สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ *Vigna angularis*

นายทัพพสาร ใจแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ANTIOXIDATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF ADZUKI BEAN *Vigna angularis*

PROTEIN HYDROLYSATE

Mr.Thappasarn Jaikaew

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ *Vigna angularis*
โดย	นายทัพพสาร ใจแก้ว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัษฐ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัษฐ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ละมุล วิเศษ)

ทัพพสาร ใจแก้ว: สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ *Vigna angularis*. (ANTIOXIDATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF ADZUKI BEAN *Vigna angularis* PROTEIN HYDROLYSATE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นินนาท ชินประหัษฐ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล 96 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิโดยใช้เอนไซม์ชนิดจำเพาะและเพื่อศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยขั้นตอนแรกเริ่มจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ พบว่า ประกอบด้วยโปรตีน 28.53 %, ไขมัน 2.19 %, เถ้า 4.76 %, เส้นใยอาหาร 4.01 % และคาร์โบไฮเดรต 60.51 % (โดยน้ำหนักแห้ง) ขั้นตอนต่อมานำถั่วอะซูกิไปย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 500 MG โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 4 ระดับ (1, 3, 5 และ 7 % w/w) และเวลาในการย่อยเป็น 4 ระดับเช่นกัน (1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ (ของเหลว) ไปวัดระดับการย่อย (degree of hydrolysis: DH) ด้วยวิธี ortho-phthaldialdehyde (OPA) รวมทั้งสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity, วิธี metal ions chelating activity, วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า ทั้งความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าว ดังนั้นจึงเลือกภาวะของการย่อยมา 2 ภาวะ คือ ภาวะที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 1 % ย่อย 1 ชั่วโมง (DH=31.46 %) และภาวะที่ย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 7 % ย่อย 4 ชั่วโมง (DH=47.94 %) เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ขนาดของโมเลกุลเพปไทด์ และศึกษากระบวนการทำแห้งวิธีแบบพ่นกระจาย รวมทั้งวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตก่อนและหลังการทำแห้งและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ได้ พบว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วยภาวะแรกมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่น้อยกว่า และมีขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ที่ใหญ่กว่า และกระบวนการทำแห้งยังมีผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต สำหรับสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ พบว่า ตัวอย่างผงที่ได้จากระดับการย่อยสูงมีความสามารถในการละลายและค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟที่ดีกว่า แต่ค่าความสามารถในการเกิดโฟม เสถียรภาพของโฟมและของอิมัลชันน้อยกว่าตัวอย่างที่มีระดับการย่อยต่ำ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่มีระดับการย่อยที่เหมาะสม จึงไม่เพียงมีแต่สมบัติการต้านออกซิเดชันที่ดีเท่านั้น แต่ยังมีสมบัติเชิงหน้าที่สำหรับการประยุกต์ใช้อย่างจำเพาะในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ได้ด้วย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5272679623: MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: ADZUKI BEAN, PROTEIN HYDROLYSATE, ANTIOXIDATION, FUNCTIONAL PROPERTIES

THAPPASARN JAIKAEW: ANTIOXIDATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF ADZUKI BEAN *Vigna angularis* PROTEIN HYDROLYSATE. ADVISOR: ASSOC. PROF. NINNART CHINPRAHAST, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. CHALEEDA BOROMPICHAICHARTKUL, Ph.D., 96 pp.

This research aimed to study the production of protein hydrolysate from adzuki bean with specific an enzyme and investigate antioxidant activities and functional properties of the prepared samples. The bean raw material was composed of 28.53 % protein, 2.19 % lipid, 4.76 % ash, 4.01 % crude fiber and 60.51 % (dry basis) carbohydrate, respectively. Flavourzyme® 500 MG at 4 levels of 1, 3, 5 and 7 % w/w and hydrolysis time also at 4 levels of 1, 2, 3 and 4 h were used in preparation of the liquid hydrolysates which were sequentially analyzed for degree of hydrolysis (DH) by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) method and their antioxidant activities including 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity, metal ions chelating activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total phenolic content (by Folin-Ciocalteu) method. It was evident that both enzyme concentration and hydrolysis time influenced the aforementioned properties. Therefore, two conditions yielding the relatively lowest DH (1 % enzyme and 1 h hydrolysis, with DH of 31.46 %) and the highest DH (7 % enzyme and 4 h hydrolysis, with DH of 47.94 %) were chosen for identifying type and amount of amino acids and molecular weights of peptides in the samples and also for studying the spray-drying process of the liquid hydrolysates. In addition, antioxidant activities of the hydrolysates before drying (as liquid) and after drying (as powder) and functionalities of the dried hydrolysate samples were also analysed. It was shown that the sample prepared with the former conditions had lower amount of total free amino acids and possessed the higher molecular weight peptides in comparison with the latter sample. Furthermore, spray drying also affected antioxidant activities of the hydrolysate. For functionalities, the sample with higher DH had higher solubility and emulsifying activity index but its foam capacity, foam and emulsion stability were lower when compared with those of the lower DH. Conclusively, adzuki bean hydrolysates with optimum DH's not only possess good antioxidant activities but also maintain functional properties suitable for specific applications in various food products.

Department: Food Technology Student's Signature ....

Field of Study: Food Technology Advisor's Signature ....

Academic Year: 2013 Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้ เนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่า เพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ และความเอาใจใส่ดูแลในทุก ๆ ด้านอย่างใกล้ชิดมาโดยตลอดระยะเวลาในการวิจัย รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ละมุล วิเศษ เป็นอย่างสูงที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนชี้แนะแนวทาง ให้คำแนะนำในการปรับปรุงและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้การสนับสนุนด้านต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยนี้ ได้แก่ บริษัท Brenntag Ingredients (Thailand) Public Co., Ltd. สำหรับความอนุเคราะห์เอนไซม์ Flavourzyme® 500 MG ที่ใช้ในการวิจัย อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช สำหรับความอนุเคราะห์สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry method และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีอนุภาค คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจาย ในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสต รวมทั้งนักวิจัยทุกท่าน วารสารวิชาการทุกฉบับ และหนังสือทุกเล่ม สำหรับความรู้ที่ได้รับสำหรับใช้ในการอ้างอิงในวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ และรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อน ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจ และความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ได้ให้กำลังใจ และอบรมสั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน พร้อมทั้งช่วยสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ จ
กิตติกรรมประกาศ ฉ
สารบัญ ช
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญรูป ฎ
บทที่
1 บทนำ 1
2 วารสารปริทัศน์ 3
2.1 ถั่วอะซูกิ 3
2.2 สารประกอบฟีนอลิค 6
2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต 6
2.4 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย 11
2.5 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต 13
2.6 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต 15
2.7 ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ 16
2.8 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเสต 20
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 21
3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ 27
3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 27
3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 28
3.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 28
3.5 การทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 29
3.6 ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต 30

บทที่ หน้า

3.7 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง 30

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 33

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ 33

4.2 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 34

4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 38

4.4 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 47

4.5 ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ 49

4.6 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตก่อนและหลังทำแห้ง 52

4.7 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง 53

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 59

5.1 สรุปผลการทดลอง 59

5.2 ข้อเสนอแนะ 60

รายการอ้างอิง 61

ภาคผนวก 72

ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางเคมี 73

ภาคผนวก ข ตารางผลการทดลอง 91

ภาคผนวก ค ตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติ 93

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 96

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ 34
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (mg GAE/g) ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 46
4.3 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเสต 48
4.4 Antioxidant activity ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสต 52
ก 1 รายละเอียดของระบบ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ 86
ก 2 ปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 89
ข 1 ค่าระดับการย่อย (DH, %) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 91
ข 2 ค่า Radical Scavenging activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 91
ข 3 ค่า Chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 92
ข 4 ค่า FRAP (µmol TE/g) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 92
ค 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 93
ค 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 94
ค 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี metal ions chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 94

ตารางที่ หน้า

ค 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 95

ค 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 95

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะของเมล็ดถั่วอะซูกิ 4

2.2 ลักษณะของต้นถั่วอะซูกิ 5

2.3 ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารประกอบ Ferric-TPTZ 14

2.4 โครงสร้างของ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$) 14

3.1 เครื่อง BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 29

4.1 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 35

4.2 Radical Scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 39

4.3 Chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 41

4.4 FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 43

4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย 45

4.6 โครมาโตแกรมแสดงขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 1 % นาน 1 ชั่วโมง 50

4.7 โครมาโตแกรมแสดงขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 7 % นาน 4 ชั่วโมง 51

4.8 ค่าความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ 54

4.9 ค่า foam capacity (FC) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ 55

4.10 ค่า foam stability (FS) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ 55

4.11 ค่า emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ 57

รูปที่ หน้า

4.12 ค่า emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ 58
ก 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox 83
ก 2 กราฟมาตรฐานของ gallic acid 85
ก 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA 90

บทที่ 1

บทนำ

ถั่วอะซูกิเป็นพืชที่ใช้เมล็ดในการบริโภค ซึ่งช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในโลหิต ช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ บำรุงระบบประสาท บำรุงกระดูกและฟันให้แข็งแรง เมล็ดประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน นอกจากนี้ยังมีวิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด รวมทั้งยังมีสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds) และสารดังกล่าวนี้โดยทั่วไปยังมีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่ออาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบโดยการใช้กรด ด่าง และ/หรือเอนไซม์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนดั้งเดิมที่มีอยู่ตามธรรมชาติขึ้นได้ กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์มีข้อดีคือ สภาวะที่ใช้ในการย่อยไม่รุนแรง จึงไม่ทำให้เกิดสมบัติที่ไม่พึงประสงค์กับผลิตภัณฑ์ และน่าจะรักษาสมบัติด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะสมบัติเชิงหน้าที่ที่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างเหมาะสม อีกทั้งพอลิเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ เช่น aspartic acid, histidine, leucine, cysteine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine และ glycine ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโปรตีนไฮโดรไลเสต ยังมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ด้วยเช่นกัน

ในปัจจุบันเริ่มมีการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วอะซูกิได้ในพื้นที่ภูเขาทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตพื้นที่รับผิดชอบของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าพื้นที่เพาะปลูกและปริมาณการผลิตจะเพิ่มขึ้นในอนาคต ดังนั้นหากนำเมล็ดถั่วอะซูกิมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยตามขอบเขตที่กล่าวมาแล้วนั้น ย่อมทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นจากการนำเนื้อเยื่ออาหารชนิดใหม่ ๆ ที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างดี

จากสาเหตุดังกล่าวทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ และสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

สมมติฐานของงานวิจัย

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายถั่วอะซูกิด้วยเอนไซม์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ เพปไทด์สายสั้น ๆ และสารประกอบฟีนอลิค ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งทำให้เกิดสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่อาจเปลี่ยนแปลงไป หลังกระบวนการผลิตและการทำแห้ง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิโดยใช้เอนไซม์ชนิดจำเพาะ
2. เพื่อศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ถั่วอะซูกิ

ถั่วอะซูกิเป็นพืชตระกูลถั่ว ที่ใช้เมล็ดบริโภคเป็นอาหาร แหล่งผลิตถั่วอะซูกิที่สำคัญอยู่ในแถบประเทศเอเชียตะวันออก ได้แก่ ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และจีน มีลักษณะคล้ายกับถั่วเขียว ส่วนมากเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) จะมีสีแดง หรือสีม่วงแดง (maroon) (รูปที่ 2.1) เมล็ดถั่วมีรสหวาน และมีกลิ่นรสของถั่ว (nutty flavor) (Yousif และคณะ, 2002) ถั่วอะซูกิถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นอาหาร เช่น ทำเป็นขนม ซุป หุงรวมกับข้าว แต่ที่นิยมกันมาก คือ ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งถั่วใช้สำหรับการผลิตขนมขบเคี้ยว หรือถั่วกวนใช้สำหรับทำเป็นไส้ขนม ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง ปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์ และปลูกเป็นปุ๋ยพืชสด เป็นต้น การนำถั่วอะซูกิใช้ประกอบอาหารนั้นถือได้ว่าเป็นเป้าหมายหลักของการผลิตถั่วอะซูกิ (Lumpkin และ McClary, 1994)

การปลูกถั่วอะซูกิในประเทศไทยได้เริ่มครั้งแรกในปี พ.ศ. 2517 โดยมีการทดลองปลูกถั่วอะซูกิพบว่าสามารถขึ้นและปรับตัวได้ดี (Tiyawalee, 1978) หลังจากนั้นมูลนิธิโครงการหลวงได้ทดสอบผลผลิตถั่วอะซูกิที่สถานีเกษตรหลวงปางดะในปี พ.ศ. 2534 พบว่าให้ผลผลิตสูงถึง 400 กิโลกรัมต่อไร่ ต่อมาในปี พ.ศ. 2539 โครงการวิจัยและพัฒนาถั่วที่สูงร่วมมือกับ บริษัท อูเอโน ไฟน์ เคมีคัลส์ อินดัสตรี (ประเทศไทย) จำกัด ได้ทดลองปลูกถั่วอะซูกิพันธุ์ Erimo ที่สถานีเกษตรหลวงปางดะ พบว่าปรับตัวได้ดี แต่เมล็ดที่ผลิตได้มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน อย่างไรก็ตามทางมูลนิธิโครงการหลวงยังเห็นความสำคัญของการปลูกถั่วชนิดนี้ ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 จึงได้มีการทดสอบปลูกถั่วอะซูกิในแปลงพื้นที่ปลูก 2 แห่ง ได้แก่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนแปะ พบว่าถั่วอะซูกิพันธุ์ Erimo สามารถขึ้นและปรับตัวได้ดีทั้ง 2 แห่ง หลังจากนั้นมูลนิธิโครงการหลวงจึงได้ขยายพื้นที่ในการส่งเสริมการปลูกถั่วอะซูกิให้เพิ่มมากขึ้น (สุทัศน์ จุลศรีไกวัล และคณะ, 2547; สุมินทร์ สมุทคุปติ์ และคณะ, 2542)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของเมล็ดถั่วอะซูกิ

2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถั่วอะซูกิเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Fabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vigna angularis* ชื่อสามัญ adzuki, atsuki bean, small red bean และ small bean ใบมีลักษณะการจัดเรียงตัวแบบตรงกันข้าม ใบจริงประกอบด้วย 3 ใบย่อย เรียกว่า trifoliate leaves เรียงตัวแบบ alternate มีข้อบนลำต้นหลัก (main stem) ประมาณ 10-15 ข้อ ลำต้นมีลักษณะแตกกิ่งเป็นพุ่มเตี้ย มีความสูงประมาณ 30-70 เซนติเมตร (รูปที่ 2.2) ดอกมีสีเหลือง ลักษณะของดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ฝักมีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย คอดและหดรัดระหว่างเมล็ด ฝักมีสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 5-13 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ภายในฝักมีเมล็ดประมาณ 2-14 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดมีลักษณะกลมรีรูปไข่ มีส่วนของขั้วเมล็ด (hilum) เมล็ดยาวประมาณ 5.0-9.1 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 4.0-6.3 มิลลิเมตร มีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นผิวเรียบมันสีแดงจนถึงแดงเข้ม (Lumpkin และ McClary, 1994)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของต้นถั่วอะซูกิ
ที่มา: Lumpkin และ McClary (1994)

2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการและองค์ประกอบทางเคมี

Lumpkin และ McClary (1994) ได้รายงานคุณค่าทางโภชนาการของถั่วอะซูกิเมล็ดแห้ง 100 กรัม จะให้พลังงาน 339 กิโลแคลอรี (1,418 กิโลจูล), โปรตีน 20.3 กรัม, ไขมันทั้งหมด 2.2 กรัม (แบ่งเป็น monounsaturated fatty acids 0.07 กรัม, polyunsaturated fatty acids 0.55 กรัม, และ saturated fatty acids 0.27 กรัม), คาร์โบไฮเดรต 54.4 กรัม, เส้นใย 4.3 กรัม, เถ้า 3.3 กรัม และน้ำ 15.5 กรัม

ถั่วอะซูกิยังประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ lysine, methionine, cysteine, phenylalanine, tyrosine และ tryptophan เป็นต้น กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของถั่วอะซูกิ ได้แก่ palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) และ linolenic acid (C18:3) (Yoshida และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีวิตามิน เอ บี 1 บี 2 บี 6 บี 12 ซี ดี อี และเค ส่วนแร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และสังกะสี

จากการศึกษาวิจัยของ Amarowicz และคณะ (2008) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากถั่วอะซูกิ พบว่าในสารสกัดจากถั่วอะซูกิมีสารประกอบฟีนอลิค เช่น catechin glucosides, epicatechin glucosides, quercetin glucoside, procyanidin dimers, myricetin rhamnoside และ protocatechuic acid โดยที่สารประกอบเหล่านี้มีสมบัติต้านออกซิเดชันได้

2.2 สารประกอบฟีนอลิค

สารประกอบฟีนอลิคจัดเป็นสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่พบมากในเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบนี้ประกอบด้วยวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ ถือเป็น secondary metabolite ของพืช สารประกอบฟีนอลิคเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิต ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสมบัติการต้านออกซิเดชัน หรือการกำจัดอนุมูลอิสระ สำหรับกลไกการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิค ได้แก่ การเป็นสารคีเลต (chelating agent) การหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) และใช้ในการ regenerate สำหรับวิตามินอี ทั้งนี้สารประกอบฟีนอลิคสามารถสลายหรือสูญเสียไปได้ด้วยความร้อนและปฏิกิริยาทางเคมีต่าง ๆ ได้เช่นกัน (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่ออาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยใช้กรด ด่าง และ/หรือเอนไซม์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือสายเพปไทด์สายสั้น ๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนดั้งเดิมที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Kristinsson และ Rasco, 2000)

2.3.1 การย่อยโปรตีนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต อาจทำได้ด้วยวิธีการหลัก 3 วิธี ดังนี้

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างต่ำ สามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี แต่จะทำให้ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย นอกจากนี้การย่อยโปรตีนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูง ในภาวะอุณหภูมิสูงทำให้เกิดสาร 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนกลุ่ม chloropropanol โดยจะมีพิษต่อตับ ไต ต่อมไทรอยด์ เยื่อบุช่องปากและลิ้น และยังก่อให้เกิดสาร 1, 3-dichloro-2-propanol (1, 3-DCP) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Baer, Calle และ Taylor, 2010) และในการย่อยโปรตีนด้วยกรดจะควบคุมระดับการย่อยได้ยาก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และยังมีกลิ่นของสารละลายกรดตกค้างในผลิตภัณฑ์ สารละลายกรดที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีนในเนื้อเยื่ออาหาร ได้แก่ HCl และ H_2SO_4 เป็นต้น (Kristinsson และ Rasco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายด่าง

ในการย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายด่าง ถ้าหากมีการย่อยในสภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา racemization ของกรดอะมิโน โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก L-form ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปฏิกิริยา β-elimination ของ serine และ cysteine โดยทำให้เกิดสารประกอบ dehydroalanine ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอื่น ๆ เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด เช่น lysinoalanine, ornithioalanine และ lathionine เป็นต้น จึงทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และสารประกอบที่เกิดขึ้นดังกล่าวบางชนิดก่อให้เกิดความเป็นพิษในอาหารอีกด้วย สารละลายด่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ NaOH, KOH และ $Ba(OH)_2$ เป็นต้น (Kristinsson และ Rasco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

การย่อยโปรตีนด้วยวิธีนี้สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease) ตัดพันธะเพปไทด์ของโมเลกุลโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ การย่อยด้วยวิธีนี้จะมีข้อดีคือ เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) สูง และสภาวะที่ใช้ในการย่อยไม่รุนแรง ดังนั้นโครงสร้างของกรดอะมิโนจะไม่ถูกทำลาย การย่อยด้วยเอนไซม์จะมีระดับการย่อยค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ใช้สารเคมีในการย่อย แต่การย่อยด้วยเอนไซม์นี้อาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ในโมเลกุลโปรตีน แต่ถ้าหากมีการควบคุมระดับการย่อย ก็สามารถทำให้สารประกอบที่ให้รสขมเกิดได้น้อยลง เอนไซม์ (ชื่อทางการค้า) ที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ Flavourzyme®, Alcalase® และ Neutrase® เป็นต้น (Kristinsson และ Rasco, 2000)

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจะใช้เอนไซม์โปรติเอส (proteases) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีนให้ได้เป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งสามารถจัดแบ่งกลุ่มของโปรติเอสเป็นประเภทต่าง ๆ ได้หลายแบบ ดังนี้

ก) แบ่งตามการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

เอนโดเพปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในโมเลกุลของโปรตีนได้เพปไทด์สายสั้น ๆ เอนไซม์กลุ่มนี้ที่ได้จากพืชหรือจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อ substrate ที่เป็นโปรตีนและเพปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้เกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว (Adler-Nissen, 1986a)

เอกโซเพปติเดส (Exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ด้านปลายของโมเลกุล ถ้าเป็นการสลายพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโนอิสระ เรียกว่า อะมิโนเพปติเดส ในขณะที่การสลายพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า คาร์บอกซิเพปติเดส (Adler-Nissen, 1986a)

ข) แบ่งตามกลไกการทำงานได้ 4 กลุ่ม ได้แก่

โปรติเอสเซรีน (Serine proteases) เป็น alkali protease มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานในช่วง pH 7-11 มีหมู่ imidazole และอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดย diisopropyl-phospho-fluoridate (DPF) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ trypsin, elastase และ thrombin เป็นต้น

โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfhydryl proteases) เป็น neutral protease มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ pH 6-7.5 มีอนุมูลซัลไฟดริลอยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูง เช่น papain จากมะละกอ, bromelain จากสับปะรด และ ficin จากมะเดื่อ และจุลินทรีย์บางชนิด

โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing proteases) เป็นโปรติเอสที่มีอิออนและโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์ หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย มีปฏิกิริยาการทำงานที่ดีในช่วงของ pH เป็นกลาง (pH 6.6-7.5) ซึ่งจัดเป็น neutral protease ถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ (metal chelating agents) เช่น EDTA และ 1, 10-phenanthroline ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ carboxypeptidase A, cytosol aminopeptidase, prolidase และ carnosinase เป็นต้น

โปรติเอสกรด (Acid proteases) เป็นโปรติเอสที่มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วง pH 2-4 และไม่แสดงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่งอย่างชัดเจน แต่จะพบว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุมูลกรดแอสปาร์ติกอยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ rennin และ pepsin เป็นต้น (Belitz, Grosch และ Schieberle, 2009)

นอกจากนี้แล้วในอุตสาหกรรมยังมีการใช้เอนไซม์ทางการค้าชนิดต่าง ๆ ในการย่อยสลายโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่

Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง endopeptidase และ exopeptidase ซึ่งจะใช้เวลาในการย่อยสลายที่น้อย ทำให้

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 °C และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 5.0-7.0

Alcalase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformis* ทำหน้าที่เป็น endopeptidase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 °C และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 8.0-8.5

Neutrase®เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformis* หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* ทำหน้าที่เป็น endopeptidase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55 °C และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 5.5-7.0 (Kristinsson และ Rasco, 2000)

2.3.2 การทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตแบบพ่นกระจาย

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อโปรตีนผ่านการย่อยด้วยกรด ด่าง และ/หรือ เอนไซม์ตามภาวะที่เหมาะสม จนได้ระดับการย่อยโปรตีนตามที่ต้องการแล้ว มักจะนำผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้มาทำแห้งด้วยวิธีต่างๆ เช่น การทำแห้งแบบพ่นกระจาย (spray drying) หรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) โดยอาศัยการถ่ายโอนมวลของน้ำออกจากมวลของอาหาร จึงทำให้ปริมาณน้ำอิสระลดลง ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และชะลอการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ โดยเฉพาะทางเคมีได้ ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษา และสะดวกต่อการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือรอการวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงต่อไป

การทำแห้งแบบพ่นกระจายเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการทำแห้งผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผง โดยมวลของผลิตภัณฑ์เหลวจะเคลื่อนที่ผ่านหัวฉีด (atomizer) กลายเป็นหยดละอองเล็ก ๆ ตกลงภายในส่วน drying chamber ของเครื่องทำแห้ง และเกิดการระเหยน้ำออกไปอย่างรวดเร็ว เมื่อถูกพัดผ่านด้วยลมร้อนอุณหภูมิสูง ผงผลิตภัณฑ์ที่ได้จะตกลงสู่ด้านล่างของ drying chamber และเคลื่อนที่เข้าสู่ cyclone ที่ใช้เก็บผงผลิตภัณฑ์ (Masters, 1979)

การทำแห้งแบบพ่นกระจายมีข้อดีคือ เป็นการทำแห้งในระบบปิดจึงมีการปนเปื้อนน้อย มีประสิทธิภาพสูง อัตราการถ่ายโอนหรือแลกเปลี่ยนความร้อนสูง และใช้เวลารวดเร็วในการ

ทำแห้ง อย่างไรก็ตามกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายก็มีข้อเสียคือ หากมวลอาหารมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส กาแลคโทส และซูโครส เป็นต้น เมื่อถูกความร้อนโมเลกุลจะเกิดการพองตัวและเก็บกักน้ำไว้ภายในโมเลกุล ทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนความร้อนลดลง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะ เหนียว และเกาะกันเป็นก้อน (Bhandari, Datta และ Howes, 1997) การเติมสารช่วยทำแห้งจำพวก มอลโทเด็กซ์ทริน จะมีส่วนช่วยในการลดค่า stickiness ของผลิตภัณฑ์ได้ และการใช้ลมร้อนอุณหภูมิสูงเพื่อทำแห้งโดยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการสูญเสียกลิ่นรสและสมบัติในการไหลของผลิตภัณฑ์ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะยังคงมีสารประกอบให้กลิ่นหลงเหลืออยู่ มีผลึกที่สมบูรณ์ และสามารถคืนสภาพหลังการ rehydration ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการทำแห้งโดยวิธีอื่นๆ (Kumar และ Mishira, 2004)

มอลโทเด็กซ์ทริน คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยกรด หรือ เอนไซม์ ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย โมเลกุลของมอลโทเด็กซ์ทรินประกอบด้วยน้ำตาล D-glucose ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1, 4 glycosidic และมีค่า dextrose equivalent (DE) ไม่เกิน 20 (ค่า dextrose equivalent คือ ค่าที่แสดงปริมาณแป้งที่ถูกไฮโดรไลซ์ หรือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์) สมบัติเชิงหน้าที่ของมอลโทเด็กซ์ทรินจะแตกต่างกันไปตามค่า DE สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของมอลโทเด็กซ์ทริน ได้แก่ สมบัติการเป็น bulking agent ความสามารถในการละลายและกระจายตัว ความสามารถในการเกิดเจลและฟิล์ม ความสามารถในการจับกับไขมัน และความสามารถในการดูดซับความชื้น เป็นต้น (Moore, Amante และ Soldi, 2005)

2.4 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย

ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis, DH) เป็นดัชนีซึ่งใช้อธิบายระดับการย่อยโปรตีนโดยเฉพาะที่นิยมทำด้วยเอนไซม์ การติดตามค่าระดับการย่อยสลาย สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความสะดวก มีความเหมาะสม และขอบเขตของความเที่ยงตรงที่ต้องการ การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยสามารถทำได้ 3 วิธี คือ

ก) การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหลืออยู่หลังจากการตกตะกอนโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย trichloroacetic acid (TCA) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี

ได้แก่ วิธีของ Kjeldahl การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของเพปไทด์ที่มีหมู่ aromatic และการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร หลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยา Biuret

ข) การวิเคราะห์ free α-amino groups สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

- OPA โดยมีหลักการของการทำปฏิกิริยากับ primary amino group ด้วยสารละลาย OPA (ortho-phthaldialdehyde) เกิดเป็นสารมีสีที่วัดค่าได้ด้วยวิธี fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูง

- TNBS มีหลักการคือ การทำปฏิกิริยากับ primary amino group ด้วยสารละลาย TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

- Ninhydrin มีหลักการคือ การทำปฏิกิริยากับ amino group ด้วยสารละลาย ninhydrin เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงินเข้ม ที่วัดค่าได้ด้วยวิธี spectrophotometry

- Formal titration มีหลักการคือ การไทเทรต amino group ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ด้วยสารละลายเบส โดยใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์

ค) การไตเตรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ เรียกว่า เทคนิค pH-stat มีหลักการ คือ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย ซึ่งจะทำให้หมู่ amino หลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งจะทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายด่างเช่น NaOH หรือ $Ca(OH)_2$ อย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการ

จากวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยดังกล่าวข้างต้น จะรายงานค่าดังกล่าวออกมาเป็น % DH ทุกวิธี (Rutherfurd, 2010)

2.5 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต คือ สมบัติที่โปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถทำหน้าที่จับหรือกำจัด (scavenge) อนุมูลอิสระที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยตรง หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการออกซิเดชันไม่ให้ดำเนินต่อไป (Pokorny, Yanishlieva, และ Gordon, 2001) ดังนั้นการเติมสารต้านออกซิเดชันในอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูงจึงเป็นที่นิยม เพราะช่วยยืดอายุการเก็บและเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการโดยสารต้านออกซิเดชันที่ใช้ทั้งที่เป็นสารธรรมชาติ (natural antioxidant) และสารสังเคราะห์ (synthethic antioxidant) จะช่วยชะลอหรือจนถึงยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Tsuda และคณะ, 1994)

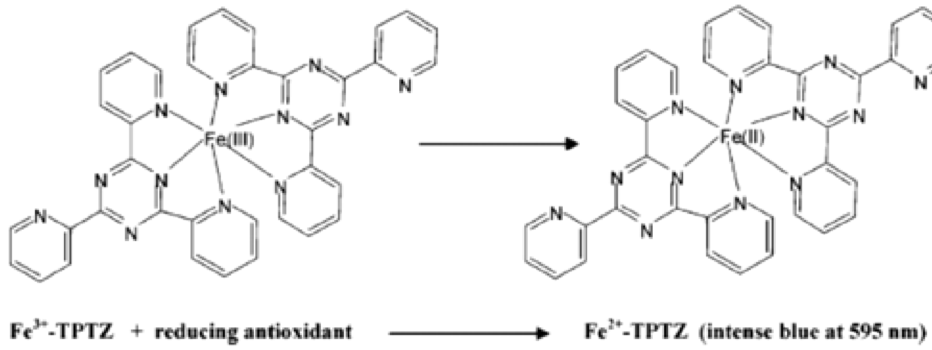
ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยต่าง ๆ ที่ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากวัตถุดิบธรรมชาติ เพื่อจุดมุ่งหมายสำหรับการประยุกต์ใช้ในฐานะสารต้านออกซิเดชันที่ปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหาร อาทิ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา (Chalamaiah และคณะ, 2012) ถั่วลิสง (Hwang และคณะ, 2010; Jamdar และคณะ, 2010) และ buckwheat (Tang และคณะ, 2009) เป็นต้น

<u>การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน</u>

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันในระบบที่ไม่มีไขมัน (non-lipid system) สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

ก) Hydrogen Atom Transfer (HAT) โดยอาศัยกลไกการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอม ตัวอย่างหนึ่งของกลไกนี้ ได้แก่ วิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

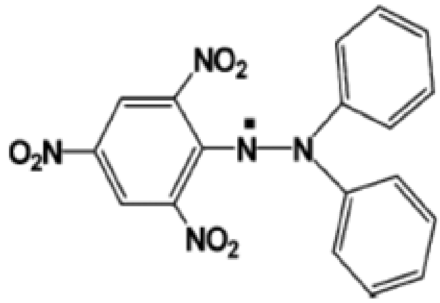
ข) Single Electron Transfer (SET) โดยอาศัยกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ตัวอย่างหนึ่งของกลไกนี้ ได้แก่ วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งมีหลักการ ดังนี้ ferric ion ถูกรีดิวซ์ โดยสารต้านออกซิเดชันได้เป็น ferrous ion ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ TPTZ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปสักระยะหนึ่ง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารประกอบ Ferric-TPTZ

ที่มา: Prior, Wu และ Schaich (2005)

ค) อาศัยทั้งกลไก HAT และ SET เกิดร่วมกันได้แก่ วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (รูปที่ 2.4) radical scavenging assay วิธีการนี้ใช้หลักการ คือ การกำจัดสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (DPPH$^{\bullet}$) ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะมีสีม่วงเข้ม โดยจะใช้สารต้านออกซิเดชันในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระดังกล่าว ซึ่งสารนี้จะไปทำให้สีม่วงของอนุมูลอิสระดังกล่าวมีสีจางลง สำหรับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประมาณ 15 นาที แล้วหลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และรายงานค่าออกมาเป็น % inhibition, EC_{50} หรือ trolox equivalent



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$)

ที่มา: Prior และคณะ (2005)

อิออนของธาตุโลหะทรานซิชัน เช่น Fe, Cu หรือ Co จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับเพอร์ออกไซด์ โดยทำหน้าที่เป็น one-electron donor แล้วสร้างเป็นอนุมูล alkoxyl ที่มีส่วน

เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี metal ions chelating activity เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการ chelate ธาตุต่าง ๆ ดังกล่าว จึงสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ การวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-ferrozine ซึ่งเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ในตัวอย่างไป chelate อิออนของเหล็ก ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ferrozine ได้ (Pokorny และคณะ, 2001; Rajalakshmi และ Narasimhan, 1996)

วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค เดิมใช้สำหรับวิเคราะห์ tyrosine โดยสารในกลุ่มฟีนอลจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ molybdotungstate reagent เกิดเป็นสารที่ให้สีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 745-750 นาโนเมตร เป็นวิธีที่ง่าย ไวต่อปฏิกิริยา และมีความแม่นยำ แต่ปฏิกิริยาจะดำเนินช้าที่ค่า pH เป็นกรดและไม่มีความจำเพาะ (Folin, 1927) ดังนั้น Singleton และ Rossi (1965) จึงได้ปรับปรุงวิธีโดยใช้ molybdotungstophosphoric heteropolyanion reagent ซึ่งสามารถรีดิวซ์สารในกลุ่มฟีนอลได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น โดยวัดสารให้สีที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร กำหนดภาวะและวิธีวิเคราะห์โดยใช้สัดส่วนปริมาตรของสารละลายที่เป็นด่างต่อ Folin-Ciocalteu reagent ควบคุมเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดสารให้สี และใช้ gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน เพื่อช่วยลดความแปรปรวนและความคลาดเคลื่อนของผลทดลองได้

2.6 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีบทบาทสำคัญต่อการพิจารณาเพื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น

สมบัติการละลาย คือ ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ นอกจากนี้ความสามารถในการละลายยังส่งผลต่อเนื่องกับสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านอื่น ๆ เช่น การเกิดโฟม และการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถรายงานในรูป nitrogen solubility index (NSI) (Sikorski, 2001)

สมบัติการเกิดโฟม คือ ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิล์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก สมบัติการเกิดโฟมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีน surface hydrophobicity ประจุ และค่า pI ของโปรตีน โดยสามารถพิจารณาได้จากค่า foam capacity และ foam stability (Kristinsson และ Rasco, 2000)

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ คือ ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในระบบอิมัลชัน โดยมีการจัดเรียงส่วนที่เป็น hydrophobic ของโมเลกุลเพปไทด์ที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ซึ่งสมบัตินี้จะพิจารณาจากค่า emulsifying activity index (EAI) และ emulsion stability index (ESI) (Pearce และ Kinsella, 1978)

2.7 ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์

ปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ แหล่งที่มาและความเข้มข้นของโปรตีน ภาวะที่ใช้ผลิต เช่น เวลา และระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ เป็นต้น

Hong และคณะ (2005) พบว่าชนิดของเอนไซม์ได้แก่ Alcalase® และ Neutrase® มีผลต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเขียวนาน 10 ชั่วโมง โดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่าระดับการย่อย 22 และ 12 % ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Kamnerdpetch และคณะ (2007) ที่ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนจากเนื้อมันฝรั่งบดโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง endoprotease และ exopeptidase ในการย่อยเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว พบว่า การใช้เอนไซม์ 2 ชนิดในการย่อยควบคู่กัน ทำให้ได้ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระและประสิทธิภาพซึ่งพิจารณาจากระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือสองชนิดร่วมกัน จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ต่างกัน ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ

ชนิดของเอนไซม์และแหล่งที่มาของโปรตีนมีผลต่อระดับการย่อยและสมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต ทั้งนี้ Torruco-Uco และคณะ (2009) พบว่า ตัวอย่างโปรตีน

ไฮโดรไลเสตจากโปรตีนเข้มข้น (protein concentrate) จากถั่วพร้าและถั่วแดงหลวง ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® และ Flavourzyme® นาน 90 นาที มีค่าดังกล่าวต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05) ตัวอย่างที่ได้จากถั่วพร้าและถั่วแดงหลวงมีค่าระดับการย่อยสูงสุด เมื่อย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® นาน 45 และ 30 นาที ตามลำดับ และเมื่อย่อยโปรตีนจากถั่วทั้งสองด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® พบว่า เมื่อเวลาย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยของตัวอย่างทั้งสองจะมีค่าเพิ่มขึ้นต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าสมบัติต้านออกซิเดชันของตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) decolourization assay มีค่าต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสต่างชนิดกันทำให้ได้เพปไทด์กลุ่มต่าง ๆ ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน ซึ่งแปรผันไปตามระดับการย่อย และคุณสมบัติของเพปไทด์ที่ได้ เช่น น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบและลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ หรือผลจากสมบัติต่าง ๆ ร่วมกัน เช่น ความสามารถในการเคลื่อนย้ายอนุมูลอิสระ การทำหน้าที่เป็นตัวจับอิออนโลหะ (chelating agent) หรือตัวให้อิเล็กตรอน (electron donator) (Tang และคณะ, 2009; Torruco-Uco และคณะ, 2009)

สัดส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรทและเวลาที่ใช้มีความสัมพันธ์กับค่าระดับการย่อย ทั้งนี้ Chabanon และคณะ (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยดังกล่าวกับค่าระดับการย่อยของโปรตีน albumin และ globulin ที่ได้จากโปรตีนไอโซเลทของ rapeseed ซึ่งผ่านการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่ามีความสัมพันธ์กันแบบ log-linear โดยอัตราการย่อยจะเร็วในช่วงแรกและค่อยๆ ลดลงเนื่องจากจำนวนเพปไทด์ที่ถูกย่อยได้มีจำกัด หรือเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibition) โดยการเสื่อมสภาพ (deactivation) ของซับสเตรทและ/หรือเอนไซม์ (Moreno และ Cuadrado, 1993) และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ค่าระดับการย่อยของโปรตีนทั้งสองชนิดจะมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้น ค่าดังกล่าวจะลดลง อาจเป็นเพราะซับสเตรทมีอิทธิพลต่อการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ แสดงให้เห็นว่าจำนวนพันธะที่ถูกย่อยได้ตามค่าระดับการย่อยไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ควบคุมอัตราการย่อย (Gonzàlez-Tello และคณะ, 1994) นอกจากนั้นยังพบว่าขนาดโมเลกุลของเพปไทด์และสมบัติเชิงหน้าที่ (สมบัติการละลาย การเกิดโฟม และการเป็นอิมัลซิไฟเออร์) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสัมพันธ์กับระดับการย่อย แต่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรท

แหล่งที่มาของโปรตีน ชนิดของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีน มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ กล่าวคือจากการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่ได้จากโปรตีนไอโซเลทจาก pea (*Pisum sativum* L.) 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Maja และ L 1 ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ papain และ commercial protease ที่เวลา 15, 30 และ 60 นาที และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วย commercial protease มีระดับการย่อยที่สูงกว่าย่อยด้วย papain และสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์ในด้านต่าง ๆ มีค่าที่แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) (Barac และคณะ, 2012)

เวลาที่ใช้ในการย่อยมีต่อผลต่อระดับการย่อย สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากการย่อยโปรตีนไอโซเลตจากถั่วลิสง ด้วยเอนไซม์ Alcalase® 2.4 L นาน 0.5, 2, 6 และ 22 ชั่วโมง และทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าทำให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตที่ได้มีระดับการย่อยเป็น 10, 20, 30 และ 40 % ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำให้สมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย DPPH radical-scavenging activity และ metal chelating activity เพิ่มขึ้น และสมบัติเชิงหน้าที่โดยเฉพาะสมบัติการละลายก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (Jamdar และคณะ, 2010) และจากการศึกษาการใช้เอนไซม์ทริปซินในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโอ๊ต ที่ใช้เวลาในการย่อยนาน 10, 40 นาที และ 2 ชั่วโมง ทำแห้งแบบพ่นกระจาย และมีระดับการย่อย 4.1, 6.4 และ 8.3 % ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ พบว่าสมบัติในการอิมัลซิไฟ (emulsifying activity) ของไฮโดรไลเสตมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อโปรตีนถูกย่อยเป็นเพปไทด์ที่มีสายสั้นลง ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วไปยังบริเวณพื้นผิวของวัฏภาคน้ำมัน โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาวัฏภาคน้ำมันและหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาวัฏภาคน้ำหรือวัฏภาคที่มีขั้วทำให้เกิดสภาพอิมัลชันขึ้น แต่ในทางกลับกันความคงตัวหรือเสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsifying stability) จะมีค่าลดลง เนื่องจากปริมาณเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการโอบล้อมรอบอนุภาคของน้ำมันลดลง ทำให้การกระจายตัวของอนุภาคน้ำมันไม่ดีจึงกลับมารวมตัวกันใหม่ (Guan และคณะ, 2007)

จากการย่อยโปรตีนไอโซเลทจาก chickpea ด้วย immobilised Alcalase® ที่เวลา 10, 50, 150 และ 300 นาที และได้ระดับการย่อย 1, 2.9, 4.9, และ 10 % ตามลำดับ แล้วศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ พบว่า เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเสต จะมีสมบัติเชิงหน้าที่ โดยเฉพาะสมบัติการละลายและสมบัติการเกิดโฟมที่เพิ่มมากขึ้น สำหรับสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จะลดลง ดังนั้น

เวลาในการย่อยและระดับการย่อยจึงมีอิทธิพลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Yust และคณะ, 2010)

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยจากโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ papain และ pepsin นาน 30 นาที และทำแห้งแบบพ่นกระจาย ไปศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ พบว่า การย่อยตัวอย่างด้วย pepsin ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีสมบัติการอิมัลซิไฟ และสมบัติการเกิดโฟมที่ดีกว่าการย่อยด้วย papain ดังนั้นชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Tsumura และคณะ, 2005)

Kong, Zhou และ Qian (2007) พบว่าระดับการย่อยมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จาก wheat gluten ซึ่งทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง โดยที่ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม จะลดลง เมื่อระดับการย่อยเพิ่มมากขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม เนื่องจากการย่อยโปรตีนส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลงและทำให้ค่า surface activity ลดลง ดังนั้นโปรตีนจึงมีความสามารถในการจัดเรียงตัวเป็นแผ่นฟิล์มบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลวและรักษาความคงตัวของฟิล์มที่หุ้มอากาศได้ลดลง

นอกจากนั้นอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่สงผลต่อคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ และชนิดของกรดอะมิโนอิสระที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นต้น โดยที่ Pihlanto, Akkanen และ Korhonen (2008) รายงานว่า สมบัติต้านออกซิเดชันในโปรตีนไอโซเลทจากมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ esperase เกิดจากเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 3 kDa ในขณะที่ Hwang และคณะ (2010) ทดลองย่อยโปรตีนไอโซเลทจากถั่วลิสงที่สกัดไขมันออกด้วยเอนไซม์ esperase และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นแยกเพปไทด์ได้เป็น 3 ขนาด ได้แก่ กลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa อยู่ระหว่าง 3-5 kDa และมากกว่า 5 kDa แล้ววิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน พบว่า เพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 3-5 kDa จะมีค่า DPPH radical scavenging activity และ metal chelating activity สูงกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่า reducing power น้อย แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันซึ่งมีสมบัติต้านออกซิเดชันต่างกัน อาจเกิดจากกลไกการต้านออกซิเดชันที่ต่างกัน อย่างไรก็

ตาม ลำดับชนิดของกรดอะมิโน โครงสร้างและความยาวของสายเพปไทด์ อาจเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อสมบัติต้านออกซิเดชันของตัวอย่าง (Hwang และคณะ, 2010; Pihlanto และคณะ, 2008)

2.8 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตขึ้นในระยะแรกเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา ผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน จึงนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนี้

ก) อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายสูงจะประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์สายสั้นจำนวนมาก ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีและเหมาะแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Ghorbel และคณะ, 2005)

ข) อาหารสัตว์

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลามีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน จึงมีการนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ที่อยู่ในระยะแรกเกิดและระยะเจริญเติบโต เช่น ลูกแกะ ลูกวัว และลูกหมู เป็นต้น (Adler-Nissen, 1986a; Chalamaiah และคณะ, 2012)

ค) อาหารมนุษย์

ปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อเยื่ออาหาร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ เช่น ในผลิตภัณฑ์ขนมอบประเภทเค้ก ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทไส้กรอก และผลิตภัณฑ์จากนมประเภทไอศกรีม เป็นต้น และสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา น้ำซ้อสปรุงรส และซีอิ๊ว เป็นต้น (Chalamaiah และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มได้ (Sinha และคณะ, 2007)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

- ถั่วอะซูกิพันธุ์ Erimo (จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนแปะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่) เก็บเกี่ยวระหว่างเดือนมีนาคม 2553 บดถั่วอะซูกิด้วยเครื่องโม่แห้ง แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 100 mesh หลังจากนั้นบรรจุผงถั่วที่ได้ลงในถุงลามิเนต (PET/AL/PE) (บริษัท ปทุมเฟล็กซ์ แพ็คเกจจิ้ง จำกัด อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี) ที่มีขนาด 150 x 230 มิลลิเมตร อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate) 0.0006 กรัม/ตารางเมตร/วัน อัตราการซึมผ่านของออกซิเจน (oxygen transmission rate) 0.0006 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ตารางเมตร/วัน ภายใต้สุญญากาศ -100 kPa และเก็บไว้ในเดซิคเคเตอร์จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์
- เอนไซม์ Flavourzyme® 500 MG (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark, และมีค่า activity = 500 LAPU/g) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง endopeptidase และ exopeptidase ซึ่งจะใช้เวลาในการย่อยสลายที่น้อย ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 °C และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 5.0-7.0
- น้ำมันถั่วเหลือง ตรา กุ๊ก (ผลิตโดยบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด จ.สมุทรปราการ) ซื้อจากร้านสหกรณ์จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย สาขาศาลาพระเกี้ยว ทั้งนี้มีอายุการเก็บ 2 เดือน หลังวันผลิต (ผลิต 25 พฤษภาคม 2556)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์	รุ่นที่ผลิต	ตราสินค้า/ประเทศผู้ผลิต
- UV - spectrophotometer	Genesys 10 UV	Thermospectronic / Rochester, N.Y., U.S.A.

-	Vortex mixer	VTX-3000L	UZUSIO / Tokyo, Japan
-	Water bath shaker	GFL 1092	GFL / Burgwedel, Germany
-	pH meter	CyberScan pH 1000 Bench	Eutech Instruments / Singapore
-	Freezer -20 °C	SF-C95	Sanyo / Tokyo, Japan
-	ตู้อบลมร้อน (Oven)	600	Memmert / Schwabach, Germany
-	Soxhlet extraction system	EV6 All/16	Gerhardt / Northants, U.K.
-	Kjeldahl system		
	- Digestion unit	K-424	BÜCHI / Flawil 1, Switzerland
	- Scrubber unit	B-141	BÜCHI / Flawil 1, Switzerland
	- Distillation unit	B-324	BÜCHI / Flawil 1, Switzerland
-	Rotary evaporator	A-3S	Eyela / Miyagi, Japan
-	Muffle furnace	CWF 1200	Carbolite / Sheffield, England
-	Soybean grinder	Type NSB-6	Lita Brand / Thailand
-	Sieve	ASTM	Retsch® / Haan, Germany
-	HPLC	Alliance 2695	Waters / MA, U.S.A.
-	MALDI-TOF mass spectrometer	Microflex	Bruker / MA, U.S.A.
-	Spray dryer	B–290	BÜCHI / Flawil 1, Switzerland

-	เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	BP 2105	Sartorius / Göttingen, Germany
-	Centrifuge	5200	Kubota / Tokyo, Japan
-	Centrifuge	Mikro 22R	Hettich / Kirchlengern, Germany
-	Centrifuge	220/240	Thermo IEC / MA, USA
-	Vacuum sealing machine	AG500	Multivac / Wolfertschwenden, Germany

สารเคมี

<u>สำหรับการวิเคราะห์ proximate analysis</u>

<u>วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl method)</u>

-	Selenium mixture reagent (A.R. grade)	Merck	Germany
-	Sulfuric acid (A.R. grade)	QReC	New Zealand
-	Sodium hydroxide (A.R. grade)	Carlo Erba	France
-	Boric acid (A.R. grade)	QReC	New Zealand
-	Methyl red (A.R. grade)	QReC	New Zealand
-	Hydrochloric acid (A.R. grade)	QReC	New Zealand
-	Ethanol (A.R. grade)	QReC	New Zealand

<u>วิเคราะห์ปริมาณไขมัน</u>

-	Petroleum ether (A.R. grade)	QReC	New Zealand

วิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหาร

- Sulfuric acid (A.R. grade)	QReC	New Zealand
- Sodium hydroxide (A.R. grade)	Carlo Erba	France
- Ethanol (A.R. grade)	QReC	New Zealand

สำหรับการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis: DH)

- Disodium tetraborate decahydrate (A.R. grade)	Univar	Australia
- Sodium dodecyl sulfate (A.R. grade)	Ajax Finechem	Australia
- Phthaldialdehyde (A.R. grade)	Fluka	Germany
- Ethanol (A.R. grade)	QRec	New Zealand
- Dithiothreitol (A.R. grade)	Fluka	Switzerland
- Serine (A.R. grade)	Fisher Scientific	U.S.A.

สำหรับวิเคราะห์สมบัติการต้านอออกซิเดชัน

วิธี DPPH

- 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (A.R. grade)	Fluka	Switzerland
- Ethanol (A.R. grade)	QReC	New Zealand

วิธี metal ions chelating activity

- Iron (II) chloride ($FeCl_2$) (A.R. grade)	QReC	New Zealand
- Ferrozine (A.R. grade) (3-(2-pyridyl)-5, 6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1, 2, 4-triazine)	QReC	New Zealand

วิธี FRAP

- Trolox (A.R. grade)	Fluka	Germany
- Methanol (A.R. grade)	J.T. Baker	U.S.A.
- Sodium acetate (A.R. grade)	Fisher Scientific	U.S.A.
- 2, 4, 6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ) (A.R. grade)	Fluka	Switzerland
- Hydrochloric acid (A.R. grade)	J.T. Baker	U.S.A.
- Iron (III) chloride ($FeCl_3$) (A.R. grade)	POCH S.A.	Poland

สำหรับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteu

- Sodium carbonate (A.R. grade)	Ajax Finechem	Australia
- Folin-Ciocalteu reagent (A.R. grade)	Carlo Erba	France
- Gallic acid (A.R. grade)	Fluka	Germany
- Ethanol (A.R. grade)	VWR Prolabo	France

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

- Acetonitrile 60 % (HPLC grade)	Labscan	Poland
- Sodium acetate buffer (HPLC grade)	Merck	Germany
- AccQ-fluor derivertization buffer (HPLC grade)	Waters	Spain
- AccQ-fluor reagent (HPLC grade)	Waters	Spain

<u>สำหรับการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorpton/ionization time of flight (MALDI-TOF)</u>

- α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) (HPLC grade)	Fluka	Singapore
- Trifluoroacetic acid (TFA) (A.R. grade)	Carl Roth GmbH	Germany
- Acetonitrile (A.R. grade)	Carlo Erba	France

<u>สำหรับการทำแห้ง</u>

- Maltodextrin (10 % DE)	Mor-rex	Brazil

<u>สำหรับการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่</u>

- Hydrochloric acid (A.R. grade)	J.T. Baker	U.S.A.
- Sodium hydroxide (A.R. grade)	Carlo Erba	France
- Sodium dodecyl sulfate (A.R. grade)	Ajax Finechem	Australia

<u>สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Modified Lowry method)</u>

- Sodium carbonate (A.R. grade)	Ajax Finechem	Australia
- Sodium dodecyl sulfate (A.R. grade)	Ajax Finechem	Australia
- Sodium deoxycholate (A.R. grade)	Sigma	U.S.A.
- Sodium hydroxyide (A.R. grade)	Carlo Erba	France
- Trichloroacetic acid (A.R. grade)	Merck	Germany
- Folin-Ciocalteu reagent (A.R. grade)	Carlo Erba	France
- Bovine serum albumin (A.R. grade)	Sigma	U.S.A.
- Tris-HCl (A.R. grade)	Sigma	U.S.A.
- Dithiothreitol (A.R. grade)	Fluka	Switzerland

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยอาหาร และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC (2006) (ภาคผนวก ก 1-6)

3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

แบ่งตัวอย่างถั่วอะซูกิผงมา 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (w/w) ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ Flavourzyme® 500 MG เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนถั่วอะซูกิ ซึ่งมีภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน คือ อุณหภูมิ 50 °C และ pH 7 แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อน้ำหนักถั่วเป็น 1.0, 3.0, 5.0 และ 7.0 % w/w และแปรเวลาในการย่อยเป็น 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ใน water bath shaker จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที และนำไปปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 1,400×*g* เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายและสมบัติการต้านออกซิเดชัน

3.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อย (degree of hydrolysis)

วิเคราะห์ระดับการย่อยโดยวิธี ortho-phthaldialdehyde (OPA) ของ Nielsen, Petersen และ Dhambmann (2001) (ภาคผนวก ก 7)

3.2.2 ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยตัวแปรตาม treatment combinations ต่าง ๆ ข้างต้นด้วยวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ Xie และคณะ (2008) (ภาคผนวก ก 8)
- วิธี metal ions chelating activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ Xie และคณะ (2008) (ภาคผนวก ก 9)

- วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1999) (ภาคผนวก ก 10)
- วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse (2008) (ภาคผนวก ก 11)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ 4 x 4 Factorial in completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Tests (DNMRT) (Cochran และ Cox, 1992)

จากนั้นคัดเลือกภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิมา 2 ภาวะ โดยพิจารณาจากภาวะที่มีระดับการย่อยสลายต่ำสุดและสูงสุด ซึ่งได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 1 % นาน 1 ชั่วโมงและ 7 % นาน 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าสมบัติการต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน เพื่อนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต (ของเหลว) ที่ได้ไปศึกษาและวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่คัดเลือกได้ ในข้อ 3.2 มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Bosch, Alegría และ Farré (2006) (ภาคผนวก ก 12)

3.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.2 ไปวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) ตามวิธีของ Boontha และคณะ (2008) (ภาคผนวก 13)

3.5 การทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

ทำแห้งตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.2 โดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการ centrifuge (KUBOTA 5200) ที่อุณหภูมิ 25 °C และแรงเหวี่ยง 1,400×*g* มาปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดให้ได้ประมาณ 21.4 % ด้วยมอลโทเด็กซ์ทริน (10 % DE) ทำให้ได้ปริมาณของสารละลายตัวอย่างไฮโดรไลเสตเท่ากับ 1,254 กรัม แล้วนำไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย (spray drying) ด้วยเครื่อง BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (รูปที่ 3.1) ที่อัตราเร็ว 6 มิลลิลิตรต่อนาที (20 % feed rate) โดยใช้เวลาในการทำแห้งประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที ซึ่งกำหนดอุณหภูมิของลมร้อนขาเข้าประมาณ 180-185 °C อุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 90-100 °C ทดลอง 2 ซ้ำ (Linarès, Larré และ Popineau, 2001) บรรจุผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ในถุงลามิเนต (PET/AL/PE) ด้วยเครื่อง Multivac AG-500 ภายใต้สุญญากาศ (-100 kPa) และเก็บไว้ในเดซิคเคเตอร์จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ ต่อไป

รูปที่ 3.1 เครื่อง BÜCHI Mini Spray Dryer B-290

3.6 ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตของเหลวและตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว โดยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 % (w/v) ด้วยวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ ดังนี้

- วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity
- วิธี metal ions chelating activity
- วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ทั้งนี้ทำงานทดลองเพื่อหาค่าดังกล่าวข้างต้นเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยทำ 3 ซ้ำ

3.7 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง

วิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง ด้วยวิธีดังนี้

3.7.1 วิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

วิเคราะห์สมบัติดังกล่าวนี้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ponnampalam และคณะ (1987) ด้วยการละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตผงให้มีความเข้มข้น 1 % (w/v) ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้มีค่า pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 หลังจากนั้นกวนผสมตัวอย่างด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500×*g* นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry ตามวิธีของ Peterson (1977) (ภาคผนวก ก 14) คำนวณค่าความสามารถในการละลาย (solubility) ตามสมการดังนี้

$$\text{Solubility} = \frac{\text{protein content in supernatant}}{\text{total protein content in sample}} \times 100\ \%$$

3.7.2 วิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟม

วิเคราะห์สมบัติดังกล่าวนี้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sathe และ Salunkhe (1981) ด้วยการละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตผงให้มีความเข้มข้น 1 % (w/v) ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้มีค่า pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร ไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วินาที และอ่านปริมาตรของตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความสามารถในการเกิดโฟม (foaming capacity) ตามสมการดังนี้

$$\text{Foaming capacity} = \frac{A - B}{B} \times 100\ \%$$

เมื่อ A = the volume after homogenization (ml)

B = the volume before homogenization (ml)

ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อนาน 3 นาที และอ่านปริมาตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความคงตัวหรือเสถียรภาพของโฟม (foam stability) ตามสมการดังนี้

$$\text{Foaming stability} = \frac{A - B}{B} \times 100\ \%$$

เมื่อ A = the volume after standing (ml)

B = the volume before homogenization (ml)

3.7.3 วิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

วิเคราะห์สมบัติดังกล่าวนี้ด้วยการดัดแปลงจากวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978) ด้วยการละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตผงให้มีความเข้มข้น 1 % (w/v) ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้มีค่า pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 แล้วผสมสารละลาย

ตัวอย่างปริมาตร 30 มิลลิลิตร กับน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำส่วนผสมไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ที่ความเร็วรอบ 22,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างอิมัลชันปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากส่วนล่างสุด (bottom) ที่เวลา 0 และ 10 นาทีหลังการโฮโมจีไนซ์ไปผสมกับสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 0.1 % (w/v) ปริมาตร 4,950 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่าความสามารถการเกิดอิมัลชัน (emulsifying activity index: EAI) ตามสมการดังนี้

$$\text{Emulsifying activity index } (m^2/g) = \frac{(2 \times 2.203 \times A_{500})}{(0.25 \times P)}$$

เมื่อ A_{500} = ค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

P = ปริมาณโปรตีน (กรัม) (ภาคผนวก ก 14)

และค่าความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability index: ESI) ตามสมการดังนี้

$$\text{Emulsifying stability index (min)} = \frac{(A_0 \times \Delta t)}{(\Delta A)}$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรของตัวอย่างที่เก็บในนาทีที่ 0

A_{10} = ค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรของตัวอย่างที่เก็บในนาทีที่ 10

Δt = 10 นาที

ΔA = $A_0 - A_{10}$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 500 MG เพื่อย่อยโปรตีนในถั่ว โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์ (1, 3, 5 และ 7 % w/w) และเวลาในการย่อย (1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง) มีเป้าหมายหลักเพื่อการผลิตและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านของการเป็นสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ เพื่ออาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ขนมอบ (bake goods) ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จำเพาะบางประเภท ได้แก่ เครื่องดื่มให้พลังงาน (energetic drinks) อาหารที่ช่วยควบคุมน้ำหนัก (weight-control diets) หรือใช้เป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างหลากหลาย (Clemente, 2000; Hamada, 2000; Neklyudov, Ivankin และ Berdutina, 2000) ทั้งนี้การรายงานผลการทดลองในประเด็นหลักจะรายงานในส่วนของการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันเป็นลำดับแรก และตามด้วยผลการศึกษาสมบัติเชิงหน้าของโปรตีนไฮโดรไลเสต อย่างไรก็ตามงานทดลองในขั้นแรกเริ่มจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ ที่นำมาใช้เป็นแหล่งของโปรตีนตั้งต้นเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ดังนี้

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ

งานวิจัยนี้ได้นำถั่วอะซูกิพันธุ์ Erimo จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนแปะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ เก็บเกี่ยวระหว่างเดือนมีนาคม 2553 มาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตให้มีสมบัติการต้านออกซิเดชัน และสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่างๆ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ จึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการพิจารณาคุณภาพของวัตถุดิบเริ่มต้นที่จะใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเส้นใยอาหารของถั่วอะซูกิ ผลการวิเคราะห์ดังกล่าว แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วอะซูกิ

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์	
	น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง
ความชื้น	10.84 ± 0.28	-
โปรตีน	25.44 ± 1.00	28.53 ± 1.12
ไขมัน	1.95 ± 0.24	2.19 ± 0.27
เถ้า	4.24 ± 0.10	4.76 ± 0.11
เส้นใยอาหาร	3.57 ± 0.27	4.01 ± 0.31
คาร์โบไฮเดรต	53.96 ± 0.79	60.51 ± 1.08

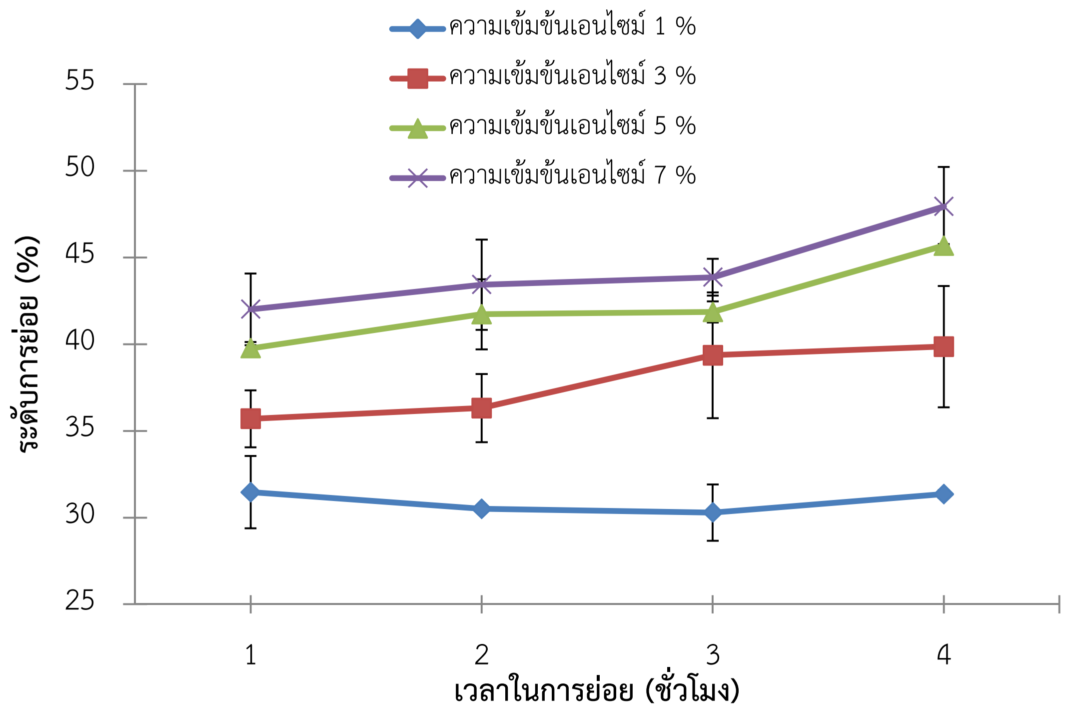
จากการวิจัยพบว่าถั่วอะซูกิประกอบด้วยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเป็นหลัก ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียง 80 % Nwokolo และ Smartt (1996) ได้รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของถั่วดังกล่าว มีปริมาณความชื้น 15 %, ปริมาณโปรตีน 21.1 %, ปริมาณไขมัน 1.0 %, ปริมาณเถ้า 3.4 %, ปริมาณเส้นใยอาหาร 3.9 % และปริมาณคาร์โบไฮเดรต 59.5 % (โดยน้ำหนักเปียก) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงหรือค่อนข้างสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของถั่วจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ขนาดของเมล็ดถั่ว ความแตกต่างของสายพันธุ์ และสภาวะระหว่างการปลูก เช่น สภาพอากาศ สภาพดินที่ใช้ปลูก การเพิ่มสารอาหารโดยการให้ปุ๋ยและการดูแลรักษา เป็นต้น

4.2 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 500 MG (ภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน คือ อุณหภูมิ 50 °C และ pH 7) โดยมีความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยเป็นปัจจัยแปรผัน แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อปริมาณถั่วเป็น 1.0, 3.0, 5.0 และ 7.0 % w/w และแปรเวลาในการย่อยเป็น 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ใน water bath shaker จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที และนำไปปั่น

เหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 1,400x*g* เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis: DH) และสมบัติการต้านออกซิเดชันด้านต่าง ๆ ดังนี้

การวิเคราะห์ระดับการย่อยของโปรตีนจะใช้วิธี OPA ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร OPA และ primary amino group ในภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT) เป็นองค์ประกอบ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และคำนวณระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

จากการทดลองพบว่าระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิมีค่าตั้งแต่ 30.29-47.94 % ซึ่งจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย (รูปที่ 4.1) เนื่องจาก Flavourzyme® เป็นโปรติเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ โดยจะช่วยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา ส่งผลให้โปรตีนถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระและสายเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงเร็วขึ้น อัตราการย่อยจึงเพิ่มขึ้น (Adler-Nissen, 1986b;

Marangoni, 2003) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเพิ่มระดับการย่อยสลายโปรตีน เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นค่า DH จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาเท่ากัน และอัตราการย่อยซึ่งสังเกตได้จากความชันของกราฟจะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนั้น พบว่าค่า DH จะแปรผันตามเวลาในการย่อย เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปเอนไซม์จะย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงได้เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นต่างๆมีค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงน้อยโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 1 % ค่าดังกล่าวแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อย่อยตัวอย่างนานขึ้น อาจอธิบายได้ว่าในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยอัตราเร็วคงที่เป็นระยะเวลาสั้น ๆ เนื่องจากสารตั้งต้นซึ่งได้แก่พันธะเพปไทด์ยังมีปริมาณมาก จากนั้นอัตราการย่อยจะลดลงเพราะความเข้มข้นของสารตั้งต้นลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จนกระทั่งอัตราเร็วเป็นศูนย์ สารตั้งต้นทั้งหมดจะกลายเป็นผลิตภัณฑ์หรือปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุล ผลิตภัณฑ์ซึ่งได้แก่ เพปไทด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายจะเข้าแข่งขันกับเพปไทด์ดั้งเดิม (Kristinsson และ Rasco, 2000; Palmer, 1995) จากการทดลองนี้ ระยะเวลา 1-4 ชั่วโมงที่ใช้ย่อยตัวอย่างอาจกำลังเข้าสู่ช่วงท้ายของปฏิกิริยา อัตราการย่อยสลายจึงเปลี่ยนแปลงน้อย และที่ความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 1 % อาจมีสัดส่วนเอนไซม์ต่อซับสเตรทต่ำเกินไปจึงมีอัตราการย่อยต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่นมาก Clemente และคณะ (1999) พบว่า การย่อยโปรตีนไอโซเลทจาก chickpea โดยใช้ Flavourzyme® มีอัตราการย่อยเร็วในช่วงแรก (0-120 นาที) และช้าในช่วงท้าย (120-180 นาที) Tang และคณะ (2009) พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยมีอิทธิพลต่อค่า DH ทั้งนี้การย่อยโปรตีนไอโซเลทจาก buckwheat โดยใช้ Alcalase® และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำให้อัตราการย่อยเพิ่มขึ้นในช่วง 30 นาทีแรกแล้วค่อย ๆ ลดลงในช่วง 180 ถึง 360 นาที และอัตราเร็วจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัดส่วนเอนไซม์ต่อซับสเตรทเพิ่มขึ้น (1:100 ถึง 4:100, v/w) โดยค่า DH จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 15 นาทีแรก ซึ่งเป็นระยะเวลาสั้น และเมื่อเวลาผ่านไปนานกว่า 270 นาที อัตราการย่อยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆกันจะใกล้เคียงกัน เนื่องจากในช่วงแรกจะเกิดการย่อย globulins ส่วนในช่วงหลังจะเกิดการย่อย albumins

ระดับการย่อยนี้จะมีผลต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ทั้งนี้ Jamdar และคณะ (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยที่มีผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากโปรตีนไอโซเลทจากถั่วลิสง

โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® 2.4 L ในการย่อยที่อุณหภูมิ 50 °C แปรเวลาในการย่อยเป็น 0.5, 2, 6 และ 22 ชั่วโมง แล้วทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีระดับการย่อยเป็น 10, 20, 30 และ 40 % ซึ่งเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากเวลาที่นานขึ้นทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงได้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้สมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และ metal chelating activity และสมบัติเชิงหน้าที่โดยเฉพาะสมบัติการละลายเพิ่มขึ้นด้วย

จากการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโอ๊ตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่เวลาต่างๆ โดยทำแห้งผลิตภัณฑ์ที่ได้แบบพ่นกระจาย พบว่าตัวอย่างมีระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 ชั่วโมงแรก แล้วเริ่มมีค่าคงที่ในเวลาต่อมา โดยตัวอย่างที่ย่อยนาน 10, 40 นาที และ 2 ชั่วโมง มีค่าดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็น 4.1, 6.4 และ 8.3 % ตามลำดับ แต่ที่เวลา 4 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย (10.1 %) สาเหตุที่อัตราการย่อยลดลงเมื่อย่อยนานขึ้นเป็นเพราะเพปไทด์ที่จำเพาะต่อซับสเตรทมีลดลง เกิด enzyme inactivation และเกิดการแข่งขันกันระหว่างโปรตีนดั้งเดิมและเพปไทด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย นอกจากนั้นพบว่าสมบัติในการอิมัลซิไฟของไฮโดรไลเสตที่ได้ยังมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น (Guan และคณะ, 2007)

Betancur-Ancona และคณะ (2009) ได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนไอโซเลทที่ได้จากเมล็ดถั่ว *Phaseolus lunatus* ซึ่งย่อยโดยใช้เอนไซม์ Alcalase® 2.4 L และ Flavourzyme® 1000 MG แล้วทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่า ค่า DH จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและช้าลงในช่วงหลังเนื่องจากเกิดการยับยั้งเอนไซม์ (Adler-Nissen, 1986b) ตัวอย่างที่ย่อยโดยใช้เอนไซม์ชนิดแรกจะมีอัตราเร็วเริ่มต้นและให้ค่า DH สูงกว่าชนิดหลัง เป็นผลมาจากแหล่งที่มา ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ (Mahmoud, Malone, และ Cordle, 1992) ทั้งนี้ตัวอย่างที่มีระดับการย่อยต่ำกว่า 10 % จะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งตัวอย่างที่ย่อยด้วย Alcalase® จะมีความสามารถในการละลายที่ดีกว่า แต่ตัวอย่างที่ย่อยด้วย Flavourzyme® จะมีสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และสมบัติการเกิดโฟมที่ดีกว่า

Batista และคณะ (2010) ทดลองย่อย black scabbardfish by-products (ที่ได้จากส่วนหัว เครื่องใน โครง หนังและส่วนที่เหลือจากการตัดแต่ง) นาน 2 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ Protamex™

ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 % ของน้ำหนักตัวอย่าง พบว่าค่า DH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของเอนไซม์จนกระทั่ง 2 % เพราะที่ความเข้มข้นสูงมากเกินไป จะเหลือพันธะเพปไทด์ไม่เพียงพอสำหรับเข้าทำปฏิกิริยาและอาจเกิด enzyme deactivation บางส่วน

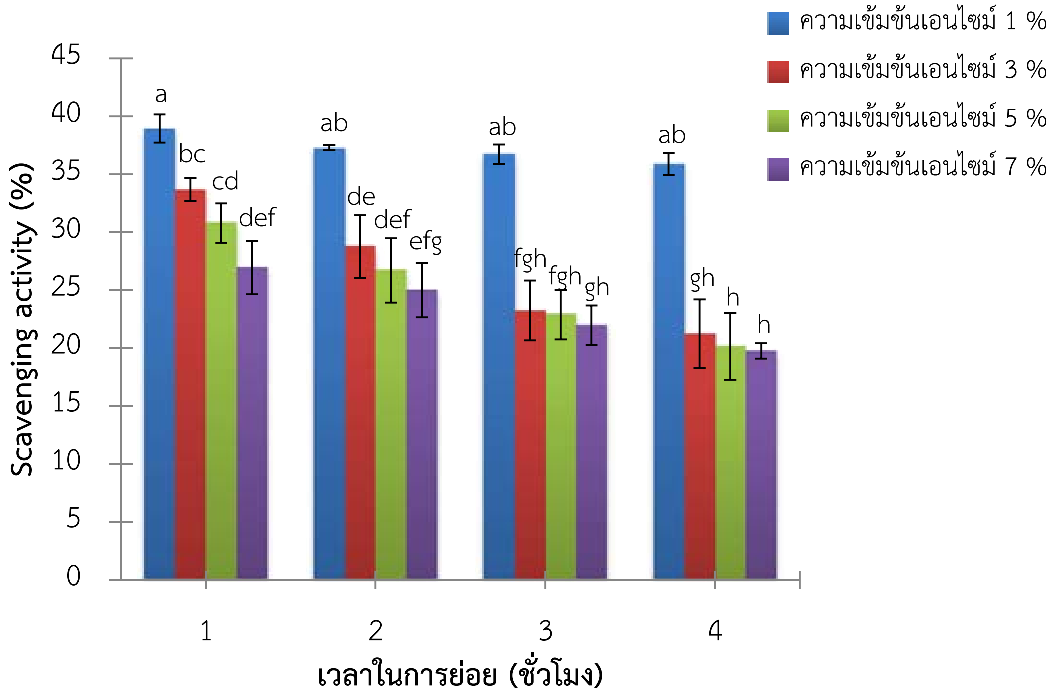
Vioque และคณะ (2001) ได้จัดแบ่งกลุ่มของไฮโดรไลเสตออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามการประยุกต์ใช้งาน ดังนี้ 1) ไฮโดรไลเสตที่มี DH ต่ำ (<10 %) ใช้สำหรับปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ 2) ไฮโดรไลเสตที่มี DH ไม่สม่ำเสมอ มีค่าขึ้น ๆ ลง ๆ โดยทั่วไปจะนำไปใช้ในการผลิตสารให้กลิ่นรส และ 3) ไฮโดรไลเสตที่มี DH สูง (>10 %) ส่วนใหญ่จะเอาไปใช้สำหรับการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและประยุกต์กับอาหารที่ใช้ในการบำบัดรักษาโรค ดังนั้นจึงนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ผลิตได้ไปศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชัน ซึ่งไม่เพียงแต่เป็นสมบัติที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในอาหารโดยเฉพาะพวกที่มีไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่สูง แต่ยังอาจมีผลพลอยได้ทางสมบัติเชิงหน้าที่และคุณค่าทางโภชนาการซึ่งก่อเกิดประโยชน์ต่อผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีกด้วย

4.3 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

ในขั้นตอนนี้ศึกษาสมบัติดังกล่าว โดยการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity, วิธี metal ions chelating activity, วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

4.3.1 วิธี DPPH

การวิเคราะห์วิธีนี้เป็นการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่าง โดยสารออกฤทธิ์ที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเสตจะไปกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (สีม่วงเข้ม) ด้วยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลดังกล่าวให้เป็นสารประกอบ DPPH-H (สีเหลือง) ที่มีความเสถียร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วคำนวณ % scavenging activity ของตัวอย่างได้ (Yang และคณะ, 2008)



รูปที่ 4.2 Radical scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ
ที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

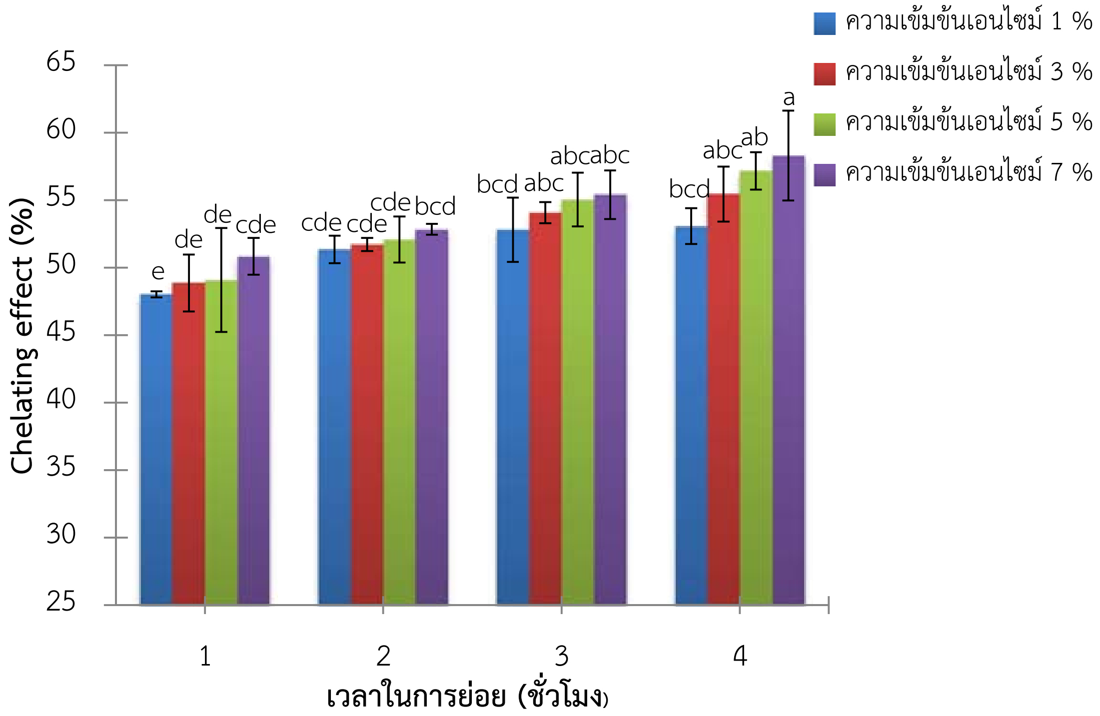
ค่า scavenging activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ (รูปที่ 4.2) มีค่าลดลงเมื่อความเข้มเข้มของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มขึ้น ซึ่งตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 1 % นาน 1 ชั่วโมงมีค่าดังกล่าวสูงสุด เท่ากับ 38.93 % ในขณะที่ตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 7 % นาน 4 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 19.74 % ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพล กล่าวคือ เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นทำให้ค่าดังกล่าวมีค่าลดลง ผลทดลองที่ได้เช่นนี้อาจเกิดจากข้อสันนิษฐานที่ว่า การย่อยสลายโปรตีนถั่วอะซูกิแล้วได้ค่า DH ที่สูงกว่า ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิคและเพปไทด์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีโครงสร้างและสมบัติ DPPH-radical scavenging ที่ด้อยลงหรือสมบัติต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ที่หวังว่าจะได้จากสารพวกเพปไทด์ต่าง ๆ แสดงออกมาน้อย อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ที่ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยที่มีผลต่อสมบัติ DPPH-radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) ที่ใช้เอนไซม์ Alcalase® 2.4 L แล้วทำแห้งด้วยวิธี

แช่เยือกแข็ง พบว่า เมื่อค่า DH เพิ่มขึ้น ตัวอย่างจะมีค่า DPPH-radical scavenging activity ลดลง เนื่องจากระหว่างกระบวนการย่อยสลาย ส่งผลให้เกิดเพปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ขึ้น ซึ่งขนาดและองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อสมบัติต้านออกซิเดชันของตัวอย่าง (Wu, Chen และ Shiau, 2003)

Amarowicz และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากถั่วอะซูกิ พบว่า ในสารสกัดจากถั่วอะซูกิมีสารประกอบฟีนอลิคหลายชนิด ซึ่งชนิดที่มีสมบัติ DPPH-radical scavenging ได้ดีที่สุดคือ สารประกอบฟีนอลิคในกลุ่มแทนนิน

4.3.2 วิธี metal ions chelating activity

การวิเคราะห์วิธีนี้เป็นการวัดความสามารถของสารที่ทำหน้าที่ในฐานะสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างโดยการเข้าทำปฏิกิริยากับอิออนของโลหะ ได้แก่ เหล็ก ทั้งนี้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลาย $FeCl_2$ จากนั้นเมื่อเติมสารละลาย Ferrozine ทำให้เกิด Fe^{2+} -ferrozine complex ซึ่งมีสีม่วง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi, 2007)



รูปที่ 4.3 Chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

รูปที่ 4.3 แสดงค่า metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าดังกล่าว โดยตัวอย่างที่ย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาย่อยต่ำสุดและสูงสุดมีค่าดังกล่าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ค่าที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ที่สอดคล้องกับค่า DH เป็นไปในทางตรงกันข้ามกับค่า DPPH-radical scavenging activity ซึ่งอาจเกิดจากข้อสันนิษฐานที่ว่า สารประกอบฟีนอลิคและสารประกอบกลุ่มเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนถั่วอะซูกิแล้วได้ค่า DH ที่สูงกว่า มีสมบัติในการ chelating อิออนของเหล็กได้ดีกว่าตัวอย่างที่มีค่า DH ต่ำ ๆ และแสดงสมบัติดังกล่าวนี้ได้ดีกว่าสมบัติ DPPH-radical scavenging

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยและชนิดของเอนไซม์ที่มีผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลาสีกุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดคือ Alcalase® 2.4 L และ Flavourzyme® 500 L แล้วทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าค่า metal chelating activity ของ

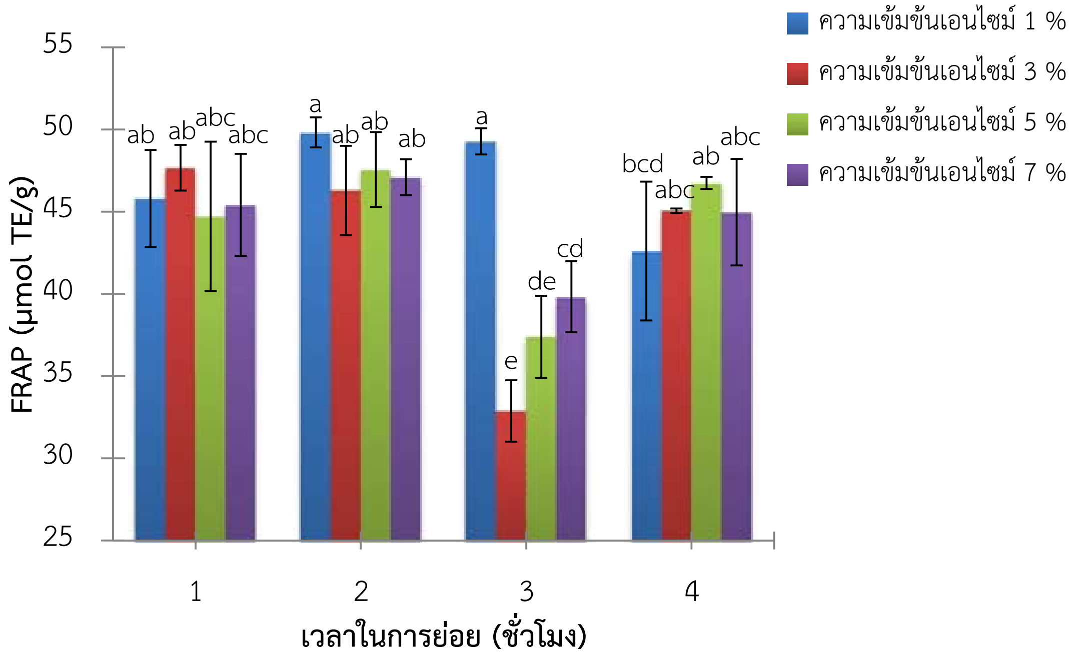
ตัวอย่างทั้งสองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยที่มากขึ้น อาจเนื่องมาจากเพปไทด์ที่เกิดขึ้นสามารถเผยหมู่ residual side chains ของกรดอะมิโนที่มีประจุลบออกมาได้มากขึ้น จึงเข้าจับกับอิออนของโลหะได้มากหรือดีขึ้น

Liu และคณะ (2010) ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยที่มีผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต จาก porcine plasma โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® ในการย่อย ซึ่งวัด % DH ได้ 6.2%, 12.7% และ 17.6% และทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าค่า metal chelating activity มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อย เนื่องมาจากอิออนของโลหะทรานซิชันจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับเพอร์ออกไซด์ โดยทำหน้าที่เป็น one-electron donor แล้วสร้างเป็นอนุมูล alkoxyl ทั้งนี้การ chelating อิออนของโลหะโดยเพปไทด์ในตัวอย่างจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้

ดังนั้นสามารถสันนิษฐานได้ว่าการสลายพันธะเพปไทด์ จะทำให้การจับกันกับอิออนโลหะเพิ่มขึ้นตามจำนวนของหมู่ carboxylic และหมู่ amino จาก acidic และ basic amino acids และในกรณีของเพปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ carboxylic อยู่นั้น ก็จะช่วยกำจัดอิออนโลหะอิสระประจุบวกที่ทำหน้าที่ prooxidants (เหล็กในที่นี้) ออกจากระบบของ hydroxyl radical ได้ ดังนั้นความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายได้ เพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระกับความสามารถในการกำจัดอิออนโลหะที่เพิ่มขึ้น จึงใช้สนับสนุนหรืออธิบายผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้

4.3.3 วิธี FRAP

การวิเคราะห์วิธีนี้อาศัยกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ซึ่งมีหลักการคือสารต้านออกซิเดชันจะไปรีดิวซ์อิออนของโลหะในรูป ferric ion (Fe^{3+}) ไปเป็นรูป ferrous ion (Fe^{2+}) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับ TPTZ ซึ่งทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+}-TPTZ (สีน้ำเงิน) ขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Ou และคณะ, 2002) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP (μmol TE/g) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ ได้ผลทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

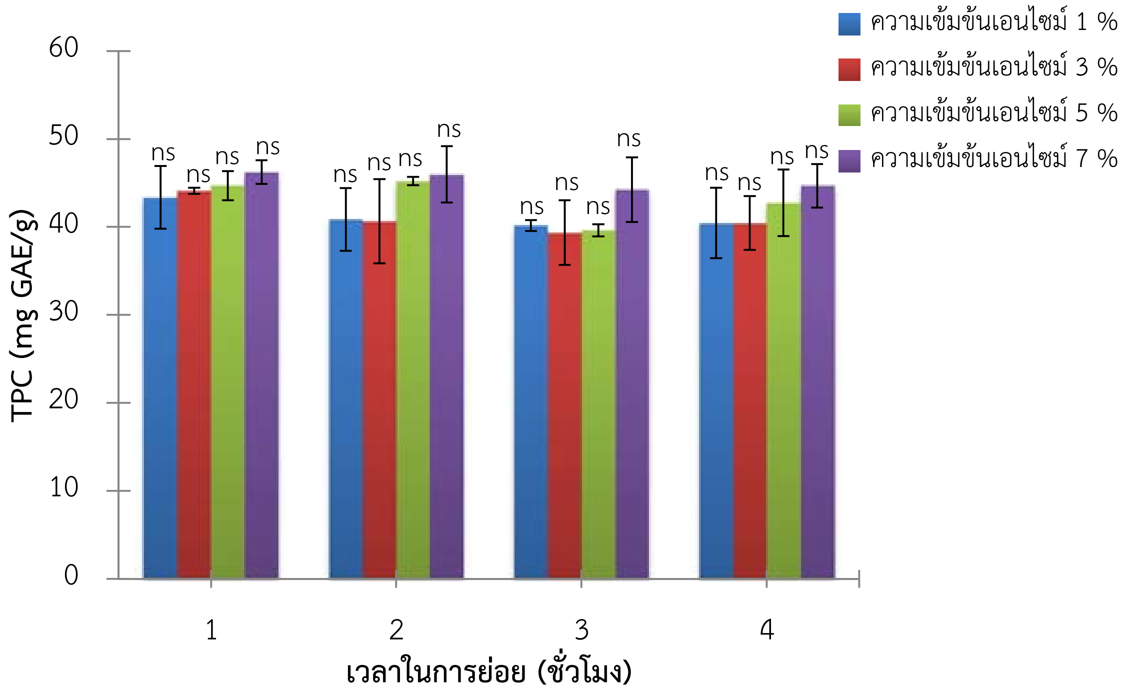
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 3 % ย่อยนาน 3 ชั่วโมงมีค่าดังกล่าวต่ำสุดคือ 32.87 µmol TE/g และค่าสูงสุดคือ 49.82 µmol TE/g ได้จากตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์เข้มข้น 1 % นาน 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่าดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสมบัติดังกล่าวนี้ที่ได้จากสารประกอบฟีนอลิค หรือเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสต (Elias, Kellerby และ Decker, 2008; Kartika และคณะ, 2007)

อนึ่ง เป็นที่สังเกตว่า หากมีการย่อยสลายนานกว่า (3-4 ชั่วโมง) ค่า FRAP ที่ได้เป็นส่วนใหญ่จะน้อยกว่าตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยเวลาที่น้อย (1-2 ชั่วโมง) และที่เวลาเดียวกันนั้น หากใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้นจนถึงระดับที่สะท้อนผลให้เห็นได้ (มากกว่า 1%) ค่า FRAP ก็มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้อาจเกิดจากข้อสันนิษฐานที่ว่าสารประกอบฟีนอลิค เช่น แทนนิน

และ phenolic acids ที่มีอยู่ในตัวอย่างถั่วอะซูกิที่ย่อยสลายไปน้อย จะส่งอิทธิพลต่อค่า FRAP ให้สูงกว่าตัวอย่างที่ย่อยสลายไปมาก แต่ในทางตรงกันข้าม ตัวอย่างที่ย่อยสลายไปมากตามเวลาย่อยและความเข้มข้นของเอนไซม์ ซึ่งสะท้อนโดยค่า DH นั้น กลับจะได้รับอิทธิพลจากสารประกอบพวกเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระมากกว่า Zhang และคณะ (2011) ได้ทดลองหมักถั่วลิสงด้วย *Bacillus subtilis* ที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างมีค่าระดับการย่อยและสมบัติต้านออกซิเดชันซึ่งวิเคราะห์จาก reducing power ability เพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิต endopeptidase ในระหว่างการหมัก ส่งผลให้เกิดเพปไทด์สายสั้นซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยกลไกดังกล่าว อย่างไรก็ตามอิทธิพลที่เกิดต่อค่า FRAP โดยรวมนี้ อาจคาดคะเนได้ว่าเกิดจากสารประกอบ ฟีนอลิคมากกว่าเกิดจากพวกเพปไทด์และกรดอะมิโน

4.3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบดังกล่าวนี้ หาได้โดยวิธีของ Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบจำพวกฟีนอล โดยสารละลาย Folin-Ciocalteu ในภาวะที่เป็นเบสให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิคที่วัดได้ทั้งหมดในตัวอย่าง (Athukorala, Kim และ Jeon, 2006) ได้ผลทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณสารประกอบดังกล่าวที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p > 0.05) ทั้งนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อปริมาณค่าดังกล่าว สังเกตได้จากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ (ตารางที่ 4.2) Ribeiro, Barreto และ Coelho (2013) พบว่าเอนไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิคจาก flaxseed (*Linum usitatissimum*) meal โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้โปรตีนย่อยสลายได้เร็วขึ้น ส่งผลให้สารประกอบดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น ดังนั้นอาจสรุปได้ว่านอกจากเพปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระแล้ว ยังมีสารประกอบฟีนอลิคอีกกลุ่มหนึ่งที่ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีสมบัติการต้านออกซิเดชันได้ และจากผลวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชันด้านต่าง ๆ ที่แสดงไว้นั้น จะเห็นได้ว่าสมบัติและกลไกในการต้านออกซิเดชัน อาจเกิดได้จากสารทั้งสองกลุ่ม กล่าวคือสารประกอบฟีนอลิคที่มีอยู่ดั้งเดิมในเนื้อเยื่อถั่วอะซูกิทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และสารประกอบพวกเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นหลังการย่อย และดูเหมือนว่าจะมีอิทธิพลจากสารทั้งสองกลุ่มร่วมกันที่แสดงออกมาในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้หากต้องการได้อิทธิพลจาก

สารกลุ่มแรกมาก ก็อาจต้องการให้เกิดการย่อยสลายน้อย แต่ในทางตรงกันข้าม หากต้องการผลหรือฤทธิ์จากสารกลุ่มที่สองมาก ก็ควรย่อยสลายถั่วอะซูกิให้มากขึ้น

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (mg GAE/g) ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)				$\bar{x}^{ns}$ ± S.D.
	1	3	5	7	
1	43.36±3.58	44.10±0.35	44.69±1.65	46.23±1.34	44.60±1.22
2	40.86±3.56	40.66±4.78	45.21±0.47	45.98±3.20	43.18±2.81
3	40.17±0.61	39.36±3.67	39.61±0.69	44.24±3.68	40.85±2.29
4	40.45±3.99	40.45±3.07	42.75±3.78	44.68±2.48	42.08±2.04
$\bar{x}$ ± S.D.	41.21^{b}±1.46	41.14^{b}±2.05	43.07^{ab}±2.53	45.28^{a}±0.97	-

^{a,b} ค่าเฉลี่ย($\bar{x}$ ± S.D.) ในแนวนอนที่มีอักษรกำกับไว้ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05)

^{ns} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p > 0.05)

จากผลการวิเคราะห์ที่ผ่านมาทั้งหมดทั้งโดยระดับการย่อยและสมบัติการออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ รวมทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ จึงใช้ข้อมูลดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่จะนำตัวอย่างไฮโดรไลเสต (ของเหลว) ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ และศึกษาการทำแห้ง โดยวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตของเหลวและตัวอย่างผง รวมทั้งสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่เตรียมได้ ซึ่งตัวอย่างที่เลือกและนำมาศึกษาต่อเป็นตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 1 % และย่อยนาน 1 ชั่วโมง และตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 7 % และย่อยนาน 4 ชั่วโมง ดังจะได้กล่าวถึงรายละเอียดและผลการวิเคราะห์ต่อไป

4.4 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ (ของเหลว) ด้วยเทคนิค HPLC จะเห็นได้ว่า กรดอะมิโนอิสระรวมในตัวอย่างทั้งสองมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 3.4 เท่า (ตารางที่ 4.3) ตามความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย กล่าวคือ การเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยนานขึ้นทำให้เกิดการย่อยที่มากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น ซึ่งบางชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น histidine, tyrosine, methionine และ lysine ทั้งที่อยู่ในรูปอิสระหรือในโมเลกุลของสายเพปไทด์ (Chen และคณะ, 1996) ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.2, 3.6, 3.2 และ 3.6 เท่า ตามลำดับสำหรับตัวอย่างทั้งสอง สำหรับปริมาณรวมของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) ในตัวอย่างแรกและตัวอย่างที่สองเท่ากับ 97.98 และ 333.46 mg/100 ml ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนอิสระในกลุ่มดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับอิออนของโลหะ ซึ่งจะส่งอิทธิพลกับสมบัติการต้านออกซิเดชัน (Pownall, Udennigwe และ Aluko, 2010) ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้ อย่างไรก็ตามสัดส่วนของปริมาณ hydrophobic amino acids ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างทั้งสองแทบจะไม่เปลี่ยนแปลง (41.3 และ 41.2 %) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณของกรดอะมิโนกลุ่มนี้ที่มีอยู่ในแต่ละตัวอย่าง ส่งอิทธิพลต่อการต้านออกซิเดชัน หากมีปริมาณมากก็จะยิ่งออกฤทธิ์ได้มาก

ตารางที่ 4.3 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเสต

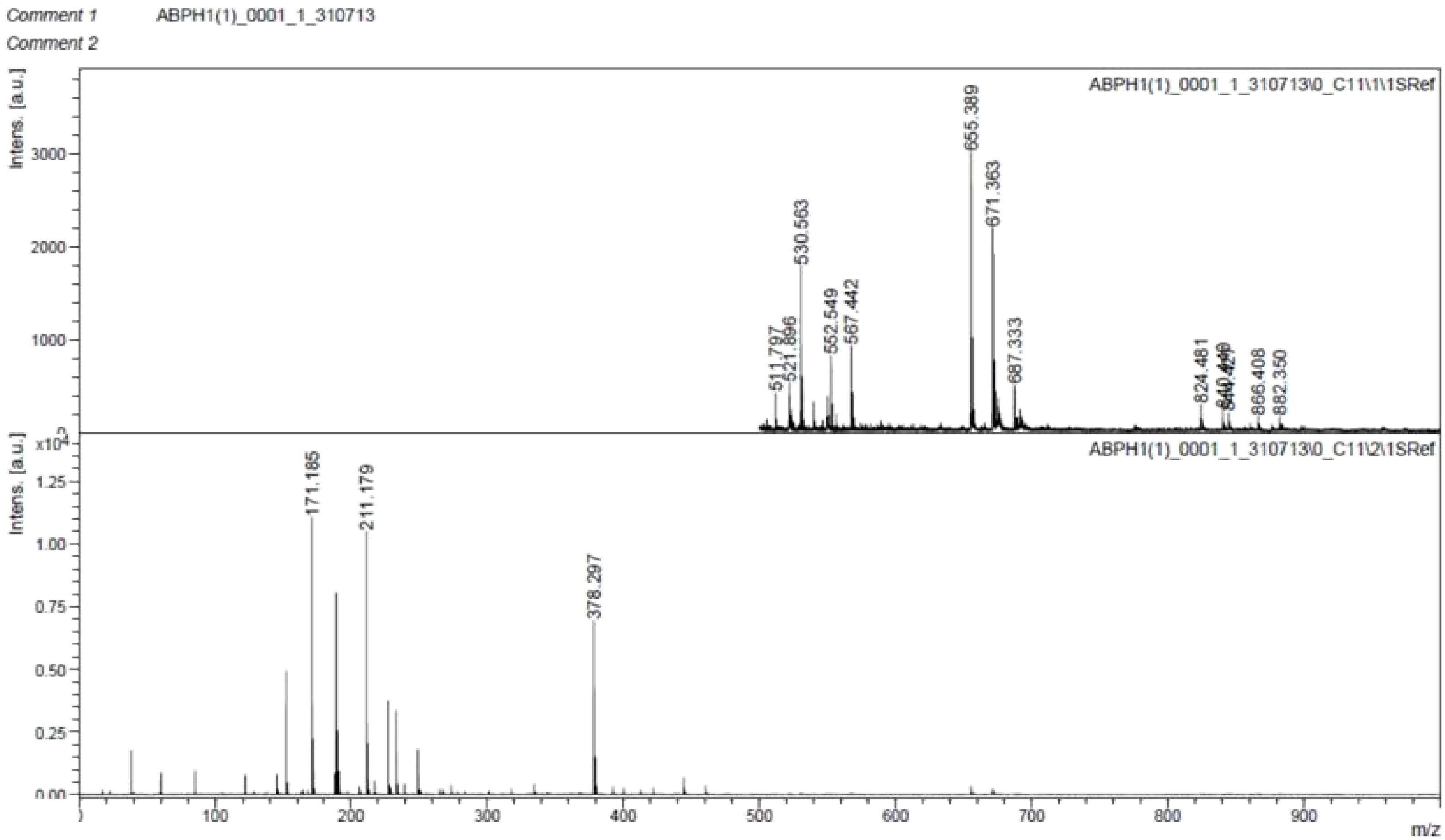
ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (mg/100 ml.)	
	ตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้น 1 % นาน 1 ชั่วโมง	ตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้น 7 % นาน 4 ชั่วโมง
Aspartic acid	12.06	37.25
Serine	13.07	53.03
Glutamic acid	16.27	70.45
Glycine	5.06	21.89
Histidine	7.96	33.23
Arginine	37.72	93.56
Threonine	11.59	41.21
Alanine*	14.02	42.64
Proline*	1.99	8.83
Cysteine	3.51	12.25
Tyrosine	12.56	44.61
Valine*	18.74	62.41
Methionine*	6.13	19.75
Lysine	19.25	68.33
Isoleucine*	13.44	47.11
Leucine*	25.04	87.26
Phenylalanine*	18.62	65.46
รวม	237.03	809.27

* Hydrophobic amino acids

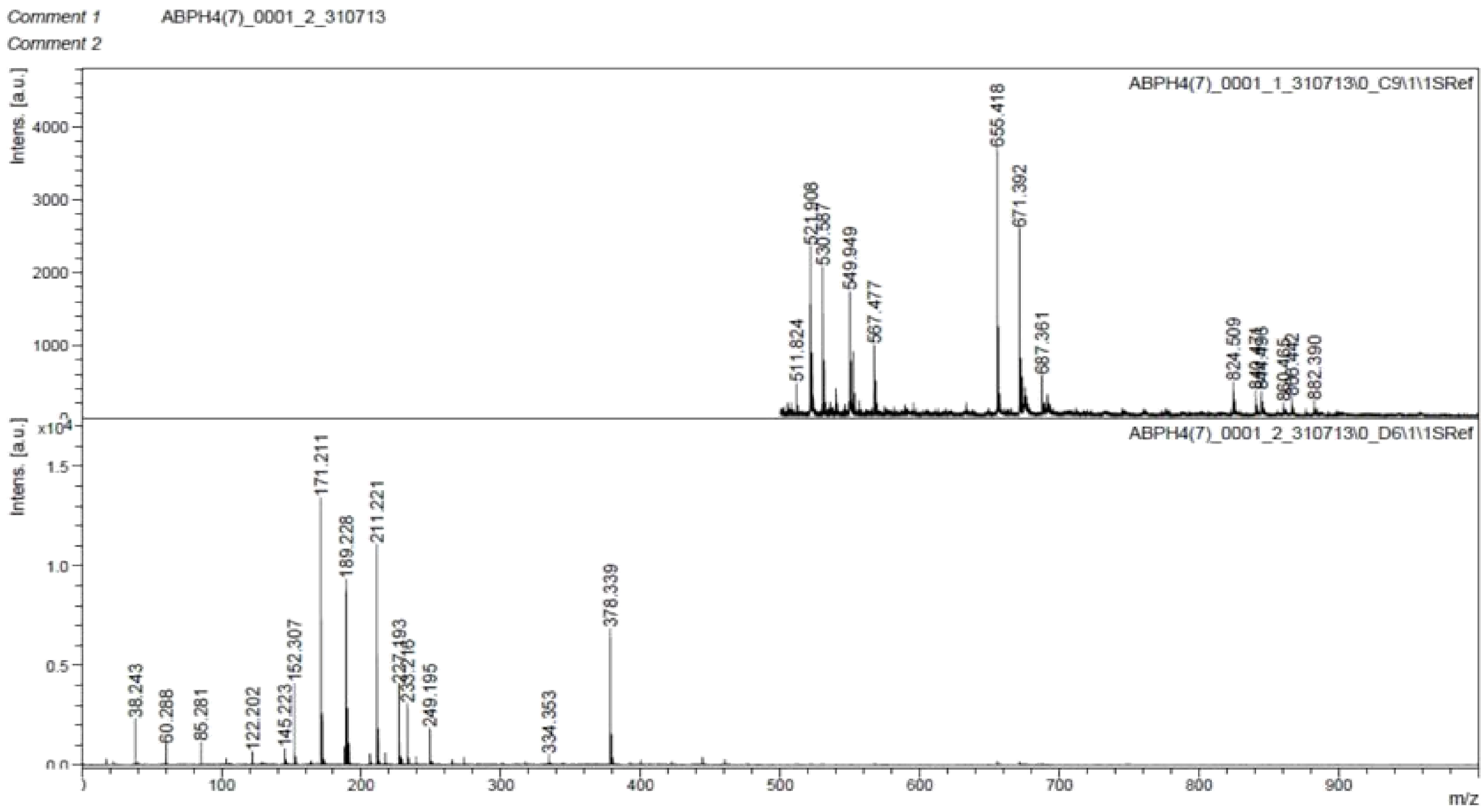
4.5 ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ

การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยวิธี MALDI-TOF พบว่า ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์อยู่ระหว่าง 171-882 Da สำหรับตัวอย่างแรก (ระดับการย่อยสลายน้อย) (รูปที่ 4.6) และ 38-882 Da สำหรับตัวอย่างที่สอง (ระดับการย่อยสลายมาก) (รูปที่ 4.7) ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวอย่างทั้งสองประกอบด้วยเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 1000 Da

Li และคณะ (2008b) ได้ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก chickpea พบว่า ไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลของเพปไทด์อยู่ระหว่าง 220-940 Da จะมีสมบัติการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลของเพปไทด์สูง ๆ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลของเพปไทด์อยู่ระหว่าง 500-1500 Da จะมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 500 Da และที่สูงกว่า 1500 Da (Li, Han และ Chen, 2008a; Sarmadi และ Ismail, 2010) ดังนั้นจากผลวิเคราะห์ที่ได้สำหรับงานวิจัยนี้ จึงแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้ทั้งสองตัวอย่าง มีขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ที่ใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ตามที่อ้างไว้ในงานวิจัยอื่น ๆ แต่ทั้งนี้ สมบัติดังกล่าวก็ยังขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่มีอยู่รวมทั้งการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเพปไทด์อีกด้วย (Jun และคณะ, 2004; Yokomizo, Takenaka และ Takenaka, 2002)



รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมแสดงขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 1 % นาน 1 ชั่วโมง



รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมแสดงขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 7 % นาน 4 ชั่วโมง

4.6 สมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตก่อนและหลังทำแห้ง

ตารางที่ 4.4 Antioxidant activity ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสต		% Scavenging activity	% Chelating effect	FRAP (μmol TE/g)	TPC (mg GAE/g)
ก่อนทำแห้ง	ย่อยด้วย 1 % เอนไซม์ นาน 1 ชม.	38.93[a]±1.22	48.02[b]±0.22	28.11[b]±0.40	26.69[a]±3.51
	ย่อยด้วย 7 % เอนไซม์ นาน 4 ชม.	19.74[b]±0.66	58.30[a]±3.31	22.67[c]±0.34	22.54[a]±0.06
หลังทำแห้ง	ย่อยด้วย 1 % เอนไซม์ นาน 1 ชม.	37.07[a]±0.50	17.57[d]±1.90	27.45[b]±0.40	2.22[b]±0.03
	ย่อยด้วย 7 % เอนไซม์ นาน 4 ชม.	18.18[b]±0.50	36.49[c]±1.90	31.72[a]±0.06	3.75[b]±0.01

[a, b ...] ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$ ± S.D.) ในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับไว้ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการทำแห้ง (ของเหลว) ดังตารางที่ 4.4 พบว่า % scavenging activity ของแต่ละตัวอย่างทั้งก่อนและหลังทำแห้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับ % chelating effect, ค่า FRAP (μmol TE/g) และค่า TPC (mg GAE/g) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า % scavenging activity, % chelating effect และค่า TPC ลดลงหลังการทำแห้ง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากความร้อนในกระบวนการทำแห้งทำให้เกิดการสูญเสียกรดอะมิโนและ/หรือสารประกอบฟีนอลิคที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันผ่านกลไกต่าง ๆ ไปได้ (Belitz และคณะ, 2009; Shahidi และ Naczk, 1995) แต่ค่า FRAP มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากความร้อนในการทำแห้ง ทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้

จากปฏิกิริยาดังกล่าว (Maillard reaction products) ออกฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ จากงานวิจัยของ Zulkifli และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาผลของความร้อนในการทำแห้งด้วยลมร้อนที่มีต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของเปลือก *Citrus sinensis* var. Navel แล้ววิเคราะห์สมบัติดังกล่าวด้วยวิธี FRAP พบว่า ค่าดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากการทำแห้ง

4.7 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง

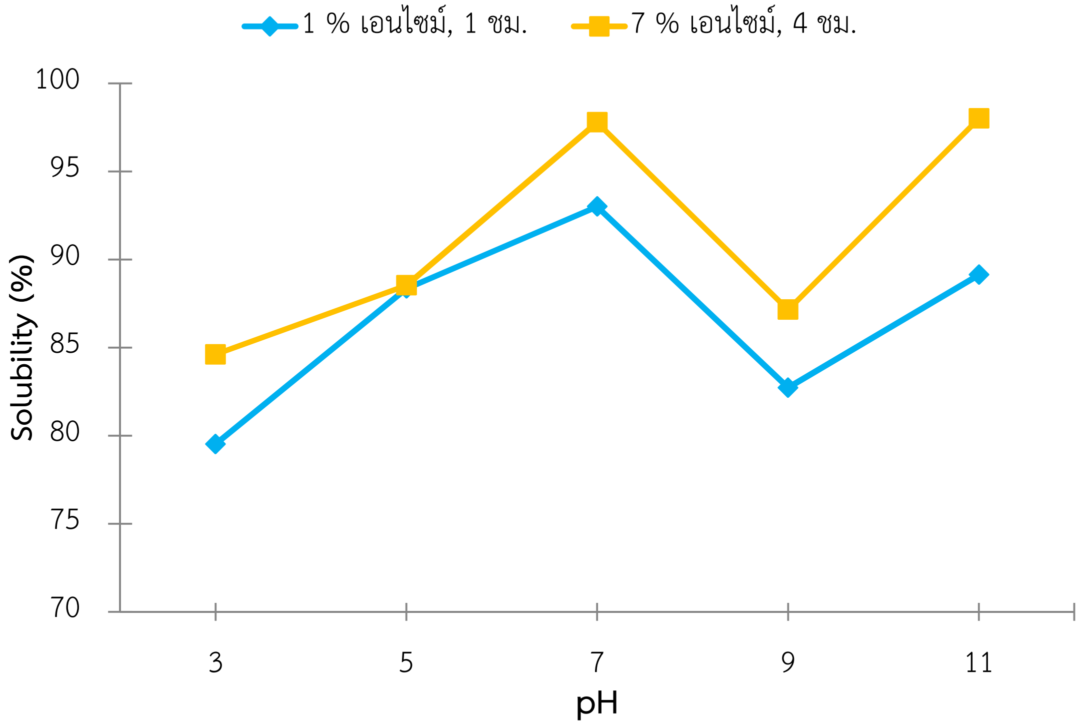
4.7.1 ความสามารถในการละลาย

สำหรับความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ (รูปที่ 4.8) นั้น พบว่า ที่แต่ละ pH ตัวอย่างทั้งสองมีค่าดังกล่าวมากกว่า 80 % โดยตัวอย่างที่มีระดับการย่อยสูงมีความสามารถในการละลายที่มากกว่าตัวอย่างที่มีระดับการย่อยต่ำ เนื่องจากมีระดับการย่อยที่สูงกว่า เพราะค่าดังกล่าวจะมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน กล่าวคือ ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เกิดจากขนาดของโมเลกุลเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง ส่งผลให้มีหมู่ที่ชอบน้ำหรือหมู่ที่มีขั้วเผยออกมาด้านนอกโครงสร้างของโมเลกุลได้มากขึ้น ทำให้เกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดี ดังนั้นความสามารถในการละลายจึงมีค่าที่มากกว่า (Nielsen, 1997)

Kim, Park และ Rhee (1990) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลือง พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยจะส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงทำให้มีความสามารถในการละลายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในระหว่างการย่อยโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุของโมเลกุลที่อยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยประจุดังกล่าวจะเกิดอันตรกิริยากับกับประจุของน้ำ ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการละลายเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้แล้วชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย (Hamada, 2000)

Chen และคณะ (2012) ได้ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยที่มีต่อสมบัติเชิงหน้าที่และสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ขาว พบว่า ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นมากกว่า 75 % เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับไข่ข่าวที่ไม่ผ่านการย่อย เพราะว่าในการย่อยด้วยเอนไซม์จะส่งผลต่อขนาดของโมเลกุลของ

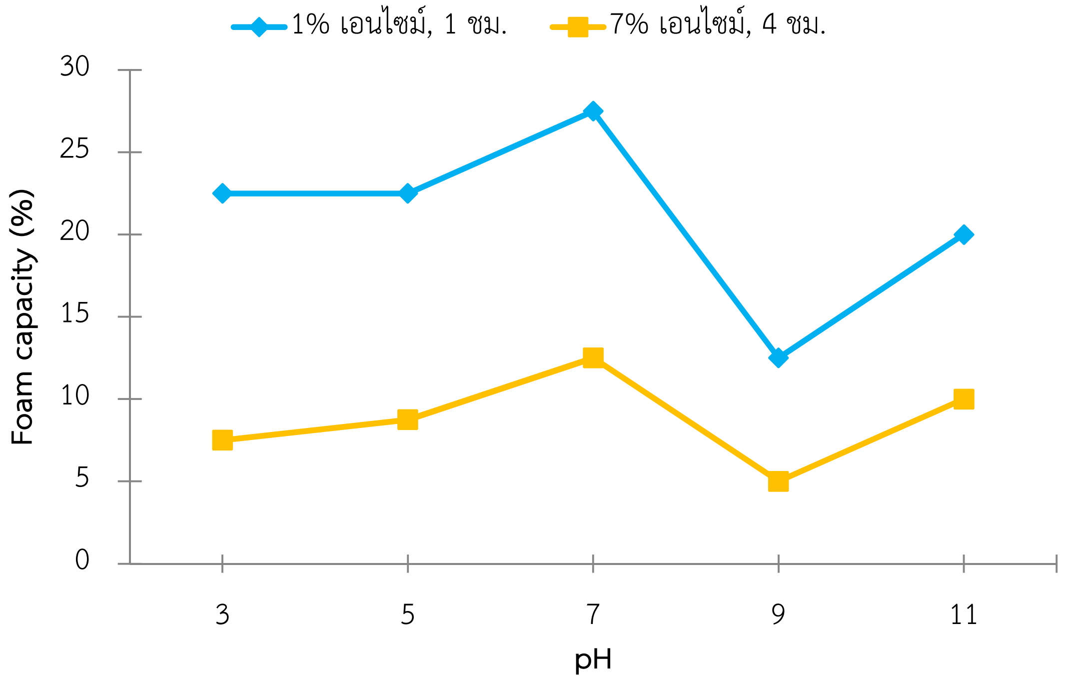
เพปไทด์ที่ย่อยสลายออกมา และ hydrophobicity ลดลง พร้อมทั้งเกิดหมู่ที่มีขั้วขึ้นในโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำอย่างแข็งแรง ดังนั้นจึงสามารถที่จะละลายน้ำได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์



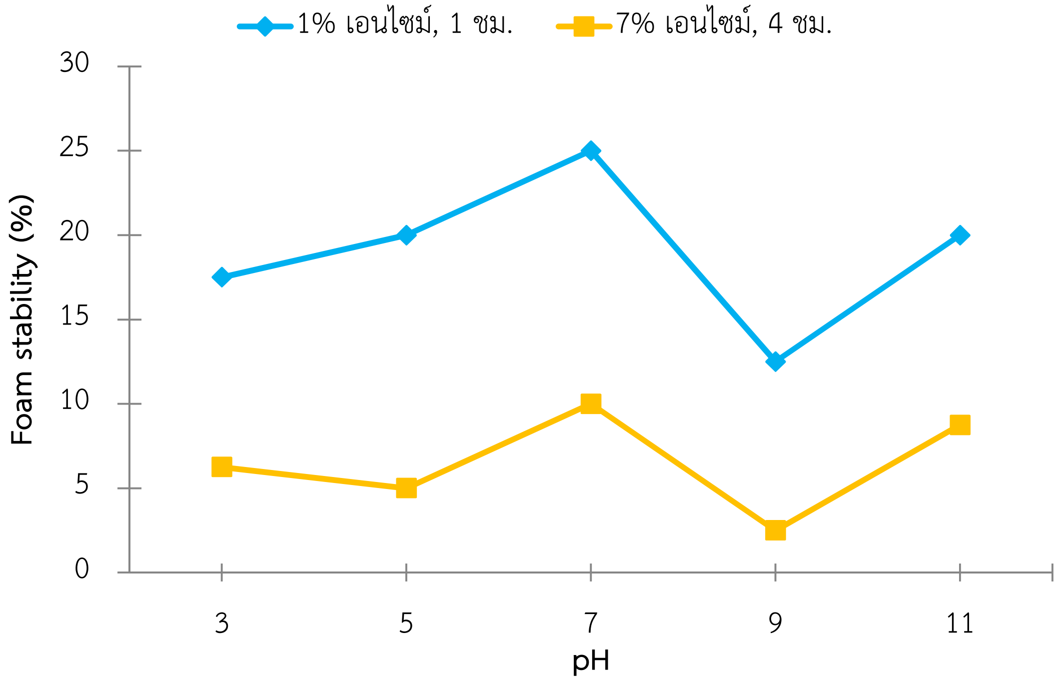
รูปที่ 4.8 ค่าความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ

4.7.2 สมบัติการเกิดโฟม

การวิเคราะห์สมบัติดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง รายงานออกมาเป็นค่าความสามารถในการเกิดโฟม (foaming capacity: FC) และค่าความคงตัวหรือเสถียรภาพของโฟม (foam stability: FS) ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ที่แต่ละ pH นั้น ตัวอย่างแรกซึ่งมีระดับการย่อยสลายที่น้อย มีค่าทั้งสองดังกล่าวที่มากกว่าตัวอย่างที่สอง ซึ่งมีระดับการย่อยสลายที่สูงกว่า ส่งผลให้ไฮโดรไลเสตที่ได้ประกอบด้วยขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ที่ใหญ่กว่า จึงทำให้มีความสามารถที่จะไปห่อหุ้มอนุภาคของอากาศไว้ได้ดีและทั่วถึงกว่า ทั้งนี้ค่า FC และค่า FS ที่ได้ จะขึ้นอยู่กับระดับการย่อย และขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ (Caessens และคณะ, 1999; Ven และคณะ, 2002)



รูปที่ 4.9 ค่า foam capacity (FC) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ



รูปที่ 4.10 ค่า foam stability (FS) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ

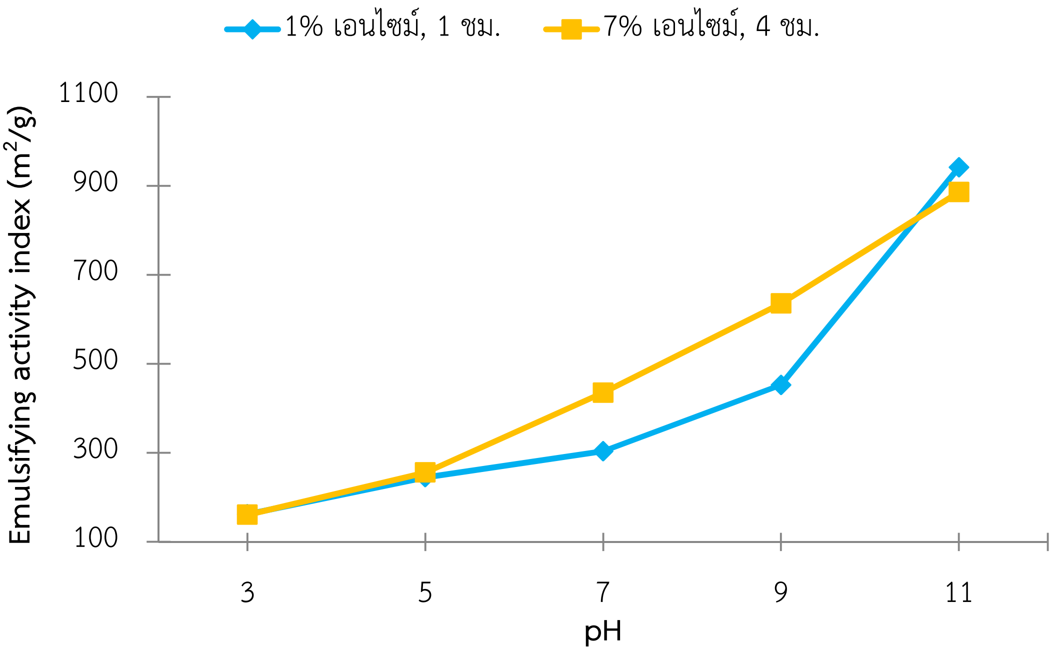
Betancur-Ancona และคณะ (2009) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดถั่ว *Phaseolus lunatus* ที่ย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิด คือ Alcalase® และ Flavourzyme® พบว่า ค่า FC และค่า FS ของตัวอย่างทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามค่าระดับการย่อยที่ลดลงเช่นเดียวกัน โดยอธิบายไว้ว่าขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ที่เล็กลงและการเกิดหมู่ไม่ชอบน้ำที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลต่อค่าทั้งสอง นอกจากนี้ยังเกิดจากประจุรวมของโปรตีนหรือเพปไทด์ที่เป็นประจุลบเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

เมื่อพิจารณาผลของ pH ที่มีต่อความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดโฟม และเสถียรภาพของโฟม พบว่า ค่าที่วิเคราะห์ได้ดังกล่าวมีค่าสูงกว่าที่ pH 7 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ เนื่องจากโปรตีนหรือเพปไทด์มีประจุรวม (net charge) ที่ดีขึ้นและมีหมู่ที่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น (Tsoukala และคณะ, 2006) แต่ในทางกลับกันที่ pH 9 ค่าดังกล่าวมีค่าลดลง ทั้งนี้ Barac และคณะ (2012) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดถั่ว *Pisum sativum* L. ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ papain และ commercial protease พบว่า ที่ pH 8 ตัวอย่างที่ย่อยด้วย papain มีความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดโฟม และเสถียรภาพของโฟมที่ดีกว่าที่ pH อื่น ๆ ดังนั้นค่า pH ของตัวอย่างจะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ดังกล่าว เพราะฉะนั้นในการพิจารณาเพื่อการประยุกต์ใช้ ต้องคำนึงถึงค่า pH ของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้ด้วย

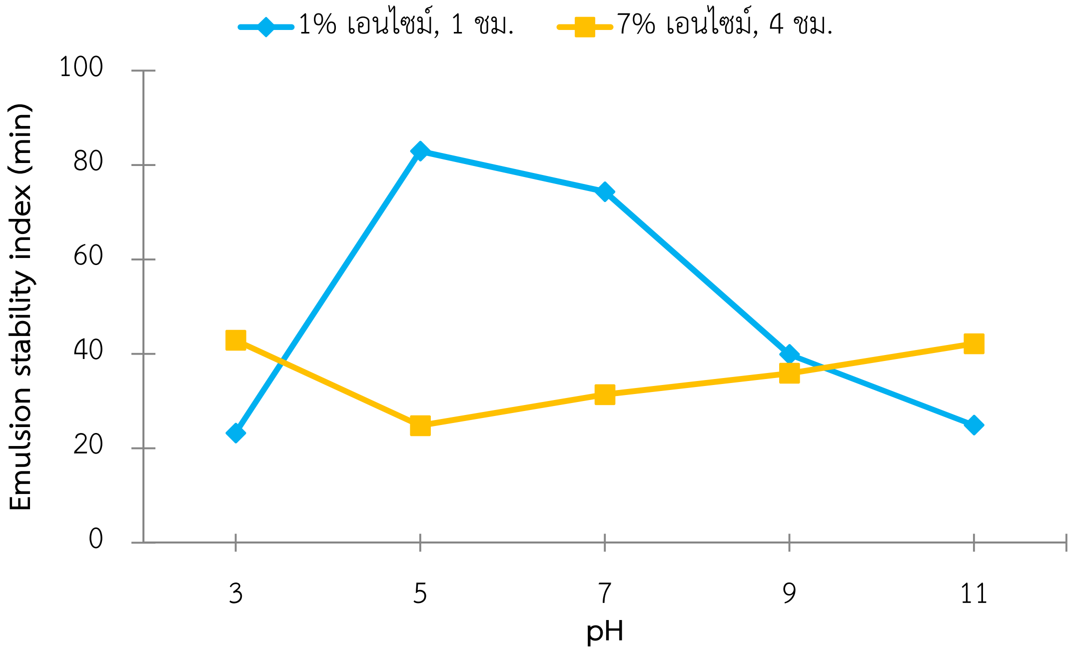
4.7.3 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผง ที่ pH ต่าง ๆ ได้รายงานเป็นค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟหรือ emulsifying activity index (EAI) และค่าความคงตัวของอิมัลชันหรือ emulsion stability index (ESI) ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์สมบัติดังกล่าว พบว่า ตัวอย่างที่สองมีค่า EAI สูงกว่าตัวอย่างแรกในช่วง pH 5-9 เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีระดับการย่อยที่สูงกว่า จึงทำให้เกิดเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระขึ้นมากกว่า ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่ไปยังผิวหน้าระหว่างน้ำมันกับน้ำ (oil-water interface) เพื่อรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันในลักษณะอิมัลชันได้อย่างรวดเร็ว (Matsumura และ Matsumiya, 2012) สำหรับค่า ESI นั้นตัวอย่างแรกมีค่าที่สูงกว่าตัวอย่างที่สอง ซึ่งน่าจะเกิดจากเพปไทด์ต่าง ๆ ที่มี

ในตัวอย่างแรกนี้มีแบบทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุล หรือประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดสมบัติที่เป็น amphiphilic ขึ้นได้อย่างเพียงพอ จึงทำให้เกิดความเสถียรของอิมัลชันได้ (Chobert, Bertrand-Harb และ Nicolas, 1988)



รูปที่ 4.11 ค่า emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ



รูปที่ 4.12 ค่า emulsion stability index (ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงที่ pH ต่าง ๆ

Qi, Hettiarachchy และ Kalapathy (1997) ศึกษาความสามารถในการละลายและสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วย pancreatin พบว่า เมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ค่า EAI มีค่าเพิ่มขึ้นตาม ซึ่งเกิดจากสายเพปไทด์เผยหมู่ hydrophobic ออกมาภายนอกโมเลกุล จึงทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและไขมัน แต่สำหรับค่า ESI มีค่าลดลงเนื่องจากการรวมตัวหรือเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันของเพปไทด์สายสั้น ๆ แล้วเกิดเป็นฟิล์มที่ cohesive ซึ่งทำให้ความหนืดใน continuous phase ลดลง ดังนั้นความคงตัวของอิมัลชันจึงลดลง

อนึ่ง Guan และคณะ (2007) ได้อธิบายว่า เสถียรภาพของไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลาย oat bran protein concentrate ด้วย trypsin จะลดลงตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น โดยมีสาเหตุจากปริมาณเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่เพิ่มขึ้น ไม่สามารถโอบล้อมอนุภาคน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ถึงแม้จะเคลื่อนที่ได้รวดเร็วและทำให้เกิดอิมัลชันได้ดีในช่วงเริ่มต้นของการเกิดระบบอิมัลชัน) จึงกลับมารวมตัว (coalesce) กันใหม่ จึงทำให้เสถียรภาพลดลง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้ ดังนั้นจึงเลือกภาวะของการย่อยมา 2 ภาวะ คือ ภาวะที่ย่อยสลายน้อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 1 % ย่อย 1 ชั่วโมง (DH=31.46 %) และภาวะที่ย่อยสลายมากด้วยเอนไซม์เข้มข้น 7 % ย่อย 4 ชั่วโมง (DH=47.94 %) เพื่อศึกษาสมบัติด้าน ต่าง ๆ รวมทั้งสมบัติเชิงหน้าที่และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้ พบว่า ตัวอย่างแรกมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยกว่า และโมเลกุลของเพปไทด์มีขนาดใหญ่กว่าตัวอย่างที่สอง ซึ่งจะส่งผลต่อสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายยังมีผลต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต สำหรับสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ พบว่า ตัวอย่างผงที่ได้จากระดับการย่อยสูงมีค่าความสามารถในการละลายและค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟที่ดีกว่า แต่ค่าความสามารถในการเกิดโฟม เสถียรภาพของโฟมและของอิมัลชันน้อยกว่าตัวอย่างที่มีระดับการย่อยต่ำ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่มีระดับการย่อยที่เหมาะสม จึงไม่เพียงมีแต่สมบัติการต้านออกซิเดชันที่ดีเท่านั้น แต่ยังมีสมบัติเชิงหน้าที่สำหรับการประยุกต์ใช้อย่างจำเพาะในผลิตภัณฑ์อาหาร ต่าง ๆ ได้ด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตเพื่อให้ได้สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ โดยเฉพาะชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยที่ส่งผลต่อสมบัติเหล่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย ตลอดจนการใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละประเภทต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สุทัศน์ จุลศรีไกวัล, สุมินทร์ สมุทคุปติ์, วีระชัย ศรีวัฒนพงศ์, วีรพันธ์ กันแก้ว และวิมล ปันสุภา. 2547. งานปรับปรุงพันธุ์ถั่วอะซูกิ. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มูลนิธิโครงการหลวง. 91 หน้า.

สุมินทร์ สมุทคุปติ์, Chikamori, M., สุทัศน์ จุลศรีไกวัล, อาคม กาญจนประโชติ, สุรัตน์ นักหล่อ, อรุณี วงศ์ปิยะสถิต และธีระ จารุจินดา. 2542. การวิจัยการผลิตถั่วอะซูกิในพื้นที่โครงการหลวง. การเผยแพร่ผลงานวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวง ครั้งที่ 2. มูลนิธิโครงการหลวง. หน้า 277-299.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พริ้นท์. หน้า 123-144.

ภาษาอังกฤษ

Adler-Nissen, J. 1986a. A review of food hydrolysis-Specific areas. In J. Adler-Nissen (ed.), Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers. pp. 57-109.

Adler-Nissen, J. 1986b. Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. In J. Adler-Nissen (ed.), Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers. pp. 9-24.

Amarowicz, R., Estrella, I., Hernández, T. and Troszyñska, A. 2008. Antioxidation activity of extract of adzuki bean and its fractions. *Journal of Food Lipids*, 15: 119-136.

AOAC. 2006. Cereal Foods. In W. Horwitz (ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th edition. Gaithersburg: AOAC International. pp. 1-61.

Athukorala, Y., Kim, K. N. and Jeon, Y. J. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1065-1074.

Baer, I., Calle, B. and Taylor, P. 2010. 3-MCPD in food other than soy sauce or hydrolysed vegetable protein (HVP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 443-456.

Barac, M., Cabrilo, S., Stanojevic, S., Pesic, M., Pavlicevic, M., Zlatkovic, B. and Jankovic, M. 2012. Functional properties of protein hydrolysates from pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1457-1467.

Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M. and Nunes, M. L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18-24.

Belitz, H.-D., Grosch, W. and Schieberle, P. 2009. Food Chemistry. 4^{th} ed. Berlin: Springer-Verlag. pp. 74-79.

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

Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E. and Chel-Guerrero, L. 2009. Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 128-137.

Bhandari, B. R., Datta, N., and Howes, T. 1997. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15: 671-684.

Boontha, B., Nakkuntod, J., Hirankarn, N., Chaumpluk, P. and Vilaivan, T. 2008. Multiplex mass spectrometric genotyping of single nucleotide polymorphisms employing pyrrolidinyl peptide nucleic acid in combination with ion-exchange capture. *Analytical Chemistry*, 80: 8178-8186.

Bosch, L., Alegría, A. and Farré, R. 2006. Application of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B*, 831: 176-183.

Caessens, P. W. J. R., Visser, S., Gruppen, H. and Voragen, A. G. J. 1999. β-Lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2973-2979.

Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. and Marc, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42: 1419-1428.

Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.

Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y. and Xu, W. 2012. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21: 27-34.

Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2619-2623.

Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 883-892.

Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 254-262.

Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J. and Millan, F. 1999. Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3776-3781.

Cochran,W. G. and Cox, G. M. 1992. Experimental Designs. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons. 611 p.

Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 430-441.

Folin, O. 1927. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry,* 73: 672-649.

Ghorbel, S., Souissi, N., Triki-Ellouz, Y., Dufossé, L., Guérard, F. and Nasri, M. 2005. Preparation and testing of *Sardinella* protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 33-38.

Gonzàlez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P. and Guadix, E. M. 1994. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 529-532.

Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L. and Zhang, M. 2007. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chemistry*, 101: 163-170.

Hamada, J. S. 2000. characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science*, 65: 305-310.

Hong, L. G., Wei, L. G., Liu, H. and Hui, S. Y. 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11: 281-287.

Hwang, J. –Y., Shyu, Y. –S., Wang, Y. –T. and Hsu, C. –K. 2010. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. *LWT Food Science and Technology*, 43: 285-290.

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

Jun, S., Park, P., Jung, W and Kim, S. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219: 20-26.

Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C. and Scheper, T. 2007. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 508-514.

Kartika, H., Li, Q. X., Wall, M. M., Nakamoto, S. T. and Iwaoka, W. T. 2007. Major phenolic acids and total antioxidant activity in mamaki leaves, *Pipturus albidus*. *Journal of Food Science*, 72: 696-701.

Kim, S. Y., Park, P. S-W. and Rhee, K. C. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 651-656.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102: 1317-1327.

Kong, X., Zhou, H. and Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101: 615-620.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysate: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43-81.

Kumar, P., and Mishira, H. N. 2004. Yoghurt powder-A review of process technology, storage and utilization. *Food and Bioproducts Processing*, 82: 133-142.

Li, X. X., Han, L. J. and Chen, L. J. 2008a. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 88: 1660-1666.

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

Linarès, E., Larré, C. and Popineau, Y. 2001. Freeze- or spray-dried gluten hydrolysates.1. Biochemical and emulsifying properties as a function of drying process. *Journal of Food Engineering*, 48: 127-135.

Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L. and Xia, X. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118: 403-410.

Lumpkin, T. A. and McClary, D. C. 1994. Azuki Bean: Botany, Production and Uses. Wallingford: CAB International. pp. 1-172.

Mahmoud, M. I., Malone, W. T. and Cordle, C. T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science*, 57: 1223-1229.

Marangoni, A. G. 2003. Enzyme Kinetics: A Modern Approach. New Jersey: John Wiley & Sons. pp. 41-43.

Masters, K. 1979. Spray Drying Handbook. 3rd ed. London: The Pitman Press. pp. 1-53.

Matsumura, Y. and Matsumiya, K. 2012. Proteins-peptides as emulsifying agents. In N. S. Hettiarachchy (ed.), Food Proteins and Peptides. New York: CRC Press. pp. 125-149.

Moore, G. R. P., Amante, L. R. C. E. R. and Soldi, V. 2005. Cassava and corn starch in maltodextrin production. *Quimica Nova*, 28: 596-600.

Moreno, M. C. M. and Cuadrado, V. F. 1993. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, 28: 481-490.

Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N. and Berdutina, A. V. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36: 452-459.

Nielsen, P. M. 1997. Functionality of protein hydrolysates. In S. Damodaran and A. Paraf (eds.), Food Proteins and their Applications. New York: CRC Press. pp. 443-472.

Nielsen, P. M., Petersen, D. and Dhambmann. C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66: 642-646.

Nwokolo, E. and Smartt, J. 1996. Food and Feed from Legumes and Oilseeds. London: Chapman and Hall. pp. 206-207.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3122-3128.

Palmer, T. 1995. An introduction to bioenergetics, catalysis and kinetics. In: Understanding Enzymes. Hertfordshire: Prentice Hall. pp. 87-105.

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

Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356.

Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. J. 2008. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109: 104-112.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. V. and Gordon, M. 2001. Antioxidants in Food. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 380 p.

Ponnampalam , R., Goulet, G., Amiot, J. and Brisson, G. J. 1987. Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 279-285.

Pownall, T. L., Udennigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 4712-4718.

Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Qi, M., Hettiarachchy, N. S. and Kalapathy, U. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin, *Journal of Food Science*, 62: 1110-1115.

Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Source and methods of evaluation. In D. L. Madhavi, S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe (eds.), Food Antioxidants Technological, Toxicological and Health Perspectives. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 65-157.

Ribeiro, B. D., Barreto, D. W. and Coelho, M. A. Z. 2013. Enzyme-enhanced extraction of phenolic compounds and proteins from flaxseed meal. *Biotechnology*, http://dx.doi.org/ 10.5402/2013/ 521067

Rutherfurd, S. M. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *Journal of AOAC International*, 93: 1515-1522.

Sarmadi, B. H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31: 1949-1956.

Sathe, S. K., and Salunkhe, D. K. 1981. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science*, 46: 71-74.

Shahidi, F. and Naczk, M. 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 13-17.

Sikorski, Z. E. 2001. Chemical and Functional Properties of Food Proteins. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 113-132.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. and Kaul, P. 2007. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101: 1484-1491.

Tang, C. –H., Peng, J., Zhen, D. –W. and Chen, Z. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 115: 672-678.

Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103: 1385-1394.

Tiyawalee, D. 1978. Legumes for highland. Final report to ARS, USDA, February 1978, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand. 222 p.

Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G. and Betancur-Ancona, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT Food Science and Technology*, 42: 1597-1604.

Tsoukala, A., Papalamprou, E., Makri, E., Doxastakis, G. and Braudo, E. E. 2006. Adsorption at the air-water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53: 203-208.

Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. 1994. Antioxidative pigments isolated from the seeds *of Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 248-251.

Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. and Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT Food Science and Technology*, 38: 255-261.

Ven, C. V. D., Gruppen, H., Bont, D. B. A. D. and Voragen, A. G. J. 2002. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2938-2946.

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. and Millán, F. 2001. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52: 132-136.

Waterhouse, A. L. 2008. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith and P, Sporn (eds.), Handbook of Food Analytical Chemistry, Vol. 2, Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons. pp. 463-464.

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

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111: 370-376.

Yang, B., Zhao, M., Shi, J., Yang, N. and Jiang, Y. 2008. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chemistry*, 106: 685-690.

Yokomizo, A., Takenaka, Y. and Takenaka, T. 2002. Antioxidative activity of peptides prepared from Okara protein. *Food Science and Technology Research*, 8: 357-359.

Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N. and Mizushina, Y. 2009. Characteristics of lipid components, fatty acid distributions and triacylglycerol molecular species of adzuki beans (*Vigna angularis*). *Food Chemistry*, 115: 1424-1429.

Yousif, A. M., Deeth, H. C., Caffin, N. A. and Lisle, A. T. 2002. Effect of storage time and conditions on the hardness and cooking quality of adzuki (*Vigna angularis*). *LWT Food Science and Technology*, 35: 338-343.

Yust, M. M., Pedroche, J., Millán-Linares, M. C., Alcaide-Hidalgo, J. M. and Millán, F. 2010. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, 122: 1212-1217.

Zhang, Y., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Qi, X. and Qian, H. 2011. Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *European Food Research and Technology*, 232: 941-950.

Zulkifli, K. S., Abdullah, N., Abdullah, A., Kamarudin, W. S. S. W. and Aziman, N. 2012. Effect of heat-drying on antioxidant activity of selected fruit peels. In Conferences of Colloquium on Humanities, Science and Engineering Research (CHUSER 2012). December 3-4, 2012 at Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก 1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้อบลมร้อน
- ถ้วยอะลูมิเนียม
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เดซิคเคเตอร์

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ให้ได้ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมซึ่งอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำเข้าไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100±2 °C โดยเปิดฝาถ้วยอะลูมิเนียมเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงปิดฝาถ้วยอะลูมิเนียมในขณะที่ยังอยู่ในตู้อบ เอาออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่ของตัวอย่างภายหลังการอบแห้ง คำนวณปริมาณความชื้นดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100\ \%$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง (กรัม)

ก 2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องย่อยโปรตีน (BÜCHI digestion unit)

- หลอดย่อยโปรตีน (BÜCHI digestion tube)
- เครื่องดูดควันกรด (BÜCHI scrubber unit)
- เครื่องกลั่นหาปริมาณไนโตรเจน (BÜCHI distillation unit)
- Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- burette ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- สารเร่งปฏิกิริยา (selenium reagent mixture)
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 45 %
- สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 4 %
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์
- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ (ใช้ในการ standardize เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์)
- สารละลายอินดิเคเตอร์ (เมทิลเรด 0.1 %) โดยละลายเมทิลเรด 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 2 กรัม ใส่ลงในหลอดกลั่น เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร จากนั้นต่อหลอดกลั่นเข้ากับชุดเครื่องย่อยโปรตีน แล้วย่อยที่ความร้อนระดับ 8 เป็นเวลา 30 นาทีจนได้สารละลายสีน้ำตาลใส ทิ้งไว้ให้เย็นและไม่มีไอกรดหลงเหลืออยู่ จากนั้นต่อหลอดย่อยเข้ากับชุดเครื่องกลั่น ทั้งนี้เติมสารละลายบอริก 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อรองรับสิ่งที่กลั่นได้ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 % ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างและกลั่น เป็นเวลา 5 นาที นำสิ่งที่กลั่นได้ มาไตเตรตกับ สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูที่จุดยุติ ทำ blank โดย

การใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (N)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1.4}{W} \times 100\ \%$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = N \times 6.25\ \%$$

เมื่อ V_a คือ ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

V_b คือ ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรต blank

M คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

W คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

ก 3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2006)

เครื่องมือ และอุปกรณ์

- Soxhlet system
- เครื่อง rotary evaporator
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- thimble
- ขวดก้นกลม
- ตู้อบลมร้อน

สารเคมี

- petroleum ether

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างที่อบแห้ง 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษ Whatman No. 1 ใส่ใน thimble (โดยตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) แล้วนำ thimble ใส่ใน extraction unit ของ Soxhlet system จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของขวดก้นกลม และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดก้นกลม 200 มิลลิลิตร ต่อขวดก้นกลมเข้ากับ extraction unit และให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับ 3 ของเตาให้ความร้อน สกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย และ นำขวดก้นกลมนี้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของขวด (+ ไขมัน) แล้วคำนวณร้อยละของปริมาณไขมันตามสมการ

$$\text{ปริมาณไขมัน} = \left(\frac{W_2}{W_1}\right) \times 100\ \%$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

ก 4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ถ้วยครูซิเบิล
- เตาเผา (muffle furnace)
- hot plate
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เดซิคเคเตอร์

วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยครูซิเบิลที่อุณหภุมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 3-5 กรัม ใส่ลงในถ้วยครูซิเบิล และเผาตัวอย่างพร้อมถ้วยครูซิเบิลบน hot plate จนกระทั่งหมดควัน และนำเข้าไปเผาต่อในเตาเผา

ที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (หากเผาไหม้ไม่สมบูรณ์อาจต้องเพิ่มเวลาให้มากขึ้น) แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักเถ้าที่ได้และคำนวณหาปริมาณเถ้าตามสมการ

$$\text{ปริมาณเถ้า} = \left(\frac{W_2}{W_1}\right) \times 100\ \%$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

ก 5 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหาร (AOAC, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ถ้วยครูซิเบิล
- ตู้อบลมร้อน
- hot plate
- เตาเผา (muffle furnace)
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เดซิคเคเตอร์
- pH paper

สารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1.25 %
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.25 %
- เอทานอล 95 %

วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1.25 % ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วต้มจนเดือดเป็นเวลา 30 นาที (หาก

ปริมาตรของสารละลายกรดลดลงขณะต้ม ให้เติมน้ำร้อนต้มเดือดจนกระทั่งปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร) จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนต้มเดือดจนกระทั่งตัวอย่างไม่มีความเป็นกรด (ทดสอบด้วย pH paper) และนำตัวอย่างไปต้มอีกครั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.25 % ปริมาตร 200 มิลลิลิตรจนเดือด 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำร้อนต้มเดือดจนกระทั่งหมดความเป็นด่าง และล้างกากที่ได้ด้วยเอทานอล 95 % ปริมาตร 25 มิลลิลิตร รวม 2 ครั้ง แล้วอบถ้วยอะลูมิเนียมที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที และใส่ตัวอย่างที่ผ่านการต้มในสารละลายกรดและสารละลายด่าง ลงในถ้วยอะลูมิเนียม นำเข้าไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในถ้วยครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (หากเผาไหม้ไม่สมบูรณ์อาจต้องเพิ่มเวลาให้มากขึ้น) แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่คงที่อีกครั้งหนึ่ง คำนวณปริมาณเส้นใยอาหารตามสมการ

$$\text{ปริมาณเส้นใยอาหาร} = \left(\frac{W1 - W_2}{W}\right) \times 100\ \%$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว (กรัม)

W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

ก 6 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิธีการคำนวณ

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต = 100 - % (ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+เส้นใย) %

ก 7 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโดยวิธี OPA (Nielsen และคณะ, 2001)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- vortex mixer
- spectrophotometer

สารเคมี

- ortho-phthaldialdehyde (OPA reagent)
- sodium dodecyl sulfate
- di-sodium tetraborate decahydrate
- dithiothreitol (DTT) 99 %
- ethanol
- สารละลายมาตรฐาน serine

วิธีการวิเคราะห์

เตรียมสารละลาย ortho-phthaldialdehyde (OPA reagent) ด้วยการผสม di-sodium tetraborate decahydrate 7.620 กรัม และ sodium dodecyl sulfate 0.200 กรัม ละลายในน้ำ deionized (DI) 150 มิลลิลิตร จนกระทั่งสารเคมีละลายหมด จากนั้นผสม dithiothreitol (DTT) 99 % ปริมาณ 0.176 กรัม และสารละลาย OPA (ละลาย OPA 0.160 กรัม ใน ethanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร) ลงใน OPA reagent ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized จนเป็น 200 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายมาตรฐาน serine 0.050 กรัม ในน้ำ deionized 500 มิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 4 กรัม ละลายในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด OPA reagent เขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 5 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า degree of hydrolysis (DH) ตามสมการดังนี้

$$\text{Serine-NH}_2 = \left(\frac{A_{340}\text{sample - }A_{340}\text{blank}}{A_{340}\text{standard - }A_{340}\text{blank}}\right) \times 0.9516\ (\text{meqv/L}) \times \left(\frac{0.2 \times 100\ \text{L/g protein}}{X \times P}\right)$$

เมื่อ Serine-NH$_2$ = $\frac{\text{meqv serine NH}_2}{\text{g protein}}$

A_{340}sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

A_{340}blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (น้ำ deionized)

A_{340}standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน (serine)

X คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

P คือ เปอร์เซ็นต์โปรตีนของตัวอย่าง

0.2 คือ ปริมาตรของตัวอย่าง (ลิตร)

$$h = \frac{\text{Serine-NH}_2\text{-}\beta}{\alpha}$$

เมื่อ ค่า α = 0.970, β = 0.342 และ h_{tot} = 7.8

$$\text{Degree of hydrolysis} = \left(\frac{h}{h_{tot}}\right) \times 100\ \%$$

ก 8 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity

เครื่องมือและอุปกรณ์

- vortex mixer
- spectrophotometer

สารเคมี

- 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- เอทานอล 95 %

การวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชันดังกล่าวนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Xie และคณะ (2008) ดังนี้

ปิเปตสารละลายสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ % scavenging activity หรือ % inhibition ตามสมการ ดังนี้

$$\text{Scavenging activity or inhibition} = \left(1- \frac{A_{517}\text{sample}}{A_{517}\text{control}}\right) \times 100\ (\%)$$

เมื่อ A_{517} control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง

A_{517} sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

ก 9 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี metal ions chelating activity

เครื่องมือและอุปกรณ์

- vortex mixer
- spectrophotometer

สารเคมี

- iron (II) chloride ($FeCl_2$)
- Ferrozine

การวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชันดังกล่าวนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Xie และคณะ (2008) ดังนี้

ปิเปตสารละลายสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $FeCl_2$ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 3.7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer หลังจากนั้นผสมสารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ % chelating effect ตามสมการ ดังนี้

$$\text{Chelating effect} = \left(1- \frac{A_{562}\text{sample}}{A_{562}\text{control}}\right) \times 100\ (\%)$$

เมื่อ A_{562} control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง

A_{562} sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

ก 10 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- vortex mixer
- spectrophotometer
- water bath

สารเคมี

- Trolox
- methanol
- sodium acetate
- 2, 4, 6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ)
- hydrochloric acid (ใช้ปรับ pH และละลาย TPTZ)
- iron (III) chloride ($FeCl_3$)

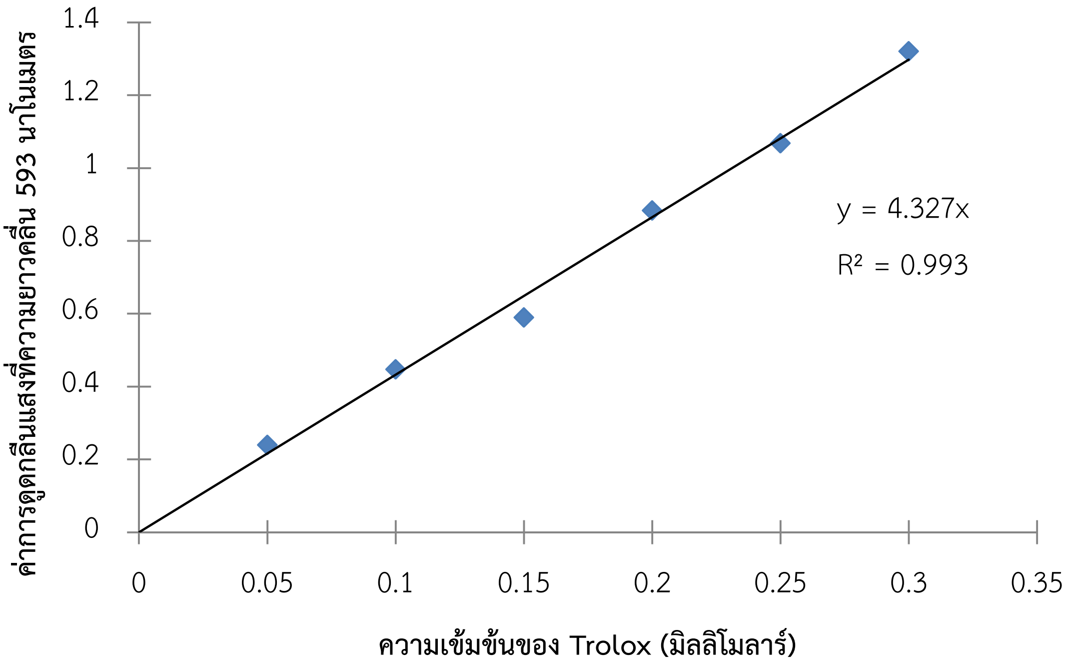
การวิเคราะห์สมบัตินี้ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1999) ดังนี้

เตรียมสารละลาย FRAP (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซีเตตเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeCl_3$ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ในหลอดทดลอง แล้วนำไปเก็บในห้องมืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสง

ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox เพื่อคำนวณหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีในตัวอย่าง

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ละลาย Trolox 0.025 กรัม ในเมทานอล แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย Trolox มา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งจะได้สารละลาย Trolox ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นำแต่ละความเข้มข้นไปวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันในด้วยวิธี FRAP เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ ก 1



รูปที่ ก 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

ก 11 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

เครื่องมือและอุปกรณ์

- spectrophotometer
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

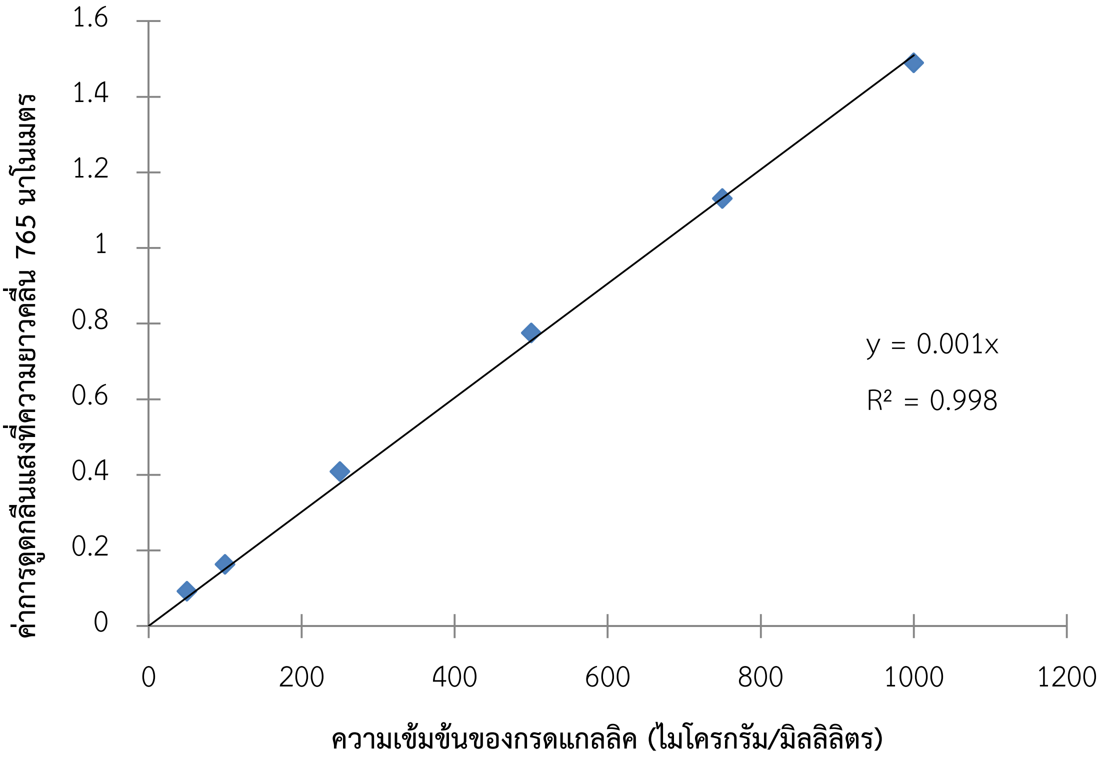
- สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent
- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว
- สารละลายมาตรฐานของ gallic acid

การวิเคราะห์สมบัติดังกล่าวนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse และคณะ (2008) ดังนี้

ปิเปตสารตัวอย่างใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร และตามด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานของ gallic acid และรายงานค่าที่ได้ในหน่วย gallic acid equivalents (GAE)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ละลาย gallic acid 0.5 กรัม ในเอทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น (จะได้สารละลาย gallic acid ที่มีความเข้มข้น 5 กรัม/ลิตร) หลังจากนั้น ปิเปตสารละลาย gallic acid ที่เตรียมไว้ปริมาณ 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกระดับด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย gallic acid ที่มีความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม/ลิตร (หรือไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ นำแต่ละความเข้มข้นไปหาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid ดังรูปที่ ก 2



รูปที่ ก 2 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

ก 12 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) (Bosch และคณะ, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- HPCL (รายละเอียดดัง ตาราง ก 1)

สารเคมี

- acetonitrile 60 %
- sodium acetate buffer
- AccQ-fluor derivertization buffer
- AccQ-fluor reagent

วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธี In-house methods based on Journal of Chromatography B ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างดังนี้ นำตัวอย่างไปเจือจางด้วยน้ำ deionized แล้วนำไปกรองผ่าน cellulose acetate membrane (13 mm, 0.85 micron) เอาส่วน filtrate ผสมกับ AccQ-fluor derivertization buffer และ AccQ-fluor reagent เพื่อ derivertize โดยทำที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 นาที

ตารางที่ ก 1 รายละเอียดของระบบ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

รายการ	รายละเอียด
HPLC System	Water Alliance 2695 with heater Jasco FP2020 fluorescence (EX:250, EM: 395 nm)
Column	Hypersil Gold column C 18 (4.6×150 mm, 3µm) Temp. 35±1 °C
Sample volume	5 µl
Eluents	Sodium acetate buffer pH 4.90±0.05 และ 60 % acetonitrile โดยมี flow rate = 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ก 13 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) (Boontha และคณะ, 2008)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)

สารเคมี

- α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)
- trifluoroacetic acid (TFA)
- acetonitrile

วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ Milli-Q 1,000 เท่าแล้วนำตัวอย่าง 1 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย matrix [ซึ่งสารละลาย matrix ประกอบด้วย CHCA ใน TFA เข้มข้น 0.1 % ในสารละลาย acetonitrile/น้ำ (ในอัตราส่วน 1:2)] ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารผสมของตัวอย่างและ matrix ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงบน target (แผ่นโลหะสำหรับวางตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์) รอจนแห้ง แล้ววิเคราะห์ขนาดของเพปไทด์โดยใช้ spectra แบบ positive ion reflectron time-of-flight ที่ความต่างศักย์ 20 kV โดยขนาดโมเลกุลที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 500-5,000 Da

ก 14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Modified Lowry (Perterson, 1977)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- spectrophotometer
- centrifuge
- vortex mixer
- water bath
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

- copper sulfate ($CuSO_4$)
- dithiothreitol (DTT) 0.1 โมลาร์
- sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6$)
- sodium carbonate (Na_2CO_3) solution 20 % (w/v)
- sodium dodecyl sulfate (SDS) stock solution 5 % (w/v)
- sodium deoxycholate solution (DOC) 0.15 % (w/v)
- sodium hydroxyide (NaOH) stock solution 0.8 โมลาร์

- trichloroacetic acid ,TCA 72 % (w/v)
- Folin-Ciocalteu reagent 2 นอร์มอล
- bovine serum albumin ,BSA (1 mg ml^{-1})
- extract solution [Tris-HCl 60 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, SDS 2 % (w/v) และ DTT 0.1 โมลาร์]
- copper-tartate-carbonate, CTC [Na_2CO_3 20 % (w/v) ผสม $CuSO_4$ 0.1 กรัม และ $KNaC_4H_4O_6$ 0.2 กรัม]

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่าง

- เตรียม reagent A โดยผสมสารละลาย CTC, SDS และ NaOH ในอัตราส่วน 1:2:1 เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง
- เตรียม reagent B โดยเจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมตัวอย่าง (การสกัดโปรตีน)

ผสมตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรกับ extract solution ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 °C ไว้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การตกตะกอนตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย DOC 0.15 % ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน micro centrifuge tube ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย trichloroacetic acid 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที หลังจากนั้นค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง และคว่ำ micro centrifuge tube ลง และเก็บตะกอนของตัวอย่างไว้ เพื่อใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การวัดค่าการดูดกลืนแสง

ผสมตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนกับ reagent A ปริมาตร 1 มิลลิลิตรให้เข้ากัน ใน micro centrifuge tube ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม reagent B

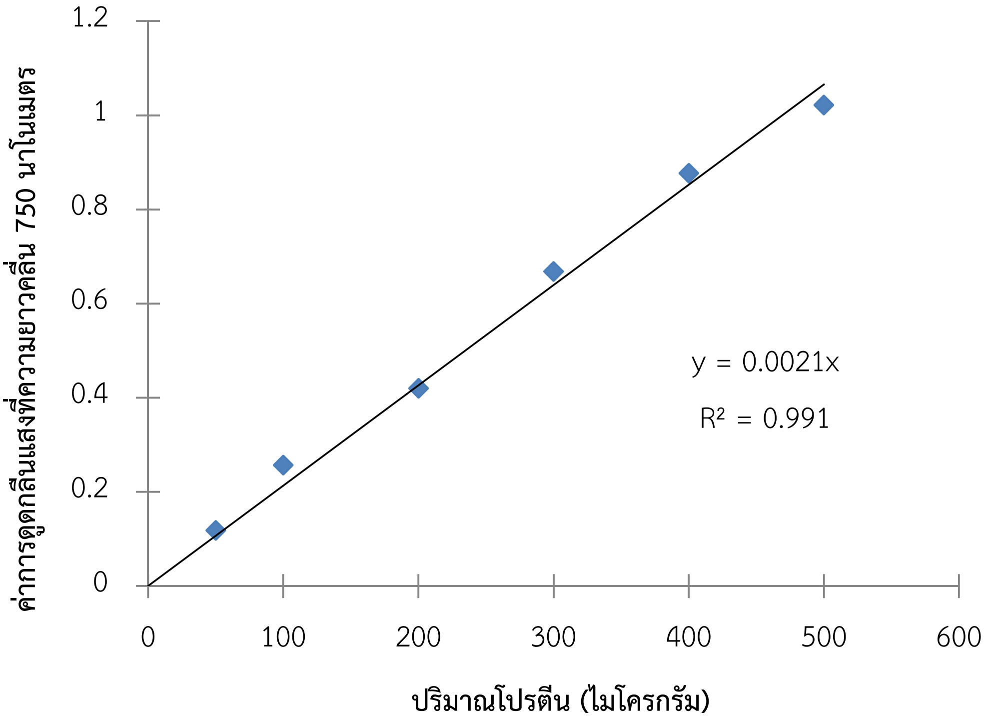
ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

ชั่ง BSA มา 0.010 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย BSA ที่เตรียมไว้มาปริมาตร 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นในระดับต่างๆ (50-500 µg ml^{-1}) ดังตาราง ก 2 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA (รูปที่ ก 3)

ตาราง ก 2 ปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA (µg ml^{-1})	ปริมาณโปรตีน (µg)
50	50
100	100
200	200
300	300
400	400
500	500



รูปที่ ก 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดลอง

ตาราง ข 1 ค่าระดับการย่อย (DH, %) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)			
	1	3	5	7
1	31.46±2.09	35.70±1.64	39.76±0.37	42.01±2.07
2	30.50±0.07	36.31±1.97	41.72±2.03	43.44±2.60
3	30.29±1.63	39.36±3.63	41.86±0.61	43.86±1.07
4	31.35±0.22	39.86±3.49	45.68±0.10	47.94± 2.28

ตาราง ข 2 ค่า Radical Scavenging activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)			
	1	3	5	7
1	38.93±1.22	33.68±1.01	30.77±1.70	26.93±2.30
2	37.28±0.21	28.74±2.70	26.69±2.78	24.99±2.37
3	36.72±0.86	23.23±2.59	22.88±2.13	21.96±1.71
4	35.88±0.94	21.22±2.96	20.14±2.87	19.74±0.66

ตาราง ข 3 ค่า Chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)			
	1	3	5	7
1	48.02±0.22	48.86±2.11	49.09±3.85	50.84±1.38
2	51.35±1.02	51.72±0.49	52.08±1.70	52.84±0.41
3	52.81±2.38	54.09±0.78	55.04±1.99	55.41±1.80
4	53.07±1.33	55.45±2.04	57.17±1.38	58.30± 3.32

ตาราง ข 4 ค่า FRAP (µmol TE/g) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)			
	1	3	5	7
1	45.80±2.95	47.66±1.39	44.71±4.55	45.41±3.11
2	49.82±0.91	46.29±2.71	47.56±2.28	47.10±1.90
3	49.27±0.79	32.87±1.87	37.38±2.50	39.82±2.16
4	42.60±4.22	45.05±0.14	46.75±0.37	44.96± 3.24

ภาคผนวก ค

ตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ค 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	949.993[a]	15	63.333	16.608	5.5×10^{-7}
Intercept	48226.086	1	48226.086	12646.573	1.3×10^{-24}
time	71.197	3	23.732	6.223	.005
con	845.678	3	281.893	73.922	1.4×10^{-9}
time * con	33.118	9	3.680	.965	.501
Error	61.014	16	3.813		
Total	49237.093	32			
Corrected Total	1011.006	31			

[a] R Squared = 0.940 (Adjusted R Squared = 0.883)

ตาราง ค 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1315.162[a]	15	87.677	21.688	7.8×10^{-8}
Intercept	25293.379	1	25293.379	6256.701	3.5×10^{-22}
time	322.513	3	107.504	26.593	1.9×10^{-6}
con	925.672	3	308.557	76.326	1.1×10^{-9}
time * con	66.978	9	7.442	1.841	.137
Error	64.682	16	4.043		
Total	26673.222	32			
Corrected Total	1379.844	31			

[a] R Squared = 0.953 (Adjusted R Squared = 0.909)

ตาราง ค 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี metal ions chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	259.083[a]	15	17.272	4.771	.002
Intercept	89502.574	1	89502.574	24720.499	6.0×10^{-27}
time	209.008	3	69.669	19.243	1.5×10^{-5}
con	39.631	3	13.210	3.649	.035
time * con	10.444	9	1.160	.321	.956
Error	57.929	16	3.621		
Total	89819.586	32			
Corrected Total	317.012	31			

[a] R Squared = 0.817 (Adjusted R Squared = 0.646)

ตาราง ค 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	599.755[a]	15	39.984	6.299	$3.5x10^{-4}$
Intercept	63563.060	1	63563.060	10014.105	$8.2x10^{-24}$
time	272.088	3	90.696	14.289	$8.7x10^{-5}$
con	65.259	3	21.753	3.427	.043
time * con	262.408	9	29.156	4.593	.004
Error	101.558	16	6.347		
Total	64264.373	32			
Corrected Total	701.313	31			

[a] R Squared = 0.855 (Adjusted R Squared = 0.719)

ตาราง ค 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อย

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	173.874[a]	15	11.592	1.353	.278
Intercept	58286.369	1	58286.369	6801.252	$1.8x10^{-22}$
time	61.097	3	20.366	2.376	.108
con	91.561	3	30.520	3.561	.038
time * con	21.216	9	2.357	.275	.973
Error	137.119	16	8.570		
Total	58597.363	32			
Corrected Total	310.994	31			

[a] R Squared = 0.559 (Adjusted R Squared = 0.146)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายทัพพสาร ใจแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 8 ตุลาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษา ภาคปลาย ปีการศึกษา 2552

การนำเสนอผลงานวิชาการ

Jaikaew, T., Chinprahast, N. and Borompichaichartkul, C. 2013. Antioxidant activities of adzuki bean (*Vigna angularis*) protein hydrolysate in Proceedings of the Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013). January 23-25, 2013 at The Tide Resort, Chonburi, Thailand.