stability (b) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วนเอนไซม์โปรตาแมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

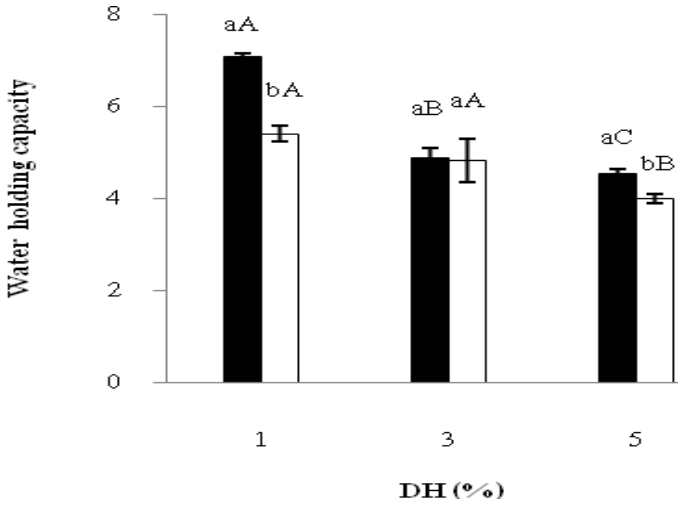
[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

เอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเกิดฟองที่ดีที่สุดที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 แต่ที่ระดับการย่อยสลายสูงกลับทำให้การคงตัวของฟองลดลงโดยทั่วไปแล้วที่

ระดับการย่อยสลายสูงซึ่งมีเปปไทด์สายสั้นๆ จำนวนมากทำให้สามารถเคลื่อนไปที่ interface ได้อย่างรวดเร็วและเรียงตัวเป็นฟิมล์รอบฟองอากาศ ทำให้มี Foaming capacity สูง ในตรงกันข้าม โดยทั่วไปแล้วที่ระดับการย่อยสลายต่ำจะมีเปปไทด์สายยาวเรียงตัวห่อหุ้มฟองอากาศอย่างแข็งแรง จะทำให้การเกิด Foaming stability สูง (Kristinsson and Rasco, 2000) จากการทดลองนี้ไม่เห็นค่าความแตกต่างระหว่าง Foaming capacity และ Foam stability อาจเนื่องจากระดับการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกัน คือ 1 3 และ 5

4.3.5.4 การอุ้มน้ำ

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าการอุ้มน้ำสูงสุด ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 66) แต่ระดับการย่อยสลายไม่มีผลต่อการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยโปรตาเมกซ์ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อมีขนาดโมเลกุลเล็กลง (Klompong et al, 2009) นอกจากนี้ความสามารถในการอุ้มน้ำยังขึ้นอยู่หมู่ hydrophilic ของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Kristinsson and Rasco, 2000)



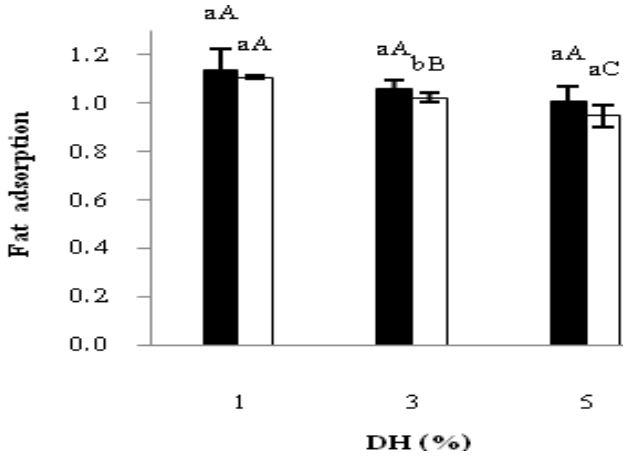
ภาพที่ 66 การอุ้มน้ำ (กรัมน้ำ/กรัมตัวอย่าง) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วย เอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

4.3.5.4 การจับกับไขมัน

ถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 มีค่าการจับกับไขมันสูงสุด รองลงมาคือถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 ส่วนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 ของทั้งสองเอนไซม์ที่มีค่าการจับกับไขมันต่ำที่สุด (ภาพที่ 67) ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ระดับการย่อยสลายต่ำได้มีการตัดเปปไทด์ซึ่งจะแสดงหมู่ amino acid ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ในสายเปปไทด์ออกมาซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการจับกับไขมันซึ่งส่วนที่จับกับไขมันได้ดีจะเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Kristinsson and Rasco, 2000) นอกจากนี้การจับกับไขมันยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายด้วย จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงมีความสามารถในการจับกับไขมันสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายสูง ดังนั้นความสามารถในการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย



ภาพที่ 67 การจับกับไขมัน (กรัมน้ำมัน/กรัมตัวอย่าง) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อย สลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (■) และฟลาโวไซม์ (□) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างชนิดของเอนไซม์

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลาย

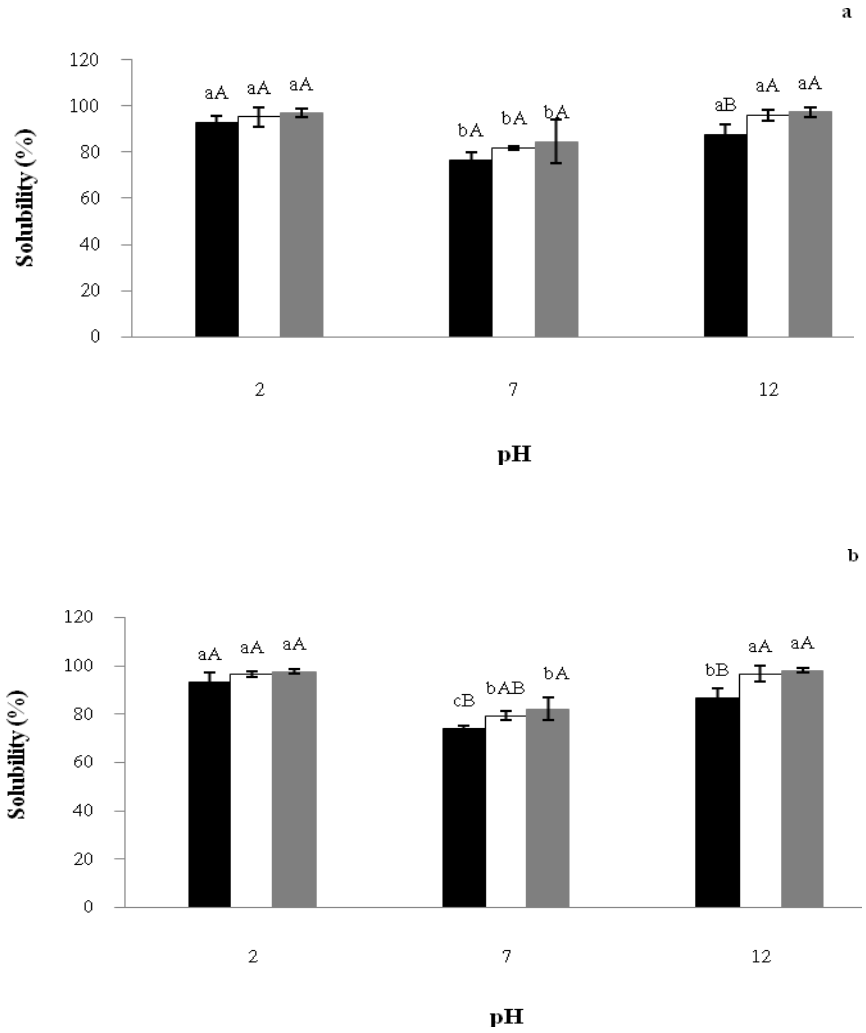
4.3.6 ผลพีเอชต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง

4.3.6.1 การละลาย

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 มีการละลายใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงร้อยละ 74.06 ถึง 98.12 ดังแสดงในภาพที่ 68 โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 มีค่าการละลายสูงที่สุด รองลงมาที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 3 และ 1 ตามลำดับโดยที่ pH 12 มีค่าการละลายสูงที่สุด ที่ระดับการย่อยสลายสูงมีความสามารถในการละลายสูง เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตถูกย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และมีปริมาณหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้น(Adler-Nissen,1979) อย่างไรก็ตามที่ pH 7 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่าที่ pH 2 ในสภาวะกรด และที่ pH 12 ในสภาวะด่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนสามารถกระจายตัวได้ดีในสภาวะกรดและด่างซึ่งเป็นสภาวะที่มีประจุและความสามารถในการละลายลดลง เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางหรือในสภาวะที่เข้าใกล้ isoelectric point (pI) ซึ่งส่งเสริมการตกตะกอนโปรตีน (Adler-Nissen and Olsen, 1979)

4.3.6.2 การเกิดอิมัลชัน

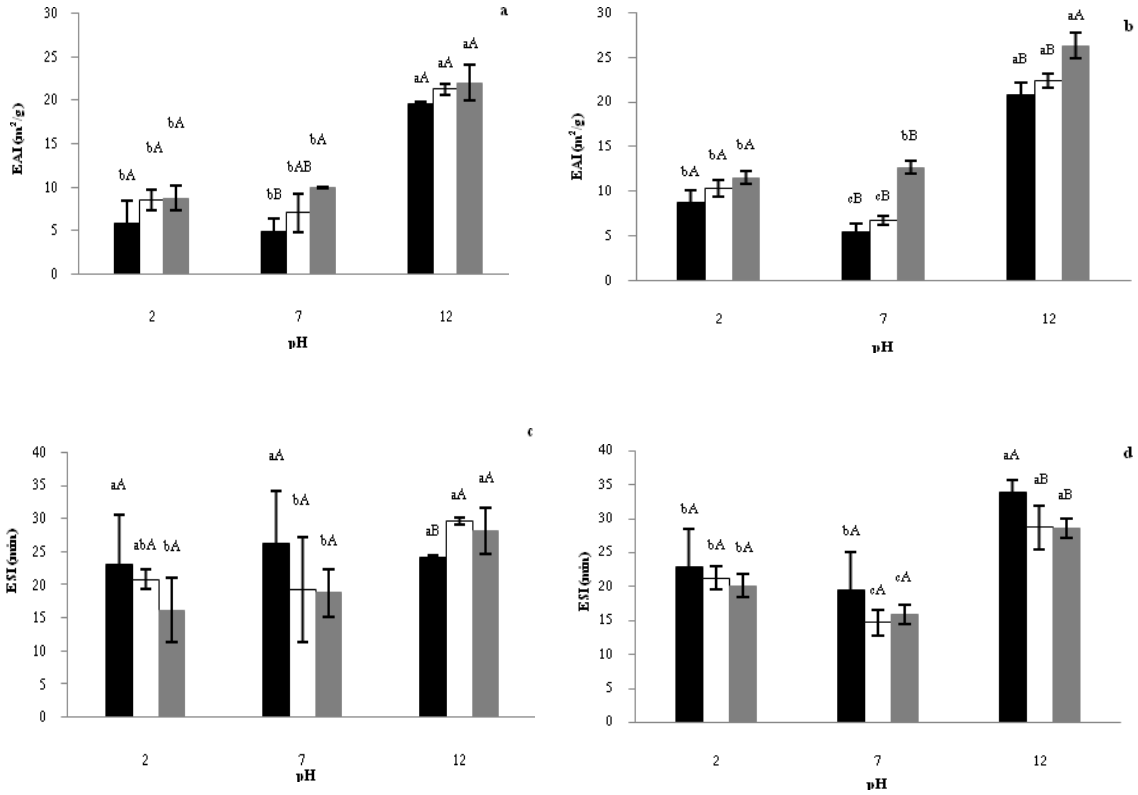
จากการศึกษาการเกิดอิมัลชัน ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์พบว่า ที่ระดับพีเอชสูง คือ pH 12 ค่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ที่มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ที่สภาวะกรดและที่สภาวะเป็นกลาง (ภาพที่ 69) ในทำนองเดียวกันค่า EAI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ซึ่งมีค่า EAI สูงสุดที่ pH 12 และที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ1 มีค่า EAI สูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ส่วนค่า ESI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์นั้นแตกต่างกัน ขึ้นกับ พีเอชและระดับการย่อยสลาย ($p \leq 0.05$) การที่ pH มีผลต่อคุณสมบัติของอิมัลชันนั้นเนื่องจากความสมดุลของโปรตีนกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และกลุ่มโปรตีนชอบน้ำมัน (lipophilic) สำหรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) โปรตีนกลุ่มที่ละลายในน้ำมันจะหันส่วน hydrophobic ไปจับกับส่วนที่เป็น hydrophobic ในเม็ดไขมัน โดยหุ้มเม็ดน้ำมันเอาไว้และในทางตรงกันข้ามโปรตีนส่วนที่ละลายในน้ำจะหันส่วน hydrophilicไปจับกับน้ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะดังกล่าวต้องอาศัยคุณสมบัติของโปรตีนเป็นหลัก หากในสภาวะ pH ที่เข้าใกล้ pI ทำให้การละลายของโปรตีนต่ำเนื่องจากประจุสุทธิเป็นศูนย์ โปรตีนจะเกิดการรวมตัวกันและความคงตัวจะเสียไปซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดคุณสมบัติอิมัลชัน (Kristinsson and Rasco, 2000)



ภาพที่ 68 การละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (■) ที่ pH 2 7 และ 12

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน



ภาพที่ 69 Emulsion activity index (EAI) และ Emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮไลเสต จากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาแมกซ์ (a, c) และฟลาโวไซม์ (b, d) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▒)

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

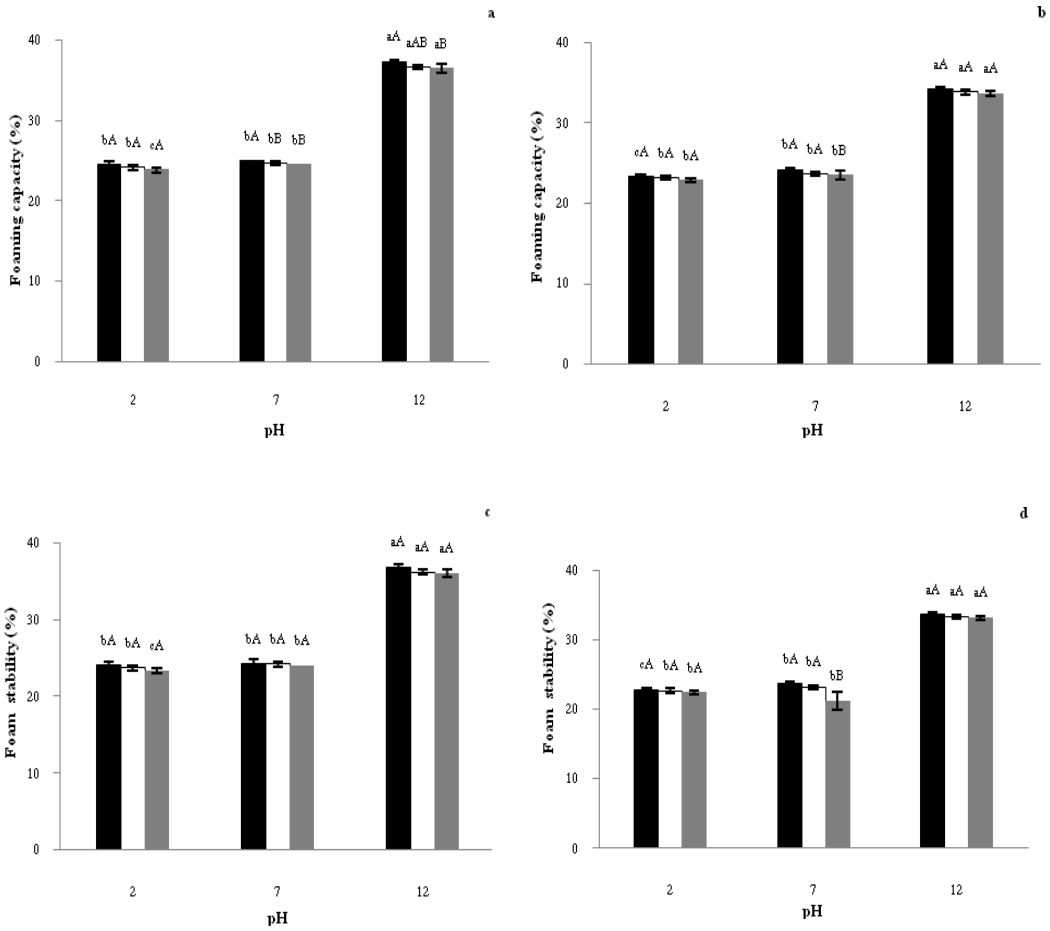
4.3.6.3 การเกิดฟอง

เมื่อศึกษาสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 3 และ 5 ซึ่งทำการศึกษาที่สภาวะต่างกันคือที่ pH 2 7 และ 12 ดังภาพที่ 70 ซึ่งพบว่า pH มีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไล เสตจากถั่วลิสง โดยที่ pH 12 Foaming capacity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โปรตาเมกซ์มีค่าสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) คือร้อยละ37.33 รองลงมาคือที่ pH 7 และ 2 คือร้อยละ 25.00 และ 24.50 ตามลำดับ ส่วน Foam stability pH 12 มีค่าสูงที่สุดคือร้อยละ 36.83 รองลงมาที่ pH 7 และ 2 คือร้อยละ 24.17 และ 24.00 ตามลำดับ เช่นเดียวกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งแสดงผลการทด

ลองที่สอดคล้องกัน Foaming capacity ที่ pH 7 มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับที่ pH 2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตกตะกอนส่งผลให้ Foaming capacity มีค่าต่ำ ส่วน Foam stability ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ และฟลาโวไซม์นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นในสภาวะด่าง (pH 12) ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลในด้านการละลายเช่นเดียวกับ Foaming capacity โดยในสภาวะที่ pH เพิ่มขึ้นมีผลทำให้โปรตีนสามารถละลายได้ดี เนื่องจากโปรตีนละลายได้ดีในสภาวะด่างซึ่งมีประจุ โดยโมเลกุลของโปรตีนจะสัมพันธ์กับประจุสุทธิทำให้เกิด electrostatic repulsion หรือการผลักกันของประจุ ซึ่งมีผลทำให้แรงไฮโดรโฟบิกอ่อนแรงลง ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนยืดหยุ่นละลายได้มากขึ้นและคุณสมบัติการมีขั้ว และชอบน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสต

4.3.6.4 การอุ้มน้ำ

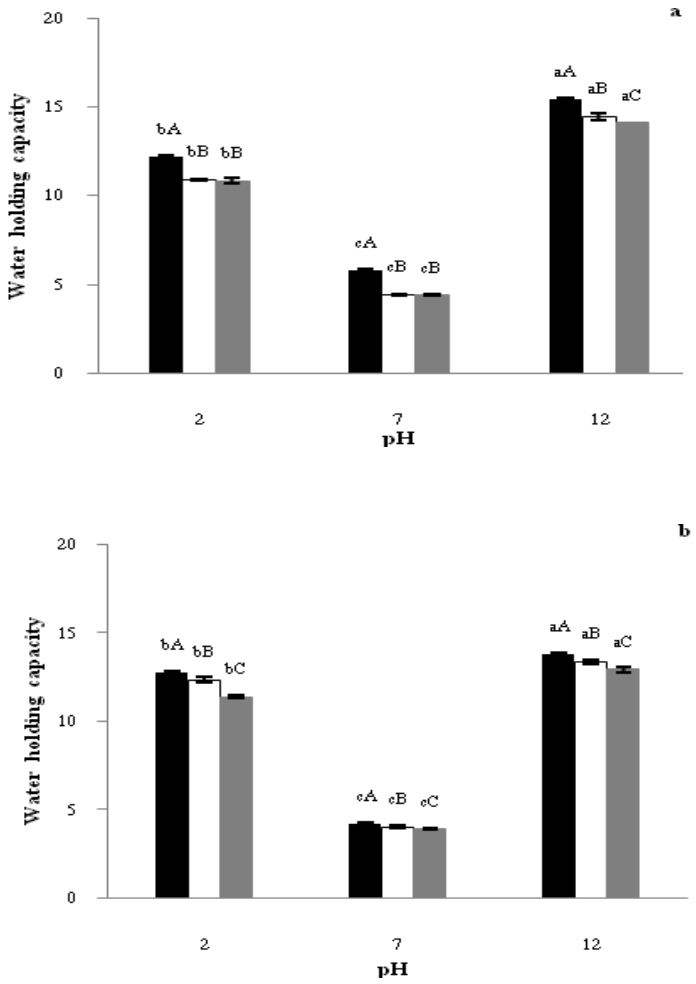
การอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ที่ pH ต่างๆ มีค่าที่แตกต่างกันที่ pH 2 7 และ 12 พบว่าที่ pH 7 ค่าการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำที่สุด (ภาพที่ 71) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่สภาวะกรดและด่างโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถละลายได้ดี ซึ่งความสามารถในการละลายนั้นเป็นคุณสมบัติขั้นต้นในการทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ซึ่งรวมถึงคุณสมบัติการอุ้มน้ำด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000) จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งความสามารถในการอุ้มน้ำเกิดจากการที่เปปไทด์มีหมู่ที่ชอบน้ำหันออกมาด้านนอกและอาจเป็นเพราะโปรตีนที่ถูกย่อยมีโมเลกุลเล็กลงทำให้สามารถกักเก็บน้ำได้น้อยลง (Diniz and Martin, 1997)



ภาพที่ 70 Foaming capacity และ Foam stability ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a, c) และฟลาโวไซม์ (b, d) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▒)

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน



ภาพที่ 71 การอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (▒)

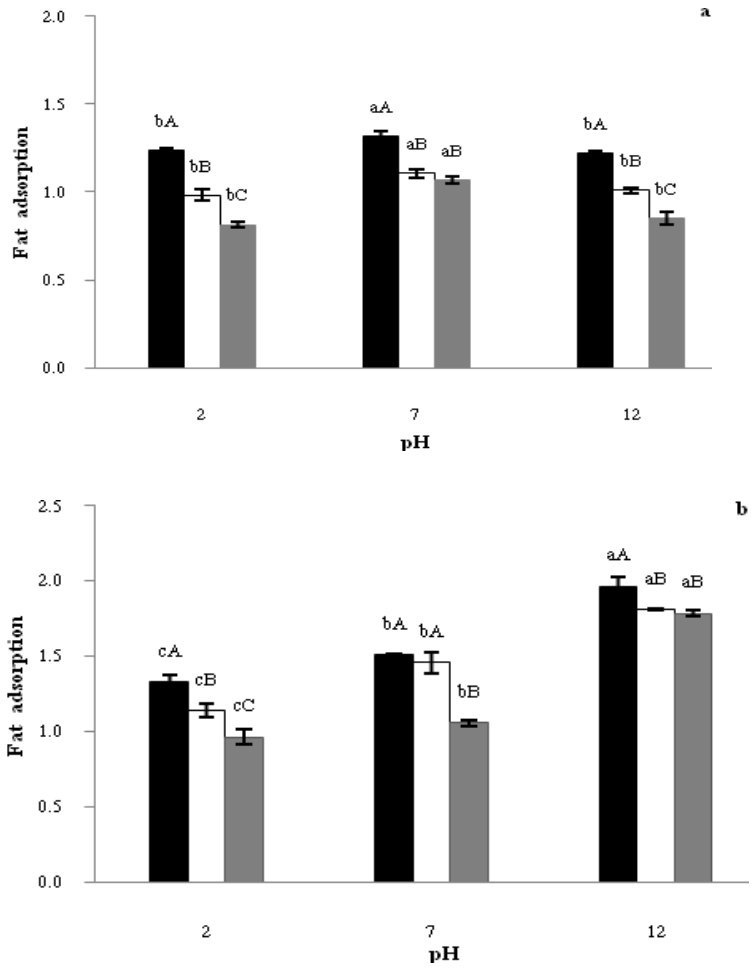
[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

4.3.6.5 การจับกับไขมัน

ความสามารถในการจับกับไขมันแสดงค่าของปริมาณน้ำมันที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น ขนาดของอนุภาคของโปรตีน (bluk density) (Kinsella, 1976) ระดับการย่อยสลายและความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรท (Kinsella, 1976) จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์มีค่าการจับกับไขมันสูงที่สุดที่ pH 7 รองลงมาคือที่ 12 และ 2 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 72) สำหรับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟ

ลาโวไซม์ที่ pH 12 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือที่ pH 2 และ 7 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) กลไกการจับกับการจับไขมันเกี่ยวกับการจับกับไขมันที่เกิดจากโครงสร้างทางกายภาพและขนาดอนุภาคของโปรตีน (bulk density) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายต่ำจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้สามารถจับกับไขมันได้ดี (Kinsella, 1976) Souissi และคณะ (2007) ได้อธิบายว่า กระบวนการย่อยสลายทำให้เปปไทด์ถูกปล่อยออกมาจากโปรตีน ซึ่งจะช่วยเสริมความยืดหยุ่นของโมเลกุล การย่อยเปปไทด์จำนวนมากทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตจับกับน้ำมันได้น้อยลง



ภาพที่ 72 การจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์ (a) และฟลาโวไซม์ (b) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 1 (■) 3 (□) และ 5 (■)

[a,b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่าง pH ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน

[A,B] แสดงความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระหว่างระดับการย่อยสลายที่ pH เดียวกัน

บทที่ 5
บทสรุป

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ตลอดจนระยะเวลาการย่อยสลายมีผลต่ออัตราการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุง ได้แก่ ถั่วหรั่ง ถั่วเหลือง และถั่วลิสง โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุงมีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน นอกสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งได้แก่ การละลาย การเกิดอิมัลชัล การเกิดฟอง การดูดซับน้ำและการจับกับไขมันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในจังหวัดพัทลุงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตาเมกซ์และฟลาโวไซม์ ขึ้นอยู่กับอัตราการย่อยสลาย ชนิดเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและพีเอชของระบบ ดังนั้นกิจกรรมการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วสายพันธุ์พื้นบ้านจังหวัดพัทลุงขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย และอาจสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองเป็นสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติในระบบอาหารได้

บรรณานุกรม

กองโภชนาการกรมอนามัย. 2547. ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.moc.go.th/opscenter/pt/Sangyod_index.htm [29 ตุลาคม 2555]

รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. 2545. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง. 2545. ข้าวสังข์หยดพัทลุง (ออนไลน์). สืบค้นจาก http:// www.ptl.brrd.brrd.in.th/web/index .php/2012-08-15-07-43-01 [29 ตุลาคม 2555]

สุปราณี มนูรักษ์ชินากร, วิสาขะ อนันธวัช และ ทนง เอี่ยวศิริ. 2545. โปรตีนในอาหาร (ออนไลน์)สืบค้นจาก http://www.nqf.agro.ku.ac.th/UP/e-courseware/supranee/food-protein/30.html [29 ตุลาคม 2555]

สำนักพัฒนาผลิตข้าว. 2551. ข้าวสังข์หยุดพัทลุง (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www2.oae.go.th/zone9/rice_songyod/information/soure_of_songyod.html [30 ตุลาคม 2555]

สำนักงานพาณิชย์จังหวัดพัทลุง. 2553. ความสำคัญและความเป็นมา (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.angyod.org [29 ตุลาคม 2555]

อัญชลินทร์ สังคำ และ ทศพร นามโฮง. 2547. การอุ้มน้ำและการละลาย (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.media.rmutt.ac.th/media/CBT/Science [29 ตุลาคม 2555]

บัญชา สุวรรณานนท์ และคณะ. 2542. อาหารเครื่องยาจีน. กรุงเทพฯ: บริษัทรีดเดอร์ส ไดเจสท์ (ประเทศไทย) จำกัด.

Adler-Nissen J. 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. (17thed.), Gaithersberg, Maryland: Association of Official Chemists.

Chiang W.D., Shih, C.J. and Chu, Y.H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. Food Chem. 65: 189-194.

Chen, H. M., Muramoto, K., Yamaguchi, F. Fujimoto and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from from peptide fragment found in digests of a soybean protein. J. Agric. Food Chem. 46: 49-53.

Chung S.K., Osawa T. and Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem. 61: 118–23.

Frankel, E.N., Huang, S.W. and Aeschbach, R. 1997. Antioxidant Activity of Green Teas in Different Lipid Systems. JAOCS. 74: 1309-1315.

Gordon, M. 2001. Antioxidants and food stability. In: J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (Eds.), Antioxidant in Food (pp. 7-21). New York, USA: CRC Press.

Hwang, J. Y., Shyu, Y. S. and Hsu, C. K. 2009. Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream. LWT-Food Sci Technol. 42: 312-318.

Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., Arun Sharma., 2009. Influence of degree of hydrolysison functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chem. 121: 178-184.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007a. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem. 102: 1317-1327.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K.D. and Shahidi, F. 2007b. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. Int. J. Food Sci. Technol. 43: 1019-1026.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Crit. Rev. Food Sci Nutri. 40: 43-81.

Li-Chan, E., Nakai, S. and Wood, D.F. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship of emulsifying properties. J. Food Sci. 49: 345.

Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H. and Suzuki N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chem. 75: 237–40.

Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26: 716-723.

Pena-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.

Quaglia, G. B. and Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. J. Food Sci. *55*: 1571-1573, 1619.

Robinson, H. W., and Hodgen, C. G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. J. Biol. Chem. 135: 707–725.

Slavin, M., Cheng, Z., Luther, M., Kenworthy, W. and Yu, L. 2009. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grow soybean lines with altered fatty acid profiles. Food Chem. 114: 20-27.

Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1981. Functional properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. J. Food Sci. 46: 71-74, 81.

Zhang, Tao., Yanhong Li., Ming Miao and Bo Jiang. 2011. Purification and characterisation of a newantioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. Food Chem.128: 28–33.