บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.1.1 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS

การวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซี ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1 ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่าง 3 ระดับคือ 0.1% 0.3% และ 0.5% พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้เล็กน้อย และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่า วิตามินซีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีถึง 100 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของวิตามินซีจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินจะคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2006) วิตามินซีที่ความเข้มข้น 0.1% -2% สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากและระดับในการต้านอนุมูลอิสระจะคงที่

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.86 ±0.2[a]	5.12± 0.4 [b]	7.83± 0.3[c]
วิตามินซี	100[d]	100[d]	100[d]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.2 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การวิเคราะห์สมบัติในทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซี แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้บ้าง และความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% แต่เมื่อเทียบกับวิตามินซีแล้วพบว่าวิตามินซีมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก ทั้งนี้เนื่องจากวิตามินซีมีความว่องไวในการจับกับอนุมูลอิสระต่างๆ จึงมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้สูง (นิทราพร, 2542)

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(%)		
	0.05%	0.07%	0.1%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.63 ±0.2[a]	7.00± 0.3 [b]	11.37± 0.7[c]
วิตามินซี	100[d]	100[d]	100[d]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.3 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโทลอกซ์ (Trolox) แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้เล็กน้อย และความสามารถในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้นข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% แต่เมื่อเทียบกับโทรอกซ์พบว่า โทรอกซ์มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McCarthy และคณะ (2001) ที่ว่า วิตามินอีสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในแพตตี้หมูทอดที่เก็บไว้เป็นเวลา 9 วันได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโทรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.77 ±0.2[a]	4.69± 0.4 [b]	7.76± 0.8[c]
โทลอกซ์	93.26±1.0[d]	95.83±0.19 [e]	97.44±0.9[f]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

4.2.1 ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ปาเปน

ผลการศึกษาระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับคือ 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็นเวลา 15 นาที มีค่าต่ำกว่า 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ที่เวลา 30 และ 60 นาทีไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม เอ็นไซม์สามารถจับกับโมเลกุลโปรตีนได้มากจึงเกิดการย่อยสลายในระดับที่ค่อนข้างสูงในช่วง 30 นาทีแรก หลังจากนั้นมีแนวโน้มคงที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ทั้งนี้ระดับการย่อยสลายโปรตีนของเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอสขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอ็นไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยา จำนวนพันธะเปปไทด์ที่เอ็นไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ โดยมีเวลา ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิเป็นปัจจัยเสริม (Hudson, 1992)

ตารางที่ 4.4 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาต่าง ๆกัน

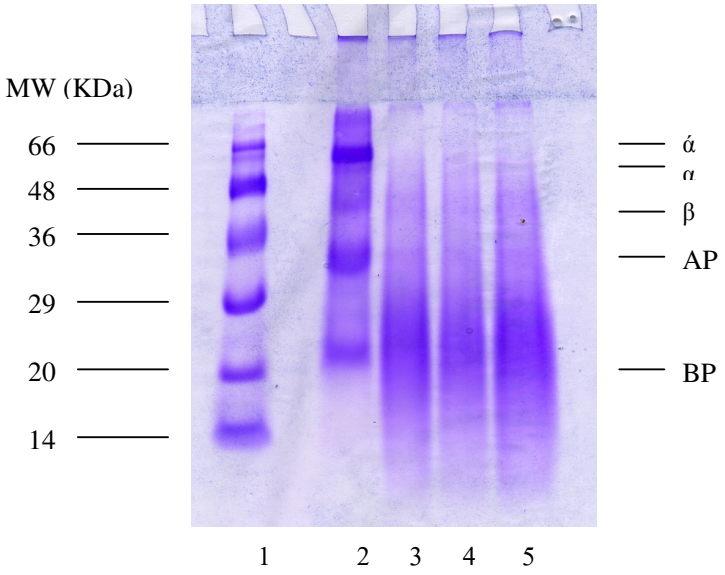
ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
15	77.07 ± 4.81^{a}
30	89.92 ± 1.67^{b}
60	89.92 ± 3.89^{b}

[abc] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาแตกต่างกันโดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent (2-ME) แสดงดังภาพที่ 4.2 เมื่อแยกองค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จะพบส่วนของ ά, α และ β – subunit ของ β-conglycinin หรือ 7S โกลบูลินและ acidic – basic subunit ของ glycinin หรือ11S โกลบูลิน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนถั่วเหลือง (Ma และคณะ, 1997) ส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการ

ดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็น 15 30 และ 60 นาที จะไม่พบแถบของ ά, α, β – subunit ของ 7S โกลบูลิน และแถบของ β-conglycinin และ acidic subunit มีความเข้มลดลง แต่จะพบแถบสีเข้มของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง คือมีขนาดเล็กกว่า 29 KDa แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ปาเปนเข้าไปย่อยส่วนของ 7S โกลบูลิน ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง อย่างไรก็ตาม SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็นเวลา 15 30 และ 60 นาทีไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ระดับการย่อยสลายที่เวลา 15 และ 30 นาทีแตกต่างกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Puechkamut และ Thiewtua (2006) ความไว (sensitivity) ของสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ SDS-PAGE อาจมีข้อจำกัดเมื่อระดับการย่อยสลายสูงๆ ทำให้ไม่สามารถแยกแถบที่มีมวลโมเลกุลต่ำออกจากกันได้



ภาพที่ 4.2 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็นเวลา 15 30 และ 60 นาที ;

1. Standard Weight Marker
2. โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI)
3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 15 นาที
4. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 นาที
5. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 60นาที

ά α และ β คือ ά α และ β-subunit ของ β-conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.2.3 ความสามารถในการละลาย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม ในระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที แสดงในตารางที่ 4.5 จากการทดลองพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุล ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง มีกลุ่ม ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น (Wu และคณะ 1998) และมีประจุสุทธิ (net charge) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการละลายดีขึ้น และเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการย่อย พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาที มีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 15 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของระดับการย่อยสลาย (ตารางที่ 4.4) โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาที มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่สูงกว่า

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาในการย่อย (นาที)	ความสามารถในการละลาย*
0	4.82 ± 0.09^{a}
15	9.14 ± 0.35^{b}
30	9.49 ± 0.40^{c}
60	9.51 ± 0.36^{c}

^{abc} ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

4.2.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

การวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.6 ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีน 3 ระดับคือ 0.1% 0.3% และ 0.5% พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปร โปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาที ไปเป็น 60 นาที พบว่า

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนสกัดที่ 0.3% และ 0.5% จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ที่ระดับการย่อยสลายเดียวกัน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน มีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีสายเปปไทด์ขนาดสั้นเพิ่มขึ้น ทำให้มีประจุสุทธิเพิ่มขึ้น การละลายเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้มีสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้นด้วย (Zhu และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปร (นาที)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	2.95 ±0.3[a]	5.12± 0.4 [b]	7.83± 0.3[c]
15	34.46±1.1 [d]	56.64± 1.2 [e]	69.05± 3.5 [g]
30	34.81±1.2 [d]	57.30± 1.1 [e]	69.91± 0.8 [g]
60	36.59±0.5 [d]	60.17± 1.2[f]	72.18± 0.7[h]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การวิเคราะห์สมบัติในทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่เวลา 30 และ 60 นาที มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่เวลา 15 นาที ทั้งนี้เนื่องมาจาก ระดับการย่อยสลายของโปรตีน และความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นทำให้เพิ่มปริมาณสายเปปไทด์ขนาดเล็กและประจุสุทธิ ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงเพิ่มขึ้น (Sakanaka และคณะ, 2006) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% พบว่า ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปร (นาที)	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(%)		
	0.05%	0.07%	0.1%
0	2.63±0.3 [a]	7.00±0.4 [b]	11.37 ±0.7 [c]
15	18.78±1.3 [d]	32.48±0.9 [f]	50.57±0.8 [h]
30	19.17±0.7 [d]	33.88±0.2 [f]	53.70± 0.4 [i]
60	22.25±1.5 [e]	36.61±0.7 [g]	57.38±2.0 [j]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน แสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเพิ่มขึ้น พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ทำให้โครงสร้างทรงกลมที่อัดแน่น (compact globular structure) ของโปรตีนถั่วเหลืองคลายตัวออก ทำให้กลุ่มไฮโดรโฟบิกที่อยู่ภายในโมเลกุลเคลื่อนที่มาที่ผิว Puechkamut และ Thiewtua (2006) พบว่า ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจากโอคารา มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและอัลคาเลส การที่โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีกลุ่มไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้น (Zhu และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปร (นาที)	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	2.77 ± 0.2^{a}	4.74 ± 0.4^{b}	7.76 ± 0.1^{c}
15	22.44 ± 0.1^{d}	35.57 ± 0.4^{f}	41.65 ± 0.4^{h}
30	26.11 ± 0.4^{e}	35.28 ± 0.7^{f}	42.07 ± 0.6^{h}
60	26.57 ± 0.5^{e}	37.85 ± 0.3^{g}	47.54 ± 0.4^{i}

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

4.3 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

4.3.1 ระดับการย่อยสลาย

ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอ็นไซม์โปรติเอสแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันไป เอ็นไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อสับสเตรทมากกว่าเอ็นไซม์อัลคาเลส (ปราณี, 2547) พรชนัน (2548) พบว่าการใช้เอ็นไซม์อัลคาเลส 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม ทำให้ 7S และ 11S โกลบูลิน ถูกย่อยจนหมด เหลือแค่เพียงโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าเอ็นไซม์ปาเปน ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นจาก 15 นาที ไปเป็น 60 นาที ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาในการย่อยเท่ากัน พบว่า ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ปาเปนสูงกว่า การที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากปริมาณของเอ็นไซม์ปาเปนที่ใช้มากกว่าเอ็นไซม์อัลคาเลส

ตารางที่ 4.9 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

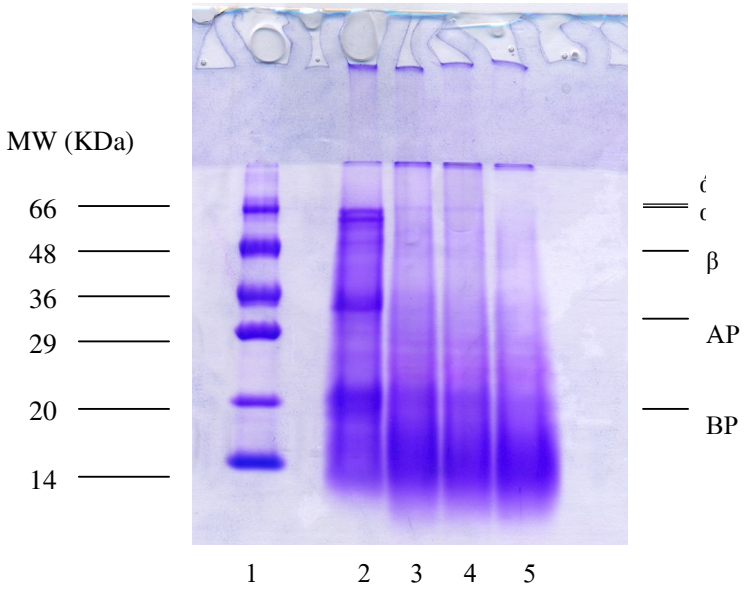
ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
15	54.47±2.0 [a]
30	63.75±2.0 [b]
60	70.00±0.8 [c]

[abc] ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสในระยะเวลาแตกต่างกันโดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent (2-ME) แสดงดังภาพที่ 4.3 จะเห็นว่ามีความแตกต่างจาก SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน (ภาพที่ 4.2) การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเอ็นไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน (ปราณี, 2547) เป็นผลให้ตำแหน่งในการย่อย

ของพันธะเปปไทด์ต่างกัน โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกดัดแปรจึงต่างกัน ภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า แถบของ ά, α และ β – subunit ของ β-conglycinin และ acidic และ basic subunit ของไกลซินินจางลงโดยเฉพาะแถบของ β-conglycinin และ acidic subunit และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาทีซึ่งมีระดับการย่อยสลายที่สูงกว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อย 15 และ 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ จะไม่พบแถบของ β-conglycinin และ acidic subunit แต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (≥14 KDa) อยู่บริเวณด้านล่างของเจล เนื่องจากเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะกว้างทำให้เกิดการย่อยในทุกๆหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนโมเลกุลที่ผ่านการย่อยจึงมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง



ภาพที่ 4.3 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 15 30 และ 60 นาที ;

1. Standard Weight Marker
2. โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI)
3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 15 นาที
4. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 30 นาที
5. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 60นาที

ά α และ β คือ ά α และ β-subunit ของ β-conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.3.3 ความสามารถในการละลาย

การวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และมีค่าสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการละลาย*
0	4.82 ± 0.09^{a}
15	7.92 ± 0.03^{b}
30	8.53 ± 0.04^{c}
60	9.07 ± 0.06^{d}

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ประจุสุทธิเพิ่มมากขึ้น และมีกลุ่ม hydrophilic ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น (Wu และคณะ, 1998) ส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายดีขึ้น โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 60 นาที มีความสามารถในการละลายดีกว่าโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรที่เวลา 15 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ระดับการย่อยสลายมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.3.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.11 ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนสกัด 3 ระดับ คือ 0.1% 0.3% และ 0.5% พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับระดับการย่อยสลาย และความสามารถในการละลาย เมื่อโปรตีนมีขนาดเล็กลง ความสามารถในการละลายเพิ่มมากขึ้น โปรตีนมีประจุสุทธิเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีสายเปปไทด์ที่มีโครงสร้างส่งเสริมให้มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี (Pena-Ramos และ Xiong, 2001)

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTSของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	4.05 ± 0.2^{a}	5.09 ± 0.2^{ab}	6.34 ± 0.5^{b}
15	20.30 ± 1.0^{c}	38.91 ± 0.5^{f}	49.58 ± 0.2^{h}
30	24.36 ± 0.3^{d}	41.6 ± 11.7^{g}	51.49 ± 2.9^{i}
60	33.33 ± 1.2^{e}	43.17 ± 0.5^{g}	57.76 ± 0.4^{j}

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาทีแสดงดังตารางที่ 4.12 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 60 นาที สามารถทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 15 และ 30 นาทีตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% ส่งผลให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)		
	0.05%	0.07%	0.1%
0	2.63±0.3 [a]	7.00±0.4[b]	11.37±0.7 [c]
15	17.09±1.5[d]	24.98±1.1[f]	32.43± 0.7[i]
30	18.18±0.9[d]	28.56±1.8 [g]	44.39±1.1[j]
60	20.71±0.4[e]	32.44±2.2[h]	53.50±0.5[k]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.13 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีกลุ่มไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เพิ่มขึ้น (Waish และคณะ, 2003) โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้น (Zhu และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	1.25±0.1 [a]	2.1±0.1 [b]	4.04±0.2 [c]
15	25.49±0.2 [d]	34.20±0.2 [e]	39.99±0.9 [f]
30	34.18±1.0 [e]	42.83±0.4 [g]	44.39±0.1 [h]
60	39.25±0.3 [f]	44.86±0.2 [i]	47.79±0.2 [j]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส แสดงให้เห็นว่าระดับการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีนมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ถ้าเพิ่มระดับการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีน ทำให้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงขึ้น โดยเฉพาะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก ขนาดโมเลกุลที่เล็กลง การเพิ่มขึ้นของประจุสุทธิและสายโพลีเปปไทด์ขนาดเล็ก จึงส่งผลให้มีสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอ็นไซม์ปาเปนและเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า การที่เอ็นไซม์อัลคาเลสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่กว้างทำให้สามารถใช้ปริมาณเอ็นไซม์ที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสที่ต่างกัน ทำให้โปรตีนถั่วเหลืองที่ถูกดัดแปรมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน การเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายเดียวกัน จะช่วยอธิบายโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดี Sakanaka และ Tachibara (2006) รายงานว่า โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีน ถึงแม้งานวิจัยนี้จะไม่ได้เปรียบเทียบที่ระดับการย่อยสลายเดียวกันของทั้งสองเอ็นไซม์ แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในกรณีของเอ็นไซม์อัลคาเลส ถึงแม้ระดับการย่อยสลายที่ 70% จะเป็นระดับการย่อยสลายที่น้อยกว่าการใช้เอ็นไซม์ปาเปน แต่แนวโน้มความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกสูงกว่า (ตารางที่ 4.7 4.8 4.12 และ 4.13)

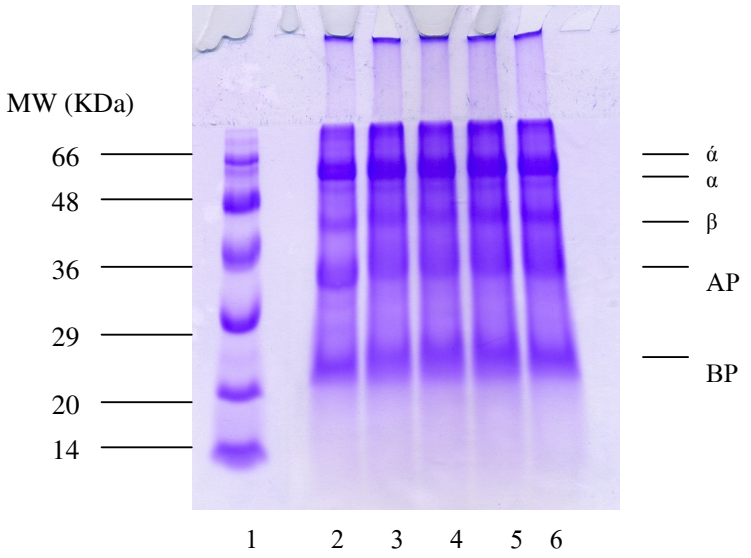
ถึงแม้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส จะถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิตามินซีและโทรอกซ์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี (ตารางที่ 4.1 ถึง 4.3) พบว่ายังมีค่าต่ำกว่ามาก อย่างไรก็ตาม ความเสถียรของ

วิตามินในกระบวนการแปรรูปมีจำกัด ควรทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสและวิตามินซีหรือโทรอกซ์ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ทั้งสามชนิดนี้

4.4 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

4.4.1 องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที มี หน่วยย่อยของ 7S และ 11S โกลบูลินไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร กระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นกระบวนการที่แทนที่หมู่อะมิโนของไลซีนด้วยประจุลบของซัคซินิค (succinic) ไม่ได้ทำให้โครงสร้างของหน่วยย่อยของโปรตีนเปลี่ยนแปลง จึงทำให้ SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร



ภาพที่ 4.4 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที ;

1. Standard Weight Marker
2. โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI)
3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 15 นาที
4. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 30 นาที
5. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 60นาที
6. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 120นาที

ά α และ β คือ ά α และ β-subunit ของ β-conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.4.2 ความสามารถในการละลาย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันด้วยกรดซัคซินิคแอนไฮไดรด์ ที่ความเข้มเข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.14 พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะที่เวลา 120 นาที เนื่องจากกระบวนการซัคซินิลเลชันจะเป็นการแทนที่หมู่อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นลบของซัคซินิล (succinyl) ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มมากขึ้น สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีขึ้น และมีแนวโน้มละลายได้มากขึ้นเมื่อระดับการซัคซินิลเลชันเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากกระบวนการซัคซินิลเลชันทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นผลรวมมาจากประจุที่เพิ่มขึ้น เป็นผลให้สายโพลีเปปไทด์เกิดการคลายตัว หรือเกิดจากกระบวนการซัคซินิลเลชันเหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลที่เพิ่มเข้าไปและหมู่คาร์บอกซิลที่มีอยู่ในโมเลกุลเดิม เป็นผลให้การเกิด electrostatic attraction ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและแอมโมเนียมที่อยู่ใกล้กันในโมเลกุลโปรตีนมีค่าต่ำลง (Lawal, 2005) นอกจากนี้การเกิด intra- และ inter- molecular electrostatic repulsion ช่วยให้โปรตีนสามารถคลายตัวและเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างโปรตีนกับน้ำได้ดีขึ้น (Achouri และคณะ, 1998) ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dua และคณะ (1996) และ Lawal (2005) และเมื่อเปรียบเทียบกระบวนการซัคซินิลเลชันกับการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส พบว่ากระบวนการซัคซินิลเลชัน เมื่อใช้เวลา 60 นาที ทำให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ถูกดัดแปรมีความสามารถในการละลายสูงกว่า (ตารางที่ 4.5 และ 4.10)

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการละลาย*
0	4.82 ± 0.09^{a}
15	7.71 ± 0.06^{b}
30	9.72 ± 0.12^{c}
60	11.31 ± 0.06^{d}
120	14.51 ± 0.22^{e}

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.15 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p\leq0.05$) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาที พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามถ้ากระบวนการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้นเป็น 120 นาที ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจาก ประจุสุทธิที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนทำให้มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันถ้ามีประจุสุทธิมากเกินไป อาจทำให้โปรตีนเปลี่ยนเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidant) ทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง (Pena และ Xiong, 2001) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายที่เพิ่มมากขึ้นและโปรตีนมีประจุสุทธิเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Hu และคณะ, 2003)

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTSของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	4.71 ± 0.7^{a}	7.84 ± 0.5^{b}	10.81 ± 0.6^{b}
15	17.08 ± 0.7^{c}	20.84 ± 0.8^{d}	29.57 ± 1.2^{fg}
30	20.56 ± 0.3^{d}	24.82 ± 1.4^{e}	30.92 ± 1.9^{g}
60	25.54 ± 0.7^{e}	34.39 ± 1.2^{h}	44.48 ± 0.7^{i}
120	16.53 ± 1.1^{c}	24.93 ± 1.0^{e}	28.01 ± 1.7^{f}

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

4.3.4 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.16 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาทีพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการดัดแปรไปเป็น 120 นาที ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ำลง เป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (ตารางที่ 4.15) เนื่องจากประจุลบที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน แต่ในขณะเดียวกันถ้ามีประจุลบมากเกินไปอาจทำให้โปรตีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง (Pena และ Xiong, 2001) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% ส่งผลให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางที่ 4.16 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(%)		
	0.05%	0.07%	0.1%
0	2.90±0.2 [a]	5.13±0.3 [ab]	7.00±0.7 [b]
15	11.96±1.0 [c]	19.37±0.9 [d]	31.86±0.6 [f]
30	27.04±0.6 [e]	37.40±1.0 [g]	50.25±0.7 [h]
60	32.30±0.3 [f]	53.55±1.2 [i]	52.29±1.4 [j]
120	12.54±1.1 [c]	19.19±2.4 [d]	30.57±2.1 [f]

[abc]ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.17 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถในการยับยั้ง

การเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาที พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการดัดแปรไปเป็น 120 นาที พบว่า ความสามารถในยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกต่ำลง ซึ่งเป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ตารางที่ 4.15 และ 4.16) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ประจุที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดซัคซินิคแอนไฮไดร์จะเหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างโปรตีนกับอนุมูลอิสระ จึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระกับกลุ่มไขมันได้ (Hu และคณะ,2003) และกระบวนการซัคซินิลเลชันทำให้โมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดคลายตัวออก ทำให้มีกลุ่มกลุ่มไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เพิ่มขึ้น กลุ่มไฮโดรโฟบิกในโปรตีนจะทำหน้าที่จับกับไขมันแทนที่อนุมูลอิสระ ทำให้ลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันได้ (Chiue และคณะ, 1997)

ตารางที่ 4.17 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	1.29 ± 0.3^{a}	2.1 ± 0.2^{b}	4.04 ± 0.4^{c}
15	15.66 ± 0.7^{d}	22.07 ± 0.6^{f}	28.17 ± 1.0^{h}
30	22.28 ± 1.1^{f}	28.33 ± 0.8^{h}	34.73 ± 0.7^{i}
60	28.28 ± 0.6^{h}	36.02 ± 0.6^{i}	42.61 ± 0.7^{k}
120	14.78 ± 0.8^{d}	19.91 ± 0.6^{e}	24.37 ± 0.7^{g}

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรทั้งสามวิธี คือขบวนการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เอ็นไซม์อัลคาเลสและกระบวนการซัคซินิลเลชัน พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรที่สูงขึ้น จึงส่งผลให้

สมบัติในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนสูงขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการละลายเพียงอย่างเดียวก็ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลา 120 นาที มีค่าการละลายสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ แต่ความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ นอกจากนี้พบว่าแนวโน้มความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน (ตารางที่ 4.6 4.11 และ 4.15) จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่า การใช้เอ็นไซม์โปรติเอสในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเพื่อให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เป็นวิธีที่สามารถดัดแปรให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีสมบัติในการสารต้านออกซิเดชันที่ดี