บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภคและใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมได้มีการนำถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็นโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ซึ่งเป็นโปรตีนจากถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ดี ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีปริมาณสูง 35-38 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี ร่างกายสามารถย่อยได้ง่าย มีกรดอะมิโนไลซีนสูง แต่มีเมทไธโอนีนและซีสทีนค่อนข้างน้อย ในเนื้อถั่วเหลืองมีโปรตีนสะสมอยู่ในเซลล์ เรียกว่า โปรตีนบอดี้ (protein bodies) โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโกลบูลิน (globulin) สามารถละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจาง ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยคือ 2S 7S 11S และ 15S โปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้แยกได้ตามลักษณะการตกตะกอนด้วยวิธีการอัลตราเซนตริฟิล (ultracentrifuge) โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลในหน่วย KDa ดังนี้ (Nakai และ Modler, 1996) 2S fraction หรือที่เรียกว่า แอลฟา-คอนไกลซินิน (α-conglycinin) มีน้ำหนักโมเลกุล 8-22 KDa 7S fraction หรือที่เรียกว่า เบต้า-คอนไกลซินิน (β-conglycinin) มีน้ำหนักโมเลกุล 180-210 KDa 11S fraction หรือที่เรียกว่า ไกลซินิน (glycinin) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 KDa และ15S fraction มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600 KDa

โปรตีนถั่วเหลืองมี 7S และ 11S โกลบูลิน เป็นองค์ประกอบหลักที่มีความสำคัญในการกำหนดสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน 7S โกลบูลิน ของโปรตีนถั่วเหลืองโดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยเบต้า-คอนไกลซินิน (β-conglycinin) ประมาณ 30-50 เปอร์เซนต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด เบต้า-คอนไกลซินิน (β-conglycinin) ประกอบด้วย 3 subunit หลัก คือ α (80 KDa), α (76 KDa) และ β (50 KDa) ส่วน 11S โกลบูลินของโปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วย 12 subunit คือมี acidic subunit 6 หน่วย และ basic subunit 6 หน่วย acidic subunit (35 KDa) มีจุดไอโซอิเลคตริคอยู่ในช่วง pH 4.75-5.4 ส่วน basic subunit (20 KDa) มีจุดไอโซอิเลคตริคอยู่ในช่วง pH 8.0-8.5 โมเลกุลของโปรตีนเหล่านี้เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Bacon และคณะ,1990)

ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองสามารถจับตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่โดยอาศัยการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง กรดอะมิโนที่สามารถสร้างพันธะประเภทนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮดริล เช่น ซีสเตอีน เมื่อหมู่ซัลไฮดริลถูกออกซิไดส์จะ

เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างปลายโมเลกุลของซีสเตอีน 2 โมเลกุล โปรตีนถั่วเหลืองที่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลมาก พันธะไดซัลไฟด์จะไปลดความยืดหยุ่นของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีน การลดหรือกำจัดพันธะไดซัลไฟด์มีผลช่วยให้การเกิดฟองของโปรตีนดีขึ้น โดยพบว่า การลดจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้โปรตีนคลายตัวและเกิดการดูดซับที่ชั้นรอยต่อของน้ำและอากาศได้ง่ายขึ้น (Hettiarachchy และ Ziegler, 1990)

ถั่วเหลืองนอกจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีปริมาณสูงแล้ว ยังมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่เป็นไขมันจำเป็น ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพและไม่มีคอเลสเตอรอล มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นใยอาหาร ซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันมะเร็งลำไส้ และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่วนวิตามินที่พบมากในถั่วเหลืองคือ วิตามินบี 1 และ บี 2 และมีแร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น (กุณฑลิยา , 2544)

2.2 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงมากกว่า 90% ของน้ำหนักแห้ง ผลิตได้จากการสกัดแยกโปรตีนออกจากแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน หรือกากถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองและการสกัดน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหารได้หลากหลายประเภท โดยทั่วไปการผลิตโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสามารถผลิตได้จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ด ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีส่วนผสมของไขมันอยู่ด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมจะผลิตจากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิตสามารถทำได้หลายวิธี โดยอาศัยตัวทำละลายในการสกัด ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารละลายด่างหรือเกลือเป็นตัวทำละลาย เช่น การผลิตโปรตีนสกัดที่ใช้ในการค้า จะใช้สารละลายด่างช่วงพีเอช 7 ถึง 10 ในการสกัดและทำการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็คตริค (Isoelectric point) พีเอช 4.5 หรือการผลิตโปรตีนโดยใช้สารละลายเกลือในการสกัด ซึ่งอาศัยความแรงของประจุเป็นตัวแยก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เมมเบรน (membrane) ในการผลิตโปรตีนสกัด โดยใช้วิธีการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) หลังจากกระบวนการสกัดตามปกติเพื่อแยกส่วนของโปรตีนออกจากสารละลายที่สกัดได้ โปรตีนที่ได้จะละลายได้ดีเนื่องจากไม่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรด (Hensley และ Lawhon, 1979)

2.3 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการนำโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะให้คุณค่าสารอาหารแล้ว ยังเป็นการเพิ่มบทบาทการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืชและอาศัยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้เป็นส่วนผสมหรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น สมบัติการดูดซึมน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร

สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนถั่วเหลือง นิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันของเนื้อสัตว์และไส้กรอก เพื่อปรับปรุงด้านเนื้อสัมผัส เพิ่มความนุ่ม และความสามารถในการอุ้มน้ำ รวมทั้งใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท dairy food และสารทดแทนน้ำนม จากการศึกษาของ Lin และ Mei (2000) พบว่า การเติมโปรตีนถั่วเหลืองจะช่วยทำให้สมบัติด้านความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดีขึ้น จึงส่งผลให้มีสัดส่วนของปริมาณไขมันในผลิตภัณฑ์ลดลง ให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lecomte และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์แฟรงเฟอร์เตอร์ นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองยังมีสมบัติในการเกิดเจลที่ดี สามารถฟอร์มเจลได้โดยการให้ความร้อนหรือการใช้สารตกตะกอนโปรตีน (coagulant) เช่น เจลเต้าหู้ อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์ในการเป็นสารให้ฟอง ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี ขนมมาชเมลโล เมอร์แรงส์ ไอศกรีม เป็นต้น ฟองที่เกิดจากโปรตีนถั่วเหลืองสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความคงตัวต่อไขมันได้ง่าย (ปาริฉัตร และ สุปราณี, 2541)

อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดด่างที่รุนแรง หรือการได้รับความร้อน ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ง่าย จึงควรปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากสมบัติต่างๆของโปรตีนจะเกี่ยวเนื่องกับโครงสร้างเป็นสำคัญ การปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี

2.3.1. การดัดแปรโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic Modifications)

เอ็นไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอ็นไซม์ในการดัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นกับการทำงานของเอ็นไซม์แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน ส่วนเอ็นไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น ทรานกลูตามิเนส (tranglutaminase)

โปรตีนไคเนส (protein kinase) และ เปปทิโดกลูตามิเนส (peptidoglutaminase) ได้มีการนำมาใช้กัน แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร (ปราณี, 2547)

2.3.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส

เอ็นไซม์กลุ่มนี้มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแตกต่างกันไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุล โมเลกุลที่ผ่านการย่อยสลายจะมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อย ความจำเพาะของเอ็นไซม์และสภาวะอุณหภูมิ เวลาที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยา การทำงานของเอ็นไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีนนั้น เอ็นไซม์จะเข้าไปตัดพันธะเปปไทด์ ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้นๆ เช่น di, tri – peptide และเมื่อมีการย่อยสลายต่อไปก็จะได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆคือ เอกโซเปปติเดส (Exopeptidase) เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายโปรตีนและเอ็นไซม์เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระแบบสุ่ม (randomly) ภายในสายโปรตีน (ปราณี, 2547)

ประเภทของโปรติเอส

1. โปรติเอสเซรีน (Serine proteases)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอ็นไซม์เอนโดเปปติเดส โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสตรท ที่มีอนุมูลกรดอะมิโน ไทโรซีน (Tyr) เฟนิลอะลานีน (Phe) และทริปโตเฟน (Tryp) เช่น เอ็นไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ซับทิไลซิน (Subtilisin) หรืออนุมูลกรดอะมิโนไลซีน (Lys) และ อาร์จินีน (Arg) เช่น เอ็นไซม์ทริปซิน (Trypsin) เอ็นไซม์ทรอมบิน (Thrombin) เอ็นไซม์เหล่านี้เป็นพวกอัลคาไลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 7-11 (ปราณี, 2547) จากการศึกษาของ Chan และ Ma (1999) พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ทริปซินจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายและดูดซับน้ำได้ดี ช่วยเพิ่มสมบัติในการเกิดฟองและอิมัลชันได้ดีขึ้นด้วย

เอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรติเอส ผลิตจาก *Baciilus lichenifomis* บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ แอสปาร์เตท เอ็นไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986) เอ็นไซม์อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติต่างๆของโปรตีนถั่วเหลืองให้ดีขึ้น เช่น สมบัติด้านการเกิดฟอง การเกิดอิมัลชัน เมื่อทำการย่อยที่ระดับจำกัด เป็นเอ็นไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อน อุณหภูมิที่ใช้คือ 55-60 องศาเซลเซียส แต่อาจสูงได้ถึง 70 องศาเซลเซียส มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 7-11 ที่ pH 4 เอ็นไซม์จะถูกยับยั้งปฏิกิริยา สูญเสียความสามารถในการทนความร้อน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอ็นไซม์ได้ จากงานวิจัยของ Waish และ

คณะ (2003) ซึ่งศึกษาการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนได้โดยการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองที่ระดับการย่อยสลาย 20 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ได้จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นในช่วง pH 3-5 ส่วนที่ pH 6-8 ค่าการละลายของโปรตีนจะลดต่ำลง Govindaraju และ Srinivas (2004) ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน arachin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายสูง โปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเป็น 55-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำจะให้ค่าการละลายในช่วง pH 4-4.5 เพิ่มเป็น 14-16 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการเกิดฟองเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน และ fungal protease แต่ไม่ส่งผลให้ค่าความคงตัวของฟองโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป พรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม พบว่า โปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรนั้นมีความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า Surface hydrophobicity ส่วนความสามารถในการเกิดฟองมีค่าสูงขึ้น ฟองที่ได้มีความคงตัวลดต่ำลง ในขณะที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารามีแนวโน้มลดลง

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfhydryl protease)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยส่วนใหญ่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เอ็นไซม์ปาเปน (Papain) จากมะละกอ เอ็นไซม์ไฟซิน (Ficin) จากมะเดื่อ และเอ็นไซม์โบรมิเลน (Bromelain) จากสับปะรด สมบัติของโปรติเอสซัลไฟดริลเป็นพวกนิวทรัลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 6-7.5 (ปราณี, 2547) จากงานวิจัยของ Were และคณะ (1997) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้สารละลายด่างที่พีเอช 10.0 ร่วมกับเอ็นไซม์ปาเปน พบว่าสมบัติการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น และยังส่งผลให้สมบัติการเกิดฟอง การจับน้ำและค่าSurface hydrophobicity เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นแต่ไม่มีผลต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน และจากงานวิจัยของ Ortiz และคณะ (2002) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์โบรมิเลนในสัดส่วนโปรตีนสกัดต่อเอ็นไซม์เท่ากับ 4:1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 18.8 เปอร์เซ็นต์ของ TCA (trichloroacetic acid solution) หรือปรับพีเอชสารละลายโปรตีนเป็นพีเอช 2.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากการทดลองพบว่าเอ็นไซม์โบรมิเลนสามารถย่อยสลาย α-subunit ά-subunit ของ 7S โกลบูลินและ acidic subunit ของ 11S โกลบูลิน และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า 94 KDa ให้เล็กลง พร้อมทั้งช่วยเพิ่มประจุของโมเลกุลโปรตีนและปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองให้ดีขึ้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นในทุกช่วงพีเอชโดยเฉพาะช่วงพีเอช 4.5-5.8 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการละลายต่ำสุด และโปรตีนที่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกให้ค่าการละลายสูงกว่าการใช้ 18.8 เปอร์เซ็นต์ของTCA

Scilingo และคณะ (2002) ศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนสกัดจาก Amaranth ที่ทำการดัดแปรโดยใช้เอ็นไซม์ cucurbita และ ปาเปน พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็ง ให้ค่าการละลายเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์ cucurbita ส่วนโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนจะให้ค่าการละลายสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ cucurbita จึงเหมาะในการเลือกใช้เอ็นไซม์ปาเปนปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีนสกัดจาก Amaranth เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องมีการให้ความร้อนเพื่อยังคงค่าการละลายที่ดีอยู่ และพรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม พบว่า โปรตีนโอคาราที่ถูกดัดแปรนั้นมีความสามารถในการละลายดีขึ้น ค่า Surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองสูงขึ้น

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing protease)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอกโซเปปติเดส ตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการไอออนของโลหะคือ Zn^{+2} มีช่วงปฏิกิริยาของพีเอชเป็นกลาง (pH 6.5-7.5) เรียกว่า นิวทรัลโปรติเอส เป็นโปรติเอสที่มีไอออนและโลหะรวมในโมเลกุลเอ็นไซม์ หรืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ นิวทรัลโปรติเอสที่นิยมในกลุ่มนี้คือ เอ็นไซม์นิวเทรสผลิตจาก *Bacillus subtilis* ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนจากพืชและสัตว์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆหรือกรดอะมิโน นิวเทรสเป็นเอ็นไซม์โปรติเอสที่มีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยา อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในช่วง pH 5.5-7.5 และ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอ็นไซม์นิวเทรส สามารถช่วยปรับปรุงสมบัติในการอุ้มน้ำและความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนที่ผลิตจากปลาแซลมอนให้สูงขึ้นได้ (Sathivel และ Bechtel, 2004)

4. โปรติเอสกรด (Acid protease)

เป็นโปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วงของพีเอชเป็นกรด (pH<7) โดยทั่วไปเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชเหมาะสมระหว่าง pH 2-4 และไม่แสดงชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณา pH activity profile ของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุมูลกรดแอสปาติก อยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอ็นไซม์เรนนินและเปปซิน เป็นต้น เอ็นไซม์เปปซิน (Pepsin) เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มแอซิดโปรติเอส มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาย่อยสลายที่เหมาะสมระหว่างพีเอช 4-8 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน เช่นไทโรซีน (Tyr) เฟนิลอะลานีน (Phe) และ ทริปโตเฟน (Tryp) (ปราณี, 2547) เอ็นไซม์เปปซินเหมาะในการนำมาย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองจับตัวกันแน่นมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดฟองได้ต่ำ ปาริฉัตรและปราณี (2541) ทำการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่ว

เหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟองสำหรับทดลองกับผลิตภัณฑ์เมอแรงส์ พบว่าการใช้เอ็นไซม์เปปซินที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 4.5 จะให้ค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ซึ่งถือว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากไข่ขาวได้

2.3.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส

ทรานซ์กลูตามิเนส (Transglutaminase, TGase) มีสมบัติในการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (ปราณี, 2547) ในสภาวะที่มีหมู่เอมีน TGase จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งเอมีนของสายโพลิเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลจากแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxyamide) ของกลูตามีนในโปรตีนกับหมู่เอมีน (RNH_2) ในสภาวะที่ไม่มีหมู่เอมีน จะเกิดปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน (deamidation) โดยเกิดการไฮโดรไลซีสของหมู่แกมมาคาร์บอกซิล (γ-carboxyl group) ของกลูตามีน ทำให้เร่งหมู่แอมโมเนียหลุดออกมาได้เป็นกรดกลูตามิก ส่วนกรณีที่ปฏิกิริยามีหมู่เอมีนเป็น NH_2-Lys (อนุมูลอิสระของไลซีน) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้โปรตีนสายยาวเชื่อมระหว่าง กลูตามีนและไลซีน เรียกว่าปฏิกิริยาเชื่อมข้าม (crosslinking) ทำให้ได้โปรตีนสายใหม่ที่มีสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น โปรตีนที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำดีขึ้น ยืดหยุ่นมากขึ้น ทนต่อการตกตะกอนด้วยความร้อน ลักษณะดังกล่าวส่งผลที่ดีต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยได้มีการทดลองนำโปรตีนจากนมและถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้ TGase มาเป็นส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกจากเนื้อไก่เพื่อลดการใช้ฟอสเฟต พบว่าโปรตีนที่ผ่านปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม ทนความร้อนได้ดี เพิ่มความเสถียรของฟองซึ่งส่งผลต่อการเกิดเจลที่แข็งแรงและมีสมบัติการเกิดอิมัลชันที่ดี สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกได้ (Muguruma และคณะ, 2002)

2.2.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

เปปทิโดกลูตามิเนส (Peptidoglutaminase, Pgase) เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายกลูตามีนออกจากสายโพลิเปปไทด์ที่ตำแหน่งเอมีน การทำงานของเอ็นไซม์สามารถย่อยได้ตั้งแต่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนไข่ขาว จนถึงโมเลกุลขนาดเล็กของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการ deamidation แล้ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรใช้เอ็นไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในระดับหนึ่งก่อนที่จะมีการใช้ PGase จะช่วยในการย่อยสลายกลูตามีนได้มากขึ้น (Hudson, 1992)

2.2.1.4 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต (amylolytic enzyme)

เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสตาร์ท เช่น แอลฟา-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส นิยมใช้ในการผลิตสตาร์ชดัดแปรหรือการสกัดโปรตีนจากรำข้าว เพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน ส่งผลให้สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ง่ายขึ้น เอ็นไซม์ที่นำมาใช้มากในระดับอุตสาหกรรมคือ แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ

การย่อยสลายภายในโมเลกุลที่พันธะแอลฟา 1, 4 ไกลโคซิดิก มีชื่อทางการค้าคือ เทอร์มามิล (Termamyl) เป็นเอ็นไซม์ชนิดทนร้อน พีเอชเหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 90 องศาเซลเซียส (ปราณี, 2547)

จากงานวิจัยของพรชนัน (2548) พบว่า โปรตีนโอคารา (กากถั่วเหลือง) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที มีหน่วยย่อยของโปรตีนที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE ไม่แตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่ความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองมีค่าลดลง แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารา

2.3.2. การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์ (Non-Enzymatic Modifications)

เป็นวิธีการดัดแปรโปรตีนโดยการใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการคลายตัวหรือจับตัวกันใหม่ของพันธะเคมีต่างๆทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2.3.2.1 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี

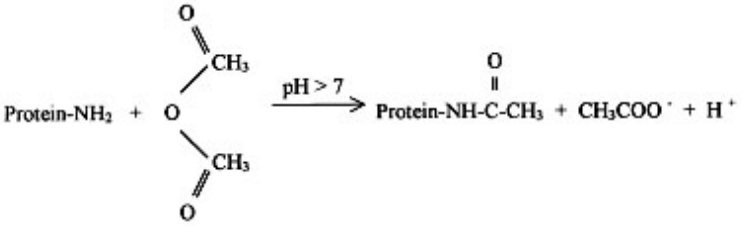
การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกกระบวนการหนึ่ง ที่นิยมนำมาปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถทำได้อย่างรวดเร็วแต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบางอย่างค่อนข้างรุนแรง ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและคุณค่าสารอาหารบางอย่างได้ การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น

เอซิลเลชัน (acylation) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารประเภทแอซิดแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ε-อะมิโนของไลซีน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารประกอบอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แทนที่หมู่ ε-อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นกลางของอะซิทิล (acetyl) เรียกว่ากระบวนการอะซิทิลเลชัน (acetylation) หรือการใช้สารประกอบซัคซินิกแอนไฮไดรด์ (succinic anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ε-อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุลบของซัคซินิล (succinyl) เรียกว่ากระบวนการซัคซินิลเลชัน (succinylation) (ภาพที่ 2.1) ซึ่งส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีประจุลบมากขึ้น เกิดแรงผลักระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในอีกโมเลกุลของโปรตีน มีผลให้การเกาะตัวกันของโปรตีนลดน้อยลง การละลายจึงเพิ่มมากขึ้น (Damodaran, 1996)

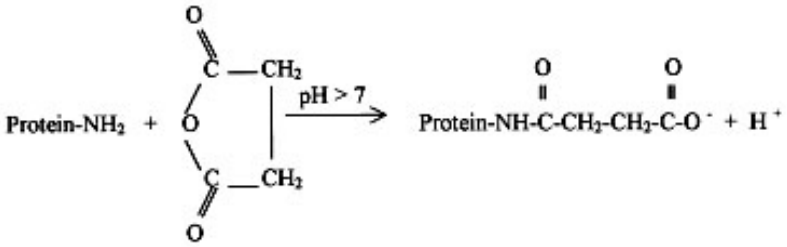
El-Adawy (2000) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียว (Mung bean protein) ที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันและอะซิทิลเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถในการละลายน้ำและการละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์เพิ่มขึ้น ส่วนกระบวนการอะซิทิลเลชัน ช่วยปรับปรุงความสามารถในการ

ละลายน้ำแต่การละลายในโซเดียมคลอไรด์ลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น

Acylation with acetic acid



Succinylation with succinic acid

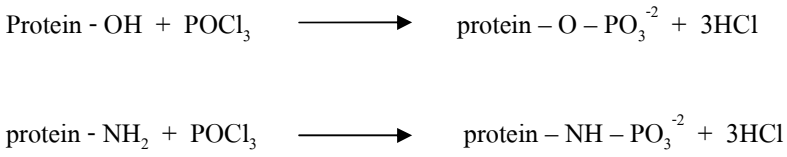


ภาพที่ 2.1 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์กับหมู่ε-อะมิโนของไลซีน

ที่มา : El-Adawy (2000)

พรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากโอคารา (กากถั่วเหลือง) ที่ถูกดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้กรดซัคซินิคแอนไฮไดร์ พบว่า โปรตีนสกัดจากโอคาราที่ถูกดัดแปรนั้นมีความสามารถในการละลายดีขึ้น ค่า Surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของฟองสูงขึ้น ในขณะที่ความสามารถในการเกิดฟองมีแนวโน้มลดลง

ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) เกิดจากการที่สารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (phosphorus oxychloride; $POCl_3$) (ภาพที่ 2.2) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน หรือหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้น มีผลต่อการปรับปรุงสมบัติด้านการละลาย การเกิดฟองและการเกิดอิมัลชันของโปรตีน Mathesis และคณะ (1989) พบว่าการใช้ $POCl_3$ ในการดัดแปรสมบัติของยีสต์โปรตีน แม้จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของโปรตีน แต่สมบัติในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้การเกิดฟอสโฟริเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงๆ จะส่งผลให้เกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ทำให้โปรตีนมีความเป็นประจุเพิ่มขึ้น (Damodaran, 1996)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน

ที่มา : Matheis และคณะ (1989)

2.3.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมในการดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร การดัดแปรโดยใช้ความร้อนจะขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของโปรตีน และสภาวะความร้อนที่ใช้เพื่อให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วนหรือเกิดโดยสมบูรณ์ ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป (Petruccelli และ Anon, 1995)

การใช้ความร้อนในระดับที่เหมาะสมถือเป็นวิธีการหนึ่งในการดัดแปรสมบัติของโปรตีนสกัด เนื่องจากความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส โปรตีนจะเกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ ส่วนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้พันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลาย และที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จะเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ใหม่ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Davis และ Williams, 1998) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลต่อพันธะที่เป็นนอนโควาเลนต์ (non-covalent) ซึ่งเป็นพันธะที่ยึดโมเลกุลของโปรตีนในการเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก และ พันธะอิเลคโตรสแตติก (electrostatic bond) เมื่อโครงสร้างเกิดการคลายตัว ส่วนไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) จะเพิ่มมากขึ้นทำให้โปรตีนจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อยลง เกิดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนมากขึ้นและเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sciling และ Anon (1996) พบว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65-73 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อการทำลาย 7S และ 11S โกลบูลิน ของโปรตีนถั่วเหลือง และเมื่อได้รับความร้อนในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส โครงสร้างโปรตีนจะแตกตัวและจับตัวกันใหม่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับความร้อนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมประเภทเนื้อสัตว์ จะทำให้ 11S acidic-basic subunit ของโปรตีนถั่วเหลือง เกิดการแตกตัวออกและสร้างพันธะไดซัลไฟด์กับไมโอซิน (myosin) ขึ้นมาใหม่ ส่งผลให้เกิดลักษณะของเจลที่มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Petruccelli และคณะ (1994) พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 92 องศาเซลเซียสในช่วงระยะเวลาสั้น 6-12 นาที ไม่ส่งผลต่อการ

เปลี่ยนแปลงสมบัติการละลาย แต่ทำให้ค่าไฮโดรโฟบิกซิตี้ (hydrophobicity) ของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 นาที จะทำให้ 7S และ 11S โกลบูลิน ถูกทำลาย โปรตีนเกิดการตกตะกอน สมบัติการละลายและค่าไฮโดรโฟบิกซิตี้ (hydrophobicity) ลดลง

2.4 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ กลุ่มของสารที่มีอิเล็กตรอนวงนอกที่ยังไม่ได้จับคู่ มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่ง อิเล็กตรอนและมีอายุสั้นประมาณ 1 หรือ 10^{-3}-10^{-10} วินาที ดังนั้นจึงมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ของร่างกาย อนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำ อนุมูลอิสระที่สำคัญได้แก่ อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $OH^{\cdot}$) ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\cdot}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ไฮโปคลอรัส (hypochlorous, HOCl) นอกจากนั้นยังมีกลุ่มของอนุพันธ์ไนโตรเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive nitrogen species, RNS) ที่สำคัญได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, $NO^{\cdot}$) และ เปอร์ออกซีไนไตร์ (peroxynitrite, $ONOO^{-}$) เป็นต้น ทั้งกลุ่มของ ROS และ RNS จัดเป็นแหล่งของอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย (วัลยาและพัชรี, 2542) อนุมูลอิสระเกิดได้ทั้งจากภายในร่างกายและภายนอกร่างกาย เช่น เกิดที่ไมโตคอนเตรีย ไมโครโซม เพอร์รอกไซโซม โดยเกิดจากระบบการขนส่งอิเล็กตรอน การเกิดเมตาบอลิซึม ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) หรือเกิดจากสารเคมี รังสี ยาบางชนิด และความร้อน (Punchard และ Kelly, 1996) อนุมูลอิสระ ใช่ว่าจะมีแต่ผลเสียอย่างเดียว ร่างกายต้องใช้อนุมูลอิสระเพื่อเป็นตัวนำสารเคมีบางอย่างที่จำเป็นในการผลิตฮอร์โมน และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆในระบบภูมิต้านทาน อนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันร่างกายจากการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส ดังนั้นปัญหาจากอนุมูลอิสระที่พบทุกวันนี้เกิดจากการมีอนุมูลอิสระล้นเกิน (นิทราพร, 2542) หรือที่เรียกว่า สภาวะ oxidative stress ซึ่งก็คือ สภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกาย เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก การสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของโปรตีน เป็นต้น (วัลยาและพัชรี, 2542) และพบว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือด โรคต้อกระจก โรคจอตาเสื่อม โรคข้ออักเสบ เป็นต้น (นิทราพร, 2542)

2.5 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants)

สารต้านออกซิเดชัน หมายถึง สารประกอบใดๆเมื่อใช้ในปริมาณเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะมีสมบัติยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติแบ่งเป็น 3 ประเภท (Niki และคณะ, 1995) คือ

2.5.1. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของเอนไซม์ที่สร้างได้ในเซลล์ของร่างกาย ได้แก่ คาตาเลส (catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น

2.5.2. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของสารและโปรตีนบางชนิดได้แก่ กลูตาไอน (glutathione) ยูเรต (urate) ไบลิรูลิน (bilirubin) ยูบิควรอล (ubiquirol) อัลบูมิน (albumin) แครูโรพลาสมิน (caeruloplasmin) ทรานเฟอริน (tranferrin) เป็นต้น

2.5.3. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันกลุ่มของสารอาหารบางชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี แคโรทีนอยด์ เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างจะมีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการเป็นสารต้านออกซิเดชันในอาหาร เช่น ความสามารถในการกระจายตัวในเฟสของน้ำมันและน้ำของสารต้านออกซิเดชัน สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น จากอิทธิพลของพารามิเตอร์เหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีใดเพียงวิธีเดียวในการตรวจสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารใด ๆ วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารหรือสารประกอบต่างๆมีหลายวิธี ดังนี้

1. ABTS free radical scavenging method

$ABTS^{+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก เกิดจากสาร ABTS (2,2–Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline–6–sulfonic)) ทำปฏิกิริยากับเปอร์ออกซิเดชันของเม็ทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) จะทำให้สารละลายสีน้ำเงินแกมเขียว ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ อัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Landrault และคณะ, 2001)

$$\text{ABTS} + \text{metmyoglobin (ไม่มีสี)} \xrightarrow{H_2O_2} \text{ABTS}^{+}\text{(สีเขียวแกมน้ำเงิน)}$$

2. DPPH radical scavenging method

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrozyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาร โดยมีหลักการคือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน จะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียร เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากสารที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลง ซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul และคณะ, 2006)

$$DPPH^{\cdot}\ (\text{สีม่วงแดง}) + AH\ (\text{antioxidant}) \longrightarrow DPPH\text{-}H\ (\text{ไม่มีสี}) + A$$

3. Ferric Thiocyanate Colorimeter method (FTC)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate (FTC) เป็นตัวแทนในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของไขมันในอาหาร (antilipoperoxidant) โดยวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้

$$\text{กรดลิโนเลอิก} \xrightarrow{O_2} \text{สารผลิตภัณฑ์}$$

$$\text{สารผลิตภัณฑ์} + FeCl_2 + NH_4SCN \longrightarrow \text{สารประกอบเชิงซ้อนของ} Fe^{3+} \text{จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน}$$

กรดลิโนเลอิกเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดสารผลิตภัณฑ์ เช่น อนุมูลไฮโดรคาร์บอน ($R^{\cdot}$) อนุมูลเพอร์ออกซี ($ROO^{\cdot}$) สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) โดยไปรีดิวซ์เฟอร์รัส (Fe^{2+}) ให้เป็นเฟอร์ริก (Fe^{3+}) และในสภาวะที่มีแอมโมเนียมไธโอไซยาเนต (NH_4SCN) จะเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลแดงของเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (Larrauri และคณะ, 1997)

4. Hydroxyl radical assay (deoxyribose assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) เป็นตัวแทนในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันอันเนื่องมาจาก อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) โดยมีหลักการคือเฟอร์รัส (Fe^{2+}) จะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$)ทำปฏิกิริยากับดีออกซีไรโบส (deoxyribose) ในขณะที่มีการให้ความร้อนร่วมกับกรดไทโอบาบิทูริก (thiobarbituric acid, TBA) จะเกิดเป็นสารสี

ชมพู สามารถติดตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Halliwell และคณะ,1987)

$$Fe^{2+}\text{-EDTA} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}\text{-EDTA}$$

$$OH^{\cdot} + \text{deoxyribose} \longrightarrow \text{fragment} \xrightarrow{\text{heat TBA acid}} \text{สารผลิตภัณฑ์}$$

$$\text{TBA} + \text{สารผลิตภัณฑ์} \longrightarrow \text{สารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู (pink chomogen)}$$

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านออกซิเดชันในโปรตีน

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนและเปปไทด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อยสลายของโปรตีน สภาวะในการย่อย ชนิดและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่อยู่ในสายเปปไทด์และโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น

Murase และคณะ (1993) รายงานว่า สายเปปไทด์ที่มีฮีสทีดีน (histidine) หรือ คาโนซิน (carnosine) อยู่ที่ปลายหมู่ของอะมิโน (N-terminal end) จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้สามารถละลายในไขมันได้ดี นอกจากนี้ฮีสทีดีนยังมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดีเป็นผลมาจากการที่มี imidazole ring นอกจากนี้ Chen และคณะ (1996) รายงานว่า ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกในโปรตีนถั่วเหลืองเกิดจากสายเปปไทด์ Leu-Leu-Pro-His-His

Hattori และคณะ (1998) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของอีลาสตินเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยอีลาสตินด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก พบว่า อีลาสตินที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันดีกว่าตัวควบคุม และเมื่อใส่กรดซิตริก (citric acid) ในปริมาณ 0.02 เปอร์เซนต์ ร่วมกับอีลาสตินที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์และกรดจะทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และ พบว่าเปปไทด์ของอีลาสตินที่มีขนาด 1000 Da มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol)

Park และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงที่ไม่มีเลซิตินโดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสในการดัดแปร พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa มีความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้มากกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol) และพบสายเปปไทด์ 2 สายที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa สายที่ 1 คือ Leu-Met-Ser-Tyr-

Met-Tryp-Ser-Thr-Ser-Met และสายที่ 2 คือ Leu-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Arg-Ser-Ser-His-Trp-Phe-Ser-Arg-Arg

Pena-Ramos และ Xiong (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนเวย์สกัด (Whey Protein Isolate) โดยทำการย่อยโปรตีนเวย์สกัดด้วยเอ็นไซม์เปปซิน เอ็นไซม์ปาเปนและเอ็นไซม์ทางการค้า (protease F) พบว่า โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วย protease F มีระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) 37 เปอร์เซ็นต์ คือมีขนาดต่ำกว่า 10 KDa มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง

Pena – Ramos และ Xiong (2003) ได้นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ chymotrypsin มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอีน (conjugated dienes) และความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทดสอบด้วยวิธีการ TBARS (thiobarbituric acid – reative substances) ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์

Sakanaka และคณะ (2003) ได้ทำการย่อยโปรตีนไข่แดงด้วยเอ็นไซม์โปรตีเอส ไฮโดรไลเซตที่ได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1000 Da และพบว่าที่ 0.025 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดีกว่าตัวควบคุม และพวกเขาได้นำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงเป็นส่วนผสมในคุ้กกี้เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่แดงและกรดอะมิโนผสมเพื่อหาค่าเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในคุ้กกี้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าคุ้กกี้ที่ผสมด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงมีค่าเปอร์ออกไซด์ต่ำกว่าคุ้กกี้ที่ผสมด้วยโปรตีนไข่แดงและกรดอะมิโนผสม และในปี 2006 Sakanaka และคณะ ได้นำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงมาทดสอบหาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่า 0.1 เปอร์เซนต์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดง มีความสามารถในการยับยั้งการเปลี่ยนสีของเบต้าแคโรทีนได้ดีกว่าตัวควบคุม และที่ 0.5 เปอร์เซนต์ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน(O_2^-) และ ไฮดรอกซิลแรดิคอล (OH^-) เป็น 83.5% 90% และ 74.2% ตามลำดับ และนอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทดสอบด้วยวิธีการ TBARS ในเนื้อวัวได้ถึง 91.7%

Pena – Ramos และ Xiong (2003) ได้นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอีน (conjugated dienes) และการเกิดสีแดงของ TBARS ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์

ในปี 2006 Zhu และคณะ ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจมูกข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากจมูกข้าวสาลีที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1500 Da มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autooxidation) ของไขมันได้ดีใกล้เคียงกับแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol) และที่ 1.3 mg/ml ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจมูกข้าวสาลีจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีเท่ากับ BHT (butylated hydroxytoluene)

Saiga และคณะ (2003) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอซินไมโอฟิบริลลาโปรตีน (Porcine Myofibrillar Proteins)ที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและเอ็นไซม์แอคทิเนสอี (actinase E) พบว่า พอซินไมโอฟิบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าพอซินไมโอฟิบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอคทิเนสอี เนื่องจากพอซินไมโอฟิบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีจำนวนของกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ซึ่งมีความสามารถละลายในไขมันมากกว่าพอซินไมโอฟิบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอคทิเนสอี