ภาคผนวก

ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน

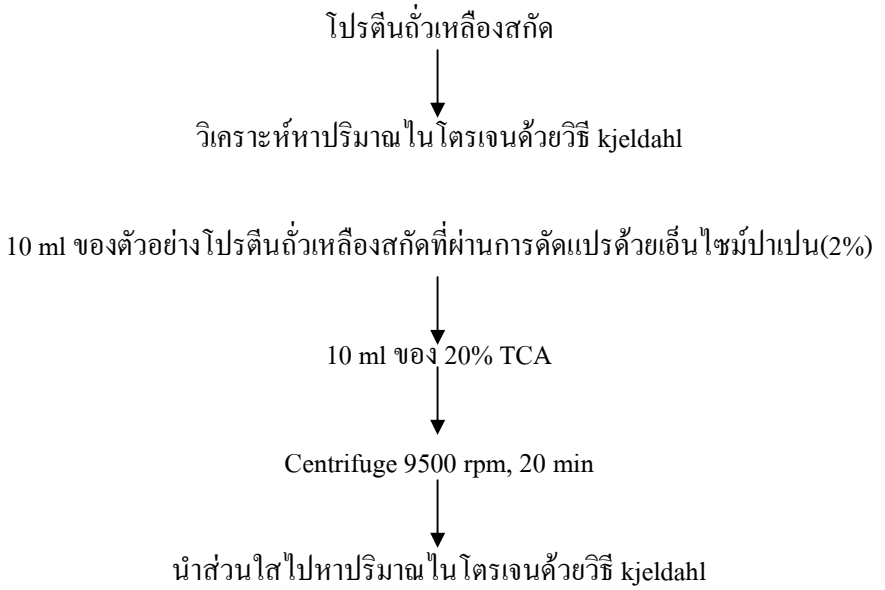
ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน

ค ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

ภาคผนวก ก
การทดสอบสมบัติของโปรตีน

การทดสอบสมบัติของโปรตีน

1. ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ (Degree of hydrolysis) ตามวิธีของVoutsinas และคณะ,1983

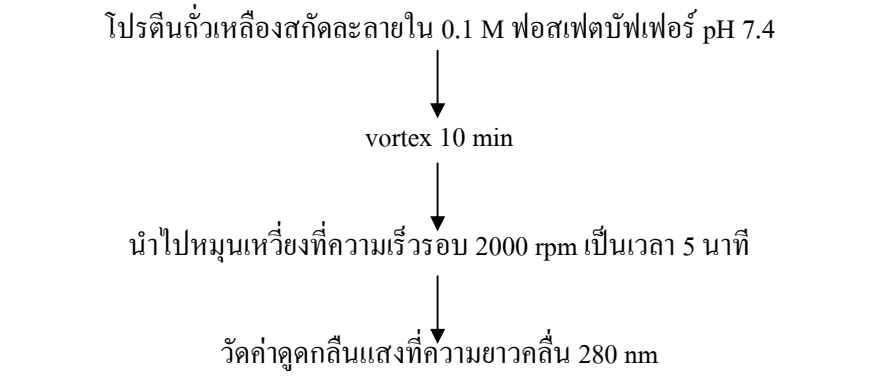


ภาพที่ ก1 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์

นำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ % DH (degree of hydrolysis) ด้วยสมการ

$$\% DH = \frac{\text{ไนโตรเจนของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด}} \times 100$$

2. ความสามารถในการละลาย



ภาพที่ ก2 ขั้นตอนการหาความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลาย = ค่าดูดกลืนแสง X ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง

3.ศึกษาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

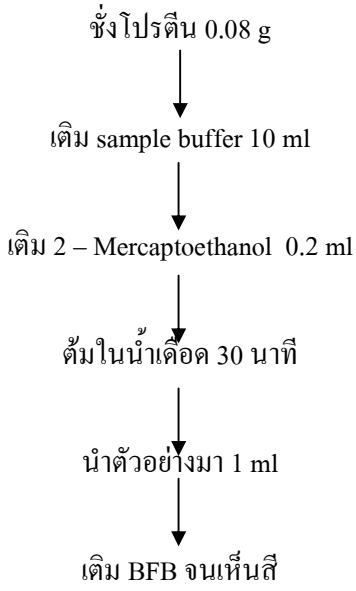
ทำการแยก subunit ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ และใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ subunit

<u>สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE</u>

A solution	
Acrylamide (CH_2CHONH_2)	29.2 g
N, N – Methylene – bis (acrylamide)	0.8 g
adjust with distilled water to	100 ml
B solution	
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	18.17 g
0.4% SDS	0.4 g
adjust with distilled water to	100 ml
C solution	
0.5 M Tris-HCl	6.06 g
0.4% SDS	0.4 g
adjust with distilled water to	100 ml
D solution	
10% Ammonium persulfate	0.5g
Water	5ml
E solution Electrophoresis buffer pH 8.4	
0.025 M Tris-HCl	3 g
0.192 M glycine	14.4 g
0.1% SDS (1% w/v)	1 g
adjust with distilled water to	1000 ml
BFB color	
Bromophenol Blue	1 mg
Glycerol	100 µl
Water	900 µl

Sample buffer	
Tris	7.57 g
SDS	20.0 g
Glycerol	100 ml
adjust with distilled water to	500 ml

วิธีเตรียมตัวอย่าง



ภาพที่ ก3 ขั้นตอนการหาเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน

การเตรียมเจล

Sepataring Gel (12.5%)	
A sol^{n}	7.5 ml
B sol^{n}	4.5 ml
Distilled H_2O	6.0 ml
D sol^{n}	0.07 ml
Temed	0.01 ml

Stacking Gel (4.4%)	
A sol^{n}	0.9 ml
C sol^{n}	1.5 ml
Distilled H_2O	6.0 ml
D sol^{n}	0.07 ml
Temed	0.01 ml

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมสารละลาย separating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด electrophoresis จากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

2. เตรียมสารละลาย stacking gel

3. เทน้ำออกจากผิวหน้าเจลที่แข็งตัวแล้ว rinse ผิวหน้าเจลด้วย stacking gel หนึ่งครั้ง จากนั้นเทส่วน stacking gel จนเต็ม เสียบ comb พักไว้ให้เจลแข็งตัว

4. ดึงcomb ออก ล้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างด้วย electrophoresis buffer

การทำ Electrophoresis

1.ต่อชุด electrophoresis เข้าด้วยกัน เติม electrophoresis buffer ที่เตรียมไว้

2. ใช้ micro syring ดูดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เติมในช่องของ stacking gel

3. ต่อส่วนของ chamber เข้ากับส่วนจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการ run gel

4. ปิดส่วนจ่ายกระแสไฟเมื่อเห็นสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล

5. นำแผ่นเจลออกจากกระจก ทำการย้อมสีแผ่นเจล

การย้อมสีแผ่นเจล

Staining solution	
Coom assie brilliant blue	2 g
Methanol	500 ml
Distilled H_2O	430 ml
Acetic acid	70 ml
Destaining solution	
Methanol	200 ml
Acetic acid	70 ml
Distilled H_2O	730 ml

ขั้นตอนการย้อมสีแผ่นเจล

1. นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก วางลงในภาชนะที่มี staining solution อยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
2. เมื่อครบเวลาเท staining solution ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ใน destaining solution จนแผ่นเจลใสเห็นแถบชัดเจน
3. เท destaining solution ทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นแล้วนำแผ่นเจลไปอบแห้ง

การอบเจล

1. แช่แผ่นเจลในสารละลายที่มี alcohol 30% และ glycerol 2% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นที่มีส่วนผสมของ glycerol 1% เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
3. การอบเจลใช้แผ่น cellophane 2 แผ่น แช่ในน้ำกลั่นแช่เย็นจนแผ่น cellophane อิ่มตัว นำแผ่น cellophane แผ่นแรกวางบนฐาน เติมน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร
4. นำแผ่นเจลวางบนแผ่น cellophane เติมน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกให้หมด
5. นำแผ่น cellophane อีกแผ่นวางทับ
6. นำกรอบสดึงมาครอบ ล็อคกรอบให้เป็นมุมตั้งฉาก
7. ยกกรอบออกจากฐานพลิกด้านล่างขึ้นด้านบนแล้วนำเข้าเครื่องอบเจล อบประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเจลแห้งแล้วจึงนำออกจากกรอบ

4. ทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging ตามวิธีของLandrault และคณะ (2001) เตรียมสารเคมี ดังนี้

1. เตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

Stock PBS solution

Solution A : 26.81g $Na_2HPO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 500 ml

Solution B : 13.80 g $NaH_2PO_4.H_2O$ ในน้ำกลั่น 500 ml

ผสม 270 ml Solution A กับ 63.5 ml Solution B เติม 87.66g NaCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml

เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงเป็น 10 เท่า

2. 2.5mM ABTS

0.0137 g ใน 10 ml PBS

3. Metmyoglobin reagent

3a. MetMg solution : 18.8 mg metmyoglobin ใน 10 ml PBS

3b. $K_3Fe(CN)_6$: 0.0122g ใน 200 ml PBS

4. Hydrogen Peroxide solution

0.091 ml ของ 30% H_2O_2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml

5. เตรียมโปรตีน1 3 และ 5 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 100 ml.

<u>ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา</u>

0.4 ml ABTS solution

0.72 ml Metmyoglobin solution

3.1 ml PBS

0.1 ml sample

↓

120 µl H_2O_2 solution

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

(ทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10-15 นาที)

ภาพที่ ก4 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตามสมการ

Antioxidant activity (%) = 1-[(abs sample/abs control) X 100]

5. ทดสอบสมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate (FTC) ตามวิธีของ Larrauri และคณะ (1996)

เตรียมสารเคมี ดังนี้

1. 3.5% HCl
2. 75% Ethanol
3. 0.02M Ferrous chloride
4. 30% Ammonium thiocyanate
5. 2.51% linoleic acid in 99.5% ethanol
6. 0.05 M phosphate buffer pH 7.0
7. เตรียมโปรตีน1 3 และ 5 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 100 ml.

<u>วิธีเตรียมตัวอย่าง</u>

0.5 ml sample

0.5 ml linoleic acid in ethanol 99.5%

1.0 ml phosphate buffer pH7

0.5 ml distilled water

↓

เก็บอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40˚C

↓

Reaction mixture

<u>ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา</u>

0.1 ml reaction mixture

0.1ml ferrous chloride solution

0.1 ml ammonium thiocyanate

9.7 ml ethanol 75%

↓

เขย่าให้เข้ากัน

↓

วางทิ้งไว้ 3 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

ภาพที่ ก5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก

นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาการต้านปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก มาคำนวณตามสมการ

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{(\text{sample abs 96 hr/sample abs 0 hr}) \times 100}{(\text{control abs 96 hr/control abs 0 hr})}$$

6. ทดสอบความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามวิธีของ Yen และคณะ (1995)

เตรียมสารเคมี ดังนี้

1. H_2O_2 ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์

   ปิเปต H_2O_2 ความเข้มข้น 30% มา 0.92 ml ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3. เตรียมโปรตีน0.5 0.7 และ 1 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 100 ml.

<u>ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา</u>

4 ml sample

0.6 ml 90 mM H_2O_2

↓

เขย่า10 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 nm

ภาพที่ ก6 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามสมการ

Antioxidant activity (%) = 1-[(abs sample/abs control) X 100]

ภาคผนวก ข
ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน

ภาพที่ ข1 Centrifuge Beckman Coulter

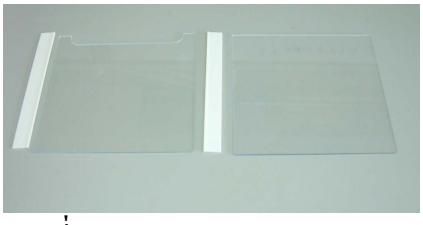
ภาพที่ ข2 Eppendorf Centrifuge

ภาพที่ ข3 Spectrophotometer

ภาพที่ ข4 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System

ภาพที่ ข5 Electrophoresis Power Supply EPS 301

ภาพที่ ข6 Eazy Breeze Drying Frame



ภาพที่ ข7 Matched glass plates for Hoefer miniVE electrophoresis system, Spacer,Comb

ภาคผนวก ค
ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

Oneway ANOVA (Ducan)

antioxidant ABTS of soy protein isolate and vitamin C

		Subset for alpha = .05			
treatment	N	1	2	3	4
SPI 0.1%	3	2.8600			
SPI 0.3%	3		5.1233		
SPI 0.5%	3			7.8333	
VitaminC 0.1%	3				100.0000
VitaminC 0.3%	3				100.0000
VitaminC 0.5%	3				100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant H_2O_2 of soy protein isolate and vitamin C

		Subset for alpha = .05			
treatment	N	1	2	3	4
SPI 0.1%	3	2.6300			
SPI 0.3%	3		7.0067		
SPI 0.5%	3			11.3767	
VitaminC 0.05%	3				100.0000
VitaminC 0.07%	3				100.0000
VitaminC 0.1%	3				100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of soy protein isolate and vitamin C

		Subset for alpha = .05					
treatment	N	1	2	3	4	5	6
SPI 0.1%	3	2.7700					
SPI 0.3%	3		4.6933				
SPI 0.5%	3			7.7633			
VitaminC 0.1%	3				93.2600		
VitaminC 0.3%	3					95.8300	
VitaminC 0.5%	3						97.4433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

%DH of Papain

เวลาที่ใช้ในการดัดแปร		Subset for alpha = .05	
(นาที)	N	1	2
15	3	77.0713	
30	3		88.6320
60	3		89.2742
Sig.		1.000	.839

antioxidant ABTS of Papain

		Subset for alpha = .05							
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8
0.1% SPI	3	2.8600							
0.3% SPI	3		5.1233						
0.5% SPI	3			7.8333					
0.1% 15 Pa	3				34.4667				
0.1% 30 Pa	3				34.8133				
0.1% 60 Pa	3				36.5867				
0.3% 15 Pa	3					56.6400			
0.3% 30 Pa	3					57.3000			
0.3% 60 Pa	3						60.1667		
0.5% 15 Pa	3							69.0467	
0.5% 30 Pa	3							69.9100	
0.5% 60 Pa	3								72.1867
Sig.		1.000	1.000	1.000	.075	.547	1.000	.432	1.000

solubility of Papain

เวลาที่ใช้ในการดัดแปร	N	Subset for alpha = .05		
(นาที)		1	2	3
0	3	4.8200		
15	3		9.1433	
30	3			9.4900
60	3			9.5100
Sig.		1.000	1.000	.673

Antioxidant H_2O_2 of Papain

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	2.6300									
0.3% SPI	3		7.0067								
0.5% SPI	3			11.3767							
0.1%15Pa	3				18.7800						
0.1%30Pa	3				19.1733						
0.1%60Pa	3					22.2533					
0.3%15Pa	3						32.4867				
0.3%30Pa	3						33.8800				
0.3%60Pa	3							36.6133			
0.5%15Pa	3								50.5700		
0.5%30Pa	3									53.7000	
0.5%60Pa	3										57.3767
Sig.		1.000	1.000	1.000	.597	1.000	.069	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of Papain

		Subset for alpha = .05								
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1% SPI	3	2.7700								
0.3% SPI	3		4.7433							
0.5% SPI	3			7.7633						
0.1% 15 Pa	3				22.4400					
0.1% 30 Pa	3					26.1100				
0.1% 60 Pa	3					26.5733				
0.3% 30 Pa	3						35.2800			
0.3% 15 Pa	3						35.5767			
0.3% 60 Pa	3							37.8533		
0.5% 15 Pa	3								41.6533	
0.5% 30 Pa	3								42.0767	
0.5% 60 Pa	3									47.5467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.196	.403	1.000	.236	1.000

% DH of Alcalase

เวลาที่ใช้ในการดัดแปร (นาที)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
15.00	3	54.4733		
30.00	3		63.7467	
60.00	3			70.0033
Sig.		1.000	1.000	1.000

Antioxidant ABTS of Alcalase

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	4.0533									
0.3% SPI	3	5.0933	5.0933								
0.5% SPI	3		6.3433								
0.1%15Al	3			20.3033							
0.1%30Al	3				24.3600						
0.1%60Al	3					33.3367					
0.3%30Al	3						38.9100				
0.3%15Al	3							41.6133			
0.3%60Al	3							43.1733			
0.5%15Al	3								49.5833		
0.5%30Al	3									51.4900	
0.5%60Al	3										57.7633
Sig.		.269	.186	1.000	1.000	1.000	1.000	.103	1.000	1.000	1.000

Solubility of Alcalase

เวลาที่ใช้ในการดัดแปร(นาที)	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
0	3	4.8200			
15	3		7.9233		
30	3			8.3533	
60	3				9.0733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant H_2O_2 of Alcalase

	Subset for alpha = .05										
treatment N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0.1% SPI 3	2.6300										
0.3% SPI 3		7.0067									
0.5% SPI 3			11.3767								
0.1%15Al 3				17.0900							
0.1%30Al 3				18.1833							
0.1%60Al 3					20.7167						
0.3%15Al 3						24.9867					
0.3%30Al 3							28.5633				
0.5%15Al 3								32.4367			
0.3%60Al 3									34.4233		
0.5%30Al 3										48.6833	
0.5%60Al 3											53.5033
Sig.	1.000	1.000	1.000	.258	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of Alclase

		Subset for alpha = .05								
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1% SPI	3	1.2500								
0.3% SPI	3		2.1000							
0.5% SPI	3			4.0433						
0.1%15Al	3				25.4933					
0.1%30Al	3					34.1833				
0.3%15Al	3					34.2033				
0.1%60Al	3						39.2533			
0.5%15Al	3						39.9900			
0.3%30Al	3							42.8300		
0.5%30Al	3								44.3933	
0.3%60Al	3								44.8633	
0.5%60Al	3									47.7900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.958	.060	1.000	.220	1.000

Solubility of Succinylation

	N	Subset for alpha = .05				
เวลาที่ใช้ในการดัดแปร(นาที)		1	2	3	4	5
0	3	4.8200				
15	3		7.7100			
30	3			9.7233		
60	3				11.3100	
120	3					14.5100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant ABTS of Succinylation

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	4.7067									
0.3% SPI	3		7.8400								
0.5% SPI	3			10.8133							
0.1%120Suc	3				16.5267						
0.1%15Suc	3				17.0867						
0.1%30Suc	3					20.5600					
0.3%15Suc	3					20.8400					
0.3%30Suc	3						24.8200				
0.3%120Suc	3						24.9300				
0.1%60Suc	3						25.5467				
0.5%120Suc	3							28.0133			
0.5%15Suc	3							29.5767	29.5767		
0.1%60Suc	3								30.9233		
0.3%60Suc	3									34.3967	
0.5%60Suc	3										44.4833
Sig.		1.000	1.000	1.000	.533	.755	.447	.088	.140	1.000	1.000

Antioxidant H_2O_2 of Succinylation

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	2.9033									
0.3% SPI	3	5.1333	5.1333								
0.5% SPI	3		7.0033								
0.1%15Suc	3			11.9600							
0.1%120Suc	3			12.5400							
0.3%120Suc	3				19.1900						
0.3%15Suc	3				19.3667						
0.1%30Suc	3					27.0400					
0.5%120Suc	3						30.5667				
0.1%15Suc	3						31.8600				
0.1%60Suc	3						32.3033				
0.3%30Suc	3							37.3967			
0.5%30Suc	3								50.2467		
0.3%60Suc	3									53.5500	
0.5%60Suc	3										62.2933
Sig.		.078	.137	.639	.886	1.000	.190	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of Succinylation

	N	Subset for alpha = .05										
treatment		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0.1% SPI	3	1.2900										
0.3% SPI	3		2.6533									
0.5% SPI	3			4.2167								
0.1%120Suc	3				14.7833							
0.1%15Suc	3				15.6567							
0.3%120Suc	3					19.9100						
0.3%15Suc	3						22.0700					
0.1%30Suc	3						22.2800					
0.5%120Suc	3							24.3733				
0.5%15Suc	3								28.1733			
0.5%30Suc	3								28.2767			
0.3%30Suc	3								28.3800			
0.1%60Suc	3									34.7300		
0.3%60Suc	3										36.0167	
0.5%60Suc	3											42.6100
Sig.		1.000	1.000	1.000	.132	1.000	.712	1.000	.733	1.000	1.000	1.000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูลย์
วัน เดือน ปี เกิด	12 กรกฎาคม 2526
สถานที่เกิด	จ.ตรัง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	104/1 ถ.พัทลุง ต.ทับเที่ยง อ.เมืองตรัง จ.ตรัง 92000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิศวกรรมแปรรูปอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง