PRAWARUN AGRICULTURAL JOURNAL

https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index

บทความวิจัย

ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเวลาย่อยสลายต่อสมบัติทางเคมี – กายภาพของโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา

พัฒสุภา ธีรการุณวงศ์[1] พร้อมลักษณ์ สรรพ่อค้า[1*] ฉัตรภา หัตถโกศล[1] และ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์[2]

[1]คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภาควิชาโภชนวิทยา 420/1 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานครฯ 10400

[2]คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี 49 ซอยเทียนทะเล 25 ถนนบางขุนเทียน – ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานครฯ 10150

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 1 ตุลาคม 2564

แก้ไข: 11 ตุลาคม 2564

ตอบรับการตีพิมพ์: 3 พฤศจิกายน 2564

ตีพิมพ์ออนไลน์: 15 ธันวาคม 2564

คำสำคัญ

กากถั่วดาวอินคา

โปรตีนไฮโดรไลเซท

ฟลาโวไซม์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเวลาย่อยสลายต่อสมบัติทางเคมี – กายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา กากถั่วดาวอินคาหลังการสกัดน้ำมันมีความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 4.09, 74.19, 0.48, 7.56, 5.03, และ 8.64 ตามลำดับ ศึกษาภาวะการย่อยสลายของกากถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และเวลาย่อยสลายเป็น 0.5, 3, 6, และ 12 ชั่วโมง โดยภาวะที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคา คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 20 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และเวลาย่อยสลายเป็น 6 ชั่วโมง ที่ภาวะของการย่อยสลายนี้โปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และ ค่าสีเหลือง (b*) เท่ากับ 87.60 – 1.36 และ 5.84 ตามลำดับ รวมถึงมีระดับการย่อยสลาย ปริมาณผลผลิต ความสามารถในการละลายของโปรตีนและความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนเท่ากับร้อยละ 43.7, 62.8, 69.9 และ 96.2 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคามีค่าเท่ากับ 340.79 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม, 2,834.46 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม และ 808.16 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนผงชงดื่มในอนาคตต่อไป

บทนำ

ถั่วดาวอินคาเป็นพืชชนิดเดียวกันกับยางพารา สบู่ดำ และมันสำปะหลัง อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Plukenetia volubilis* L. ชื่อสามัญคือ Sacha inchi, Mountain peanut หรือ Inca peanut ปัจจุบันมีการนำมาปลูกและแปรรูปน้ำมันจากถั่วดาวอินคามากขึ้น กากถั่วดาวอินคาที่เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันของถั่วดาวอินคามักนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ยหมักหรือทิ้งไปโดยไม่ได้นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบในกากถั่วดาวอินคาที่เหลือจากการบีบน้ำมัน พบว่าในกากถั่วดาวอินคายังคงมีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญ ได้แก่ กรดไขมันที่จำเป็น (โอเมก้า 3, 6 และ 9 ปริมาณร้อยละ 2.66, 2.44 และ 0.57 ตามลำดับ) กรดอะมิโนจำเป็น (ไลซีน, ลิวซีน, ฮีสทิดีน และ ฟีนิลอะลานีน ปริมาณร้อยละ 17.85, 7.22, 9.33 และ 3.18 ตามลำดับ) ใยอาหารและโปรตีนปริมาณร้อยละ 11.06 และ 56.6 ตามลำดับ (Rawdkuen et al., 2018) ดังนั้นการนำกากถั่วดาวอินคาจากกระบวนการสกัดน้ำมันนี้มาเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์จึงเป็นที่สนใจในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากยังคงมีสารอาหารที่จำเป็นและคุณค่าทางโภชนาการสูง

*Corresponding author

E-mail address: promluck@yahoo.com (P. Sanporkha)

Online print: 15 December 2021 Copyright © 2021. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University.

สามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารฟังก์ชันที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น แต่การรับประทานอาหารประเภทถั่วอาจทำให้เกิดอาการท้องอืดดูดซึมได้ยากในลำไส้เล็ก การนำโปรตีนไปผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นไดเพปไทด์และไตรเพปไทด์จะทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมโปรตีนได้ดีขึ้น (Borges et al., 2015)

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสเป็นการใช้ภาวะการย่อยสลายที่ไม่รุนแรง และไม่ทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง 3–chloropropane–1, 2–diol (3–MCPD) เมื่อเทียบกับการย่อยสลายด้วยกรด และยังสามารถกำหนดขอบเขตของการย่อยสลายได้เพื่อให้ได้สมบัติเชิงหน้าที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นอาหารฟังก์ชัน (Lee et al., 2015) ซึ่งเอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นหนึ่งในทางเลือกที่ดีสำหรับการย่อยสลายโปรตีน เนื่องจากฟลาโวไซม์ประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนโดเพปทิเดส (Endopeptidases) และ เอกโซเพปทิเดส (Exopeptidases) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ได้ทั้งภายในสายและปลายสายของโปรตีน นิยมนำมาใช้ลดความขมของโปรตีนไฮโดรไลเซท เอนไซม์นี้จะให้โปรตีนที่มีเพปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงสุด เนื่องจากเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและพีเอชที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทการเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และภาวะการย่อยสลายที่เหมาะสมจะทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีคุณภาพ (Clare et al., 2000) ซึ่งการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยการใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก เนื่องจากทำให้ได้โปรตีนที่มีเพปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูง สามารถดูดซึมโปรตีนเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งมีงานวิจัยพบว่าจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 51.8 และมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเพิ่มขึ้นร้อยละ 23.9 เมื่อเปรียบเทียบกับกากดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (Limjutitham et al., 2021) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเวลาย่อยสลายต่อสมบัติทางเคมี – กายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โปรตีนผงชงดื่ม

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียมกากถั่วดาวอินคาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำกากถั่วดาวอินคาจากบริษัท นิเคโอะ คอร์ปอเรชั่น จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ มาต้มในน้ำเดือด 20 นาที และอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อกำจัดกลิ่น Yuenyongputthakarn et al. (2017) บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (รุ่น SG – 400 – 03, Dxfill Machine, China) และสกัดโดยการแช่ในสารละลายเฮกเซน (Food grade 30 – 50%, STN Chemical Co.,Ltd., Thailand) อัตราส่วนกากถั่วดาวอินคาต่อสารละลายเฮกเซน 1:10 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ภายใต้ภาวะสุญญากาศ (สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง หรือจนกระทั่งมีไขมันเหลือร้อยละ 1) และระเหยสารละลายเฮกเซนออกจากกากถั่วดาวอินคาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Laohakunjit et al., 2011) จากนั้นนำกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการสกัดน้ำมันมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช บรรจุใส่ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้ภาวะสุญญากาศและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และ คาร์โบไฮเดรต โดยวิธี AOAC (1)

การย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

วิธีการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทดัดแปลงมาจาก Laohakunjit et al. (2011) โดยนำกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการสกัดน้ำมัน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (ความดัน 15 – 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7 (รุ่น CyberScan pH 510, Eutech Instruments Pte Ltd., Singapore) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ และย่อยสลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้พร้อมต่อการทำงานของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme® ยี่ห้อ Sigma จากบริษัท Sigma – Aldrich) จากนั้นเตรียมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 (โดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อน้ำหนักกากถั่วดาวอินคา) ลงในขวดรูปชมพู่ ปิดฝาขวดและตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แปรเวลาในการย่อยสลายที่ 0.5, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน (95 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น UNIVERSAL 320 / 320R, Hettich Singapore (S.E.A.) Pte Ltd., Singapore) ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บรักษาที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์สมบัติทางทางเคมี – กายภาพต่อไป

วิเคราะห์สมบัติทางเคมี – กายภาพ

1. ค่าสี (The color value)

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาใส่ถ้วยแก้วประมาณ 1/4 ของถ้วย หรือจนกว่าตัวอย่างครอบคลุม ก้นถ้วย วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter (Hunter Lab รุ่น ColorFlex EZ, Hunter Associates Laboratory, Inc., USA) ในระบบ CIE L*a*b* และ hue angle โดยค่า L* คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 0 (มืดดำ) ถึง 100 (สว่างขาว) ค่า a* คือ ค่าระหว่างสีแดง (+) และเขียว (-) ส่วนค่า b* คือ ค่าระหว่างสีเหลือง (+) และน้ำเงิน (-) แล้วนำค่าที่ได้

คำนวณหาค่าความแตกต่างของสี (ΔE) เทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ไม่ได้ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นตัวอย่างควบคุมดังสมการ

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

2. ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis)

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาจากทุกภาวะการย่อยสลายมาวิเคราะห์ร้อยละระดับการย่อยสลายโดยดัดแปลงจากวิธีของ Kaewka et al. (2009) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาจากทุกภาวะการย่อยสลายมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ตกตะกอนโปรตีนโดยเติมร้อยละ 20 ของกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacitic acid: TCA) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl method และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \text{ร้อยละ 20 TCA soluble – N} \times \frac{100}{\text{Total – N}}$$

โดยที่ TCA soluble – N คือ ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ใน ร้อยละ 20 TCA และ Total – N คือร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ

3. ผลผลิต (Yield)

การวิเคราะห์ปริมาณร้อยละของผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา โดยดัดแปลงจากวิธีของ Songsaeng (2007) โดยคำนวณปริมาณร้อยละของผลผลิตจากน้ำหนักของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาที่ได้ จากการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (รุ่น R100, BÜCHI Labortechnik AG., Switzerland) เทียบกับน้ำหนักกากถั่วดาวอินคาเริ่มต้นตามสูตรดังนี้

ปริมาณร้อยละผลผลิต= (น้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเซทข้นหนืดที่ได้/น้ำหนักของกากถั่วดาวอินคาเริ่มต้น) x 100

4. ความสามารถในการละลายโปรตีน (Protein solubility)

วิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการละลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาโดยดัดแปลงวิธีของ Laohakunjit et al. (2011) และคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ละลายในร้อยละ 20 ของกรดไตรคลอโรอะซิติก และปริมาณโปรตีนทั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง สามารถคำนวณความสามารถในการละลายโปรตีน โดยใช้สูตรดังนี้ ร้อยละความสามารถในการละลายโปรตีน = (ปริมาณโปรตีนละลายในร้อยละ 20 TCA/ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง) × 100

5.ความสามารถในการย่อยโปรตีน (Protein digestibility)

วิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการย่อยโปรตีนจากการจำลองการย่อยในหลอดทดลอง (จำลองการย่อยส่วนลำไส้เล็ก) ด้วยการใช้เอนไซม์เพปซินและทริปซิน โดยการวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Xia et al. (2012) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกาก ถั่วดาวอินคา 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 1.5 และเติมเอนไซม์เพปซินต่อโปรตีนไฮโดรไลเซทที่อัตราส่วน 1:100 (โดยน้ำหนัก) ใส่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และคำนวณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method (ร้อยละโปรตีนคำนวณจากร้อยละไนโตรเจน × 6.25)

6.ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีของ Faller et al. (2009) โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 30 ไมโครลิตร กับสารละลายโฟลินซิโอ–เคาทูรีเอเจนต์ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่น (อัตราส่วนโฟลินต่อน้ำเท่ากับ 50 : 50) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV microplate spectrophotometer (EPOCH2, BioTek Instruments, USA) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐานปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกในน้ำหนักตัวอย่างแห้งปริมาณ 1 กรัม

7.ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant efficacy)

การตรวจประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Fukumoto et al. (2000) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 22 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (DPPH ละลายในเมทานอลร้อยละ 80) ความเข้มข้น 150 ไมโครโมล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV microplate spectrophotometer (EPOCH2, BioTek Instruments, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 0.01 – 1.28 มิลลิโมล รายงานผลเป็นมิลลิโมลของโทรลอกซ์ ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม

การตรวจประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงจากวิธี ของ Benzie et al. (1999) โดยเตรียมสารละลาย

FRAP reagent ด้วยการผสมโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมล ที่มีค่าพีเอช 3.6 สารละลายทีพีทีแซด (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล กับสารละลายไอรอน (II) คลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล ในอัตราส่วน 10:1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ จากนั้นนำสารผสมที่ได้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมลงในสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV microplate spectrophotometer (EPOCH2, BioTek Instruments, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาค่า FRAP โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้น 6.25 – 1000 ไมโครโมล ปริมาณที่ได้แสดงหน่วยไมโครโมลของโทรลอกซ์ ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วดาวอินคาและสมบัติทางเคมี – กายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความแปรปรวน (ANOVA) คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 การทดสอบ T – test ใช้สำหรับการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของกากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลายและโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน (Table 1) พบว่ากากถั่วดาวอินคาประกอบด้วยความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 4.09, 74.19, 0.48 7.56, 5.03 และ 8.64 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยกากถั่วดาวอินคาที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูง เหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนตั้งต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท เนื่องจากแหล่งโปรตีนตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทควรมีองค์ประกอบโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 ประกอบกับมีปริมาณไขมันต่ำ (ประมาณร้อยละ 1) เนื่องจากไขมันสามารถทำปฏิกิริยากับเพปไทด์สายสั้น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและตกตะกอนได้ นอกจากนี้ไขมันยังสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหืนได้ (Zheng et al., 2015)

Table 1 Proximate compositions of defatted Sacha inchi pressed cake

Compositions (%)	Defatted Sacha inchi pressed cake
Moisture	4.09±0.05
Protein	74.19±0.59
Fat	0.48±0.06
Crude fiber	7.56±0.17
Ash	5.03±0.10
Carbohydrate	8.64±0.79

These results were expressed as mean ± standard deviation (SD) from triplicatedetermination.

ลักษณะปรากฏและค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

เมื่อวิเคราะห์ค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Table 2) พบว่าค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) มีค่าอยู่ระหว่าง 84.66, ถึง 89.97 – 0.88 ถึง – 1.57 และ 1.89 ถึง 7.17 ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเวลาในการย่อยสลายส่งผลต่อค่าความสว่าง ค่าสีแดง และค่าสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยค่าความสว่างและค่าสีเหลืองจะเพิ่มขึ้นแต่ค่าสีแดงจะลดลงเมื่อเวลาการย่อยสลายนานขึ้น เมื่อนำค่า L*, a* และ b* มาคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงของสี (ΔE) โดยเทียบจากกากถั่วดาวอินคาที่ไม่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (No enzyme hydrolysis) พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเวลาในการย่อยสลายส่งผลต่อค่าการเปลี่ยนแปลงของสี และค่าเฉดสี (Hue angle) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งเมื่อเวลาการย่อยสลายนานขึ้นแสดงให้เห็นถึงค่าการเปลี่ยนแปลงของสีที่เพิ่มขึ้นแต่ค่าเฉดสีลดลง จึงสามารถแสดงสีที่ปรากฏโดยแท้จริงจากค่าเฉดสี ที่อยู่ในช่วงระหว่าง 97.75 – 116.56 แสดงถึงเฉดสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาตรงกับช่วงสีเหลือง ทั้งนี้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคามีสีเหลืองเข้มกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากผลของการตัดพันธะเพปไทด์ของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่สามารถตัดได้ทั้งภายในและปลายสายของโปรตีน ทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระ (ไลซีน ไกลซีน ทริปโตเฟน และไทโรซีน) ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลเซท (Hellwig et al., 2014) หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยา Maillard reaction กับน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นองค์ประกอบในกากถั่วดาวอินคา ส่งผลให้ได้สารที่มีสีน้ำตาลเข้มขึ้น (Eskin et al., 2013)

ระดับการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

ระดับการย่อยสลายแสดงถึงสัดส่วนร้อยละของเพปไทด์ที่ได้รับจากการย่อยสลายต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลายส่งผลต่อการ

เพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในช่วง 0.5 ถึง 6 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วดังแสดงใน Figure 1 และ Figure 2 เนื่องจากถั่วดาวอินคามีโปรตีนอัลบูมินซึ่งเป็นโปรตีนประเภทที่ละลายน้ำได้ดี ซึ่งโปรตีนที่ละลายน้ำได้มีปริมาณ 1 ใน 3 ของโปรตีนในถั่วดาวอินคาทั้งหมด ดังนั้นกากถั่วดาวอินคาจึงย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาแรก ๆ ของการเกิดปฏิกิริยา (Su et al., 2011) โดยที่ภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 20 มีค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตสูงที่สุด คือ ร้อยละ 43.7 และ 62.8 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ย่อยสลายกากถั่วดาวอินคาเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนถึง 12 ชั่วโมง พบว่าค่าปริมาณผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซทเริ่มมีแนวโน้มคงที่ เนื่องจากกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดีที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จนหมด ดังนั้นเอนไซม์จึงไม่สามารถย่อยสลายได้อีกทำให้สารตั้งต้นในปฏิกิริยาไม่เพียงพอต่อเอนไซม์หรือเกิดการยับยั้งผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) ส่งผลให้ค่าระดับการย่อยสลายคงที่ (Haslaniza et al., 2014) การย่อยสลายโปรตีนกากถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ภาวะความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าร้อยละการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตที่สูง เนื่องจากเอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นเอนไซม์ชนิดผสมระหว่าง Endo – exo peptidases ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ได้ทั้งภายในสายและปลายสายของโปรตีน ทำให้มีระดับการย่อยสลาย เพปไทด์สายสั้นๆหรือกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าเอนไซม์ที่เป็น Endopeptidases ที่ย่อยสลายภายในสายเพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongimpong et al. (2016) ที่ศึกษาการย่อยสลายกากทานตะวันด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าในช่วงเวลาการย่อยที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง ค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่หลังจาก 6 ชั่วโมง ไปจนถึง 18 ชั่วโมง ดังนั้นภาวะความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงเหมาะสมสำหรับการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม

Table 2 Color values of Sacha inchi pressed cake hydrolysate from various enzymatic hydrolysis conditions

Concentration of Flavourzyme enzyme (%)	Time (h.)	Color				
		L*	a*	b*	ΔE	h*
0 (No enzyme hydrolysis)	0.5	89.94±0.06^{a}	-0.89±0.02^{a}	1.89±0.16^{f}	-	115.50±1.26^{a}
	3	89.94±0.05^{a}	-0.88±0.03^{a}	1.91±0.15^{f}	-	114.49±2.90^{a}
	6	89.95±0.08^{a}	-0.90±0.03^{a}	1.89±0.14^{f}	-	116.56±0.70^{a}
	12	89.97±0.04^{a}	-0.89±0.02^{a}	1.91±0.22^{f}	-	114.71±2.51^{a}
5	0.5	87.52±0.23^{c}	-1.10±0.15^{b}	3.45±0.07^{d}	2.97±0.52^{f}	108.92±0.07^{a}
	3	86.62±0.29^{d}	-1.34±0.04^{c}	3.26±0.02^{d}	3.66±0.70^{b}	114.11±0.21^{a}
	6	85.70±0.31^{e}	-1.40±0.01^{d}	4.55±0.03^{c}	5.10±0.14^{d}	107.16±0.01^{ab}
	12	84.72±0.17^{f}	-1.40±0.02^{d}	4.96±0.03^{c}	6.21±0.10^{b}	105.58±0.01^{b}
10	0.5	88.15±0.18^{b}	-1.17±0.10^{b}	2.75±0.13^{e}	2.06±0.52^{g}	111.29±0.03^{a}
	3	87.46±0.26^{c}	-1.25±0.04^{bc}	4.73±0.03^{c}	3.88±0.42^{e}	107.11±0.06^{ab}
	6	86.65±0.11^{d}	-1.36±0.02^{c}	4.63±0.02^{c}	4.39±0.14^{d}	106.14±0.06^{b}
	12	85.72±0.12^{e}	-1.57±0.04^{e}	4.92±0.06^{c}	5.38±0.22^{d}	105.52±0.06^{b}
15	0.5	87.32±0.21^{c}	-1.17±0.12^{b}	2.91±0.01^{e}	2.87±0.52^{f}	110.38±0.02^{a}
	3	86.35±0.08^{d}	-1.17±0.01^{b}	3.74±0.03^{d}	4.09±0.51^{e}	107.51±0.01^{ab}
	6	85.84±0.10^{e}	-1.38±0.03^{c}	5.75±0.03^{b}	5.75±0.19^{c}	103.47±0.05^{c}
	12	85.25±0.09^{e}	-1.47±0.11^{d}	7.17±0.03^{a}	7.25±0.21^{a}	97.75±0.06^{d}
20	0.5	87.52±0.32^{c}	-1.19±0.04^{b}	4.45±0.11^{c}	2.87±0.52^{f}	104.93±0.05^{b}
	3	87.23±0.16^{c}	-1.25±0.03^{bc}	5.45±0.02^{b}	4.09±0.51^{e}	102.83±0.04^{c}
	6	85.60±0.23^{e}	-1.36±0.02^{c}	5.84±0.05^{b}	5.75±0.19^{c}	103.80±0.46^{c}
	12	84.66±0.29^{f}	-1.53±0.05^{e}	5.27±0.05^{b}	7.25±0.21^{a}	98.74±0.07^{d}

The results are given as mean ± SD from triplicate determination. $^{a-g}$ Means followed by different letters within the same column indicate means significant differences ($p \leq 0.05$).

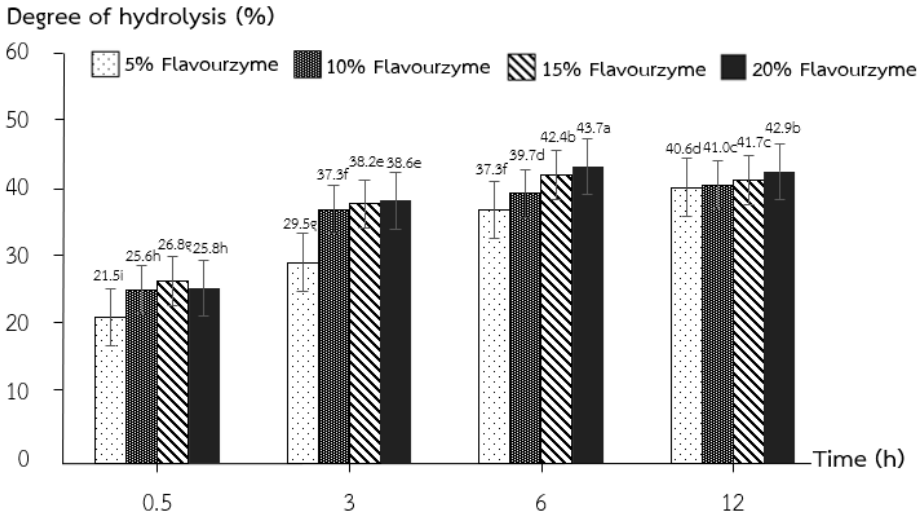

Figure 1 Effect of Flavourzyme enzyme concentration & hydrolysis time on degree of hydrolysis of Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate. Line on data bars show SE of the mean while data bars with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT.

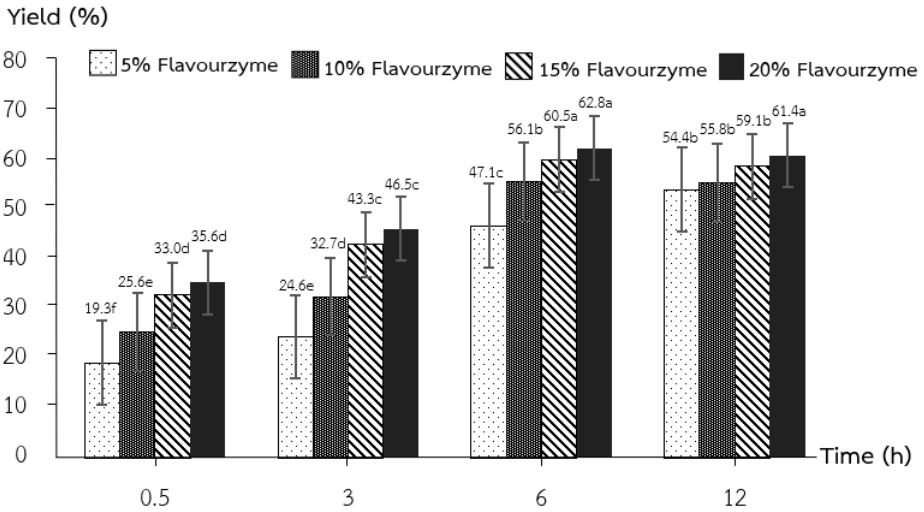

Figure 2 Effect of Flavourzyme enzyme concentration & hydrolysis time on yield of Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate. Line on data bars show SE of the mean while data bars with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT.

ความสามารถในการละลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคา

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติการทำงานที่สำคัญที่สุดของโปรตีนไฮโดรไลเซท เนื่องจากสมบัติเชิงหน้าที่ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับความสามารถในการละลาย การเปรียบเทียบการละลายสำหรับโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่างร้อยละ 5 ถึง 20 และเวลาในการย่อยสลายช่วง 0.5 ถึง 12 ชั่วโมง (Figure 3) แสดงค่าความสามารถในการละลายสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาเพิ่มขึ้น โดยที่ภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ร้อยละ 20 และเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าการละลายโปรตีนสูงสุด คือ ร้อยละ 69.9 ซึ่งแตกต่างภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ความสามารถในการละลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นสาเหตุมาจากการย่อยสลายของเอนไซม์ทำให้โมเลกุลโปรตีนคลี่ออกและอาจสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดีขึ้น (Paraman et al., 2007) โดยเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ระดับของการย่อยสลายและปริมาณผลผลิตจะเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าความสามารถในการละลายโปรตีนสูงขึ้น ซึ่งผลมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yuwanti et al. (2020) ที่มีค่าการละลายโปรตีนจากการย่อยสลายกากถั่วเขียวร้อยละ 69 ที่ภาวะเหมาะสม คือ ความเข้มข้นเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 20 เวลา 6 ชั่วโมง เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนสามารถลดสารต้านโภชนาการ เช่น แทนนิน, ซาโปนิน และกรด

ไฟติก เป็นต้น โดยมักจะมีอยู่ในอาหารประเภทถั่วและ ธัญชาติชนิดต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อการละลายโปรตีนในน้ำและความสามารถในการย่อยโปรตีนในลำไส้ ดังนั้นความสามารถในการละลายโปรตีนของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุด

ความสามารถในการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา

ความสามารถในการย่อยได้ในหลอดทดลองของกากถั่วดาวอินคาและโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Kjeldahl ดังผลที่แสดงไว้ใน Figure 4 ค่าความสามารถในการย่อยโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซท กากถั่วดาวอินคาจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ร้อยละ 5 ถึง 20 และเวลาในการย่อยสลายที่ 0.5 ถึง 12 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยภาวะที่เหมาะสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา คือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าความสามารถในการย่อยโปรตีนสูงสุด (ร้อยละ 96.2) ในขณะที่ช่วงเวลาการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองของกากถั่วดาวอินคา พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) และมีค่าสูงสุดที่ร้อยละ 52.7

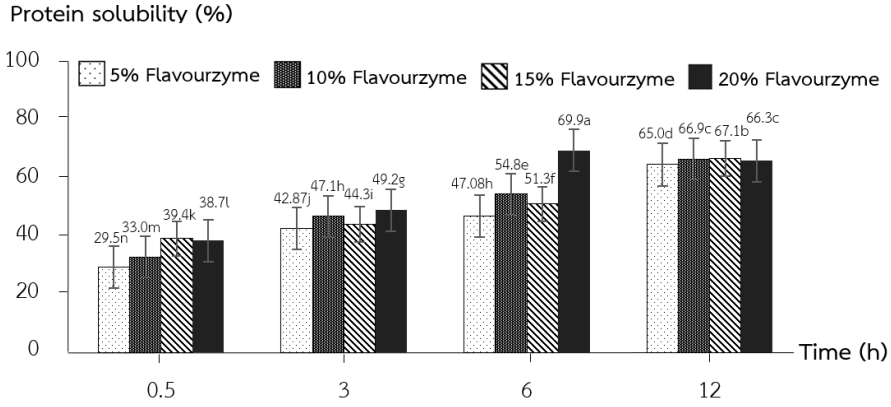

Figure 3 Effect of Flavourzyme enzyme concentration & hydrolysis time on protein solubility of Sacha inchi pressed cake hydrolysate. Line on data bars show SE of the mean while data bars with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT.

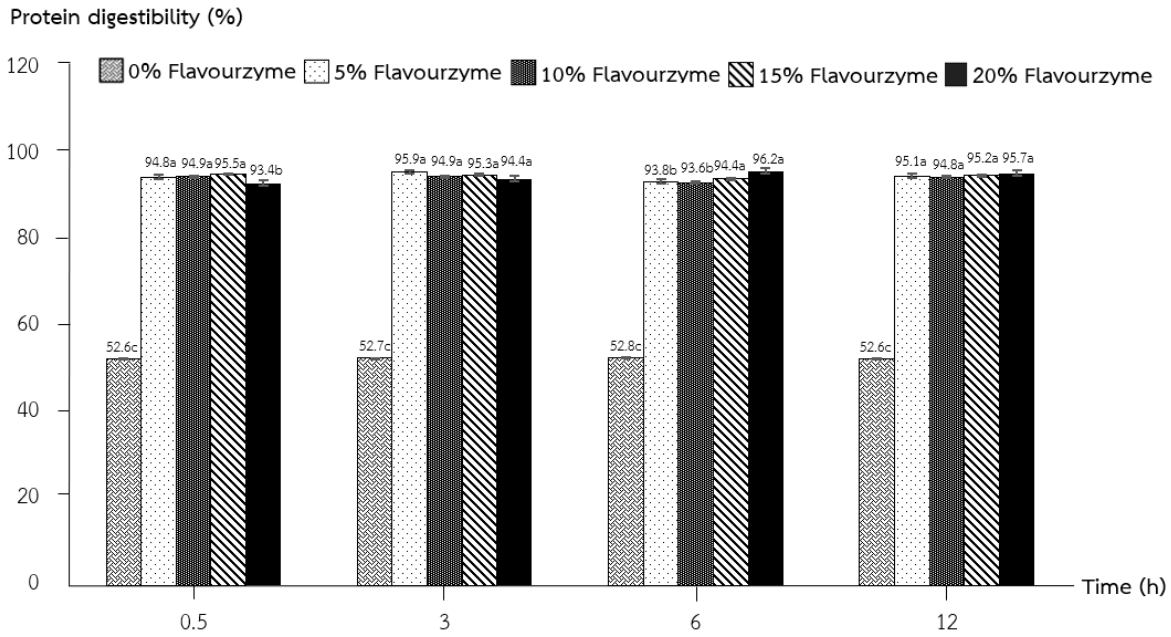

Figure 4 Effect of Flavourzyme enzyme concentration & hydrolysis time on protein digestibility of Sacha inchi pressed cake & Sacha inchi pressed cake hydrolysate. Line on data bars show SE of the mean while data bars with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT.

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rawdkuen et al. (2018) ที่รายงานค่าความสามารถในการย่อยโปรตีนของกากถั่วดาวอินคา โดยใช้เอนไซม์ทริปซินและเพปซิน พบว่าจะช่วยให้ความสามารถในการย่อยเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 50 การย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาส่งผลให้คุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วดาวอินคาเพิ่มขึ้น (Chinsan et al., 2017) โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคามีความสามารถในการย่อยและดูดซึมได้เพิ่มขึ้น มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย

ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคาและกากดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย

การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาและกากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลายแสดงใน Table 3 โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์เข้มข้น ร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าระดับการย่อยสลาย ปริมาณผลผลิต ความสามารถในการละลายของโปรตีนและความสามารถในการย่อยโปรตีนสูงสุด ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคา (808.16 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม) สูงกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (246.93 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคามีความสามารถในการทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนมากกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย และพบว่ากิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย เนื่องจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จะเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นหรือที่ระดับการย่อยสลายสูงสุด (Jamdar et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Li et al., (2008) ที่ศึกษากิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าความสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของ เพปไทด์ เมื่อเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Ajibola et al. (2011) ได้รายงานว่าการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ยังเกี่ยวข้องกับเพปไทด์ส่วนที่ไม่ชอบน้ำโดยตรงอีกด้วย ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการลดเฟอร์ริก (Fe^{3+}) เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ผ่านการบริจาคอิเล็กตรอน จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคา (794.89 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (2,834.46 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัม) เนื่องจากการผลิตโปรตีนไฮโดรเซทในช่วงระหว่างกระบวนการย่อยสลายจะมีการผลิตเพปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระมากมาย ซึ่งปริมาณเพปไทด์สูงจะมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดระดับ และองค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็ก ซึ่งส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Wu et al., 2003) การหาสารประกอบฟีนอลซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถหาได้จากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วดาวอินคามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 340.79 มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัม ซึ่งมากกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อย (117.53 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม) เนื่องจากปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดเกิดจากการคลี่ออกของโปรตีนจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกหลุดออกมาได้มากขึ้น และจากรายงานการวิจัยของ Rawdkuen et al. (2018) พบว่ากากถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ที่เนื้อเยื่อชั้นนอกของเมล็ดมากกว่าชั้นของเอนโดสเปิร์ม นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับค่าระดับการย่อยสลายและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การย่อยสลายกากถั่วดาวอินคาเกิดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก

Table 3 Total phenolic contents & antioxidant activities of Sacha inchi pressed cake & Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate

Antioxidants values	Sacha inchi pressed cake	Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate
TPC (mg GAE/100g)	117.53±1.17[b]	340.79±1.70[a]
DPPH (μmolTE/100g)	246.93±1.32[b]	808.16±3.19[a]
FRAP (μmol TE/100g)	794.89±0.88[b]	2,834.46±2.78[a]

The results showed mean ± standard deviations of triplicate determination. [a – b]Means followed by different letters within the same row indicate means significant differences ($p \leq 0.05$).

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีความสามารถในการละลายของโปรตีนและความสามารถในการย่อยของโปรตีนที่สูง ซึ่งแสดงถึงความสามารถในดูดซึมโปรตีนเข้าสู่ร่างกายได้สูงด้วยเช่นกัน ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้

สรุปผลการวิจัย

ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ คือ การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 20 และเวลาสำหรับการย่อยสลาย 6 ชั่วโมง ซึ่งที่ภาวะนี้ให้ค่าร้อยละระดับการย่อยสลาย ปริมาณผลผลิต ความสามารถในการละลายของโปรตีน และความสามารถในการย่อยของโปรตีนสูงสุด โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคา มีค่าร้อยละความสามารถในการย่อยโปรตีนและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วดาวอินคาจึงมีโอกาสในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนผงชงดื่มที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ดียิ่งขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและนักวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (RRi) ปี 2562 และ บริษัท นิเคโอะ คอร์ปอเรชั่น จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) สำหรับการเข้าใช้สถานที่และปฏิบัติงานการเพื่อศึกษาวิจัยและทดลอง

References

Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N., & Aluko, R.E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (Sphenostylis stenocarpa) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685–6702.

AOAC, G. (2016). Official methods of analysis of AOAC International. *Rockville, MD: AOAC International*, ISBN: 978–0–935584–87–5.

Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids & modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power & ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.

Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(12), 727–741.

Chinsan, S., Yunyonputtakarn, V., & Krasaerchon, N. (2017). Value added of Sacha inchi by using nut meal & leaf to produce valuable products. (Master's thesis). *Burapha University, Faculty of Science*.

Clare, D.A., & Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy science*, 83(6), 1187–1195.

Eskin, N.A.M., Shahidi, F. (2013). Browning reaction in foods. In. *Biochemistry of Foods*, *3rd ed*, 245–287.

Faller, A.L.K., & Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity & polyphenol content of organic & conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, 42(1), 210–215.

Fukumoto, L.R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant & prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604.

Haslaniza, H., Maskat, M. Y., Aida, W., & Mamot, S. (2014). Process development for the production of protein hydrolysate from cockle (Anadara granosa) meat wash water. *Sains Malaysiana*, 43(1), 53–63.

Hellwig, M., Henle, T. (2014). Baking, ageing, diabetes: A short history of the Maillard reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(39), 10316–10329.

Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity & ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184.

Kaewka, K., Therakulkait, C., & Cadwallader, K. R. (2009). Effect of preparation conditions on composition & sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *Journal of Cereal Science*, 50(1), 56–60.

Laohakunjit, N., Phetaveeporndet, P., Kerdchoechuen, O., & Ratanakhanokchai, K. (2011). Flavoring Agent Produced from Mungbean Meal by Protease. *KMUTT Research & Development Journal*, 34(2), 128–145.

Lee, B.Q., & Khor, S.M. (2015). 3–Chloropropane–1, 2–diol (3–MCPD) in soy sauce: A review on the formation, reduction, & detection of this potential carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 14(1), 48–66.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant & free radical–scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444–450.

Limjutitham, N, Tantanarat, K. (2021). Effects of Protein Hydrolysate from Sacha Inchi (Plukenetia Volubilis L.) on Enzyme Inhibition of Angiotensin–Converting Enzyme & Dipeptidyl–Peptidase 4. *The National Graduate Research Conference 22nd*, 22(9), 429–436.

Paraman, I., Hettiarachchy, N. S., Schaefer, C., & Beck, M. I. (2007). Hydrophobicity, solubility, & emulsifying properties of enzyme–modified rice endosperm protein. *Cereal Chemistry*, 84(4), 343–349.

Rawdkuen, S., Rodzi, N., & Pinijsuwan, S. (2018). Characterization of sacha inchi protein hydrolysates produced by crude papain & Calotropis proteases. *LWT–Food Science & Technology Journal*, 98, 18–24.

Selamassakul O. (2017). Characterization of Bioactive & Flavor Peptides from Cereal Protein Hydrolysate Fractions with Proteolytic Enzymes. *(Master's thesis). King Mongkut's University of Technology Thonburi, Division of Biochemical Technology*.

Songsaeng, N. (2007). Production of seafood flavoring from protein from mung bean meal by protease enzyme. (Master's thesis). *King Mongkut's University of Technology Thonburi, Division of Biochemical Technology*.

Su, G., Cui, C., Zheng, L., Yang, B., Ren, J. & Zhao, M. (2012). Isolation & Identification of Two Novel Umami & Umami–Enhancing Peptides from *Peanut Hydrolysate by Consecutive Chromatography & MALDI–TOF/TOF MS, Food Chemistry*, 135(2), 479–485.

Thongimpong, P., Laohakunjit, N. & Kerdchoechuen, O. (2 0 1 6). Antioxidant & Functional Properties of Extracted Sunflower Proteins by *Bromelain & Flavourzyme®. KMUTT Research & Development Journal*, 39(4), 565–582.

Wu, H.C., Chen, H.M., & Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids & peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). *Food Research International*, 36(9–10), 949–957.

Xia, N., Wang, J. M., Gong, Q., Yang, X. Q., Yin, S. W., & Qi, J. R. (2012). Characterization & In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme–assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 482–489.

Yuenyongputthakarn, W, Chinsan, S, Kranchol, N. (2017). A Study on Potential Application of Sacha Inchi Oil Extraction By–product in Functional Food Product Development. *Food Chemistry*, 140, 1–99.

Yuwanti, S., Ahmadi M.B., Afsari Y.L. (2020). The anti hypertensive nutraceuticals of Vigna sp bean protein hydrolized by alcalase & Flavourzyme. *Journal of Functional Food & Nutraceutical*, 31, 63–73.

Zheng, L., Zhao, Y., Xiao, C., Sun–Waterhouse, D., Zhao, M., & Su, G. (2015). Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour & peanut protein isolate by *Flavorzyme. Food Chemistry*, 168, 100–106.

Research article

Effect of flavourzyme concen tration & hydrolysis time on physico –chemical properties of sacha inchi pressed cake protein hydrolysate

Patsupa Teeragaroonwong[1] Promluck Sanporkha[1*] Chatrapa Hudthagosol[1] and Natta Laohakunjit[2]

[1*]*Department of Nutrition, Faculty of Public Health, Mahidol University Ratchawithi Road Thung Phayathai Sub – district Ratchathewi District, Bangkok 10400*
[2]*School of Bioresources & Technology, King Mongkut's University of Technology Soi Thian Thale 2 Bang Khun Thian Chai Thale Road Tha Kham Bang Khun Thian Bangkok 10150*

ARTICLE INFO

Article history
Received: 1 October 2021
Revised: 11 October 2021
Accepted: 3 November 2021
Online published: 15 December 2021

Keyword
Sacha inchi pressed cake
Protein hydrolysate
Flavourzyme

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effect of Flavourzyme concentration and hydrolysis time on physico–chemical properties of Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate. The moisture, protein, fat, crude fiber, ash and carbohydrate of Sacha inchi pressed cake after oil extraction were 4.09%, 74.19%, 0.48%, 7.56%, 5.03% and 8.64%, respectively. The enzyme concentration for hydrolysis of Sacha inchi pressed cake was varied at 5, 10, 15 and 20% (w/w) & hydrolysis time was varied at 0.5, 3, 6 and 12 h. The optimal condition for producing protein hydrolysate from Sacha inchi pressed cake was 20% Flavourzyme concentration (w/w) and hydrolysis time of 6 h. The Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate at this hydrolysis condition showed the lightness (L*) redness (a*) & yellowness (b*) of 87.60 – 1.36, & 5.84, respectively. Including the degree of hydrolysis, yield, protein solubility and protein digestibility were 43.7%, 62.8%, 69.9% and 96.2%, respectively. Moreover, the total phenolic content and antioxidant activity by FRAP and DPPH of the Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate were 340.79 mg GAE/100g, 2,834.46 µmolTE/100g and 808.16 µmolTE/100g, respectively. In addition, the antioxidant activity of the Sacha inchi pressed cake protein hydrolysate was higher than Sacha inchi pressed cake. Thus, the Sacha inchi pressed cake protein hydrolysates will be developed to protein drink mix products in the future.

*Corresponding author
E-mail address: promluck@yahoo.com (P. Sanporkha)
Online print: 15 December 2021 Copyright 2021 © 2021. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University.