การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว

นายปฏิญญา ศิริกุลชยานนท์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0294-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF FAT REPLACER FOR OIL IN WATER EMULSION

FROM MUNGBEAN PROTEIN

Mr. Patinya Sirikulchayanont

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0294-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว
โดย	นายปฏิญญา ศิริกุลชยานนท์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ มล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ มล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พันธิพา จันทวัฒน์)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิญญา ศิริกุลชยานนท์ : การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว (PRODUCTION OF FAT REPLACER FOR OIL IN WATER EMULSION FROM MUNGBEAN PROTEIN) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน และ อ. ม.ล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์, 61 หน้า. ISBN 974-17-0294-9

งานวิจัยนี้แยกโปรตีนถั่วเขียวจากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตแป้งถั่วเขียวซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูง ด้วยวิธี isoelectric precipitation แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry เพื่อการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียวซึ่งต้องมีรูปร่างเป็นทรงกลมมีขนาดอยู่ในช่วง 0.1-3 ไมครอน จึงดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่แยกได้มีองค์ประกอบดังนี้ โปรตีน 88.93% เถ้า 4.59 ไขมัน 0.78% คาร์โบไฮเดรตและเส้นใย 5.7% โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีนนี้มีการละลายต่ำสุดที่ pH 4.5 การดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนมีค่าเท่ากับ 2.41 กรัมน้ำต่อกรัมโปรตีน และ 5.76 กรัมน้ำมันต่อกรัมโปรตีน ตามลำดับ ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนเท่ากับ 30 [ของ bovine serum albumin (BSA) มีค่าเท่ากับ 1000] ค่า emulsifying activity index ของโปรตีนถั่วเขียวมีค่าเท่ากับ 83 (ของ BSA มีค่าเท่ากับ 102) อุณหภูมิการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน

การดัดแปรทางเคมีโดยวิธี succinylation บ่งว่า degree of chemical modification เพิ่มขึ้นอย่างถดถอยเมื่อเพิ่มปริมาณสารดัดแปรมากขึ้น ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนดัดแปรมีค่าสูงสุดและเท่ากับ 62 เมื่อใช้สารดัดแปร succinic anhydride 0.4 กรัมต่อกรัมโปรตีน การดัดแปรโปรตีนทำให้การละลายของโปรตีน การดูดซับน้ำ และค่า emulsifying activity index ของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ค่าการดูดซับน้ำมันไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเขียว อุณหภูมิการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนนี้มีค่าเท่ากับโปรตีนเริ่มต้นคือ 83 $^{\circ}$C ส่วนค่า ΔH มีค่าลดลงอย่างมากจาก 13.53 J/g เหลือ 3.62 J/g

จากการทดลองพบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารทดแทนไขมันคือ ใช้โปรตีนถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการดัดแปร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 83 $^{\circ}$C นาน 15 นาที โดยมีการตีปั่นตลอดเวลาที่ความเร็ว 17,000 rpm แล้วตีปั่นต่อที่ความเร็ว 23,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำมาแยกอนุภาคที่ใหญ่กว่า 3 ไมครอน โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g นาน 10 นาที กระบวนการดังกล่าวให้อนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอนที่มีรูปร่างเป็นวงกลมในส่วนของเหลวในปริมาณ 94.66% ของอนุภาคทั้งหมด

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.........................
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม....................

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4172342723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD : MUNGBEAN PROTEIN / FAT REPLACER / CHEMICAL MODIFICATION / SUCCINYLATION

PATINYA SIRIKULCHAYANONT. PRODUCTION OF FAT REPLACER FOR OIL IN WATER EMULSION FROM MUNGBEAN PROTEIN. THESIS ADVISOR : PASAWADEE PRADIPASENA, Sc.D., AND SIRIPASTR JAYANTA. 61 pp.

ISBN 974-17-0294-9

This research is aimed to transform high protein content wastewater from mungbean starch factories into value added products such as fat replacer. The feasibility of isoelectric precipitation method to separate protein from wastewater followed by freeze-drying process to produce dried mungbean protein (MBP) is reported. An exceptionally good quality MBP (protein 88.93%, ash 4.59%, fat 0.78%, carbohydrate and fiber 5.7%) is obtained from these processes. Significant characteristics of MBP are: oil adsorption at 5.76 g oil/g MBP, water adsorption at 2.41 g water/g MBP, surface hydrophobicity 30 (BSA 1000), emulsifying activity index (EAI) 83 (BSA 102), ΔH of denaturation 13.53 J/g, minimum solubility at pH 4.5. It was found that denature temperature increased when protein concentration increased.

Chemical modification of MBP is done via succinylation with succinic anhydride. The rate of chemical modification decreased when concentration of modifying agent increased. Maximum surface hydrophobicity of modified MBP was obtained with 0.4g succinic anhydride/g MBP. Solubility at pH 4.5 and 7.0, water adsorption and EAI of modified MBP are higher than those of unmodified protein significantly, while oil adsortion is not difference. Other characteristics of modified MBP are: denature temperature 83 ^{o}C and ΔH of denaturation 3.62 J/g.

Optimum conditions for production of fat replacer can be obtained by directly heating unmodified MBP at 83 ^{o}C for 15 minutes coupled with homogenizing at 17,000 rpm and continued homogenizing at 23,000 rpm for 15 minutes without heating. Then, oversized particles (> 3 microns) were precipitated at 4000 x g for 10 minutes, resulting in 94.66% protein particles of 0.1-3 microns in supernatants.

Department Food Technology	Student's signature ....
Field of study Food Technology	Advisor's signature ....
Academic year 2001	Co-advisor's signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้สนับสนุนการวิจัยดังนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ม.ล. ศิริพัสตร์ ไชยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดการวิจัยนี้

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์คือ อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล รองศาสตราจารย์ ดร. พันธิพา จันทวัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร สำหรับการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

โครงการอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ของทบวงมหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ชุดโครงการสำรวจเพื่อประเมินผลและวางแผนการวิจัยเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร-อุตสาหกรรมอาหาร งบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2544 สำหรับงบประมาณในการวิจัย

บริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์ จำกัด (มหาชน) และ บริษัท Abbra coporation limited สำหรับวัตถุดิบ และ soy protein isolate ตามลำดับ

ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ และหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง สำหรับการทำแห้งโปรตีนด้วยเครื่อง Freeze dryer และการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Colorimeter

เจ้าหน้าที่ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และเจ้าหน้าที่ของศูนย์เครื่องมือกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือต่างๆ

พี่ น้อง และเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิจัย

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และคุณป้า และขอบคุณญาติ พี่น้อง และเพื่อนๆ ที่เป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญตาราง .... ซ

สารบัญภาพ .... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทัศน์ 3

3. วิธีการทดลอง 21

4. ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง 31

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 50

รายการอ้างอิง 52

ภาคผนวก 57

ภาคผนวก ก 58

ภาคผนวก ข 59

ภาคผนวก ค 60

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ปริมาณโปรตีนของถั่วเขียว 12
2 ปฏิกิริยาการดัดแปรทางเคมีของโปรตีน 17
3 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้ 32
4 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้ 33
5 การดูดซับน้ำ และน้ำมัน ค่า surface hydrophobicity และค่า emulsifying activity index ที่ pH 7.0 ของโปรตีนถั่วเขียว และ soy protein isolate (SPI) ……….. 35
6 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเขียว และโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร ที่ pH 7.0 และ 4.5 39
7 ค่าการดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนถั่วเขียว และโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร .. 40
8 ค่า EAI ของสารละลายโปรตีน 0.5%(w/v) ใน phosphate buffer pH 7 41
9 สมบัติทางความร้อนของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร ความเข้มข้น 10% (w/w) ที่ pH 7.0 41
10 ผลของแรงที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงต่อส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง 47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่าง ขนาดอนุภาคของ microparticulated protein particle* (MP^3) กับลักษณะทางประสาทสัมผัส	6
2	Scanning electron micrograph (SEM) ของ Simplesse® ซึ่งแสดงให้เห็นถึงขนาดและรูปร่างของสารทดแทนไขมัน	7
3	Atomic force micrograph ของ MP^3 (Simplesse®) แสดงให้เห็นอนุภาครูปทรงกลม	8
4	Light micrograph ของ MP^3 (Simplesse®) ที่ความเข้มข้น 1.5% ในน้ำ แสดงให้เห็นขนาด รูปร่าง และการกระจายของอนุภาค	8
5	ผลของความคงตัวต่อความร้อน ของอนุภาคโปรตีนต่างๆ	10
6	การกระจายของอนุภาคขนาดต่างๆ ที่ได้จากการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ชอบน้ำ	11
7	ผลของ pH ต่อการละลายของโปรตีนถั่วเขียวที่อุณหภูมิห้อง (27.5 °C) ……..	15
8	รูปแบบของ SE-HPLC ของ micellized protein (1) และ isoelectric precipitated protein (2) เมื่อมีการเติม SDS ……………………………….	16
9	Succinic anhydride ………………………………………………………	18
10	ปฏิกิริยา succinylation ……………………………………………………	18
11	ผลของความเข้มข้นของสารดัดแปรคือ acetic anhydride (AA) และ succinic anhydride (SA) ต่อระดับของ lysine ที่ถูกดัดแปร	20
12	วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาสมบัติและการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว	22
13	วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาวิธีการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว ..	29
14	โปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้	31
15	ความสามารถในการละลายของไนโตรเจนในโปรตีนถั่วเขียวที่ pH ต่างๆ	34
16	สมบัติทางความร้อนของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวที่ pH 7.0 ……………….	35
17	ความสัมพันธ์ระหว่าง Degree of chemical modification กับปริมาณสารดัดแปร	36

18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร โดยวิธี succinylation กับปริมาณสารดัดแปร 38
19 โปรตีนถั่วเขียวดัดแปรซึ่งดัดแปรโดยใช้ปริมาณสารดัดแปร 0.4 กรัมสารต่อกรัมโปรตีน 39
20 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาคในช่วง 0.1-3 ไมครอน กับเวลาที่ให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนถั่วเขียว (native)และโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร (modified) ที่อุณหภูมิ 83 ^{o}C โดยแปรปริมาณ $CaCl_2$ ที่เติมในช่วง 0-0.03 กรัม 43
21 ผลของความเร็วของ hand-operating homogenizer ที่ใช้ในการตีปั่นนาน 5 นาที ต่อปริมาณอนุภาคของโปรตีนถั่วเขียวที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอน 44
22 ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นที่ความเร็ว 23,000 rpm ต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนถั่วเขียวขนาด 0.1-3ไมครอน 45
23 ผลของแรงเหวี่ยงต่อปริมาณอนุภาคที่แยกได้ในส่วนของเหลวตอนบน 46
24 ผลของแรงเหวี่ยงต่อปริมาณอนุภาคที่แยกได้ในส่วนตะกอน 48
25 รูปร่างของอนุภาคโปรตีนที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง (B) เมื่อเทียบกับรูปร่างของกระดาษกรอง (A) 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีนถั่วเขียวในงานวิจัยนี้หมายถึง โปรตีนที่แยกได้จากกระบวนการผลิตแป้งถั่วเขียว เนื่องจากถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของทวีปเอเชีย มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบถึง 24% (Poehlman, 1991) ในปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตแป้งถั่วเขียวและวุ้นเส้นในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่มีวิธีการแยกโปรตีนถั่วเขียวออกจากน้ำทิ้งของโรงงาน ซึ่งนอกจะทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีนพืชคุณภาพดีที่เหมาะกับการบริโภคแล้ว ยังอาจก่อปัญหาด้านมลภาวะด้วย มีโรงงานในประเทศไทยบางแห่งเท่านั้น ที่มีกระบวนการแยกโปรตีนถั่วเขียวออกจากน้ำทิ้งของโรงงานขายเป็นสินค้าเสริมจากการผลิต ที่เพิ่มมูลค่าด้านเศรษฐกิจให้แก่โรงงาน โปรตีนที่แยกได้นี้มักมีคุณภาพต่ำ และจำหน่ายในรูปอาหารสัตว์ หรือเป็นสารตั้งต้นของอุตสาหกรรมโปรตีนไฮโดรไลเซทของสารปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำซอสปรุงรส เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นว่าการแยกโปรตีนถั่วเขียวไปใช้นั้นยังจำกัดอยู่ในวงแคบ อาจเนื่องมาจากมีงานวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนถั่วเขียวน้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยของโปรตีนเวย์ซึ่งเป็นของเสียหรือผลพลอยได้จากอุสาหกรรมนม ในปัจจุบันมีการนำโปรตีนเวย์มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าที่มีราคาสูงเช่น สารทดแทนไขมันแล้ว (Simplesse®, Dairy-Lo®)

แนวความคิดใหม่ทางด้านโภชนาการ และการแพทย์ในปัจจุบันบังคับให้อุตสาหกรรมอาหารหันมาสนใจในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันต่ำ เนื่องจากข้อมูลทางการแพทย์ชี้ให้เห็นว่าการบริโภคอาหารที่มีไขมันในปริมาณสูง เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของโรคอ้วน โรคหัวใจ และโรคมะเร็งบางชนิดแก่ผู้บริโภค (Akoh, 1999) แต่เนื่องจากไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารที่ให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคเช่น ทำให้อาหารนุ่มไม่แข็งกระด้าง ทำให้ไขมันเป็นองค์ประกอบที่ขาดไม่ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นจึงมีการสรรหาสารทดแทนไขมันที่ให้พลังงานน้อยกว่าไขมันแต่ยังคงช่วยให้อาหารมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ถูกใจผู้บริโภค

โปรตีนเป็นสารอาหารประเภทหนึ่ง ที่สามารถนำมาใช้ผลิตสารทดแทนไขมันได้ การผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนเพื่อ นำไปใช้ทดแทนไขมันในอาหารที่มีน้ำเป็นวัฏภาคต่อเนื่องนั้น สามารถทำได้โดยการผลิตคอลลอยด์โปรตีนที่มีอนุภาคเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ถึง 3 ไมครอน คุณสมบัติสองประการนี้เป็นข้อกำหนดสำคัญของสารทดแทนไขมันเพื่อที่จะได้มีสมบัติทางกายภาพ และลักษณะทางเนื้อสัมผัสของอาหารที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกับไขมันธรรมชาติ (Singer and Dunn, 1990)

กระบวนการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนเวย์ใช้หลักการทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน ร่วมกับการให้อัตราเฉือนสูง เพื่อให้ได้อนุภาคโปรตีนทรงกลมที่มีสมบัติกระจายตัวได้ในน้ำ มีขนาดประมาณ 0.1-3.0 ไมครอน และเป็นคอลลอยด์ที่มีลักษณะทางประสาทสัมผัสคล้ายครีม (Singer *et al.*, 1988)

ดังนั้นเพื่อศึกษาสมบัติและผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว จึงกำหนดขอบเขตของงานวิจัยนี้ไว้ดังต่อไปนี้

- เตรียมโปรตีนถั่วเขียวจากน้ำทิ้งของโรงงานแป้งถั่วเขียว
- วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของโปรตีนถั่วเขียว
- ศึกษากระบวนการดัดแปรทางเคมีของโปรตีนถั่วเขียว
- วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนดัดแปร
- ศึกษาวิธีผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนดัดแปร
- ศึกษาขนาดและรูปร่างของสารทดแทนไขมันที่ผลิตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

หน้าที่ของไขมันและน้ำมันในอาหาร

เนื่องจากชนิด ปริมาณ และ การกระจายตัว ของไขมันในอาหาร เป็นคุณลักษณะเฉพาะของอาหารชนิดต่างๆ การที่จะลดปริมาณไขมันในอาหารเหล่านี้ด้วยสารทดแทนไขมัน จะต้องกระทำโดยไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของอาหารที่เนื่องมาจากไขมัน เช่น รสชาติ ความข้นหนืด ลักษณะปรากฏ ลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ เป็นต้น ดังนั้นในเบื้องต้นจึงขอสรุปถึงบทบาทของไขมันในอาหารซึ่งมี 3 ประการดังนี้ (Jones, 1996a)

1) หน้าที่ทางด้านโภชนาการ
   - ไขมันเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายเช่น กรดลิโนเลอิก (18:2) และกรดลิโนเลนิก (18:3)
   - ไขมันเป็นตัวพา (carrier) สำหรับวิตามินที่ละลายในไขมันเช่น วิตามินเอ ดี อี และ เค
   - ไขมันเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เนื่องจากไขมัน/น้ำมัน ให้พลังงานแก่ร่างกายได้ถึง 9 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม ซึ่งมากกว่าสารอาหารชนิดอื่นๆ (โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตให้พลังงานประมาณ 4 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม)
2) หน้าที่ทางด้านเคมีและฟิสิกส์
   - ไขมันส่งผลต่อพฤติกรรมของอาหารระหว่างการแปรรูปเช่น ความคงตัวต่อความร้อน และความหนืด
   - ไขมันส่งผลต่อลักษณะอาหารหลังการแปรรูปเช่น การกระจายตัวขององค์ประกอบของอาหาร และความข้นเหนียว
   - ไขมันส่งผลต่อความคงตัวของอาหารในช่วงการเก็บรักษาเช่น การแยกตัวของน้ำมัน และการหืน
3) หน้าที่ทางด้านประสาทสัมผัส
   - ไขมันส่งผลถึงด้านลักษณะปรากฏของอาหารเช่น ผิวมัน สี และความขุ่นของอาหาร

- ไขมันส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของอาหารเช่น ความข้นหนืด และความกระด้างหรือแข็งของอาหาร
- ไขมันส่งผลต่อกลิ่นรสของอาหารเช่น ความเข้มของกลิ่นรส การปลดปล่อยกลิ่นรส (flavor release) และการพัฒนากลิ่นรสในอาหาร
- ไขมันส่งผลต่อ mouthfeel ของอาหาร เช่น การละลายในปากของไขมันทำให้รู้สึกนุ่มนวล และลักษณะเป็นครีม

สารที่ใช้เพื่อทดแทนไขมัน

Jones (1996a) ได้ให้นิยามของส่วนผสมอาหารที่ทดแทนไขมันและก่อให้เกิดหรือคงไว้ซึ่งลักษณะเดิมของอาหารที่เกิดจากไขมันไว้ดังนี้

- Fat replacer หมายถึงส่วนผสมในอาหารที่สามารถใช้แทนไขมันได้
- Fat substitute หมายถึงสารประกอบสังเคราะห์ที่สามารถใช้แทนไขมันได้หนึ่งต่อหนึ่งโดยน้ำหนัก โดยทั่วไปจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายไขมันแต่จะไม่ย่อยสลายในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่คงทนทนต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยเอนไซม์ในร่างกาย
- Fat mimetic หมายถึงสารทดแทนไขมันซึ่งเมื่ออุ้มน้ำไว้ในเมตริกซ์ (matrix) ในปริมาณมากพอเพียง จึงทำให้มีลักษณะปรากฏ และลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายไขมัน
- Low-calorie fat หมายถึงสารประกอบไตรกลีเซอไรด์สังเคราะห์ (synthetic triglyceride) โดยการแทนที่กรดไขมันธรรมชาติด้วยกรดคาไพรลิก (8:0), กรดคาพริก (10:0) และกรดบีฮีนิก (22:0) บนโครงของกลีเซอรอล (glycerol backbone) ยังผลในการลดปริมาณแคลอรี่ เนื่องจากกรดบีฮีนิกไม่ถูกย่อยสลาย ส่วนกรดกรดคาไพรลิกและกรดคาพริกถูกย่อยสลายแต่จะคายพลังงานน้อยกว่ากรดไขมันธรรมชาติ สารประกอบไตรกลีเซอไรด์สังเคราะห์เหล่านี้ให้พลังงานเพียง 5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม
- Fat extender หมายถึงสารทดแทนไขมันที่ประกอบด้วยไขมันธรรมชาติผสมกับส่วนผสมอื่นๆ เช่น น้ำ ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้เช่น อิมัลชั่น

Akoh ได้สรุปว่าสารทดแทนไขมัน (fat replacer) โดยทั่วไปแล้วแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ fat substitute และ fat mimetic (Akoh, 1999) โดยแต่ละกลุ่มมีสมบัติดังนี้

- Fat substitute หมายถึงสารที่มีความคล้ายคลึงกับไตรกลีเซอไรด์ทั้งทางกายภาพและทางเคมีสามารถใช้แทนไขมันได้ต่อน้ำหนัก อาจเป็นสารที่ผลิตมาจากไขมัน จากการสังเคราะห์ทางเคมีของไขมันหรือน้ำมัน จากการดัดแปรไขมันหรือน้ำมันปกติด้วยวิธีการทางเอนไซม์ สารทดแทนไขมันประเภทนี้มักคงตัวต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแปรรูปอาหารทั้งที่อุณหภูมิต่ำและสูง
- Fat mimetic เป็นสารที่เลียนแบบสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสและทางกายภาพของไตรกลีเซอไรด์ แต่ไม่สามารถใช้ทดแทนไขมันได้ทั้งหมด 100% สารทดแทนไขมันประเภทนี้มักผลิตมาจากโปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง และเซลลูโลส จากกระบวนการดัดแปรทางเคมี หรือกายภาพเพื่อให้มีสมบัติใกล้เคียงไขมันธรรมชาติมากที่สุด สารทดแทนไขมันประเภทนี้ให้พลังงานประมาณ 0-4 kcal/g โดยทั่วไปสารทดแทนไขมันประเภทนี้ดูดซับน้ำเอาไว้ในปริมาณสูง จึงไม่เหมาะที่จะใช้ทอดอาหาร นอกจากนั้นสารทดแทนไขมันประเภทนี้ยังอาจนี้ยังอาจเสียสภาพธรรมชาติ หรือเกิดการไหม้ของน้ำตาลได้ที่อุณหภูมิสูง

ข้อมูลทางการแพทย์ชี้ให้เห็นว่า การบริโภคไขมันในปริมาณสูงเป็นสาเหตุให้ผู้บริโภคเป็นโรคอ้วน (obesity) และโรคมะเร็งบางชนิดมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่า การบริโภคอาหารที่ประกอบด้วยไขมันอิ่มตัวอาจเป็นสาเหตุของคอเลสเตอรอลในโลหิตสูง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเส้นเลือดเลี้ยงหัวใจอุดตัน (coronary heart disease) ได้ (Akoh, 1999) จากข้อมูลทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้สารทดแทนไขมันได้รับความสนใจจากผู้บริโภค นักโภชนาการ และแพทย์

สารทดแทนไขมันจากโปรตีน

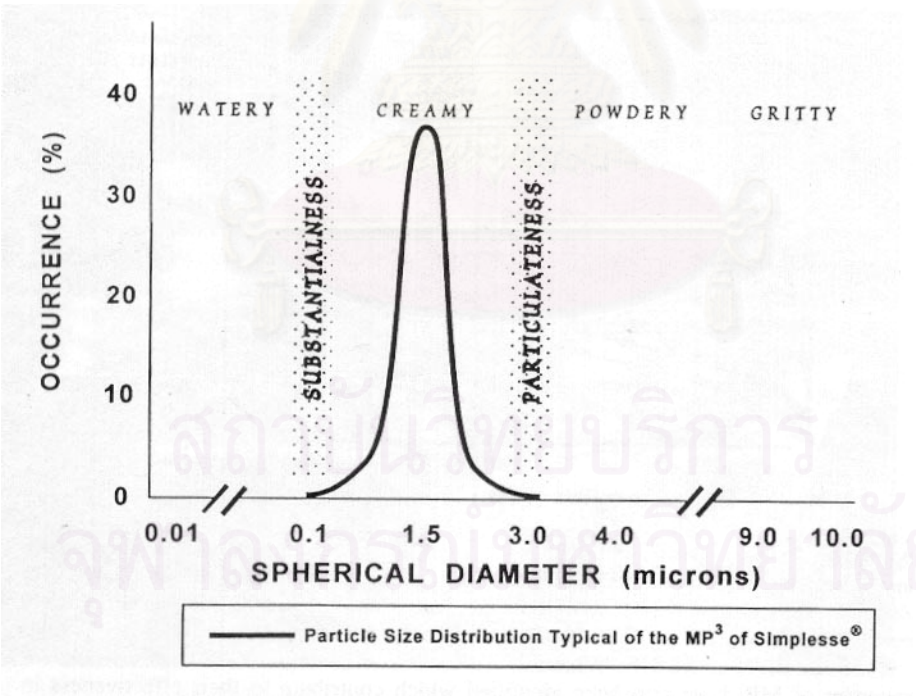
ในระบบอาหารที่มีน้ำเป็นวัฏภาคต่อเนื่อง การแทนที่ไขมันทั้งหมดหรือบางส่วนอาจทำได้โดยการแทนที่ไขมันด้วยสารที่มีโครงสร้างทางกายภาพคล้ายไขมัน ดังนั้นจึงเกิดแนวความคิดที่จะแทนที่เม็ดไขมันในอาหารด้วยสารทดแทนไขมันที่สามารถเกิดอนุภาคทรงกลมในวัฏภาคนี้ และให้สมบัติทางกายภาพคล้ายเม็ดไขมันขึ้น (Jones, 1996b)

ในการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีน ทำได้โดยการแปรสภาพโปรตีนให้เสียสภาพธรรมชาติ ในภาวะนี้สายโปรตีนจะเกิดการคลายตัว (protein unfold) แล้วรวมตัวกัน การรวมตัว

ของสายโปรตีนนี้อาจให้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นจะต้องมีวิธีควบคุมขนาดของเม็ดโปรตีนให้อยู่ในช่วงที่ต้องการเช่น การใช้แรงเฉือนร่วมกับการให้ความร้อน (Singer, 1996) เป็นต้น

สารทดแทนไขมันที่ได้จากกระบวนการที่กล่าวมานี้เรียกว่า Microparticulated protein particle (MP^3) ซึ่งสามารถให้คำนิยามได้ว่า “MP^3” คือเจลของโปรตีนที่ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1/1000 มิลลิเมตร แต่ละอนุภาคมีโมเลกุลของโปรตีนหลายล้านโมเลกุล (Tang *et al*., 1989 cited in Singer, 1996)

ลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายไขมันของผลิตภัณฑ์อาหารแบบอิมัลชั่น ที่มีน้ำเป็นวัฏภาคต่อเนื่องนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคเป็นสำคัญ Singer and Dunn (1990) รายงานว่าอนุภาคของโปรตีนที่ใช้เป็นสารทดแทนไขมันควรเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1-3.0 ไมครอน ลักษณะทางกายภาพเหล่านี้จำเป็นที่จะทำให้สารทดแทนไขมันมีลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายครีม (creamy) สารแขวนลอยที่อนุภาคมีขนาดต่ำกว่า 0.1 ไมครอน จะให้ลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายน้ำ (watery) ส่วนในกรณีที่สารแขวนลอยมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 3.0 ไมครอน จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสหยาบคล้ายแป้งหรือทราย (powdery or gritty) ดังแสดงในภาพที่ 1

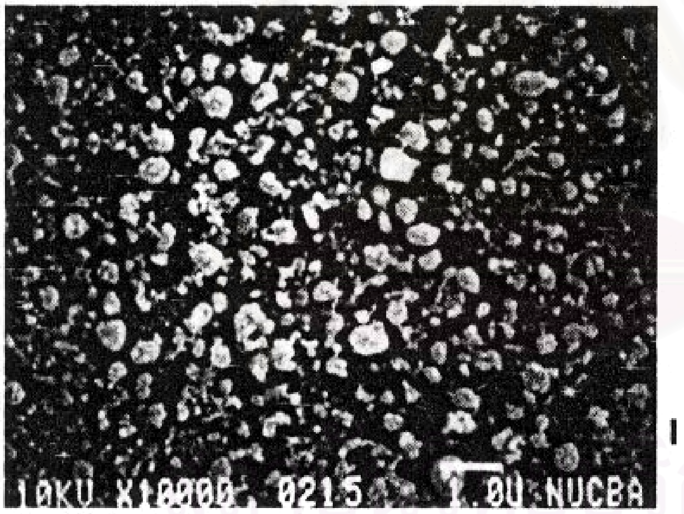


<u>ภาพที่ 1</u> ความสัมพันธ์ระหว่าง ขนาดอนุภาคของ microparticulated protein particle (MP^3) กับลักษณะทางประสาทสัมผัส

ที่มา: Singer and Dunn (1990)

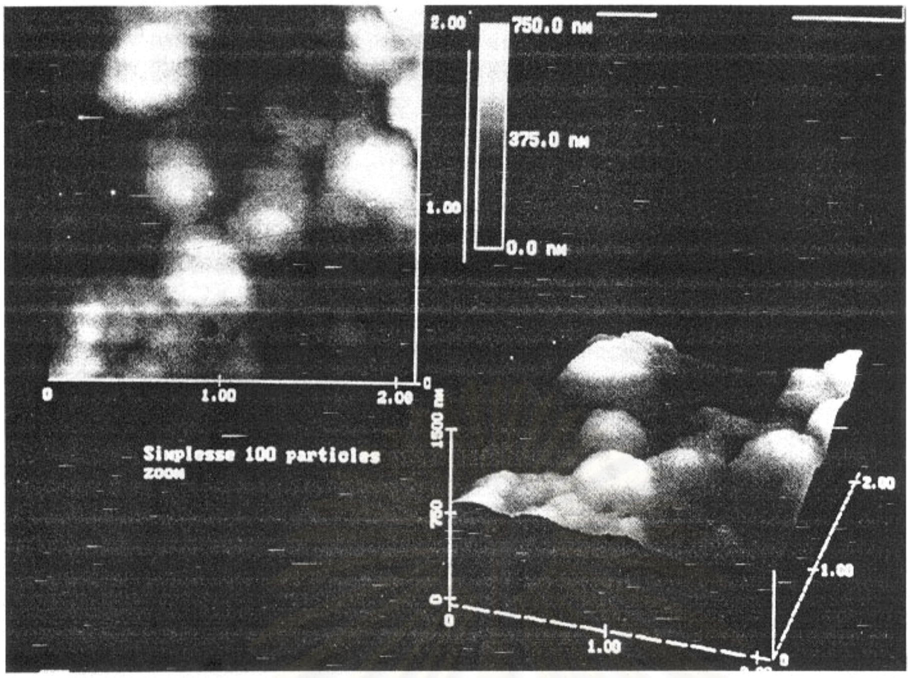
ผลจากการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ MP^3 พบว่านอกจากขนาดแล้ว รูปร่างของอนุภาคก็เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ทำให้ MP^3 มีลักษณะทางประสาทสัมผัสคล้ายไขมัน (Civille, 1990) จากข้อมูลการวิเคราะห์โครงสร้างระดับย่อย (microstructure) ของ MP^3 ในสารทดแทนไขมัน Simplesse® พบว่าอนุภาคเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ไมครอน และมีค่าการกระจายตัวของอนุภาค (particle size distribution) อยู่ในช่วงแคบ ดังแสดงในภาพที่ 2 3 และ 4

แม้ว่าสารทดแทนไขมันจากโปรตีนสามารถใช้ทดแทนลักษณะเนื้อสัมผัสของไขมัน ธรรมชาติในอาหารได้ แต่ก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานที่อุณหภูมิสูง เช่น เป็นน้ำมันในการปรุงอาหาร (cooking oil) หรือน้ำมันทอดอาหาร เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติและจับตัวกันเป็นก้อนที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้แล้วโปรตีนยังมีแนวโน้มที่จะรวมตัวกับสารประกอบที่ให้กลิ่นรสเป็นสาเหตุให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ลดลง (Lucca and Tepper, 1994)



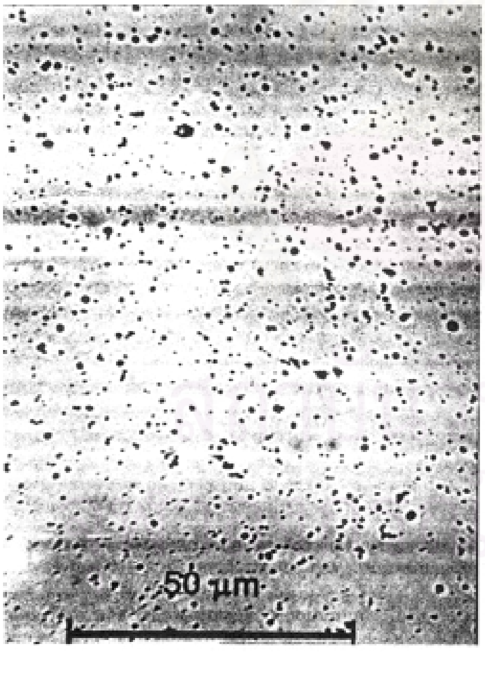
<u>ภาพที่ 2</u> Scanning electron micrograph (SEM) ของ Simplesse® ซึ่งแสดงให้เห็นถึงขนาดและรูปร่างของสารทดแทนไขมัน

ที่มา: Singer (1990) cited in Singer (1996)



ภาพที่ 3 Atomic force micrograph ของ MP^3 (Simplesse®) แสดงให้เห็นอนุภาครูปทรงกลม

ที่มา: The Nutrasweet Co., Deerfield, IL, USA



ภาพที่ 4 Light micrograph ของ MP^3 (Simplesse®) ที่ความเข้มข้น 1.5% ในน้ำ แสดงให้เห็นขนาด รูปร่าง และการกระจายของอนุภาค

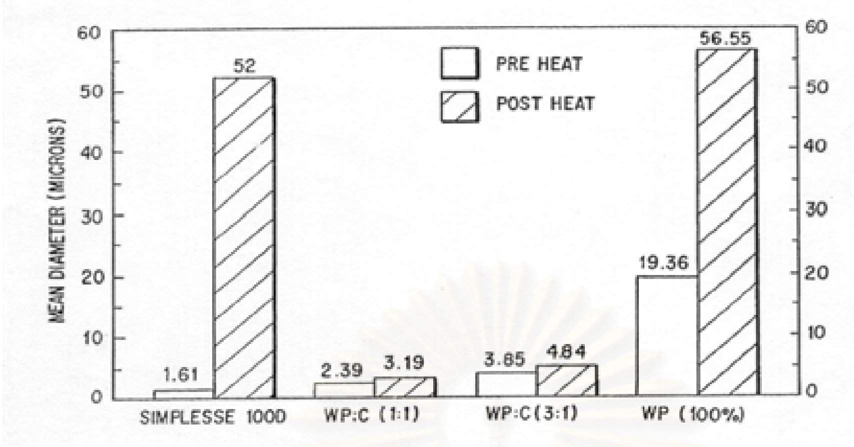
ที่มา: Singer and Dunn (1990)

การผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีน

Singer *et al.* (1988) ได้ผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนเวย์ของนม โดยทำให้โปรตีนเวย์เสียสภาพด้วยความร้อนร่วมกับการใช้แรงเฉือน วิธีการผลิตเริ่มจากการนำโปรตีนเวย์มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) จากนั้นนำโปรตีนเวย์เข้มข้นที่ได้ไปทำการไล่อากาศออกเพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายเทความร้อนให้ดีขึ้น หลังจากนั้นนำโปรตีนเวย์ไปทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (heat denaturation) ที่อุณหภูมิประมาณ 80-130 $^{\circ}C$ โดยปรับ pH ของสารละลายโปรตีนให้อยู่ในช่วง 3.5 ถึง 5.0 และใช้อัตราเฉือนที่ 500,000 นาที$^{-1}$ Singer *et al.* พบว่าเวลาในการเสียสภาพของโปรตีนจะแปรผันตามอุณหภูมิที่ใช้ หลังจากโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติแล้ว จำเป็นต้องเติมสารป้องกันการจับตัวของโปรตีน (aggregate blocking agents) เช่น น้ำตาลแล็กโทส เลซิทิน (lecithin) หรือ แซนแทนกัม (xanthan gum) หรือของผสมของสารเหล่านี้ หลังจากนั้นจะนำโปรตีนไปบดปั่นเพื่อลดขนาดอนุภาค และทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยกระบวนการโฮโมจีไนซ์ (homogenization) ในขั้นนี้สารละลายโปรตีนประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กประมาณ 0.1-2.0 ไมครอน อนุภาคโปรตีนกระจายตัวได้ดีในวัฏภาคน้ำโดยไม่รวมตัวกันเป็นก้อน พบปริมาณอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 3.0 ไมครอน น้อยกว่า 2% สารแขวนลอยที่ได้ให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสคล้ายครีม

McCarthy and Maegli (1994) ผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนเวย์ เคซีน และสารเคมีอื่นๆ ที่อัตราเฉือนต่ำ โดยนำโปรตีนเวย์เข้มข้นมาผสมกับเคซีน โดยคนสารละลายที่อัตราเฉือนต่ำ พบว่าขนาดของอนุภาคที่ได้มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนระหว่างโปรตีนเวย์เข้มข้นต่อเคซีน สารแขวนลอยที่ได้มีความคงทนต่อความร้อนมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากโปรตีนเวย์โดยตรงดังแสดงในภาพที่ 5

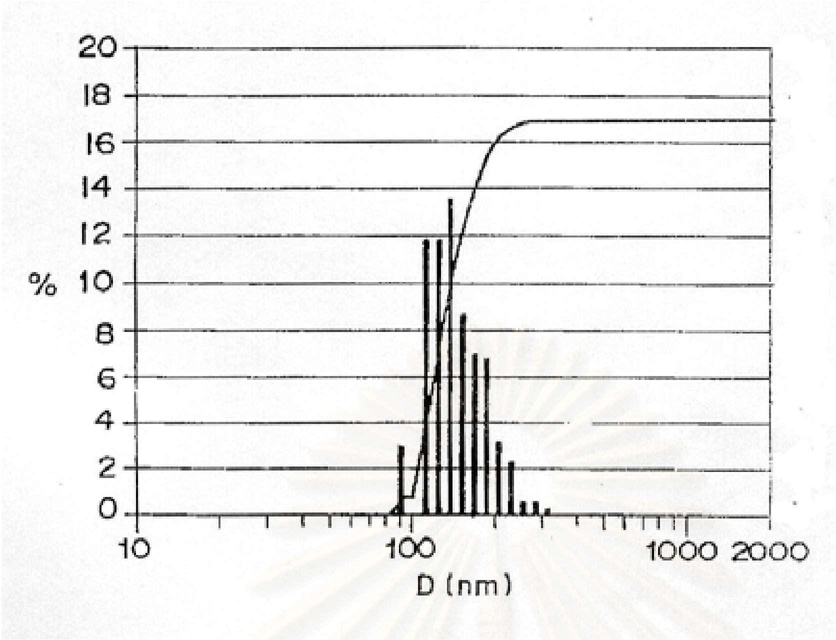
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5 ผลของความคงตัวต่อความร้อน ของอนุภาคโปรตีนต่างๆ
ที่มา: McCarthy and Maegli (1994)

ขั้นตอนการผลิตมีดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนเวย์กับเคซีน ให้มีความเข้มข้นในช่วง 5-27% (เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม) ปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 3.0-6.6 จากนั้นกวนสารละลายด้วยแรงเฉือนต่ำ อาจเติมสารเคมีอื่นๆลงไปด้วยเช่น ไอออนที่มีประจุ 2+ (divalent cation) สารประกอบฟอสเฟต และอิมัลซิไฟเออร์ เพื่อช่วยให้ได้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันตามต้องการ จากนั้นนำโปรตีนไปแปรสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 75-100 $^{\circ}$C โดยใช้เวลาประมาณ 1-20 นาที พบว่าวิธีอนุภาคโปรตีนจากขั้นตอนนี้มีขนาดประมาณ 1-20 ไมครอน และสามารถทำให้แตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กได้ง่ายโดยการบดปั่น (homogenized)

Yamamoto *et al.* (1998) ผลิตสารทดแทนไขมันโดยการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติด้วยสารละลายอินทรีย์ที่ชอบน้ำ โดยผสมโปรตีนเวย์ที่เป็นกรด (acid whey protein) กับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ชอบน้ำเช่น แอลกอฮอล์โมเลกุลเล็กที่มีคาร์บอนอะตอม 1-5 (โดยเฉพาะเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัยในการบริโภค) ในปริมาณ 1:1 พบว่าอนุภาคโปรตีนจะตกตะกอนออกมาจากสารละลายและสามารถทำการแยกออกได้โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 15 นาที ตะกอนที่แยกได้เป็นอนุภาคโปรตีนขนาด 0.01-1 ไมครอน ดังแสดงในภาพที่ 6 มีลักษณะนุ่มเนียน (smooth) และ grossy คล้ายไขมันธรรมชาติ สามารถนำไปใช้แทนไขมันได้



<u>ภาพที่ 6</u> การกระจายของอนุภาคขนาดต่างๆ ที่ได้จากการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ชอบน้ำ
ที่มา: Yamamoto *et al*. (1998)

โปรตีนเวย์ถือเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง จึงมีการนำโปรตีนเวย์มาผลิตสารทดแทนไขมันกันมากในประเทศที่บริโภคนมและผลิตภัณฑ์จากนมเป็นหลัก นมมีโปรตีนเวย์ในประมาณถึง 20% เนื่องจากโปรตีนเวย์มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น globular protein (Leman and Kinsella, 1989) คล้ายคลึงกับโปรตีนถั่วเขียวที่นิยมบริโภคกันมากในเอเชีย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงคิดนำโปรตีนถั่วเขียวมาผลิตสารทดแทนไขมัน โดยจะนำวิธีของ Singer *et al.* (1988) และ McCarthy and Maegli (1994) มาใช้ทดลองดัดแปรโปรตีนถั่วเขียว

โปรตีนถั่วเขียว

ถั่วเขียว (mungbean, greengram) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ประเภทพืชล้มลุก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna radiata* (L.) Wilczek เป็นพืชเกษตรกรรมสำคัญของทวีปเอเชียเช่น อินเดีย พม่า และไทย ถือเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีราคาไม่แพง ถั่วเขียวมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 24% (ตารางที่ 1) โปรตีนถั่วเขียวเป็นโปรตีนประเภท กลอบูลาร์โปรตีน (globular protein) ประกอบด้วยกลอบูลิน (globulins) ประมาณ 70% และอัลบูมิน (albumins) ประมาณ 15-20%

โดยส่วนที่เหลือเป็นกลูเตลิน (glutelins) โปรตีนประเภทกลอบูลินหลักในถั่วเขียวคือ วิซิลิน (vicilin) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่มกรด (acidic amino acid) ในประมาณสูง แต่มีกรดอะมิโนกลุ่มที่ประกอบด้วยกำมะถัน (sulphur amino acid) ในปริมาณน้อย (Poehlman, 1991)

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนของถั่วเขียว

Number Accessions	Range (%)	Mean (%)	Reference
131	19.10 to 28.30	24.00	Yohe *et al*., 1971
7[a]	24.31 to 27.91	26.27	Soni *et al*., 1975
3[a]	25.20 to 28.20	26.56	Shobhana *et al*., 1976
6[a]	20.37 to 21.77[b]	21.08[b]	Rao *et al*., 1978
68	19.00 to 25.00	21.80	AVRDC, 1979
17[a]	22.88 to 25.00	23.91	Rosario *et al*., 1980

[a] Locally adapted accessions only included in the experiment.

[b] Moisture-free basis.

ที่มา: Poehlman (1991)

โปรตีนจากเมล็ดพืชล้มลุกหลายชนิดมีกรดอะมิโนไม่ครบถ้วนทุกชนิด หรือมีอยู่ในอัตราที่ไม่เหมาะสม กล่าวคือมี ไลซีน (lysine) ไอโซลูซีน (isoleusine) ลูซีน (leusine) ทรีโอนีน (threonine) และวาลีน (valine) ในปริมาณสูง แต่เมไทโอนีน (methionine) และซิสตีน (cystine) ในปริมาณที่น้อยทำให้คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนต่ำ (Evan and Bandemer, 1967 cited in Poehlman, 1991)

โดยทั่วไปถั่วเขียวจะถูกแปรรูปเป็นแป้งถั่วเขียว ซึ่งจะถูกนำมาแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อไป ในการผลิตแป้งถั่วเขียวจะมีการแยกองค์ประกอบที่เป็นสตาร์ช (starch) ออกมา แป้งที่ได้ไม่ควรมีโปรตีน (Nx6.25) เกินร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง (มอก. 948, 2533) ข้อเท็จจริงนี้แสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียโปรตีนไปในกระบวนการผลิตแป้งถั่วเขียว โปรตีนส่วนมากจะถูกแยกออกมาจากแป้งในรูปของน้ำทิ้ง (Ko *et al*., 1994)

สมบัติด้านต่าง ๆของโปรตีนถั่วเขียว

การวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของโปรตีนถั่วเขียว เช่น ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน การเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ ต่างแสดงถึงศักยภาพในการนำโปรตีนถั่วเขียวไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร คุณสมบัติเหล่านี้ยังส่งผลถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ที่สำคัญในการผลิต เช่น การละลาย, surface hydrophobicity และ emulsifying property ของโปรตีนถั่วเขียวอีกด้วย (Hall, 1996)

งานวิจัยนี้ศึกษาสมบัติต่างๆ ของโปรตีนถั่วเขียวเพื่อทดสอบศักยภาพของโปรตีนในการนำไปใช้งานในด้านอื่นนอกเหนือจากการนำโปรตีนไปผลิตเป็นสารทดแทนไขมันด้วย โดยสมบัติต่างๆที่ศึกษามีดังนี้คือ

- การละลาย (solubility) เป็นสมบัติที่มีความสำคัญในอันดับแรกเนื่องจากมีอิทธิพลต่อสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีน (Halling, 1981 cited in Vojdani, 1996) โดยทั่วไปโปรตีนที่นำไปใช้ในการผลิตควรมีการละลายสูง การละลายของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับ hydrophilicity ของโปรตีน เช่น โปรตีนที่มีค่า hydrophilicity สูงจะละลายได้ดีในน้ำ การละลายของโปรตีนยังมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น emlsifying property (Vojdani, 1996) อีกด้วย
- การดูดซับน้ำ (water binding) เป็นผลจากพันธะเคมีประเภทมีขั้ว (ionic bonding) เช่น พันธะไฮโดรเจน หรือปริมาณไอออนในโมเลกุลของโปรตีน โปรตีนที่มีพันธะเหล่านี้สูงจะสามารถดูดซับน้ำได้ดี
- การดูดซับน้ำมัน (fat binding) เป็นผลจากกพันธะเคมีประเภทไม่มีขั้ว (non-ionic bonding) ในโครงสร้างของโปรตีน โปรตีนที่มีพันธะชนิดนี้ในปริมาณมากจะสามารถดูดซับน้ำมันได้ดี นอกจากนี้ยังเป็นผลจากการที่น้ำมันถูกกักเก็บไว้ในเมตริกซ์ของโปรตีนด้วย
- Emulsifying activity index (EAI) เป็นสมบัติที่สำคัญของโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hill, 1996) จึงสามารถทำหน้าที่เป็น emulsifier ได้ด้วย สมบัตินี้เป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวของโปรตีนระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน การจัดเรียงตัวที่ดีระหว่างวัฏภาคจะทำให้ค่า EAI ของโปรตีนมีค่าสูง
- Surface hydrophobicity สมบัตินี้เป็นผลมาจากการที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายโปรตีนโดยหันหมู่ไม่ชอบน้ำออกมาด้านผิว เป็นสมบัติที่สำคัญในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล ทั้งที่เป็นอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน

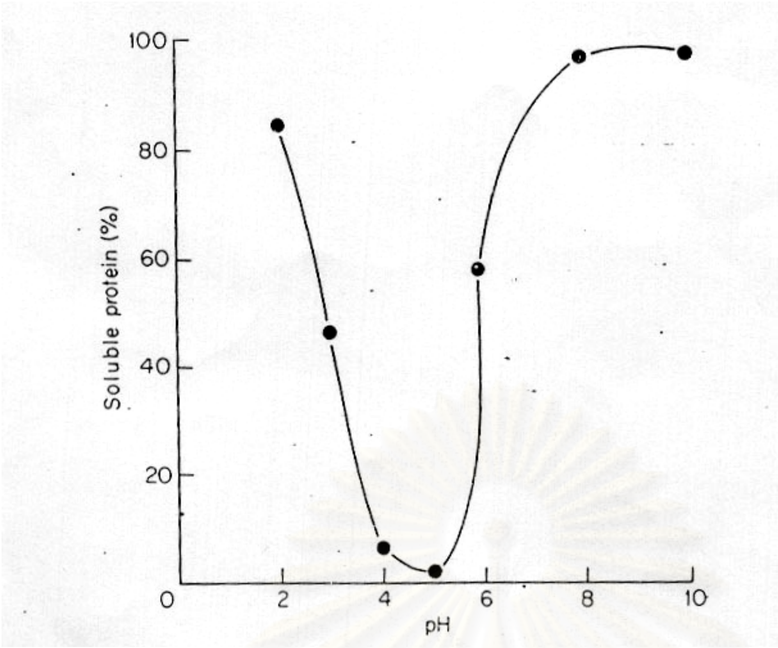
และโปรตีนกับไขมัน (Nakai *et al*., 1996) โดยจะส่งผลถึงสมบัติทางกายภาพบางประการของโปรตีน

อรอนงค์ นัยวิกุล และคณะ (2531) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของถั่วเขียว 20 สายพันธุ์ พบว่าโดยทั่วไปถั่วเขียวมีโปรตีนประมาณ 19-24% จากการคัดเลือก 4 สายพันธุ์มาสกัดและวิเคราะห์คุณภาพโปรตีนโดยศึกษา สมบัติการดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมัน และการเกิดเจล พบว่าโปรตีนจากถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 1 ของประเทศไทย มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโปรตีนจากถั่วเขียวพันธุ์วีซี 2745 พันธุ์วีซี 2742 และพันธุ์วีซี ของประเทศไต้หวัน

วิธีการทั่วไปที่ใช้แยกโปรตีนออกจากแป้งถั่วเขียวคือการสกัดแป้งด้วยด่าง โปรตีนจะละลายออกมาจากเนื้อแป้ง เมื่อนำน้ำสกัดมาปรับ pH จนมีค่าประมาณ 4.5 โปรตีนจะตกตะกอนออกมา Coffmann and Garcia (1977) ได้ทำการศึกษาสมบัติของ protein isolate จากถั่วเขียวที่แยกโดยวิธีดังกล่าวและทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry โดยวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน ความสามารถในการละลายของไนโตรเจน (nitrogen solubility) ความสามารถในการเกิดฟองและการเกิดเจล พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีปริมาณโปรตีน 92.83% (Nx6.25) พบกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียวเช่นเดียวกับกรดอะมิโนในแป้งถั่วเขียว ยกเว้นไม่พบซิสตีน ซึ่งคาดว่าถูกทำลายไปในขั้นตอนการสกัดโปรตีนออกจากแป้ง โปรตีนถั่วเขียวละลายน้ำได้เพียง 2-5% ในช่วง pH 4-5 แต่เมื่อ pH ต่ำกว่า 3 หรือสูงกว่า 6 พบว่าการละลายน้ำของโปรตีนจะดีกว่า 50% (ภาพที่ 7) พบว่าโปรตีนถั่วเขียวสามารถเกิดฟองได้ดี นอกจากนั้นยังพบว่าเสถียรภาพของเจลโปรตีนถั่วเขียวแปรผันตามความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย

Thompson (1977) ได้ทำการศึกษาสมบัติของ protein isolate จากถั่วเขียว ที่แยกโดยการสกัดแป้งถั่วเขียว ที่ pH 9 จากนั้นนำน้ำสกัดมาตกตะกอนที่ pH 4 พบว่าตะกอนมีปริมาณโปรตีนถึง 92% (น้ำหนักแห้ง) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน สี และความสามารถในการละลายของไนโตรเจน พบว่าโปรตีนถั่วเขียวมีไลซีน ในปริมาณสูงแต่มีเมไทโอนีน และซิสตีนในปริมาณน้อยมาก โปรตีนแห้งมีสีครีม และมีการละลายสูงมากที่ pH นอกจุด Isoelectric point (pI)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

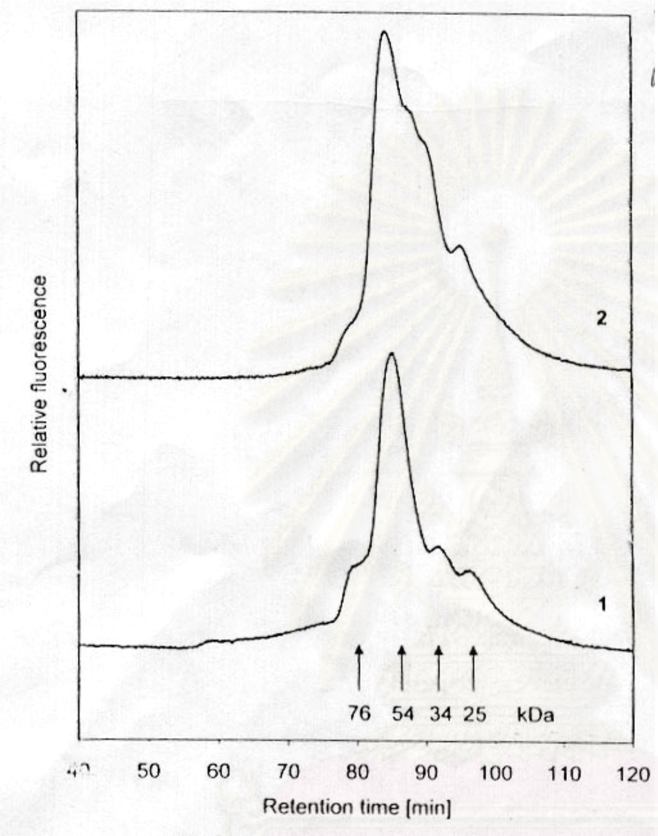


ภาพที่ 7 ผลของ pH ต่อการละลายของโปรตีนถั่วเขียวที่อุณหภูมิห้อง (27.5 °C)
ที่มา: Coffmann and Garcia (1977)

Narang *et al*. (1981) ได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วเขียวที่ละลายในสารละลายเกลือซึ่งเตรียมโดยการสกัดโปรตีนออกจากแป้งถั่วเขียวด้วยสารละลายเกลือ NaCl เข้มข้น 5% กรองตะกอนผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 พบว่าโปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 62,500 มีค่า Stokes' radius 33 Å และมีค่า pI (isoelectric point) ที่ pH 5.85 จากการศึกษาโครงร่างของโปรตีน (conformation) พบว่าโปรตีนมีลักษณะเป็นทรงกลมมีรัศมี 25 °A และมีชั้นของน้ำหุ้มอยู่บนผิวหนาประมาณ 8 °A ในโครงร่างนี้โปรตีนจะเสถียรที่อุณหภูมิ 35-85 °C โดยมีหมู่ของกรดอะมิโนที่มีขั้ว (polar residues) อยู่ที่ผิวของโปรตีนประมาณ 36%

Rahma *et al*. (2000) ได้เปรียบเทียบคุณสมบัติของโปรตีนที่แยกจากแป้งถั่วเขียวสองวิธี คือ การสกัดด้วยด่างแล้วตกตะกอนที่จุด pI กับการใช้วิธี micellisation ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนพบว่า โปรตีนที่เตรียมขึ้นด้วยวิธี micellisation มีปริมาณกรดไฟติก (phytic acid) น้อยกว่าโปรตีนที่เตรียมขึ้นจากการตกตะกอนที่จุด pI ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค size exclusion chromatography (SEC) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูง (analytical ultracentrifugation) โดยพบว่าโปรตีนมีมวลโมเลกุลเฉลี่ยที่ 54 $\pm$ 2 kDa (Rt =84.1 นาที) (ภาพที่ 8) โดยมีองค์ประกอบหลักเป็น 7S globulin ผลการวิเคราะห์ SDS-gel electrophoresis ทั้งแบบหนึ่งและสองมิติ ไม่พบพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) ระหว่างสายพอลิเพปไทด์ ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของ 7S globulin ผลการวิเคราะห์ยังพบ 11S globulin ในโปรตีนในปริมาณ

น้อย 11S globulin มีพันธะ S-S เชื่อมระหว่างสายโพลิเพปไทด์ การละลายของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนที่ pI มีการละลายต่ำสุดที่ pH 4.5-6 ในขณะที่โปรตีนที่เตรียมโดยวิธี micellization มีการละลายต่ำสุดที่ pH 5.0-6.1 แต่ละลายได้สมบูรณ์ที่ pH ต่ำกว่า 3 หรือ สูงกว่า 7



ภาพที่ 8 รูปแบบของ SE-HPLC ของ micellized protein (1) และ isoelectric precipitated protein (2) เมื่อมีการเติม SDS
ที่มา: Rahma *et al.* (2000)

การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี

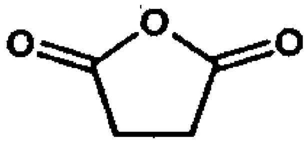
โดยทั่วไปการดัดแปรทางเคมีของโปรตีนใช้ปฏิกิริยาระหว่าง หมู่ฟังชันนัลของกรดอะมิโนกับรีเอเจนต์ที่เหมาะสม หมู่ฟังชันนัลที่นิยมใช้เป็นเป้าในการดัดแปรคือ หมู่อะมิโน (เช่น ไลซีน) หมู่คาร์บอกซิล (เช่น กรดกลูตามิก และ กรดแอสพาร์ติก) หมู่ ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) หรือ หมู่ไดซัลไฟด์ (เช่น ซิสเตอีน) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปฏิกิริยาการดัดแปรทางเคมีของโปรตีน

Reaction	Reactive group	Reagent
Acylation	amino	acid anhydride
Alkylation	amino	iodoacetic acid, iodoacetamide
Phosphorylation	amino	Phosphorus oxy chloride
Esterifacation	carboxyl	Alcohol
Amidation	carboxyl	amine & condensing agent
Oxidation-Reduction	sulfhydryl, disulfide	hydrogen peroxide, sulfite ion

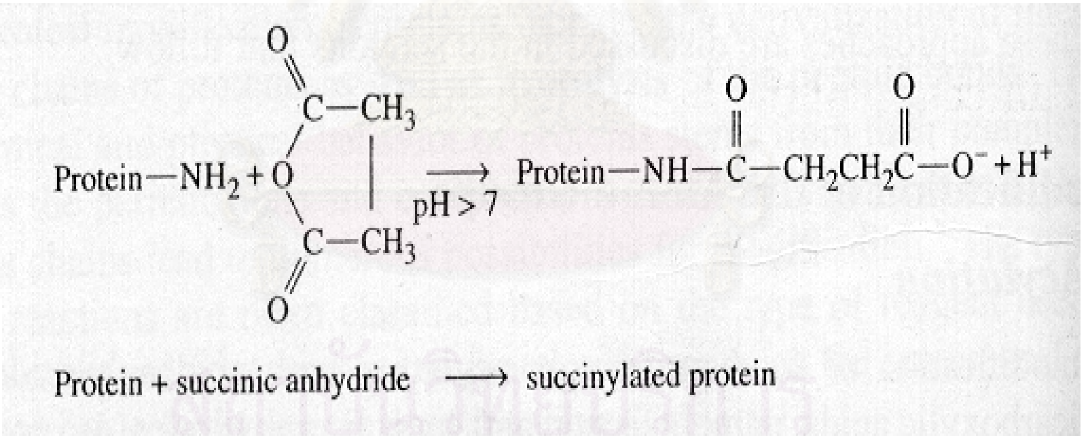
เนื่องจากการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธี oxidation-reduction เหมาะสำหรับโปรตีนที่มีหมู่ซิสเตอีนในปริมาณสูง ส่วนการดัดแปรด้วยวิธี esterifacation และ amidation จะต้องทำในภาวะที่เป็นกรด วิธีการทั้งสองจึงไม่เหมาะที่จะใช้ดัดแปรโปรตีนถั่วเขียวซึ่งมีซิสเตอีนในปริมาณน้อยมาก และมี pI ที่ประมาณ pH 4-5 ดังนั้นจึงคาดว่าโปรตีนจะละลายได้เพียงเล็กน้อยในสภาวะกรดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อย สภาวะของปฏิกิริยา phosphorylation จะทำให้การละลายของโปรตีนตั้งต้นลดลง แต่ในกรณีที่สามารถปรับสภาวะในเกิดการตกตะกอนของผลิตภัณฑ์โปรตีนดัดแปรได้ ปฏิกิริยาจะสามารถดำเนินไปข้างหน้าได้ตามหลักของสมดุลเคมี โปรตีนที่ถูกดัดแปรโดยวิธีนี้ สามารถทำให้เกิดตะกอนได้ง่ายด้วยแคลเซียมไอออน ซึ่งทำให้การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีนี้ดีสำหรับการนำไปผลิตผลิตภัณฑ์เลียนแบบเนยแข็ง (Damodaran, 1996a) การดัดแปรด้วยปฏิกิริยา acylation และ alkylation ใช้สภาวะคล้ายกัน โดยจะต้องให้ปฏิกิริยาดำเนินไปในสารละลายที่เป็นกลางถึงเป็นด่าง (pH 7-8) แต่มีการใช้ปฏิกิริยา acylation กับโปรตีนหลายชนิดอย่างแพร่หลาย ในขณะที่ปฏิกิริยา alkylation ไม่เป็นที่นิยมนัก ด้วยเหตุผลตามที่กล่าวมานี้จึงเลือกปฏิกิริยา acylation มาใช้ในการดัดแปรคุณสมบัติของโปรตีนถั่วเขียวในงานวิจัยนี้

การดัดแปรโปรตีนทางเคมีส่วนใหญ่เป็นการปรับปรุงสมบัติของโปรตีน เพื่อนำไปใช้งานโดยตรง แต่งานวิจัยนี้มุ่งที่จะดัดแปรโปรตีนถั่วเขียวเพื่อให้มีความเหมาะสมในการผลิตสารทดแทนไขมันต่อไปโดยปฏิกิริยา succinylation (คือปฏิกิริยา acylation ที่ใช้ succinic anhydride เป็นรีเอเจนต์) ในการดัดแปรซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มหมู่ลบของรีเอเจนต์เข้าไปบนสายพอลิเพปไทด์ จากนั้นจะใช้ไอออนที่มีประจุ 2+ เชื่อมสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนดัดแปรร่วมกับการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติโดยใช้ความร้อนเพื่อนำโปรตีนไปผลิตสารทดแทนไขมันต่อไป



ภาพที่ 9 Succinic anhydride
ที่มา: Budavari *et al*. (1996)

รีเอเจนต์ของปฏิกิริยา succinylation คือ succinic anhydride (ภาพที่ 9) โดย succinic จะทำปฏิกิริยากับหมู่ ε-amino ของ lysine ซึ่งมีประจุเป็นบวก ดังนั้นโปรตีนดัดแปรจะมีประจุลบบนสายโพลิเพปไทด์มากกว่าเดิม การเปลี่ยนแปลงทางประจุไฟฟ้า (electrostatic) นี้ ทำให้เกิดการแยกตัวของ สายพอลิเพปไทด์ออกจากกันเป็นผลให้โครงร่างของโปรตีนเปลี่ยนไปด้วย (Howell, 1996) สมการเคมีของการเกิดปฏิกิริยา succinylation แสดงในภาพที่ 10

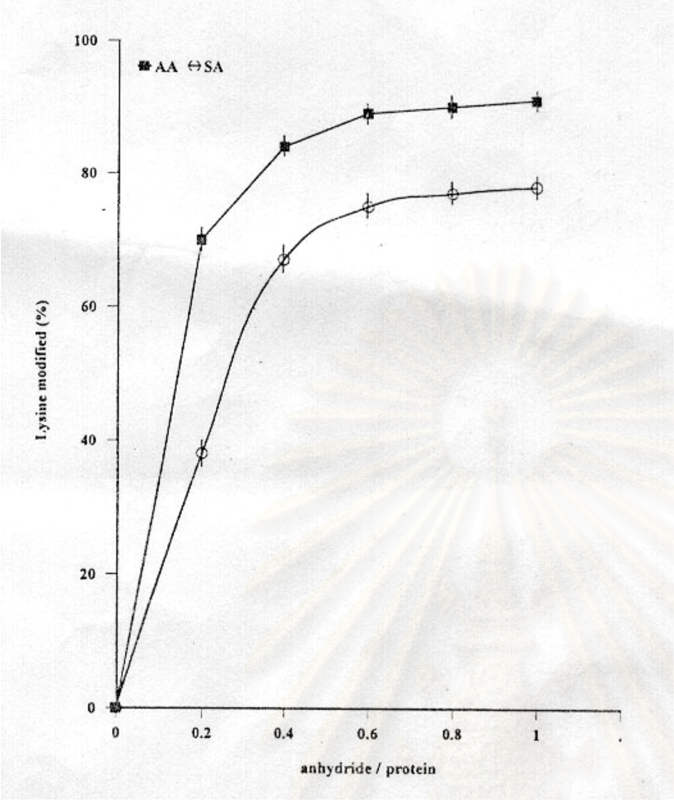


ภาพที่ 10 ปฏิกิริยา succinylation
ที่มา: Howell (1996)

Franzen and Kinsella (1976) ได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรทางเคมีโดยปฏิกิริยา succinylation โดยเตรียมสารละลายโปรตีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากนั้นเติม succinic anhydride ลงไปโดยควบคุม pH ของสารละลายให้อยู่ระหว่าง 7 - 8 ด้วย 3.5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เมื่อ pH ของสารละลายคงที่ นำสารละลายไป dialysis กับน้ำกลั่นที่

4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยก succinic anhydride ที่มากเกินพอออกจากสารละลาย ผลการวิเคราะห์ระดับการดัดแปรด้วยวิธี ninhydrin assay แสดงว่ามีหมู่อะมิโนลดลง 50, 78 และ 93% เมื่อใช้ succinic anhydride 0.2 0.5 และ 2 กรัม ตามลำดับ แม้ว่าหมู่อะมิโนของโปรตีนสามารถทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride ได้ทุกหมู่ แต่หมู่ ε-amino ของ lysine มีโอกาสสูงสุดเนื่องจากมีค่า pK ต่ำ พบว่า pI ของโปรตีนดัดแปรต่ำลงเล็กน้อย (โปรตีนถั่วเขียว pH 4.5 โปรตีนดัดแปร pH 4.0) ค่า emulsifying activity และค่า emulsifying stability ของโปรตีนดัดแปรเพิ่มขึ้น 30 และ 21% ตามลำดับ โปรตีนดัดแปรมีสมบัติด้านการละลายและสีดีขึ้น

El-Adawy (2000) ได้ศึกษาสมบัติและคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรด้วยปฏิกิริยา acetylation และ succinylation โดยเติมรีเอเจนต์ปริมาณ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อกรัมโปรตีนลงไปในสารละลายโปรตีนถั่วเขียวที่ pH 8 ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมา dialysis กับน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 2-3 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จาก dialysis ไป freeze dry ผลการวิเคราะห์ระดับการดัดแปรโดยการวิเคราะห์ปริมาณ lysine ที่ถูกดัดแปรไปด้วย 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) พบว่าระดับการดัดแปรเป็นสัดส่วนกับปริมาณรีเอเจนต์ที่ใช้ (ภาพที่ 11) โดยอัตราการดัดแปรเมื่อใช้ acetic anhydride สูงกว่า succinic anhydride ภาพที่ 11 ยังแสดงว่า acetic anhydride เป็นรีเอเจนต์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า succinic anhydride เพราะให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนดัดแปรสูงถึง 91% เมื่อใช้รีเอเจนต์ในปริมาณ 1.0 กรัมต่อกรัมโปรตีน ในขณะที่ succinic anhydride ให้ผลิตภัณฑ์เพียง 78% acetic anhydride เป็นรีเอเจนต์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า succinic anhydride benzentricarboxylic anhydride และ tetrahydrofurantetracarboxylic dianhydride (Eisele and Brekke, 1981 cited in El-Adawy, 2000) โปรตีนถั่วเขียวดัดแปรจากปฏิกิริยา succinylation มีการละลายในน้ำสูงขึ้น แต่โปรตีนถั่วเขียวดัดแปรจากปฏิกิริยา acetylation จะมีการละลายในน้ำลดลง พบว่าการดัดแปรโดยปฏิกิริยาทั้งสองทำให้ค่าการดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า emulsifying activity จะลดลง (เมื่อใช้สารดัดแปรเกิน 0.6 กรัมต่อกรัมโปรตีน) การดัดแปรโดยปฏิกิริยา acetylation ช่วยลดผลไม่พึงประสงค์ทางโภชนาการ (antinutrition factors) เช่น ลดปริมาณแทนนิน (tannins) กรดไฟติก และ สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitor) ได้ดีกว่าปฏิกิริยา succinylation และพบว่าร่างกายสามารถย่อยโปรตีนดัดแปรจากปฏิกิริยา acetylation ได้ดีกว่าด้วย



<u>ภาพที่ 11</u> ผลของความเข้มข้นของสารดัดแปรคือ acetic anhydride (AA) และ succinic anhydride (SA) ต่อระดับของ lysine ที่ถูกดัดแปร

ที่มา: El-Adawy (2000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

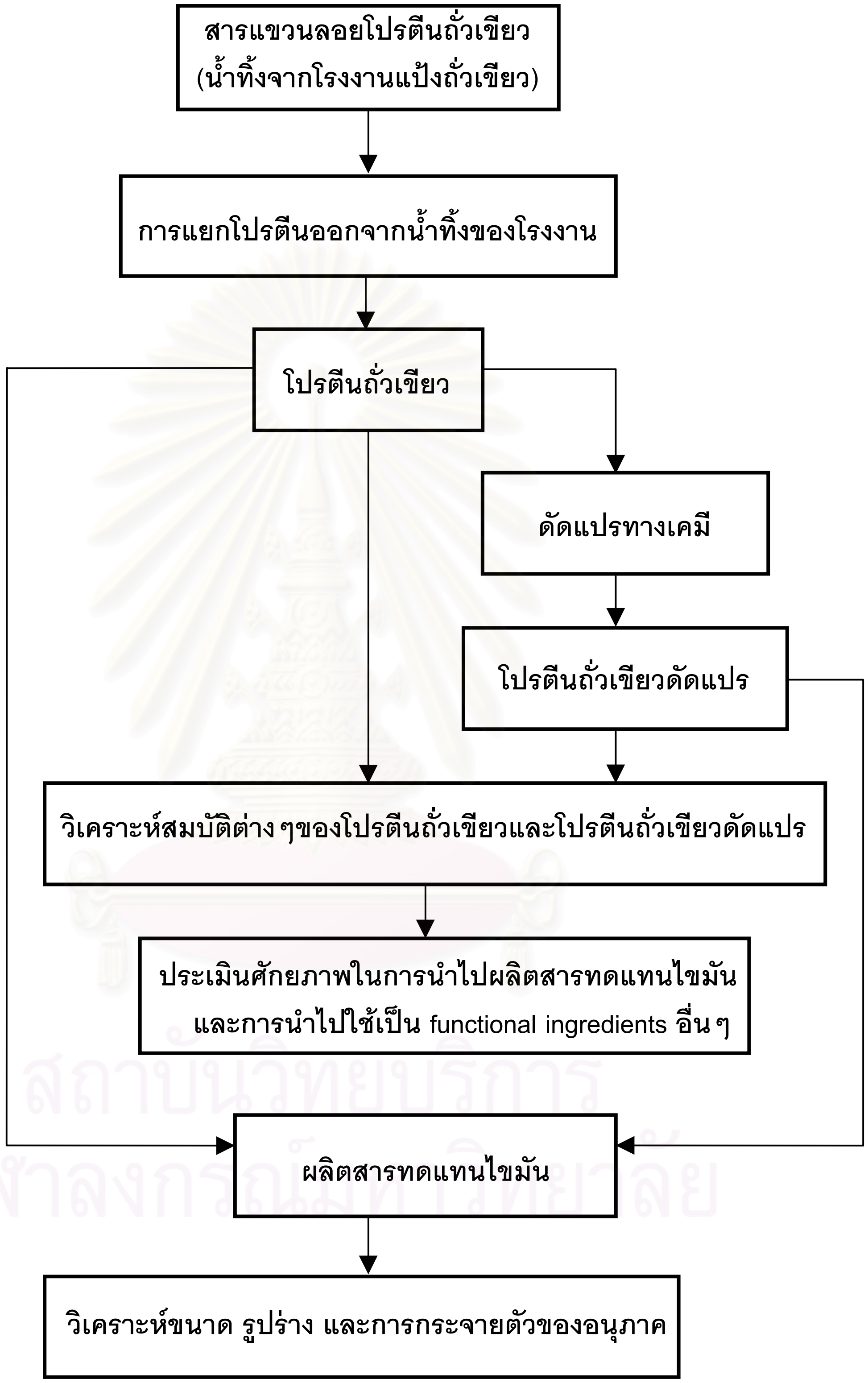
วิธีการทดลอง

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เริ่มจากการนำสารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียว (น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งถั่วเขียว) มาแยกเอาโปรตีนออกจากน้ำ ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้คือโปรตีนถั่วเขียวแห้ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเขียวนี้ไปดัดแปรทางเคมี แล้วทำการวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ ของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเขียวเดิม เพื่อศึกษาสมบัติที่เปลี่ยนไปของโปรตีนหลังการดัดแปรว่ามีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตสารทดแทนไขมันและมีศักยภาพในการนำไปใช้งานด้านอื่นๆอย่างไรบ้าง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมาผลิตสารทดแทนไขมัน ทำการวิเคราะห์ขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคของสารทดแทนไขมันที่ผลิตขึ้นจากโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร วิธีการดำเนินงานวิจัยแสดงดังผังภาพที่ 12 โดยมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

1. การแยกโปรตีนออกจากน้ำทิ้งของโรงงาน

นำสารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียว (บริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์ จำกัด กรุงเทพฯ) ซึ่งผ่านการตกตะกอนที่ pH 4.5 ด้วยกรด hydrochloric มาแล้วจากโรงงาน มาหมุนเหวี่ยงที่ 2000xg นาน 20 นาที ที่ 20 $^{\circ}$C (Heraeus-Christ Varifuge K, Heraeus-Christ GMBH, Germany) เทส่วนสารละลายทิ้งไป แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (สัดส่วนตะกอนและน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่สภาวะเดิม นำตะกอนโปรตีนมาละลายในน้ำกลั่นสัดส่วนตะกอนและน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วปรับ pH ของสารละลายเป็น 7 ด้วย 1N NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนนี้ ไปหมุนเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที ที่ 20 $^{\circ}$C แยกตะกอนทิ้ง และนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไป freeze dry (Duradry μP, FTS Systems Inc., New York, USA) ที่ความดันต่ำกว่า 500 mT และอุณหภูมิต่ำกว่า –40 $^{\circ}$C จนแห้ง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาสมบัติและการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว

2. การวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆของโปรตีนถั่วเขียว

2.1 องค์ประกอบทางเคมี

2.1.1 ความชื้นโดยใช้ hot air oven ตามวิธี AOAC. 925.10 (1995)

2.1.2 โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ตามวิธี AOAC. 920.87 (1995)

2.1.3 ไขมันโดยวิธี soxhlet extraction ตามวิธี AOAC. 920.85 (1995)

2.1.4 เถ้าโดยใช้ furnace ตามวิธีของ AOAC 923.03 (1995)

2.1.5 คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเส้นใย ตามสมการต่อไปนี้

$$A = 100 - B \quad (1)$$

เมื่อ A = ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเส้นใย (ร้อยละ)

B = ผลรวมของปริมาณร้อยละขององค์ประกอบอื่นที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 2.1.1-2.1.4

2.2 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ของกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียว

การวิเคราะห์ทางคุณภาพ และปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียวจากข้อ 1 ใช้เทคนิค HPLC/AccQ. Tag Method (Liu *et al.*, 1995) อุปกรณ์ HPLC และสารมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด (ASP SER GLU GLY HIS ARG THR ALA PRO CYS TYR VAL MET LYS, ILE LEU PHE) ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นของ Waters, Milford, MA, USA (ภาคผนวก ก)

2.3 การละลายของโปรตีน (nitrogen solubility)

ความสามารถในการละลายของโปรตีนในเชิงการละลายของไนโตรเจน มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนในน้ำเข้มข้น 1 %(w/v) ที่ระดับ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 2-10 (ปรับ pH ให้ได้ค่าที่ต้องการด้วย 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) และ 1 N NaOH) คนสารละลายโปรตีนด้วย magnetic stirrer นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายโปรตีนไปหมุนเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที (Kubota 5200, Kubota Coporation, Tokyo, Japan) วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในส่วนใสด้วยวิธี Kjeldahl แล้วคำนวณตามสมการ 2 และ 3 (Vojdani, 1996)

$$\%WSN = \frac{WN \times 100}{WS} \quad (2)$$

และ

$$NSI = \frac{\%WSN \times 100}{TN} \quad (3)$$

เมื่อ %WSN = % Water Soluble Nitrogen

WN = Weight of Soluble nitrogen

WS = Weight of Sample

NSI = Nitogen Solubility Index

TN = % Total Nitrogen

2.4 การดูดซับน้ำและน้ำมัน (water and oil adsorption)

ผสมโปรตีนถั่วเขียว กับน้ำ หรือน้ำมัน (น้ำมันถั่วเหลืองตราองุ่น บริษัทน้ำมันพืชไทยจำกัด นครปฐม) สำหรับวิเคราะห์การดูดซับน้ำ หรือน้ำมัน ตามลำดับ โดยใช้สัดส่วนโปรตีนต่อน้ำหรือน้ำมันเป็น 0.5 ต่อ10 โดยน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำของผสมไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000xg นาน 30 นาที (Hettich Zentrifugen EBA21, Hettich, Tuttlindgen, Germany) แยกส่วนของเหลวไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำหรือน้ำมันที่ถูกดูดซับไปโดยโปรตีน (Sathe and Salunkhe, 1981) โดยเปรียบเทียบกับการดูดซับน้ำหรือน้ำมันของ soy protein isolate, SPI (Supro EX33, Protein Technologies International, St. Louis, MO, USA)

2.5 การวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity

เนื่องจากค่า surface hydrophobicity เป็นคุณสมบัติ intrinsic มีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนของโปรตีน โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีหมู่ hydrophobic เช่น glycine valine alanine proline tyrosine และ phenylalanine โครงสร้างของกรดอะมิโนเหล่านี้สามารถทำให้สารประกอบบางชนิดเช่น 1-anilinonapthalene-8-sulfonate (ANS) และ *cis*-parinaric acid (CPA) เกิดปรากฏการณ์ fluorescence ได้ ทำให้สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity กับ surface hydrophobicity ของโปรตีนได้ เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีของ Alizadeh-Pasdar and Li-Chan (2000) โดยได้ทำการทดลองดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 0.005-0.025 %(w/v) ใน 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 [Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) และ NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany)] เติม

fluorescent probe [8 mM ANS, Sigma, St. Louis, MO, USA] ปริมาณ 20 μL ต่อสารละลายโปรตีน 4 mL นำสารละลายไปวัดค่า fluorescent intensity ที่ 390 nm (excitation wavelength) และ 470 nm (emission wavelength) โดยตั้งค่า excitation และ emission slit widths ที่ 5 และ 5 nm ตามลำดับ ด้วยอุปกรณ์ Jasco FP-770 Spectrofluorometer (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Japan) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) (จาก Sigma, St. Louis, MO, USA) และ SPI เป็นสารอ้างอิง ค่า surface hydrophobicity สามารถคำนวณได้จากสมการ 4

$$\text{Surface hydrophobicity} = (S_p / S_{BSA}) \times 1000 \quad (4)$$

เมื่อ S_p = ค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับ fluorescent intensity สำหรับโปรตีนที่ศึกษา

S_{BSA} = ค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับ fluorescent intensity สำหรับ BSA

2.6 การวิเคราะห์ค่า emulsifying activity index (EAI)

เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 0.5% (w/v) ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) ผสมสารละลายนี้กับน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 30 ต่อ 10 โดยปริมาตร ทำการปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer (Ystral X10/20, Ystral, Germany) ที่ความเร็ว 25,000 rpm นาน 2 นาที เจือจางสารละลาย 1/1000 เท่าด้วย 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (Ajax, Auburn, N.S.W., Australia) แล้วนำสารละลายเจือจางไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วยอุปกรณ์ Jasco V-530 Spectrophotometer (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Japan) คำนวณค่าความขุ่นของสารละลาย (turbidity) และ ค่า EAI ดังสมการ 5 และ 6 ตามลำดับ (Pearce and Kinsella, 1978) โดยเปรียบเทียบ BSA และ SPI

$$T = \frac{2.303A}{l} \quad (5)$$

เมื่อ T = ค่า turbidity

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

l = ความกว้างของ cuvette

$$EAI = \frac{2T}{\varnothing C} \quad (6)$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของโปรตีน

T = turbidity

$\varnothing$ = volume fraction ของน้ำมัน (ภาคผนวก ข)

2.7 การวิเคราะห์สมบัติเชิงความร้อนในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (thermal property for protein denaturation)

เตรียมสารละลายโปรตีนใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) ที่ความเข้มข้น 10-25% (w/w) มำการวิเคราห์ค่า denatured temperature (T_d) และค่า denaturation enthalpy change (ΔH) ด้วยอุปกรณ์ Differential Scanning Calorimeter (DSC) (Perkin Elmer model DSC7, Connecticut, USA) ในช่วงอุณหภูมิ 40-110 $^{\circ}$C โดยให้ความร้อนในอัตรา 5 $^{\circ}$C ต่อนาที (Puppo and Anon, 1999)

3. การดัดแปรทางเคมีและการวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของโปรตีนดัดแปร

3.1 การดัดแปรทางเคมี

ทำการดัดแปรโปรตีนทางเคมีโดยปฏิกิริยา succinylation ซึ่งดัดแปรกรดอะมิโน lysine ในโปรตีนเป็นหลัก (Franzen and Kinsella, 1976) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้ เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 1% (w/v) ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 8) โดยแปรปริมาณ succinic anhydride (Sigma, St. Louis, MO, USA) ในช่วง 0.2-1.2 กรัมต่อกรัมโปรตีน ควบคุม pH ระหว่างปฏิกิริยา succinylation ให้คงที่ที่ pH 7-8 ด้วย 3.5 N NaOH ปฏิกิริยาสิ้นสุดเมื่อ pH คงที่ นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไป dialysis กับน้ำปลอดไอออนที่ 5 $^{\circ}$C นาน 48 ชั่วโมง นำสารละลายในขั้นนี้ไปไล่น้ำออกด้วย vacuum rotary evaporator จนสารละลายโปรตีนเข้มข้น 10 $^{\circ}$Brix นำสารละลายโปรตีนเข้มข้นไป freeze dry ที่ความดันต่ำกว่า 500 mT และอุณหภูมิต่ำกว่า -40 $^{\circ}$C จนแห้ง

ได้ใช้วิธี Completely Randomized Design (CRD) ในการวางแผนการทดลอง โดยทำซ้ำ 3 ครั้งและนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test

นำโปรตีนไปวิเคราะห์ระดับการดัดแปรทางเคมีโดยปฏิกิริยา Ninhydrin (Franzen and Kinsella 1976) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้น 1% (w/v) ผสมกับ ninhydrin solution (ภาค

ผนวก ค) ต้มสารละลายในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็นอุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่เย็นแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเจือจางสารละลายจนความเข้มข้นเหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 nm ด้วยอุปกรณ์ Jasco V-530 Spectrophotometer สารละลายที่ได้มีสีม่วงซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง Ninhydrin กับ หมู่อะมิโนของ (free amino group) lysine หรือหมู่อะมิโนของ n-terminal คำนวณระดับการดัดแปร (degree of modification) ดังนี้

$$\text{ระดับการดัดแปร} = \frac{Abs_{native} - Abs_{modefied}}{Abs_{native}} \qquad (7)$$

เมื่อ Abs_{native} = ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนเดิมที่ 565 nm

$Abs_{modefied}$ = ค่าการดูกกลืนแสงของโปรตีนดัดแปรที่ 565 nm

3.2 การวิเคราะห์ surface hydrophobicity

นำโปรตีนดัดแปรจากข้อ 3.1 มาวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ตามวิธีในข้อ 2.5

3.3 การวิเคราะห์การละลายของโปรตีน การดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมัน emulsifying activity index และสมบัติเชิงความร้อน ของโปรตีนดัดแปร ตามวิธีในข้อ 2.3, 2.4, 2.6, 2.7 ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำ3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนดัดแปรกับโปรตีนถั่วเขียวโดย T-Test

3.4 การคำนวณระดับการสูญสภาพของโปรตีนดัดแปร (Degree of Denaturation) โดยใช้ผลการทดลองจากข้อ 2.7 และ 3.3 ตามวิธีของ Puppo and Anon (1999) ดังนี้

$$\text{Degree of denaturation} = [1-(\Delta H_{modified\ protein}/\Delta H_{native\ protein})] \times 100 \qquad (8)$$

4. การผลิตสารทดแทนไขมัน

รายละเอียดของการศึกษากระบวนการผลิตสารทดแทนไขมันมีดังนี้ (ภาพที่ 13)

4.1 การศึกษาผลของชนิดโปรตีน ปริมาณ $CaCl_2$ และเวลา ที่มีต่อ ขนาด และการกระจายตัวของอนุภาคของโปรตีน

เตรียมสารละลายโปรตีน (ทั้งโปรตีนไม่ดัดแปรและโปรตีนดัดแปร) เข้มข้น 5% (McCarthy and Maegli, 1994) ในน้ำปลอดไอออน เติม $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0-0.03 กรัมต่อกรัมโปรตีน ให้ความร้อนแก่สารละลายที่ 83 $\pm$ 1 ^{o}C นาน 5-15 นาที คนสาร

ละลายตลอดเวลาด้วย homogenizer (Ystral X10/20) ที่ความเร็ว 17,000 rpm เพื่อกระจายความร้อนให้ทั่วถึงและเพื่อลดขนาดอนุภาคด้วยแรงเฉือน นำสารแขวนลอยที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีน ด้วยอุปกรณ์ Laser Particle Size Analyzer (Mastersizer, Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.)

ได้ใช้วิธี asymmetrical factorial (2x4x3) ในการวางแผนการทดลอง โดยทำซ้ำ 2 ครั้งและนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test

4.2 การศึกษาผลของแรงเฉือนจากการตีปั่น ต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอน

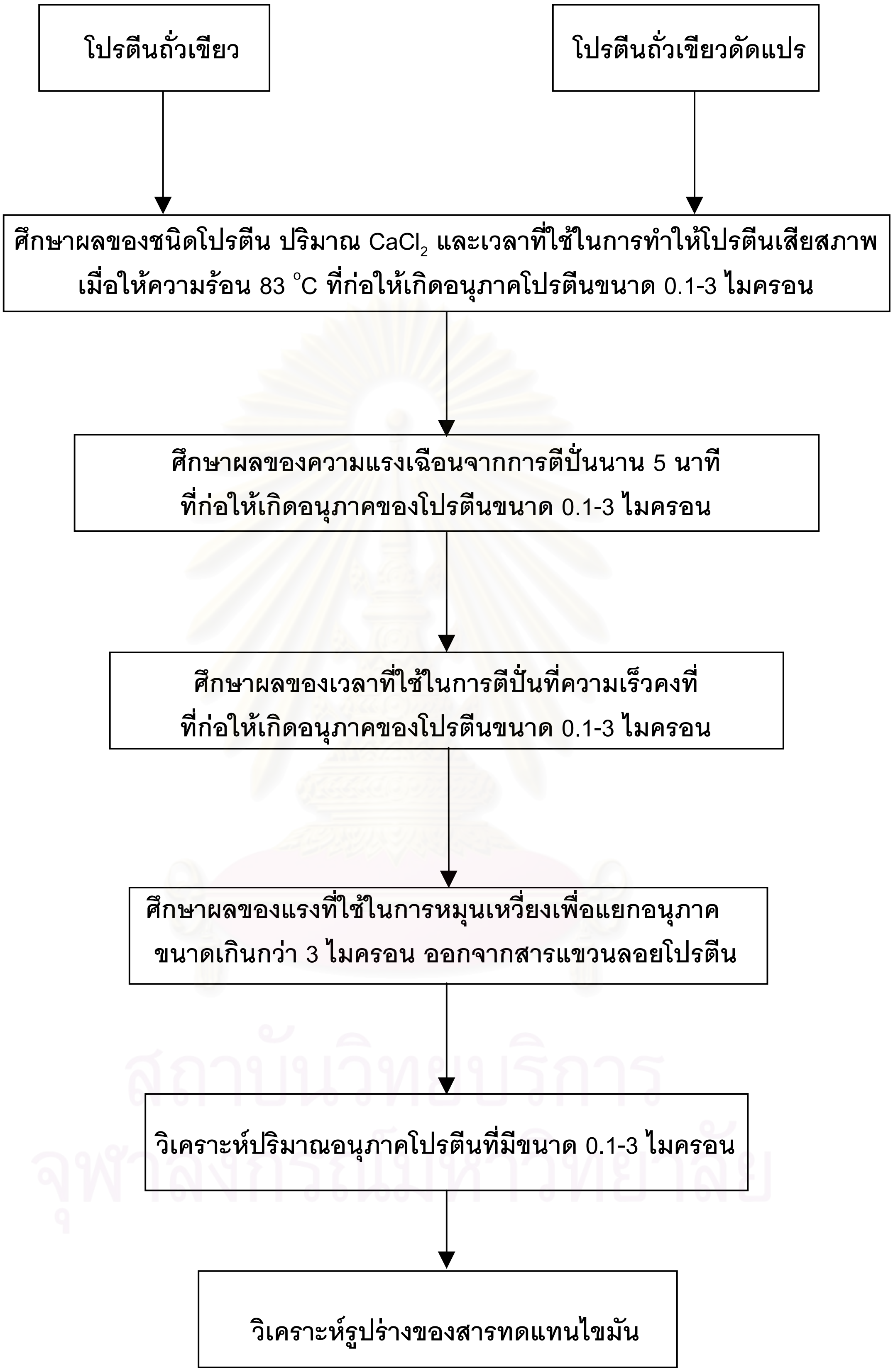
นำอนุภาคโปรตีนที่ผ่านการทำให้เสียสภาพมาแล้วตามสภาวะในข้อ 4.1 มาตีปั่นต่อโดย homogenizer ที่ความเร็ว 23,000-27,000 rpm นาน 5 นาที ทำการวิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนในสารละลาย ด้วย Laser Particle Size Analyzer

ได้ใช้วิธี completely randomized design (CRD) ในการวางแผนการทดลอง โดยทำซ้ำ 2 ครั้งและนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test

4.3 การศึกษาผลของเวลาในการตีปั่นต่อปริมาณอนุภาคของโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอน

นำอนุภาคโปรตีนที่ผ่านการทำให้เสียสภาพมาแล้วตามสภาวะในข้อ 4.1 มาตีปั่นโดย homogenizer ที่ความเร็วตามที่ระบุไว้ข้อ 4.2 นาน 5-20 นาที วิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนในสารละลายด้วย Laser Particle Size Analyzer

ได้ใช้วิธี completely randomized design (CRD) ในการวางแผนการทดลอง โดยทำซ้ำ 2 ครั้งและนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test



<u>ภาพที่ 13</u> วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาวิธีการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การศึกษาผลของแรงหมุนเหวี่ยงในการแยกอนุภาคที่ใหญ่กว่า 3 ไมครอน ออกจากสารแขวนลอยโปรตีน

นำอนุภาคโปรตีนที่ผ่านการทำให้เสียสภาพมาแล้วตามสภาวะในข้อ 4.1 มาตีปั่นต่อโดย homogenizer ที่ความเร็วและเวลาตามที่ระบุไว้ข้อ 4.2 และ 4.3 นำสารแขวนลอยไปหมุนเหวี่ยงที่ 1000-4000 x g นาน 10 นาที (Hettich Zentrifugen EBA21) เพื่อแยกอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอนออก ทำการวิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคโปรตีนโดยเปรียบเทียบระหว่างของเหลวชั้นบนกับตะกอนชั้นล่างด้วย Laser Particle Size Analyzer

ได้ใช้วิธี completely randomized design (CRD) ในการวางแผนการทดลอง โดยทำซ้ำ 2 ครั้งและนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Analysis of Variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test

4.5 การวิเคราะห์รูปร่างของสารทดแทนไขมัน

แยกอนุภาคโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน ออกจากสารแขวนลอยโดยการเหวี่ยง ศึกษารูปร่าง 2 มิติของอนุภาคโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 3 ไมครอน โดย Scanning Electron Microscope (SEM) (JAOL 5410LV, JAOL. Ltd., Akishima, Tokyo, Japan) กรองสารแขวนลอยโปรตีนจากข้อ 4.4 ผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) ทิ้งกระดาษกรองให้แห้งแล้วนำไปเคลือบทองเพื่อการวิเคราะห์โดย SEM โดยเปรียบเทียบกับกระดาษกรองเปล่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

สมบัติด้านต่าง ๆของโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้

โปรตีนที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นผง มีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 14) และมีกลิ่นของถั่วเขียวเล็กน้อย

ภาพที่ 14 โปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้

ผลการวิเคราะห์พบว่าโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้มีความชื้นเท่ากับ 6.38 $\pm$ 0.45% โดยน้ำหนัก และ เมื่อคำนวณจากน้ำหนักแห้งพบว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้คือ 88.93% (ตารางที่ 3) ซึ่งสูงเกือบถึงระดับ isolate [The Food and Nutrition Service, USDA ให้คำจำกัดความไว้ว่า protein isolate ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 90%โดยน้ำหนักแห้ง (N x 6.25) สำหรับโปรตีนจากพืช แต่ถ้าน้อยกว่า 90% แต่ไม่น้อยกว่า 65% ถือว่าเป็น protein concentrate (Kohnhorst, 1991)] พบว่ามีเถ้าสูงถึง 4.59% เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์ NaCl จากปฏิกิริยาสะเทินระหว่าง HCl และ NaOH ที่ใช้ในการปรับ pH ของสารแขวนลอยโปรตีนให้เกิดการตกตะกอน และใช้ในการปรับ pH เพื่อละลายตะกอนตามลำดับ และยังพบปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเส้นใย 5.7% ทั้งนี้อาจเนื่อง

จากกระบวนการที่ใช้ยังไม่สามารถกำจัดแป้งและกากถั่วเขียวที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบจากโรงงานได้สมบูรณ์

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณโดยน้ำหนักแห้ง (%)
โปรตีน	88.93 ± 0.59
คาร์โบไฮเดรตและเส้นใย	5.7
เถ้า	4.59 ± 0.04
ไขมัน	0.78 ± 0.09

ตารางที่ 4 แสดงผลปริมาณวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีนถั่วเขียว พบว่าโปรตีนถั่วเขียวมีกรดอะมิโน phenylalanine มากที่สุดถึง 2.53 กรัม/100 กรัมโปรตีน และยังพบมีกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์เป็นกรดคือ glutamic acid ในปริมาณ 1.91 กรัม/100 กรัมโปรตีน และ aspartic acid ในปริมาณ 1.02 กรัม/100 กรัมโปรตีน ดังนั้นคาดว่าจุด isoelectric ของโปรตีนควรอยู่ในช่วง pH ต่ำกว่า 7 พบกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบคือ methionine 0.29 กรัม/100 กรัมโปรตีนโปรตีน แต่ไม่พบ cysteine ในโปรตีนถั่วเขียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Poehlman ในพืชเมล็ดชนิดอื่นๆ (Poehlman, 1991)

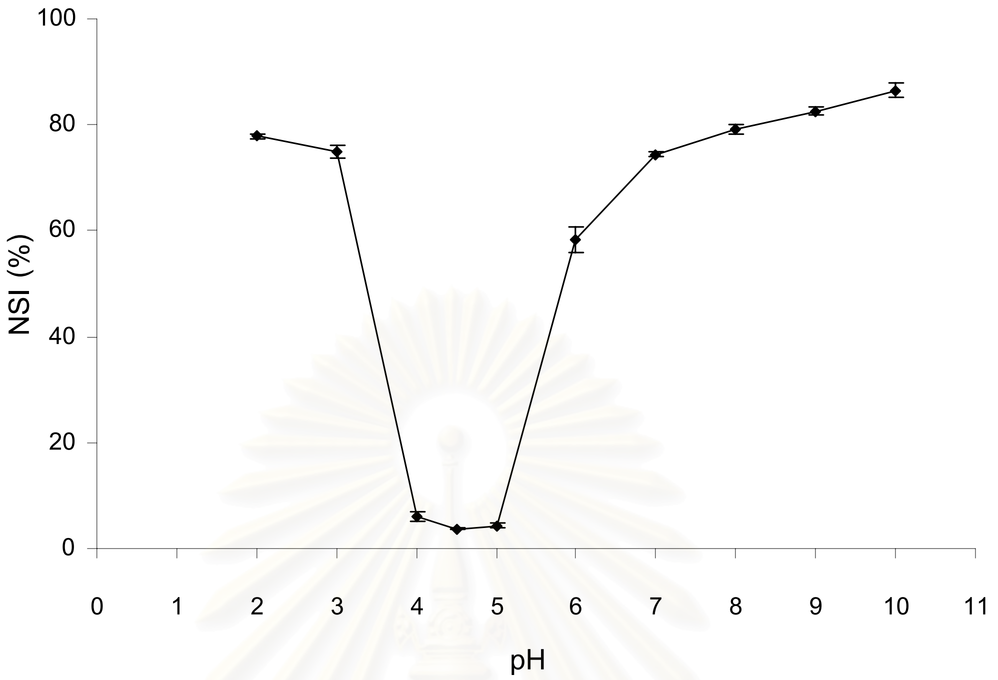
จากปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ [ยกเว้น asparagine และ glutamine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)] พบว่าโปรตีนถั่วเขียวมีกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำและกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำในปริมาณเท่าๆ กัน (ครึ่งต่อครึ่ง) ข้อมูลของชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนยังไม่เพียงพอในการระบุสมบัติของโปรตีนได้ เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ และโครงร่าง 3 มิติของโปรตีนต่างเป็นตัวกำหนดสมบัติโดยรวมของโปรตีน ดังนั้นการที่กรดอะมิโนบางชนิดเรียงตัวอยู่ด้านในของโครงร่าง 3 มิติ (ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ) และกรดอะมิโนที่อยู่ด้านนอกของโครงร่าง 3 มิติ ต่างมีอิทธิพลต่อสมบัติของโปรตีนเช่นกัน (Damodaran, 1996b)

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียวที่เตรียมได้

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณ (g/100 g)	ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณ (g/100 g)
PHE	2.53 ± 0.12	VAL	0.80 ± 0.01
GLU	1.91 ± 0.02	ILE	0.76 ± 0.03
ARG	1.76 ± 0.04	GLY	0.67 ± 0.00
LEU	1.59 ± 0.09	ALA	0.60 ± 0.07
TYR	1.19 ± 0.01	LYS	0.50 ± 0.06
SER	1.05 ± 0.02	MET	0.29 ± 0.04
ASP	1.02 ± 0.03	CYS	N/A
THR	0.89 ± 0.04	ASN*	-
PRO	0.84 ± 0.11	GLN*	-
HIS	0.81 ± 0.01	TRP*	-

* ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน

โปรตีนถั่วเขียวมีจุด isoelectric ที่ pH 4.5 ซึ่งที่ pH นี้ค่าการละลาย (NSI) ต่ำสุดเท่ากับ 3.74 % (ภาพที่ 15) ซึ่งตรงกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์พืชเมล็ดส่วนใหญ่ ที่พบจุด isoelectric ที่ pH 4-5 (Kohnhorst *et al.*, 1991; Were *et al.*, 1997) ผลการทดลองแสดงการละลายสูงสุดของโปรตีนถั่วเขียว (86.50 %) ที่ pH 10 ซึ่งสูงกว่าการละลายที่จุด isoelectric ถึง 23 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH 4.5 ซึ่งเป็นจุด isoelectric โปรตีนมีประจุรวมเป็นศูนย์ สายพอลิเพปไทด์สามารถรวมตัวกันได้ดีขึ้น ขณะเดียวกันโปรตีนจะแยกตัวออกจากน้ำซึ่งเป็นสารมีขั้ว ก่อให้เกิดการตกตะกอนและการแยกตัวของโปรตีนออกจากสารละลายที่สภาวะนี้ กรณีที่ pH ของสารละลายห่างจากจุด isoelectric ประจุรวมของโปรตีนจะมีค่าเป็นบวกหรือลบ ในสภาวะนี้สายโปรตีนจะไม่รวมตัวกันเนื่องจากการผลักกันของประจุของโปรตีนเอง และชอบที่จะรวมตัวกับน้ำซึ่งเป็นสารมีขั้วทำให้การละลายเพิ่มขึ้น (Vojdani, 1996)



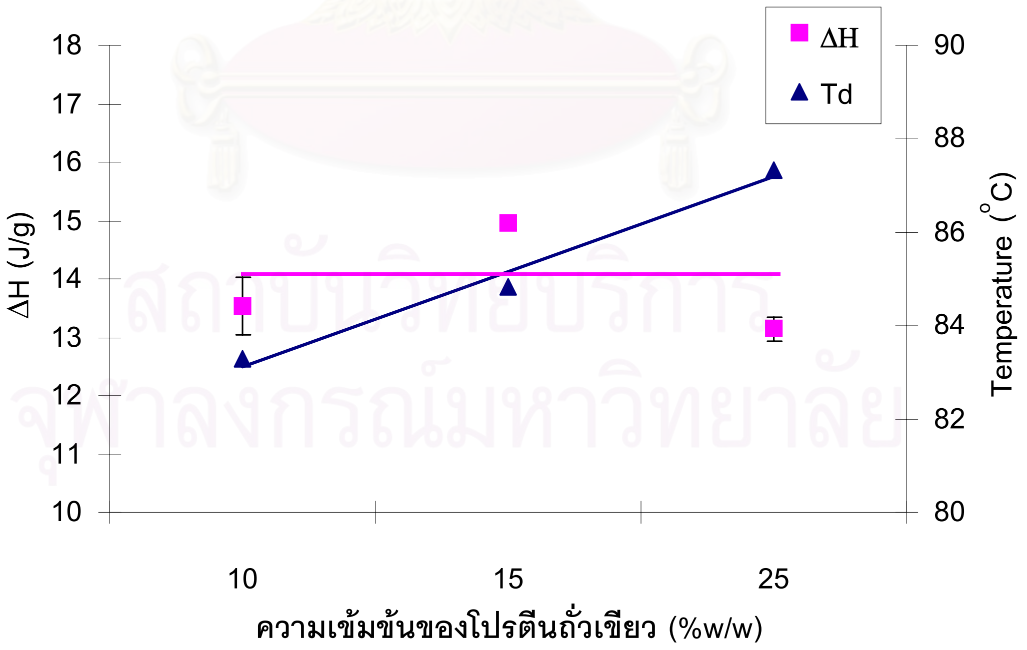
ภาพที่ 15 ความสามารถในการละลายของไนโตรเจนในโปรตีนถั่วเขียวที่ pH ต่างๆ

ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมัน surface hydrophobicity และ emulsifying activity index ของโปรตีนถั่วเขียวที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับ SPI ซึ่งเป็นโปรตีนจากพืชเมล็ดที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์สูง ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 5 พบว่าโปรตีนถั่วเขียวดูดซับน้ำได้น้อยกว่า SPI ประมาณ 72% แต่ดูดซับน้ำมันได้มากกว่า SPI 65% พบว่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเขียวต่ำกว่า SPI ประมาณ 80% แต่ EAI ของโปรตีนถั่วเขียวสูงกว่า SPI 24% ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า surface hydrophobicity ไม่สามารถใช้ตัดสินการดูดซับน้ำและน้ำมันได้ เนื่องจากค่าเหล่านี้เป็นผลรวมของกรดอะมิโน การเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ และโครงร่าง 3 มิติของโปรตีน รวมไปถึงพันธะต่าง ๆ ระหว่างสายพอลิเพปไทด์ เช่น พันธะไฮโดรเจน หรือพันธะ hydrophobic ด้วย นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงปริมาณน้ำ หรือน้ำมันในโครงข่ายของโปรตีน (protein matrix) อีกด้วย (Barbut, 1996) สรุปได้ว่าโปรตีนถั่วเขียวมีศักยภาพในการเป็น emulsifier ที่ดีกว่า SPI แต่ไม่เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารทอด เนื่องจากดูดซับน้ำมันได้ดี อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้โปรตีนถั่วเขียวเพื่อเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ เพราะโปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ

ตารางที่ 5 การดูดซับน้ำและน้ำมัน ค่า surface hydrophobicity และค่า emulsifying activity index ที่ pH 7.0 ของโปรตีนถั่วเขียวและ soy protein isolate (SPI)

สมบัติ	ชนิดของโปรตีน	
	โปรตีนถั่วเขียว	SPI
Water adsorption (g/g)	2.41 ± 0.07	8.76 ± 0.05
Oil adsorption (g/g)	5.76 ± 0.05	2.00 ± 0.01
surface hydrophobicity	30	149
EAI	83 ± 2	63 ± 2

จากการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนเพื่อ หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ และเกิดการรวมตัวกันในกระบวนการผลิตสารทดแทนไขมันด้วยความร้อน และแรงเฉือน ผลการวิเคราะห์ ΔH แสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (T_d) ในการทำให้โปรตีนถั่วเขียวเสียสภาพที่ pH 7 คือ 83.29-87.34 $^{\circ}$C (ภาพที่ 16) โดย T_d เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน แต่ ΔH คงที่ไม่แปรตามความเข้มข้นของโปรตีน และมีค่าเฉลี่ยประมาณ 13.88 J/g

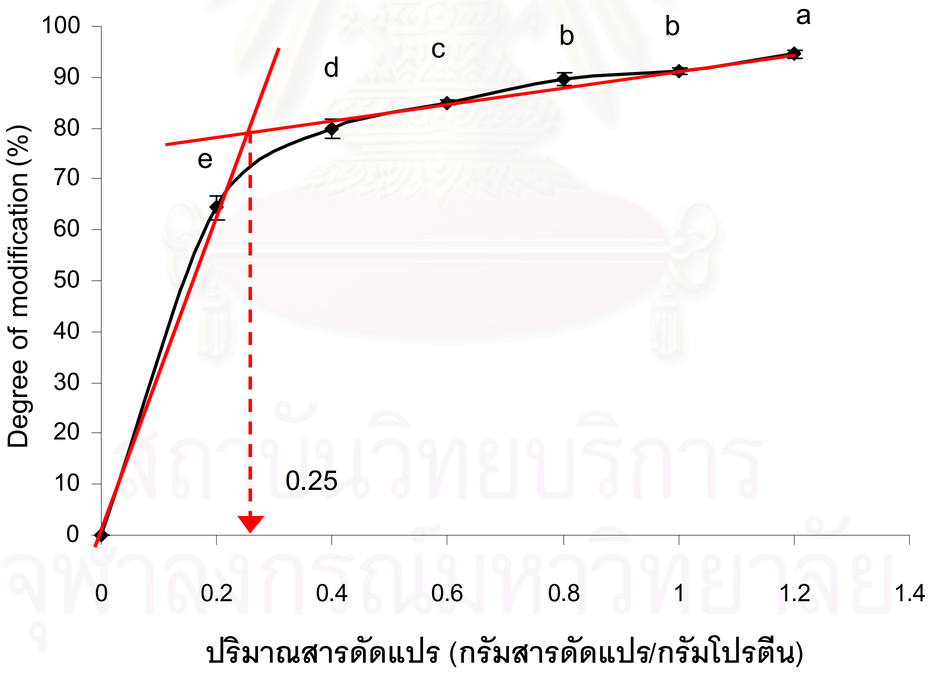


ภาพที่ 16 สมบัติทางความร้อนของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวที่ pH 7.0

การดัดแปรโปรตีนถั่วเขียวและสมบัติของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร

ระดับการดัดแปรของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ปริมาณสารดัดแปรระหว่าง 0.2-1.2 กรัมสารดัดแปรต่อกรัมโปรตีน ระดับการดัดแปรคงที่เมื่อใช้ปริมาณสารดัดแปร 0.8 และ 1.0 กรัม ระดับการดัดแปรเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารดัดแปรเพิ่มขึ้นจาก 1.0 เป็น 1.2 กรัม พบว่าอัตราการดัดแปรโปรตีนจะลดลงเมื่อปริมาณสารดัดแปรมีค่ามากกว่า 0.25 กรัม/กรัมโปรตีน (ภาพที่ 17)

เนื่องจากวิธีการดัดแปรโปรตีนโดยปฏิกิริยา succinylation นี้เป็นการดัดแปรกรดอะมิโน lysine เป็นหลัก แต่ก็สามารถดัดแปร histidine tyrosine และหมู่ฟังชันนัล aliphatic hydroxyl และ sulfhydryl ของกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ได้ด้วย (Howell, 1996) ส่วนวิธีการวัดปริมาณการดัดแปรนี้สามารถตรวจวัดการได้เฉพาะการดัดแปรของหมู่ฟังชันนัลอะมิโนของ lysine และ หมู่ฟังชันนัล n-terminal อะมิโน เท่านั้น (Franzen and Kinsella, 1976)



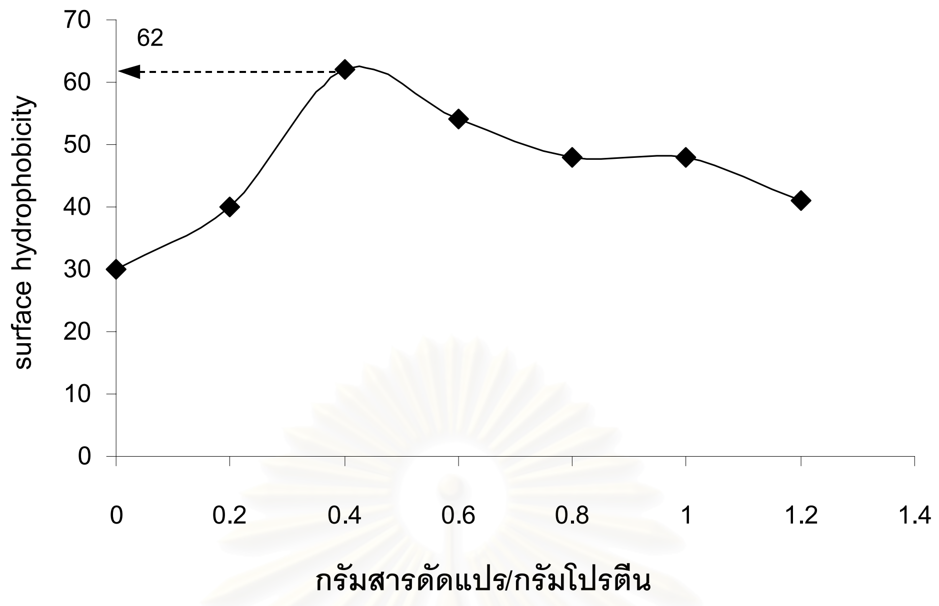
ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่าง Degree of chemical modification กับปริมาณสารดัดแปร

หมายเหตุ
- การดัดแปรใช้สารละลายโปรตีนเข้มข้น 1%(w/v) ใน 0.1M phosphate buffer (pH 8) โดยแปรปริมาณ succinic anhydride ในช่วง 0.2-1.2 กรัมต่อกรัมโปรตีน
- จุดที่อยู่ใต้ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b, c, d และ e) ในภาพ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การดัดแปรโปรตีนโดยกระบวนการ succinylation เป็นการดัดแปรทางเคมีเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติ และการกระจายตัวของประจุบนพื้นผิวโปรตีนเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนใหม่ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีตามที่เราต้องการ โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้แปรรูปโดยปฏิกิริยา succinylation นี้จะละลายในน้ำได้ดีขึ้น และมี surface hydrophobicity สูงขึ้นด้วย สามารถใช้เตรียมอิมัลชั่นได้ดีกว่าเดิม การที่โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้นจากกระบวนการ succinylation นี้ ทำให้โครงสร้างสามมิติของโปรตีนเปลี่ยนไปเนื่องจากการคลายตัวของสายโปรตีน ดังนั้นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติ hydrophobic ที่เดิมจัดเรียงตัวอยู่ด้านในโครงสร้างสามมิติจะย้ายมาอยู่ด้านนอกด้วย ทำให้สัดส่วนของกรดอะมิโนชนิด hydrophobic และ hydrophilic ในโครงสร้างสามมิติของโปรตีนเปลี่ยนไป เนื่องจากโปรตีนใหม่มีกลุ่ม hydrophobic เพิ่มขึ้นค่า surface hydrophobicity ก็น่าจะเพิ่มขึ้นด้วย พบว่าผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับสมมุติฐานนี้โดยพบว่าโปรตีนดัดแปรมี surface hydrophobicity สูงกว่าโปรตีนเดิมที่ทุกระดับการดัดแปร โดยที่ surface hydrophobicity แปรผันโดยตรงกับปริมาณสารดัดแปรที่ใช้ (กรัม/กรัมโปรตีน) จนถึงค่าสูงสุดที่ 0.4 กรัม/กรัมโปรตีน หลังจากนี้พบว่า surface hydrophobicity จะลดลงเมื่อปริมาสารดัดแปรเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 18) อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มปริมาณสารดัดแปรมากกว่า 0.4 กรัม/กรัมโปรตีนแล้ว สายโปรตีนไม่เกิดการคลายตัวอีกต่อไป แต่ยังคงมีการเพิ่มประจุลบเข้าไปในโปรตีนเรื่อย ๆ ทำให้ suface hydrophobicity ค่อยๆ ลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณสารดัดแปรที่ 0.4 กรัม/กรัมโปรตีน เพื่อให้สายพอลิเพปไทด์มีหมู่ hydrophobic สูงสุดสามารถที่จะเกิดพันธะเคมีระหว่างสายพอลิเพปไทด์ได้ง่ายเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยความร้อน

ผลของการเติมสารเคมีเข้าไปบนสายโปรตีนโดยปฏิกิริยา succinylation นี้ทำให้ขนาดอนุภาคโปรตีนดัดแปรใหญ่ขึ้นกว่าเดิม และเนื่องจากประจุลบที่พื้นผิวมีจำนวนมากขึ้นและสายโปรตีนสามารถเกิด calcium bridge ได้เมื่อมี $CaCl_2$ ในสารละลาย ดังนั้นก้อนโปรตีนดัดแปรจึงอาจมีขนาดใหญ่กว่าที่ต้องการ จึงจำเป็นจะต้องลดขนาดอนุภาคโดยการตีปั่นให้มีขนาด 0.1-3 ไมครอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรโดยวิธี succinylation กับปริมาณสารดัดแปร

หมายเหตุ การดัดแปรใช้สารละลายโปรตีนเข้มข้น 1%(w/v) ใน 0.1M phosphate buffer (pH 8) โดยแปรปริมาณ succinic anhydride ในช่วง 0.2-1.2 กรัมต่อกรัมโปรตีน

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนดัดแปร ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบ การละลาย (NSI) การดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมัน EAI สมบัติทางความร้อน และสมบัติทางกายภาพ ระหว่างโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรตามกรรมวิธีที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อนคล้ายโปรตีนถั่วเขียวก่อนดัดแปร แต่มีสีเข้มกว่าเดิมเล็กน้อย (ภาพที่ 19) พบว่า surface hydrophobicity ของโปรตีนดัดแปรสูงกว่าโปรตีนไม่ดัดแปร แต่การละลาย (NSI) ของโปรตีนดัดแปรกลับสูงกว่าโปรตีนไม่ดัดแปรด้วย (ตารางที่ 6) ที่ pH 7.0 การละลายของโปรตีนดัดแปรดีขึ้น 1.1 เท่า และที่ pH 4.5 การละลายดีขึ้นถึง 5.8 เท่า ดังนั้นจึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าการดัดแปรโปรตีนทางเคมีโดยปฏิกิริยา acylation นี้สามารถนำไปปรับปรุงการละลายของโปรตีนในตัวกลางที่เป็นกรดได้ (Meyer and Williams, 1977) อย่างไรก็ตามจุด isoelectric ของโปรตีนดัดแปรอาจไม่ตรงกับจุด isoelectric ของโปรตีนถั่วเขียวอีกต่อไป โดยอาจเลื่อนไปอยู่ในช่วง pH ที่เป็นกรดมากขึ้นได้ (pH ต่ำกว่า 4.5) ผลจากปฏิกิริยา succinylation ทำให้เกิดการเปลี่ยนหมู่อะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ที่มีประจุบวกเป็นหมู่ที่มีประจุลบ เป็นการเพิ่มประจุรวมของสายพอลิเพปไทด์ให้เป็นลบมากขึ้น เมื่อแรงผลักดันทางไฟฟ้าระหว่างสายพอลิเพปไทด์สูงขึ้นจะทำให้สายพอลิเพปไทด์รวมตัวกันได้น้อยลง ทำให้โปรตีนตกตะกอนลดลงด้วย การที่สาย

พอลิเพปไทด์มีประจุมากขึ้นทำให้โปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมีการละลายน้ำสูงขึ้น (Franzen and Kinsella, 1976)

ภาพที่ 19 โปรตีนถั่วเขียวดัดแปรซึ่งดัดแปรโดยใช้ปริมาณสารดัดแปร 0.4 กรัมสารต่อกรัมโปรตีน

ตารางที่ 6 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรที่ pH 7.0 และ 4.5

PH	ค่า NSI ของโปรตีน (%)	
	โปรตีนถั่วเขียว	โปรตีนถั่วเขียวดัดแปร
7.0	74.36 ± 0.42b	83.92 ± 0.29a
4.5	3.74 ± 0.16b	21.84 ± 0.29a

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่หน้าตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a และ b) ในแนวนอนในตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

พบว่าโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมีดูดซับน้ำ และน้ำมันดีขึ้นกว่าเดิม ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าการดัดแปรทางเคมีมีผลต่อการดูดซับน้ำแน่นอนขณะที่ข้อมูลการดูดซับน้ำมันยังไม่สามารถสรุปได้ (ตารางที่ 7) การดูดซับน้ำของโปรตีนดัดแปรเพิ่มขึ้น 48% จากโปรตีนถั่วเขียวเดิม นั้นอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยา succinylation สามารถทำให้โปรตีนโมเลกุลใหญ่เกิดการแตกออกเป็นหน่วยย่อยและเกิดการคลายตัวของโครงสร้างสามมิติ (unfold) ทำให้มีจำนวนของส่วนที่

ซอบน้ำ (hydrophilic binding sides) เพิ่มขึ้นทำให้สามารถจับน้ำไว้ได้มากขึ้น (Narayana and Rao, 1984, El-Adawy, 2000)

ตารางที่ 7 ค่าการดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร

สมบัติ	ชนิดของโปรตีน	
	โปรตีนถั่วเขียว	โปรตีนถั่วเขียวดัดแปร
Water adsorption (g/g)	2.41 ± 0.07b	3.57 ± 0.03a
Oil adsorption (g/g) [ns]	5.76 ± 0.05	6.34 ± 0.18

หมายเหตุ - ตัวเลขที่อยู่หน้าตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a และ b) ในแนวนอนในตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

- ns ในตาราง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การปรับปรุงผิวของโปรตีนให้มี surface activity สูงโดยการดัดแปรทางเคมีอาจทำให้โครงร่างสามมิติของโปรตีนเปลี่ยนไปเป็นแบบ amphiphilic เป็นผลให้โปรตีนสามารถเป็น emulsifier ที่ดีได้ (Hill, 1996) ค่า EAI แสดงว่าผิวของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมีปริมาณหมู่มีขั้ว และไม่มีขั้วเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเมื่อโครงสร้างสามมิติของโปรตีนการคลายตัวนั้น จะมีทั้งหมู่ที่เป็น hydrophilic และ hydrophobic เพิ่มมากขึ้นที่โครงสร้างด้านนอก ทำให้โปรตีนดัดแปรเป็น surface active agent หรือ emulsifier ที่ดีกว่าโปรตีนไม่ดัดแปร พบว่าข้อมูลจากการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานนี้โดยค่า EAI ของโปรตีนดัดแปรสูงกว่าของโปรตีนไม่ดัดแปรถึง 1.3 เท่า (ตารางที่ 8) ความสามารถในการละลายของโปรตีนแปรผันโดยตรงกับความสามารถในการเป็น emulsifier ของโปรตีน (Franzen and Kinsella, 1976) โดยโปรตีนที่มีการละลายดีขึ้นจะมีค่า EAI สูงขึ้นด้วย โดย EAI ของโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรสูงกว่าของ BSA และ egg albumin ที่เป็น surface active agent ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายถึง 4 เท่า (Pearce and Kinsella, 1978)

ตารางที่ 8 ค่า EAI ของสารละลายโปรตีน 0.5%(w/v) ใน phosphate buffer pH 7

ชนิดของโปรตีน	EAI
โปรตีนถั่วเขียวดัดแปร	110 ± 5a
BSA	102 ± 4
โปรตีนถั่วเขียว	83 ± 2b

หมายเหตุ ตัวเลขที่อยู่หน้าตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a และ b) ในตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิ (Td) และปริมาณความร้อน (ΔH) ที่ใช้ในการทำให้โปรตีนดัดแปรเสียสภาพ พบว่าอุณหภูมิของการเสียสภาพของโปรตีนทั้งสองชนิดไม่ต่างกัน แต่พลังงานที่ต้องใช้ในการทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยความร้อนของโปรตีนดัดแปรน้อยกว่าหลายเท่า ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมีการเสียสภาพธรรมชาติไปบางส่วนแล้ว จากกระบวนการดัดแปรทางเคมี ซึ่งอาจทำให้พันธะเคมีภายในสายและระหว่างสายพอลิเพปไทด์มีปริมาณลดลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ จากที่มีความเป็นระเบียบสูงไปสู่ความเป็นระเบียบน้อยลง การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถติดตามได้ด้วย DSC (Kilara and Harwalkar, 1996) ข้อมูลในตารางที่ 8 แสดงว่าวิธีการดัดแปรทางเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติประมาณ 73%

ตารางที่ 9 สมบัติทางความร้อนของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร ความเข้มข้น 10% (w/w) ที่ pH 7.0

ชนิดของโปรตีน	Tp (^{o}C)	ΔH (J/g)	Relative degree of denaturation (%)
โปรตีนถั่วเขียว	83.29 ± 0.14	13.53 ± 0.49	0
โปรตีนถั่วเขียวดัดแปร	83.05 ± 1.00	3.62 ± 1.99	73.24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตสารทดแทนไขมัน

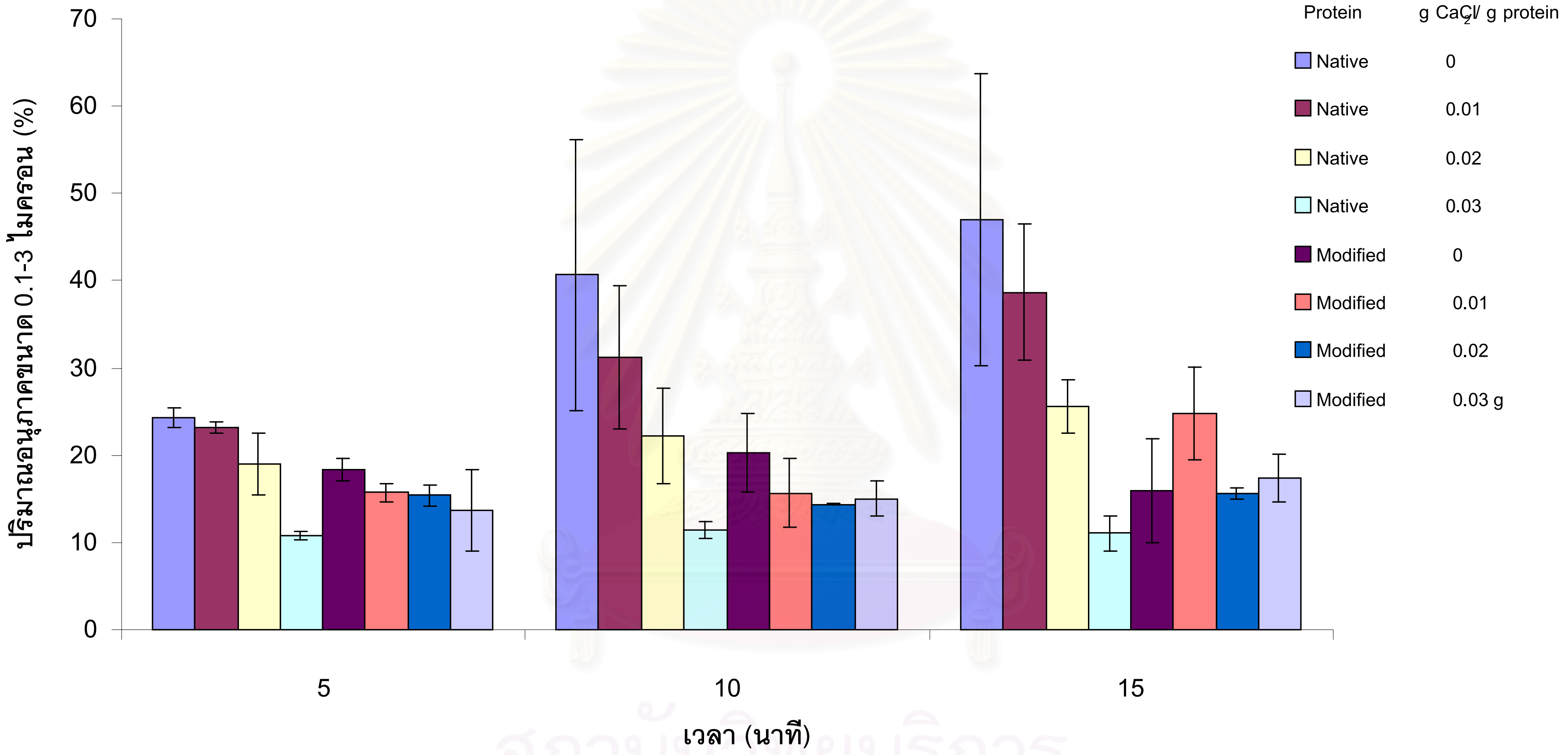
งานวิจัยนี้ได้นำโปรตีนถั่วเขียวและโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรมาทดลองผลิตสารทดแทนไขมัน โดยให้ความร้อนจนโปรตีนเสียสภาพ จากนั้นมีการเติม $CaCl_2$ เพื่อเป็น salt bridge ช่วยให้สายพอลิเพปไทด์ที่คลายตัวยึดเหนี่ยวกันได้ดีขึ้น สุดท้ายมีการตีปั่นสารละลายตลอดเวลาเพื่อกระจายความร้อนและปริมาณ $CaCl_2$ ให้ทั่วถึง การตีปั่นยังทำให้ขนาดอนุภาคคอลลอยด์ลดลงจนได้ขนาดตามต้องการอีกด้วย ในการศึกษาผลของ ชนิดโปรตีน ปริมาณ $CaCl_2$ และ เวลาในการให้ความร้อน ที่เหมาะสมแก่การผลิตสารทดแทนไขมันนั้นใช้สารละลายโปรตีนเข้มข้น 5% (McCarthy and Maegli, 1994) โดยให้ความร้อนที่ 83 ± 1 °C (ตารางที่ 9) Singer รายงานว่าคุณลักษณะของสารทดแทนไขมันที่ให้ลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายกับไขมันมากที่สุด จะต้องเป็นอนุภาคทรงกลม และมีขนาด 0.1-3 ไมครอน เท่านั้น (Singer and Dunn 1990)

ผลจากงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 20) พบว่าตัวแปรสำคัญที่ควบคุมขนาดของอนุภาคของสารทดแทนไขมันมีดังนี้

1. **ชนิดของโปรตีน** พบว่าสารละลายโปรตีนไม่ดัดแปรและไม่เติม $CaCl_2$ ให้ผลดีกว่ากรณีที่ใช้โปรตีนดัดแปร
2. **ปริมาณ $CaCl_2$** พบว่าเมื่อใช้ปริมาณ $CaCl_2$ มากขึ้นปริมาณของอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ลดลง
3. **เวลาในการให้ความร้อน** พบว่าจำนวนอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน มากขึ้นเมื่อใช้เวลานานขึ้น

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปัจจัยหลัก (main effect) ทั้ง 3 ล้วนมีผลต่อขนาดอนุภาคทั้งสิ้น และพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (interaction effect) มีเพียงอิทธิพลร่วมของชนิดของโปรตีนและปริมาณ $CaCl_2$ เท่านั้นที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาค

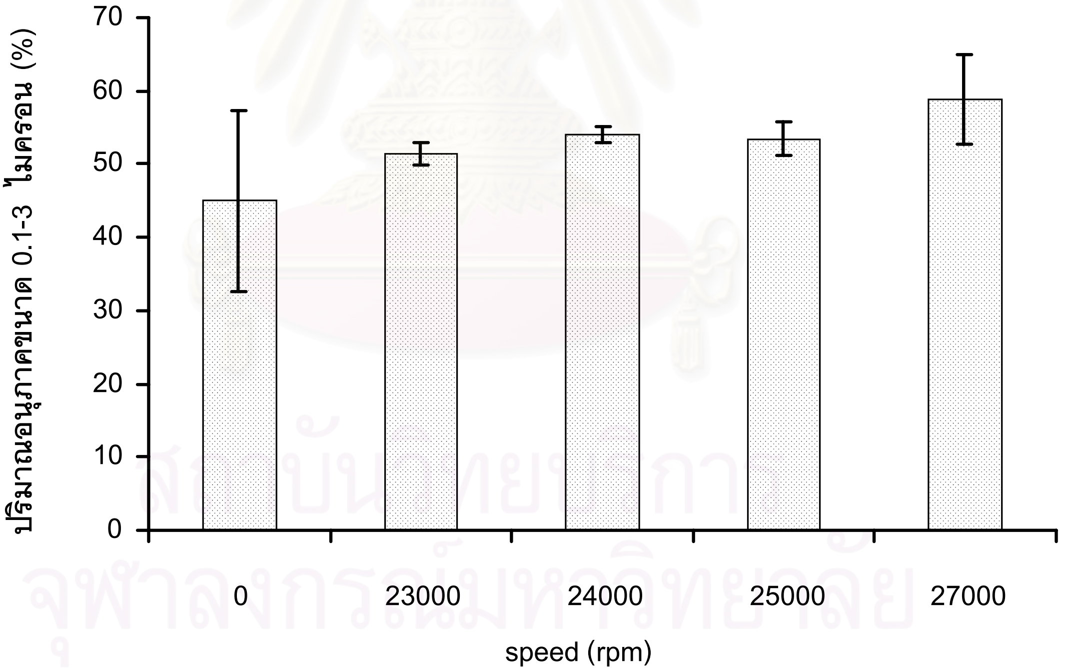
การที่โปรตีนที่ไม่ดัดแปรและโปรตีนดัดแปรมีจำนวนประจุลบบนพื้นผิวต่างกัน เมื่อมีการเติม divalent cation เช่น Ca^{2+} ลงไปในสารละลาย สายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนดัดแปรสามารถจับกันผ่าน calcium bridges ได้ดีขึ้น (Murphy and Howell, 1991, cited in Howell, 1996) ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งขนาดที่ใหญ่กว่านั้นส่วนใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 3 ไมครอน ซึ่งเป็นขนาดที่เราไม่ต้องการ และนอกจากนี้แล้วอนุภาคของโปรตีนดัดแปรน่าจะมีความแข็งแรงกว่าอนุภาคของโปรตีนไม่ดัดแปรเนื่องจากมี calcium bridge ด้วย ซึ่งอาจทำให้การลดขนาดในขั้นตอนต่อไปทำได้ยากขึ้น **จากผลการทดลองพบว่า<u>สภาวะที่ดีที่สุด</u> (สภาวะที่ให้ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน สูงสุด) คือ ใช้โปรตีนไม่ดัดแปร ไม่เติม $CaCl_2$ เวลาในการให้ความร้อน 15 นาที พบปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอน เท่ากับ 47.02 ± 16.76 % จึงเลือกสภาวะนี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป**



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอนุภาคในช่วง 0.1-3 ไมครอน กับเวลาที่ให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนถั่วเขียว (native)และโปรตีนถั่วเขียวดัดแปร (modified) ที่อุณหภูมิ 83 °C โดยแปรปริมาณ $CaCl_2$ ที่เติมในช่วง 0-0.03 กรัม

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคโปรตีนในสารทดแทนไขมัน ที่ทำจากโปรตีนถั่วเขียวนั้น พบว่ามีอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ประมาณ 45% ส่วนที่เหลือเกือบทั้งหมดเป็นอนุภาคที่มีขนาดเกินกว่า 3 ไมครอน และมีอนุภาคขนาดต่ำกว่า 0.1 ไมครอนน้อยมาก ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน จึงเพิ่มการตีปั่นต่อภายหลังการให้ความร้อน

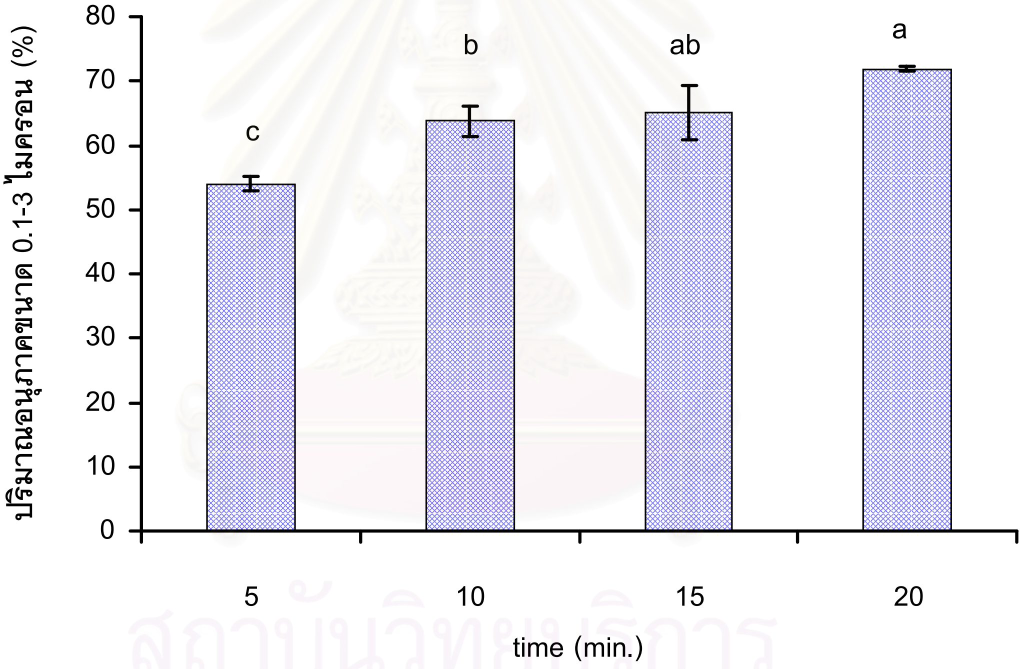
การศึกษาผลผลของแรงเฉือนจากการตีปั่นทำโดย เลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว (หน้า 42) ได้ทดลองแปรความเร็วในการตีปั่นตั้งแต่ 23,000-27,000 rpm ในเวลา 5 นาที ผลการทดลองพบว่า ความเร็วในช่วงที่ศึกษาสามารถใช้ผลิตอนุภาคที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอนได้ดี โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ดีพบว่าการกระจายตัวของอนุภาคโปรตีนเมื่อตีปั่นที่ 23,000 rpm มีความเบี่ยงเบนน้อย (ภาพที่ 21) ข้อมูลทางสถิติและปริมาณพลังงานที่ใช้ในการตีปั่นชี้ว่า **การตีปั่นที่ 23,000 rpm มีประสิทธิภาพสูงสุดและใช้พลังงานในการผลิตต่ำที่สุด**



<u>ภาพที่ 21</u> ผลของความเร็วของ hand-operating homogenizer ที่ใช้ในการตีปั่นนาน 5 นาที ต่อปริมาณอนุภาคของโปรตีนถั่วเขียวที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอน

<u>หมายเหตุ</u> สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวที่นำมาตีปั่นคือ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวความเข้มข้น 5%(w/w) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 83 $^{\circ}$C นาน 15 นาที

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตีปั่นที่ 23,000 rpm และการกระจายตัวของอนุภาคโปรตีน พบว่าเวลาที่ใช้ในการตีปั่นมีผลต่อปริมาณและการกระจายตัวของอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน (ภาพที่ 22) เนื่องจากการตีปั่นเป็นเวลานานเป็นการเพิ่มจำนวนรอบที่อนุภาคถูกแรงเฉือนจึงเป็นผลให้มีอนุภาคโปรตีนมีขนาด 0.1-3 ไมครอน มากขึ้น แต่เนื่องจากการตีปั่นนานกว่า 15 นาทีไม่ทำให้ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน เพิ่มมากนัก (เมื่อใช้เวลา 15 และ 20 นาที ปริมาณอนุภาคที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอนไม่แตกต่างกัน) ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการตีปั่นนาน 15 นาที ที่ความเร็ว 23,000 rpm โดยเป็นการช่วยประหยัดพลังงาน (ลดต้นทุนการผลิตในการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียวอีกด้วย



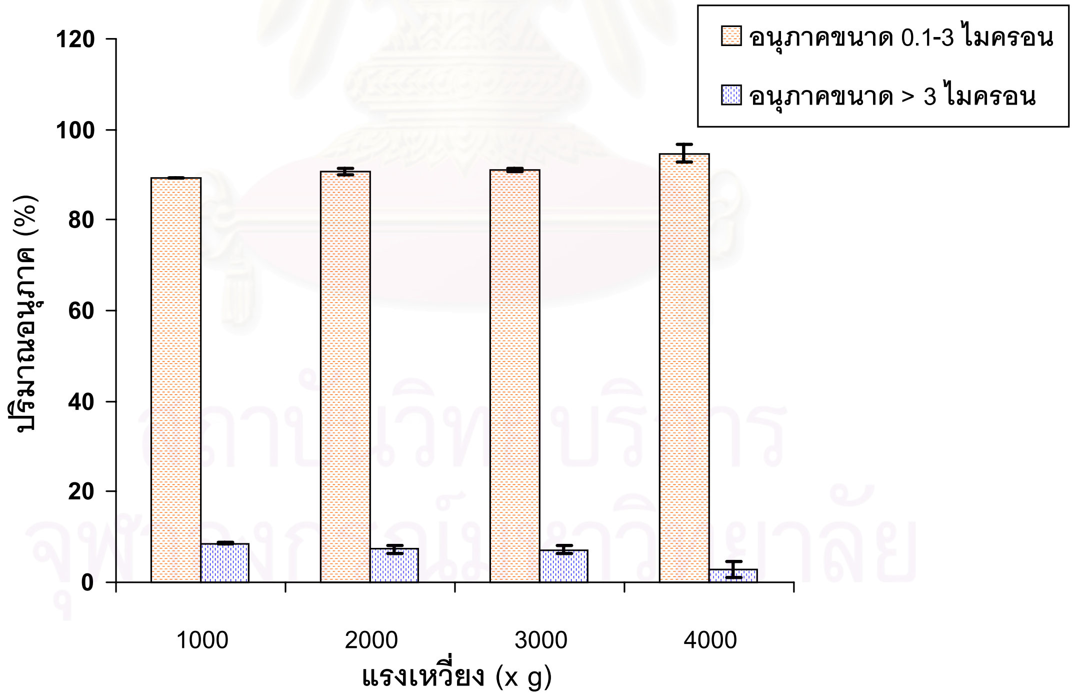
<u>ภาพที่ 22</u> ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นที่ความเร็ว 23,000 rpm ต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนถั่วเขียวขนาด 0.1-3 ไมครอน

<u>หมายเหตุ</u> - สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวที่นำมาตีปั่นคือ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวความเข้มข้น 5%(w/w) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 83 ^{o}C นาน 15 นาที

- จุดที่อยู่ใต้ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b และ c) ในภาพ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคโปรตีนเมื่อทำการตีปั่นที่ 23,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที พบอนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอน 65 % พบอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน 34 % และพบอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 0.1 ไมครอนเพียง 1 % เนื่องจากผลิตภัณฑ์นี้ประกอบด้วยอนุภาคจิ๋วที่มีขนาดเล็กกว่า 0.1 ไมครอนเพียงเล็กน้อย จึงเลือกใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงมาใช้แยกอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน ออกไป

ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของการปั่นเหวี่ยง ในการแยกอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน โดยใช้แรงเหวี่ยงขนาด 1000-4000 x g เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มแรงเหวี่ยง ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอนในของเหลวและในตะกอนจะเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23 และ 24) และแรงเหวี่ยงขนาด 4000 x g มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากพบอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ถึง 94.66% จากผลการวิเคราะห์ตะกอนในตัวอย่างนี้ พบอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอนในตะกอนคิดเป็น 45.49% ของปริมาณอนุภาคทั้งหมดในตะกอน (ตารางที่ 10) ผลการทดลองชี้ว่ามี การปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g ให้อนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ในชั้นของเหลวมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกส่วนของเหลวที่ใช้แรงปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g ไปศึกษารูปร่างของอนุภาคต่อไป



ภาพที่23 ผลของแรงเหวี่ยงต่อปริมาณอนุภาคที่แยกได้ในส่วนของเหลวตอนบน

หมายเหตุ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวที่นำมาปั่นเหวี่ยงคือ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวความเข้มข้น 5%(w/w) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 83 °C นาน 15 นาที จากนั้นนำมาตีปั่นต่อที่ความเร็ว 23,000 rpm นาน 15 นาที

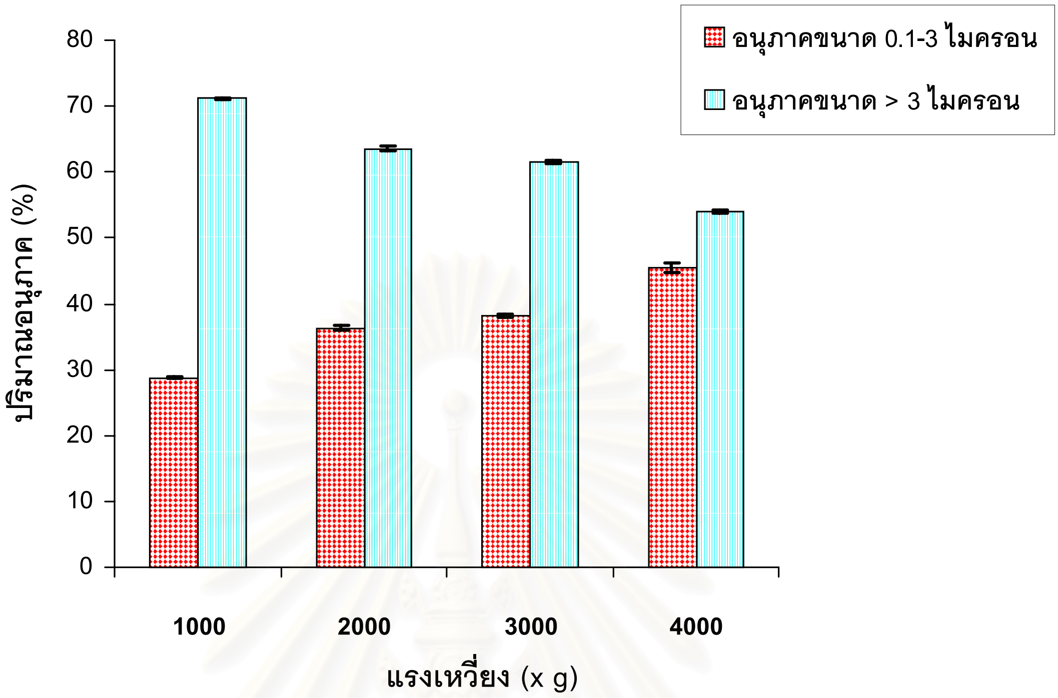
ตารางที่ 10 ผลของแรงที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงต่อส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง

แรงเหวี่ยง (x g)	ปริมาณของอนุภาคตามขนาด (%)					
	ในของเหลว			ในตะกอน		
	< 0.1 ไมครอน ^{ns}	0.1-3 ไมครอน	> 3 ไมครอน	< 0.1 ไมครอน ^{ns}	0.1-3 ไมครอน	> 3 ไมครอน
1000	2.19 ± 0.01	89.20 ± 0.08b	8.60 ± 0.06a	0.14 ± 0.01	28.72 ± 0.13d	71.14 ± 0.13a
2000	2.00 ± 0.27	90.64 ± 0.62b	7.36 ± 0.89a	0.18 ± 0.01	36.28 ± 0.37c	63.54 ± 0.36b
3000	1.71 ± 0.42	91.12 ± 0.40b	7.18 ± 0.81a	0.30 ± 0.01	38.14 ± 0.25b	61.56 ± 0.26c
4000	2.38 ± 0.15	94.66 ± 1.93a	2.96 ± 1.78b	0.50 ± 0.40	45.48 ± 0.64a	54.01 ± 0.24d

หมายเหตุ - ตัวเลขที่อยู่หน้าตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b, c และ d) ในแนวตั้งในตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

- ns ในตาราง แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

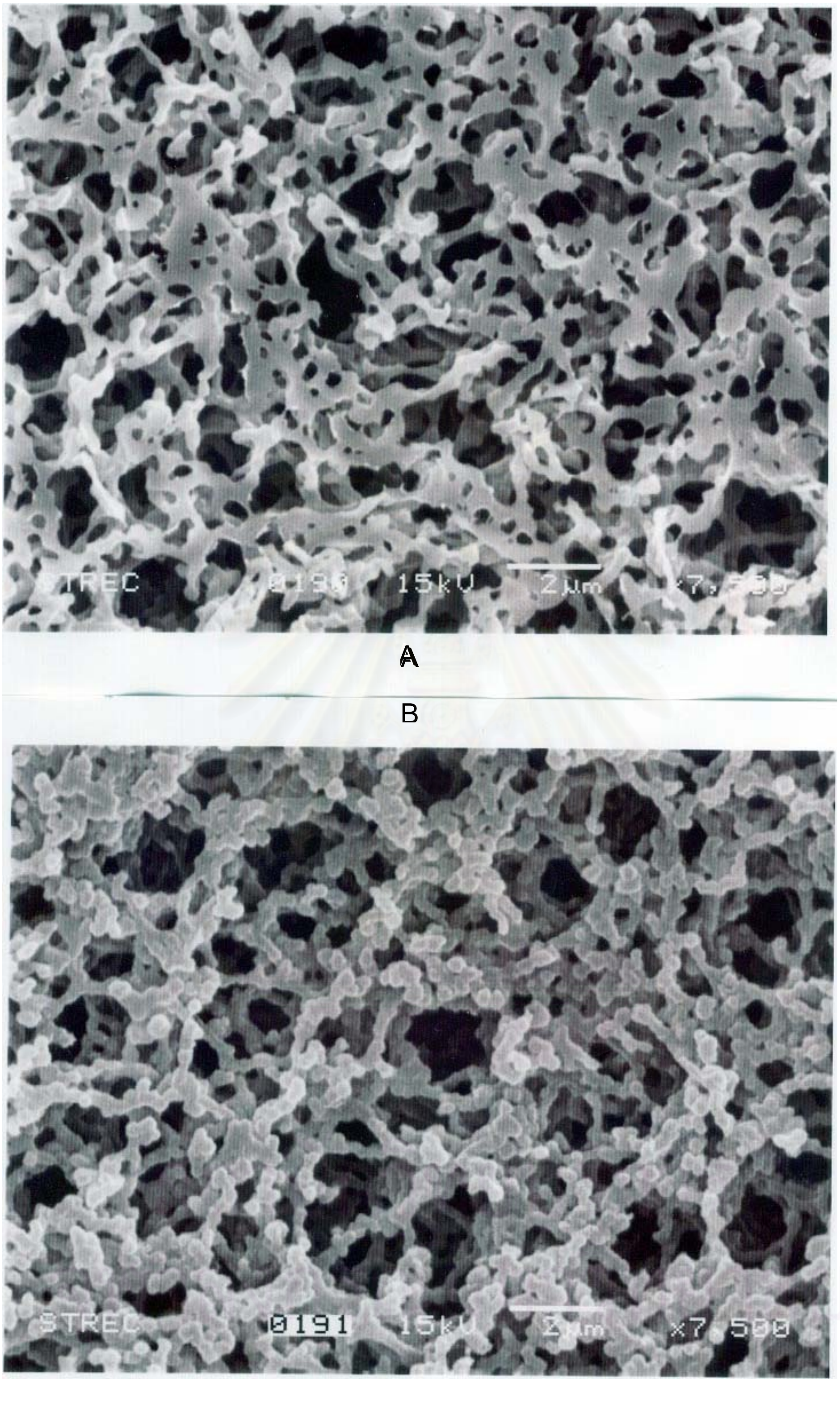
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 24 ผลของแรงเหวี่ยงต่อปริมาณอนุภาคที่แยกได้ในส่วนตะกอน

หมายเหตุ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวที่นำมาปั่นเหวี่ยงคือ สารแขวนลอยโปรตีนถั่วเขียวความเข้มข้น 5%(w/w) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 83 $^{\circ}$C นาน 15 นาที จากนั้นนำมาตีปั่นต่อที่ความเร็ว 23,000 rpm นาน 15 นาที

เมื่อนำอนุภาคโปรตีนซึ่งอยู่ในของเหลวซึ่งผ่านการเหวี่ยงที่ 4000 x g มาวิเคราะห์รูปร่างด้วยเครื่อง SEM (แสดงรูปร่าง 2 มิติของอนุภาค) พบว่ารูปร่างของอนุภาคโปรตีนมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม แต่เนื่องจากความเข้มข้นของสารแขวนลอยโปรตีนที่นำไปวิเคราะห์สูงเกินไปทำให้ resolution ของ SEM ไม่ดี (ภาพที่ 25) อย่างไรก็ตาม SEM แสดงให้เห็นชัดเจนว่ารูปร่างของสารทดแทนไขมันที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยนี้มีโอกาสเป็นทรงกลมสูง แสดงถึงศักยภาพในการนำโปรตีนถั่วเขียวมาผลิตสารทดแทนไขมันที่มีคุณภาพดีได้ (Civille, 1990; Singer, 1992 cited in Singer,1996)



ภาพที่ 25 รูปร่างของอนุภาคโปรตีนที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง (B) เมื่อเทียบกับรูปร่างของกระดาษกรอง (A)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียว ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยสามารถผลิตสารทดแทนไขมันที่มีขนาดอนุภาค 0.1-3 ไมครอน ในปริมาณ 94.66% และยังพบว่ารูปร่าง 2 มิติของอนุภาคมีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งเป็นข้อมูลที่บ่งศักยภาพในการเป็นสารทดแทนไขมันได้ดี

ขั้นตอนการผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วเขียวมีดังนี้คือ

1. ใช้โปรตีนถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการดัดแปรทางเคมีเข้มข้น 5%(w/w)
2. ให้ความร้อนที่ 83 ^{o}C นาน 15 นาที โดยตีปั่นที่ความเร็ว 17,000 rpm ตลอดเวลา
3. ตีปั่นต่อเพื่อลดขนาดที่ความเร็ว 23,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g นาน 10 นาที เพื่อแยกอนุภาคขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอนออก

องค์ความรู้ใหม่อื่น ๆ ที่เกิดจากงานวิจัยนี้คือ

1. วิธีการเตรียมโปรตีนถั่วเขียวที่มีคุณภาพเทียบเท่าโปรตีน isolate จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งถั่วเขียว โดยสามารถผลิตโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากถึง 88.93% โดยน้ำหนักแห้ง
2. วิธีการผลิตโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรที่มีศักยภาพเป็น surface active agent เช่น emulsifier ได้ โดยดัดแปรด้วย succinic anhydride 0.4 กรัมต่อกรัมโปรตีน ซึ่งโปรตีนถั่วเขียวดัดแปรนี้มีค่า emulsifying activity index เพิ่มขึ้นจากโปรตีนถั่วเขียวไม่ดัดแปร 1.3 เท่า และยังมีค่า emulsifying activity index สูงกว่า BSA ประมาณ 8% ด้วย

ข้อเสนอแนะ

นอกจากองค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำงานวิจัยนี้แล้ว ยังมีปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการวิจัยซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปเพื่อให้งานวิจัยนี้มีประโยชน์สูงสุด ซึ่งผู้วิจัยขอสรุปไว้ดังนี้

1. การวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตสารทดแทนไขมันโดย
   - ศึกษาผลของการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาต่าง ๆ ในช่วงการเพิ่มขนาดอนุภาคโดยทำให้โปรตีนเสียสภาพ ต่อขนาดและรูปทรงของอนุภาค
   - ศึกษาวิธีการลดขนาดอนุภาคแบบอื่น ๆ เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอนมากที่สุด ในกรณีที่มีขนาดเกินกว่า 3 ไมครอนอยู่
   - ศึกษาวิธีการแยกอนุภาคโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน ที่มีประสิทธิภาพสูง พร้อมคำนวณหา yield ของกระบวนการทุกกระบวนการในการผลิตสารทดแทนไขมัน
   - ศึกษารูปร่างของอนุภาคโปรตีนในแบบ 3 มิติ เพื่อที่จะได้ทราบรูปร่างที่แน่นอนของอนุภาคโปรตีนที่ผลิตได้
   - ศึกษาเพื่อนำโปรตีนที่แยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงาน ไปผลิตสารทดแทนไขมันเลยโดยไม่ต้องมีการทำแห้งก่อนเพื่อประหยัดต้นทุน (เนื่องจากในงานนี้ การทำแห้งโปรตีนด้วยวิธี freeze dry มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาสมบัติของโปรตีนที่นำมาศึกษาให้ใกล้เคียงธรรมชาติและเพิ่มอายุการเก็บรักษาโปรตีนเท่านั้น)

2. การวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการแยกโปรตีนออกจากน้ำทิ้งของโรงงาน ด้วยวิธีการอื่น เช่น freeze concentration และ ultafiltration เพื่อรักษาสภาพและสมบัติของโปรตีนในการนำโปรตีนไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

3. การวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการดัดแปรโปรตีนทั้งทางเคมี และ/หรือ ทางกายภาพ เพื่อผลิต functional ingredient อื่นๆ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2533. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งถั่วเขียว (มอก. 948). กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ นัยวิกุล, จิตธนา แจ่มเมฆ, อรพิน ภูมิภมร และวุฒิชัย นาครักษา. 2531. คุณสมบัติของสตาร์ชและโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวบางพันธุ์. *ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.).* 22: 330-337.

ภาษาอังกฤษ

Akoh, C. C. 1999. Fat Substitute. *Food Ingredients and Analysis International* 21(2): 13-22.

Alizadeh-Pasdar, N. and Li-Chan, C. Y. 2000. Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. *J. Agric. Food Chem.* 48: 328-334.

AOAC(Association of Official Analytical Chemists). 1995. AOAC Official Method of Analysis. 16th ed. Washington D.C.

Barbut, S. 1996. Determining water and fat holding. In G. M. Hall (Ed.), Methods of Testing Protein Functionality, pp. 186-225. London: Blackie Academic & Professional.

Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., and Kinneary, J. F. 1996. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemical, Drugs, and Biologicals. 12th edition. Rahway, New Jersey: Merck & Co.

Civille, G. V. 1990. The sensory properties of products made with microparticulated protein. *J. Am. Coll. Nutr.* 9: 427.

Coffmann, C. W. and Garcia, V. V. 1977. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mungbean flour. *J. Fd. Technol.* 12: 473-484.

Damodaran, S. 1996a. Amino Acids, Peptides, and Proteins. In O. R. Fennema (Ed.), Food Chemistry, 3rd edition, pp. 321-429. New York: Marcel Dekker.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Damodaran, S. 1996b. Functional Properties. In S. Nakai and H. W. Modler (Eds.), Food Protein: Properties and Characterization, pp. 167-234. New York: VCH Publishers.

Eisele, T. A. and Brekke, C. J. 1981. Chemical modification and functional properties of acetylated beef heart myofibrillar protein. *Journal of Food Science.* 46: 1095-1102. cited in El-Adawy, T. A. 2000. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry* 70: 83-91.

El-Adawy, T. A. 2000. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry* 70: 83-91.

Evans, R. J., and Bandemer, S. L. 1967. Nutritive value of legume seed proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 15: 439-443. cited in Poehlman, J. M. 1991. The Mungbean. Colorado: Westview Press.

Franzen, K. L. and Kinsella, J. E. 1976. Functional Properties of Succinylated and Acetylated Soy Protein. *J. Agric. Food Chem.* 24: 788-795.

Hall, G. M. 1996. Basic concepts. In G. M. Hall (Ed.), Methods of Testing Protein Functionality, pp.1-10. London: Blackie Academic & Professional.

Halling, P. J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 13: 155-203. cited in Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 11-60. London: Blackie Academic & Professional.

Hill, S. E. 1996. Emulsions. In G. M. Hall (Ed.), Methods of Testing Protein Functionality, pp. 153-185. London: Blackie Academic & Professional.

Howell, N. K. 1996. Chemical and Emzymatic Modification. In S. Nakai and H. W. Modler (Eds.), Food Protein: Properties and Characterization, pp. 235-280. New York: VCH Publishers.

Jones, S. A. 1996a. Issues in Fat Replacement. In S. Roller and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 3-26. Boca Raton: CRC Press.

Jones, S. A. 1996b. Physical, Chemical, and Sensory Aspects of Fat Replacement. In S. Roller and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 59-86. Boca Raton: CRC Press.

Kilara, A., and Harwalkar, V. R. 1996. Denaturation. In S. Nakai and H. W. Modler (Eds.), Food Protein: Properties and Characterization, pp. 71-165. New York: VCH Publishers.

Ko, W. C., Chen, W. J., and Lai, T. H. 1994. Recovery and functional-properties of protein from the waste-water of mungbean starch processing by ultrafiltration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 41(9): 633-638.

Kohnhorst, A. L., Smith, D. M., Uebersax, M. A. and Bennink, M. R. 1991. Production and Characterization of a Protein Concentrate from Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* 41: 33-42.

Leman, J., and Kinsella, J. E. 1989. Surfacr activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28(2): 115-138.

Liu, H. J., Chang, B. Y., Yan, H. W., Yu, F. H., and Liu, X. X. 1995. Determination of amino acid in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-*n*-hydroxysuccinimidyl carbamate and reverse-phase liquid chromatographic separation. *J. of AOAC international* 78(3): 736-744.

Lucca, P. A., and Tepper, B. J. 1994. Fat replacer and the functionality of fat in food. *Trends in Food Science & Technology* 5: 12-19.

McCarthy, A. J. and Maegli, J. W. 1994. Protein fat replacer and method of manufacture thereof. US Patent 5,350,590.

Meyer, E. W., and Williams, L. D. 1977. Chemical Modification of Soy Proteins. In R. E. Feeney and J. R. Whitaker (Eds.), Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification, pp. 52-66. Washington, D.C. American Chemical Society

Murphy, M. C., and Howell, N. K. 1991. Effect of succinylation on the functional and physicochemical properties of bovine serum albumin. *J. Sci. Food Agric*. 51: 109-123. cited in Howell, N. K. 1996. Chemical and Emzymatic Modification. In S. Nakai and H. W. Modler (Eds.), Food Protein: Properties and Characterization, pp. 235-280. New York: VCH Publishers.

Nakai, S. Li-Chan, E., and Artega G. E. 1996. Measurement of surface hydrophobicity. In G. M. Hall (Ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 226-259. London: Blackie Academic & Professional.

Narang, A. S., Bains, G. S., and Bhatia, I. S. 1981. Physical and Hydrodynamic studies on Salt-Soluble Protein of Mungbean. *Cereal Chem.* 58(2): 92-96.

Narayana, K., and Narasinga Rao, M. S. 1984. Effect of Acetylation and Succinylation on the Functional Properties of Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Flour. *Journal of Food Science* 49: 547-550.

Paik, W. K., and Kim, S. 1972. Effect of Methylation on Susceptibility of Protein to Proteolytic Enzymes. *Biochemistry* 11(14): 2589-2593.

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

Poehlman, J. M. 1991. The Mungbean. Colorado: Westview Press.

Puppo, M. C. and Anon, M. C. 1999. Soybean Protein Dispersion at Acid pH. Thermal and Rheological Properties. *Journal of Food Science* 64(1): 50-56.

Rahma, E. H., Dudek, S., Mothes, R., Gornitz, E., and Schwenke, K. D. 2000. Physicochemical characterisation of mung bean (Phaseolus aureus) protein isolates. *J. Sci. Food Agric.* 80: 477-483.

Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. 1981. Functional Properties of the Great Northern Bean (Phaseolus vulgaris L.) Protein: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. *Journal of Food Science* 46: 71-74, 81.

Singer, N. S. 1990. Simplesse®: All natural fat substitute and the dairy industry. ADPI/CDR Proc. Of the Dairy Products Technical Conference, Chicago. April 25-26. cited in Singer, N. S. 1996. Microparticulated Proteins as Fat Mimetics. In S. Roller, and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 175-189. Boca Raton: CRC Press.

Singer, N. S. 1992. Simplesse®. Advanced Food Ingredients Symposium, Rutgers University, New Brunswick. March. cited in Singer, N. S. 1996. Microparticulated Proteins as Fat Mimetics. In S. Roller, and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 175-189. Boca Raton: CRC Press.

Singer, N. S. 1996. Microparticulated Proteins as Fat Mimetics. In S. Roller, and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 175-189. Boca Raton: CRC Press.

Singer, N. S., and Dunn, J. M. 1990. Protein microparticulation: The principle and the process. *J. Am. Coll. Nutr.* 9: 388.

Singer, N. S., Yamamoto, S., and Latella, J. 1988. Protein product base. US Patent 4,734,287.

Tang, P. S., Chang, H. H., Dunn, J. M., and Singer, N. S. 1989. A gel electrophoretic study of microparticulated protein (Simplesse®). *FASEB*, March. cited in Singer, N. S. 1996. Microparticulated Proteins as Fat Mimetics. In S. Roller, and S. A. Jones (Eds.), Handbook of Fat Replacer, pp. 175-189. Boca Raton: CRC Press.

Thomson, L. U. 1977. Preparation and Evaluation of Mung Bean Protein Isolates. *Journal of Food Science* 42: 202-206.

Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), Method of Testing Protein Functionality, pp. 11-60. London: Blackie Academic & Professional.

Were, L., Hettiarachchy, N. S., and Kalapathy, U. Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties. *Journal of Food Science* 62(4): 821-823, 850.

Yamamoto, N., Yamamoto, Y., Nunome, T., Muroyama, K., and Kusaka, H. 1998. Process for producing proteinaceous microparticles. US Patent 5,750,183.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธี AccQ. Tag™ **Method** (Liu *et al.*, 1995)

เครื่อง HPLC (Waters, Milford, MA, USA) ประกอบด้วย

Pump:	600E
Detector:	Fluorescence (λex = 250 nm และ λem = 395nm)
Column:	AccQ. Tag™ Column, 3.9 mm x 150 mm
Mobile phase (gradient system):	AccQ. Tag™ Eluent A, Acetonitrile และ HPLC grade water.
Inject Volume:	5 μL
Run Time:	45 นาที

<u>วิธีการเตรียมตัวอย่าง</u>

- นำตัวอย่างและน้ำเกลือ 5 mL ใส่หลอดทดลอง
- เติม 6 N HCl ปริมาตร 20 mL
- ย่อยที่อุณหภูมิ 110 ^{o}C นาน 5 ชั่วโมง
- ปรับ pH ให้ได้ 7 ด้วย NaOH เข้มข้น
- ปรับปริมาตรเป็น 100 mL
- กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
- นำตัวอย่างที่ผ่านกระดาษกรองมา 1 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ 10 mL
- กรองผ่าน membrane ขนาด 0.45 ไมครอน
- นำสารละลายที่กรองผ่าน membrane มา 20 μL มาทำอนุพันธ์กับ AccQ. Flour™ และปรับปริมาตรให้ได้ 100 μL
- Inject 5 μL โดย HPLC

ภาคผนวก ข

การหา oil volume fraction สามารถหาได้จากวิธีของ Pearce and Kinsella (1978) โดยการนำอิมัลชั่นมา 5 กรัม หาน้ำหนักแห้งโดยการอบให้คงที่ที่อุณหภูมิ 105 °C จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการ ข1

$$\varnothing = \frac{W_d - (E \times W_1)}{W_d + W_1 [\{((1 + E) \times D_o) / D_m\} - E]} \qquad (ข1)$$

เมื่อ $\varnothing$ = Oil volume fraction

D_o = Density of oil

D_m = Density of protein solution

E = Concentration of solute; mass per unit mass solvent

W_1 = (loss of weight of emulsion on heating / weight of emulsion)

W_d = (dried weight / weight of emulsion)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียม ninhydrin solution (Paik and Kim, 1972) เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณหมู่ ε-NH_2 ของ lysine ในโปรตีน

I. เตรียม 0.2 M citrate buffer (pH 5.0) โดยใช้ citric acid monohydrate (Merck, Damstadt, Germany) และ tri-sodium citrate dihydrate (Merck, Damstadt, Germany)

II. เตรียม ninhydrin (Prolabo, Paris, France) ใน ethylene glycol monoethyl ether (ethyl Cellosolve) (Merck, Hohenbrunn, Germany) ที่ความเข้มข้น 4% (w/v)

III. นำสารละลายในข้อ I. และข้อ II. มาผสมกันโดยใช้ปริมาตรสารละลายทั้งสองเท่ากับ 30 มิลลิลิตร ทั้งคู่

IV. นำสารละลายที่ได้จากข้อ III. มาเติมสารแขวนลอย $SnCl_2$ (M&B, May & Baker Ltd., Dagenham, England) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยที่ในสารแขวนลอยนี้มี $SnCl_2$ ปริมาณ 50 มิลลิกรัม

สารที่ได้ในข้อ IV. เป็นสารละลาย ninhydrin ที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปฏิญญา ศิริกุลชยานนท์ เกิดวันที่ 2 กันยายน พ.ศ. 2520 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541

ผลงานทางวิชาการ

ปฏิญญา ศิริกุลชยานนท์, ศิริพัสตร์ ไชยันต์ และ พาสวดี ประทีปะเสน. 2545. การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชั่นชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว. การเสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 10 ประจำปี 2545 “ก้าวที่ 85”, 20-22 มีนาคม. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย