ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี

ANTIOXIDANT CAPACITIES OF ENZYMATIC AND CHEMICAL MODIFIED SOY PROTEIN ISOLATE

โดย

ยุพร พืชกมุทร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QK
898
.E58
ย395ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 116862
วัน,เดือน,ปี 16 ธ.ค. 2554

รายงานผลการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

b. 12328964
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย : ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี

Antioxidant capacities of enzymatic and chemical modified soy protein isolate

ชื่อผู้วิจัย : นางยุพร พืชกมุทร

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2551

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย : 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2551

หน่วยงานที่สังกัด : คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี โดยใช้เอ็นไซม์ 2 ชนิด คือเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม เอ็นไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อย 15 30 และ 60 นาที และใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 15 30 60 และ 120 นาที ในกรณีของเอ็นไซม์ปาเปนพบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ หน่วยย่อยของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) พบว่าส่วนของ 7S และ acidic subunit จางหายไป แต่จะพบแถบของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล เช่นเดียวกับในกรณีของเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า 7S และ 11S โกลบูลินจางหายไป และพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองมีความสามารถในการละลายดีขึ้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านผ่านการดัดแปร และความสามารถจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการดัดแปรเพิ่มขึ้นจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาทีและความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีแนวโน้มให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีของกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์พบว่า การดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน่วยย่อยของโปรตีน และพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรมีค่าสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสูงขึ้น ความสามารถในการต้านออกเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรเพิ่มขึ้นจาก 0 ไปเป็น 60 นาที แต่จะลดลงถ้าเพิ่มเวลาในการดัดแปรเป็น 120 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส พบว่า แนวโน้มของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antioxidant Capacities of Enzymatic and Chemical Modified Soy Protein Isolate

Yuporn Puechkamut

ABSTRACT

Antioxidant capacities of enzymatic and chemical modified soy protein isolate were studied. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate was done by using papain (0.5 gm enzyme /100 protein) and alcalase (0.2 gm enzyme / 100 protein). The hydrolysis periods were varied 15, 30 and 60 min. For chemical reaction, succinic anhydride was added into the protein solution at 0.5 gm anhydride/100 gm protein. The succinylation times were varied at 15, 30, 60 and 120 min.

In case of papain, it was found that the degree of hydrolysis (DH) increased with increasing in reaction time and SDS-PAGE of soy protein hydrolysates showed that 7S and acidic subunit were disappeared, while the increased intensity of low molecular weight band were observed at the bottom of the gel.

In the case of alcalase, it was found that the degree of hydrolysis (DH) increased with increasing in reaction time and SDS-PAGE of soy protein hydrolysates showed that 7S and 11S globulin were disappeared, while the increased intensity of low molecular weight band were observed at the bottom of the gel. The solubility properties of both the enzymatic hydrolysates were increased. The action of the enzymatic hydrolysate in a linoleic oxidation and scavenging-radical system were significantly improved compared to those of the native protein. Moreover the antioxidant capacities were increased with increasing in reaction times and concentrations. From the result of using enzymatic, the tendency of hydrogen peroxide scavenging activity and inhibition of linoleic oxidation of the hydrolysate from alcalase was better than those of the hydrolysate from papain.

In the case of succinylation, it was found that the succinylation did not affect the protein subunit as determined by SDS-PAGE. The modified proteins were increased in the solubility. The antioxidant capacities of the modified proteins were strongly increased when the reaction time was increased from 15 min to 60 min. However, the activities were decreased when the reaction time was 120 min. The results showed that the scavenging activity against ABTS of the protein modified by enzyme was higher than the activity of the protein modified by succinylation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โปรตีนถั่วเหลือง	3
2.2 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	4
2.3 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน	5
2.3.1. การดัดแปรโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์	5
2.3.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส	6
2.3.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส	9
2.2.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส	9
2.2.1.4 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต	10
2.3.2. การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์	10
2.3.2.1 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี	10
2.3.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน	12
2.4 อนุมูลอิสระ	13
2.5 สารต้านออกซิเดชัน	14
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านออกซิเดชันในโปรตีน	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
3.1 วัตถุดิบ	17
3.2อุปกรณ์ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	18
3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์	18
3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง	19
3.5 วิธีการดำเนินงาน	19
3.5.1 ศึกษาสมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	19
3.5.2 การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	19
3.5.3 การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	20
3.5.4 การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยกระบวนการซัคซินิลเลชัน	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
4.1 ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	22
4.2 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	24
4.3 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	30
4.4 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	43
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	22
4.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	23
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	23
4.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	24
4.5 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	26
4.6 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	27
4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	28
4.8 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	29
4.9 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	30
4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	32
4.11 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	33
4.12 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	34
4.13 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ถูกดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	35
4.14 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.15 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน 39

4.16 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน 40

4.17 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์กับหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน	11
2.2 ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน	12
4.2 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	25
4.3 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	31
4.4 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน	37
ก 1 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์	53
ก 2 ขั้นตอนการหาความสามารถในการละลาย	53
ก 3 ขั้นตอนการหาเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน	55
ก 4 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	58
ก 5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก	59
ก 6 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	60
ข 1 Centrifuge Beckman Coulter	62
ข 2 Eppendorf Centrifuge	62
ข 3 Spectrophotometer	62
ข 4 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System	62
ข 5 Electrophoresis PowernSupply EPS 301	62
ข 6 Eazy Breeze Drying Frame	62
ข 7 Matched glass plates for Hoefer miniVE electrophoresis system, Spacer,Comb	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นผลผลิตอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการแมทาบอลิซึม นอกจากนั้นยังสามารถเกิดจากปัจจัยภายนอกที่มากระทบต่อร่างกาย เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) โอโซน ควันจากท่อไอเสียต่างๆ ควันบุหรี่ เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้โดยทั่วไปจะทำลายชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ก่อให้เกิดความเสียหายและอันตรายแก่ร่างกายอันนำไปสู่ภาวการณ์เกิดพยาธิสภาพของโรคบางโรคได้ (วัลยา และ พัชรี, 2542) นอกจากนี้อนุมูลอิสระเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปัญหาที่สำคัญของอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีผลทำให้เกิดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ต่อความต้องการของผู้บริโภค เช่น การเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ มีสีดำ หรือเกิดสารที่เป็นพิษต่างๆ ดังนั้นการควบคุมปฏิกิริยาปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงเป็นสิ่งจำเป็น สารต้านออกซิเดชันชนิดสังเคราะห์ได้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งและป้องกันปฏิกิริยาชนิดนี้ แต่เนื่องจากในระยะหลัง มีงานวิจัยหลายฉบับ (Bishov และ Henick, 1975 ; Nagai และคณะ, 2003 ; Shahidi และ Wanasaudara, 1992) ที่บอกถึงความไม่ปลอดภัยของการใช้สารต้านออกซิเดชันชนิดสังเคราะห์ต่อสุขภาพของมนุษย์ อีกทั้งผู้บริโภคหันมาสนใจในสุขภาพร่างกายมากขึ้น สารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นที่นิยม

สารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติมีหลายตัวอาทิ โทโคฟีรอล (tocopherol) วิตามินซี สารฟีนอลิกในพืช เช่น คาเทชิน (catechin) จากชาเขียว และเครื่องเทศ เช่น โรสแมรี่ (rosemary) โอริกาโน (oregano) เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีพอๆ กับสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (Abd-El-Aim และคณะ, 1999 ; Karpinska และคณะ, 2001 ; Mansour และ Khalil, 2000 ; McCarthy และคณะ, 2001a, 2001b ; Sahoo และ Verma, 1999 ; Tang และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่กล่าวว่า โปรตีนและเปปไทด์ อาทิ โปรตีนเวย์ โปรตีนถั่วเหลือง และคาโนซิน (carnosine) สามารถใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกได้ (Decker และ Crum, 1993 ; McCarthy และคณะ, 2001a ; Wu และ Brewer, 1994)

ถั่วเหลืองเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วนที่มนุษย์ต้องการเพื่อไปสร้างโปรตีนในร่างกายและโปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่ย่อยง่าย ถั่วเหลืองเป็นแหล่งที่ดีมากของธาตุเหล็กและแคลเซียม นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสารต้านอนุมูลอิสระที่ชื่อว่า ไอโซฟลาโวน ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน สารไอโซฟลาโวนที่มีพบในถั่วเหลืองนี้มีผลช่วยลดคอเลสเทอรอลในเลือดและยังป้องกันโรคหัวใจได้ (Setchell และ Cassidy, 1999) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองมีขนาดใหญ่ จึงทำให้โปรตีนถั่วเหลืองมีความสามารถในการละลายจำกัด คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจึงอาจน้อยลงไป การดัดแปรโครงสร้าง การลดขนาดโมเลกุล หรือเพิ่มความเป็นประจุของโปรตีนถั่วเหลืองเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ที่เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ (Sakanka และคณะ, 2004 ; Hattori และคณะ, 1998) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมีที่มีผลต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปเป็นสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน
2. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส
3. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยกระบวนการทางเอ็นไซม์และทางเคมี พร้อมทั้งศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนที่ได้ เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการดัดแปรเพื่อให้ได้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน
2. เป็นแนวทางในการปรับปรุงให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่างๆ
3. เป็นแนวทางในการนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดไปใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

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

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

ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองสามารถจับตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่โดยอาศัยการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง กรดอะมิโนที่สามารถสร้างพันธะประเภทนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮดริล เช่น ซีสเตอีน เมื่อหมู่ซัลไฮดริลถูกออกซิไดส์จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

2.2 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการนำโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะให้คุณค่าสารอาหารแล้ว ยังเป็นการเพิ่มบทบาทการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืชและอาศัยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้เป็นส่วนผสมหรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น สมบัติการดูดซึมน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร

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

อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดด่างที่รุนแรง หรือการได้รับความร้อน ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ง่าย จึงควรปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากสมบัติต่างๆของโปรตีนจะเกี่ยวเนื่องกับโครงสร้างเป็นสำคัญ การปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี

2.3.1. การดัดแปรโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic Modifications)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.3.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส

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

ประเภทของโปรติเอส

1. โปรติเอสเซรีน (Serine proteases)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfhydryl protease)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing protease)

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

4. โปรติเอสกรด (Acid protease)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟองสำหรับทดลองกับผลิตภัณฑ์เมอแรงส์ พบว่าการใช้เอ็นไซม์เปปซินที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 4.5 จะให้ค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ซึ่งถือว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากไข่ขาวได้

2.3.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส

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

2.2.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

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

2.2.1.4 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต (amylolytic enzyme)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

2.3.2. การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์ (Non-Enzymatic Modifications)

เป็นวิธีการดัดแปรโปรตีนโดยการใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการคลายตัวหรือจับตัวกันใหม่ของพันธะเคมีต่างๆทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2.3.2.1 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี

การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกกระบวนการหนึ่ง ที่นิยมนำมาปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถทำได้อย่างรวดเร็วแต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบางอย่างค่อนข้างรุนแรง ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและคุณค่าสารอาหารบางอย่างได้ การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น

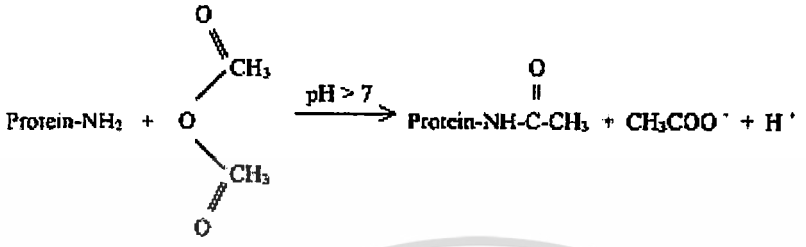
เอซิลเลชัน (acylation) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารประเภทแอซิดแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ε-อะมิโนของไลซีน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารประกอบอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แทนที่หมู่ ε-อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นกลางของอะซิทิล (acetyl) เรียกว่ากระบวนการอะซิทิลเลชัน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

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

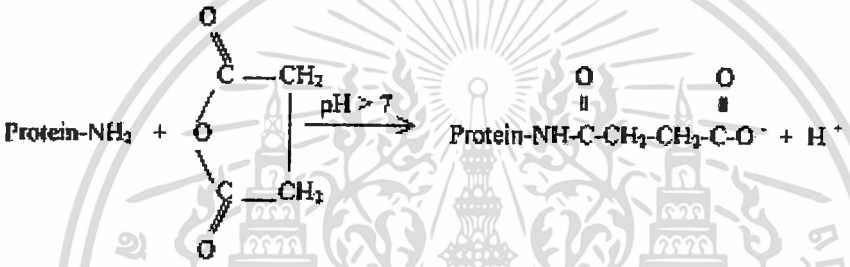
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายน้ำแต่การละลายในโซเดียมคลอไรด์ลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น

Acylation with acetic acid



Succinylation with succinic acid



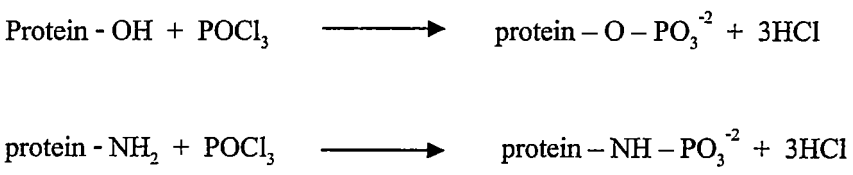
ภาพที่ 2.1 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์กับหมู่ε-อะมิโนของไลซีน

ที่มา : El-Adawy (2000)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน

ที่มา : Matheis และคณะ (1989)

2.3.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.4 อนุมูลอิสระ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants)

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

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

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

2.5.3. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันกลุ่มของสารอาหารบางชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี แคโรทีนอยด์ เป็นต้น

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านออกซิเดชันในโปรตีน

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนและเปปไทด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อยสลายของโปรตีน สภาวะในการย่อย ชนิดและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่อยู่ในสายเปปไทด์และโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น

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

Hattori และคณะ (1998) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของอีลาสตินเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยอีลาสตินด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก พบว่า อีลาสตินที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันดีกว่าตัวควบคุม และเมื่อใส่กรดซิตริก (citric acid) ในปริมาณ 0.02 เปอร์เซนต์ ร่วมกับอีลาสตินที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์และกรดจะทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และ พบว่าเปปไทด์ของอีลาสติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีขนาด 1000 Da มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol)

Park และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงที่ไม่มีเลซิตินโดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสในการดัดแปร พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa มีความสามารถในการยับยั้งออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้มากกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-tocopherol) และพบสายเปปไทด์ 2 สายที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa สายที่ 1 คือ Leu-Met-Ser-Tyr-Met-Tryp-Ser-Thr-Ser-Met และสายที่ 2 คือ Leu-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Arg-Ser-Ser-His-Trp-Phe-Ser-Arg-Arg

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทดสอบด้วยวิธีการ TBARS ในเนื้อวัวได้ถึง 91.7%

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด จาก บริษัท The Solae Company (USA)

3.1.2 เอ็นไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) 3.0 units/mg บริษัท Sigma-Aldrich Inc.

3.1.3 (Alcalase®) 2.4 AU/mg บริษัท Novo Nordisk Co., Ltd.

3.1.4 succinic anhydride บริษัท Sigma-Aldrich Inc.

3.1.5 สารเคมี

- Sodium hydroxide
- Hydrochloric acid
- Monosodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)
- Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.H_2O$)
- Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)
- Copper (II) Sulfate
- Trichloroacetic acid (TCA)
- 2, 2 – Azino- bis (3-ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic) (ABTS)
- Tris (hydroxymethyl) Aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)
- Glycerol
- Bromophenol Blue
- Ammonium persulfate
- Acrylamide
- N, N-Methylene-bis (acrylamide)
- N,N,N,N – Tetrametyl ethylenediamine (TEMED)
- Bromophenol Blue
- Methanol
- Coom assie brilliant blue
- 2 – Mercaptoethanol
- Hydrogen peroxide
- Linoleic acid

116862
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 99.5% Ethanol
- 95% Ethanol
- Ferrous chloride
- Ammonium thiocyanate
- Ascorbic acid
- Trorox (6-aaahydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97%)

3.2อุปกรณ์ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

- Freeze Dryer	Vacuum freeze drier FT33
- Spectrophotometer	Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- SDS-PAGE	Amersham phamacia biotech, Sweden
- Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R

- หลอดเซนตริฟิว
-Water bath shaker
- multistirrer
- Water bath
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.3.1 อุปกรณ์ในการทดสอบระดับการย่อยสลาย

- ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Buchi Distillation unit B-316, Switzerland
- Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R

- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3.2 อุปกรณ์ในการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

- Electrophoresis set	Amershame pharmacia biotech, Sweden
- Easy Breeze Gel Dryer	Hoefer scientific instruments
- Micropipette P1000 pipetman	Gilson Medical Electronic

- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 อุปกรณ์ในการทดสอบความสามารถในการละลาย

- Spectrophotometer Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- Centrifuge Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.3.4 อุปกรณ์ในการทดสอบสมบัติการต้านออกซิเดชัน

- Spectrophotometer Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- Quazt cuvetter
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 ศึกษาสมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ทำการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีดังนี้

3.5.1.1 ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ตามวิธีของ Landrault และคณะ (2001)

3.5.1.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามวิธีของ Yen และคณะ (1995)

3.5.1.3 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate (FTC) ตามวิธีของ Larrauri และคณะ (1996)

3.5.2 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ตามวิธีของ พรชนัน (2548) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.5 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Kim และคณะ (1989) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.5.3 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

ย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ตามวิธีของ Waish และคณะ (2003)โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.0 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Kim และคณะ (1989) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

ดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ตามวิธีของ El-Adawy (2000) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมกรดซัคซินิคแอนไฮไดร์ ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชของสารละลายเป็น8.0 และควบคุมให้คงที่ตลอดปฏิกิริยา เป็นระยะเวลาต่างกัน 4 ระดับ คือ 15 30 60 และ 120 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการไดอะไลซีส (dialysis) ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดซัคซินิคแอนไฮไดร์มาหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.1.1 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS

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

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS		
	0.1%	0.3%	0.5%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.86 ± 0.2^{a}	5.12 ± 0.4^{b}	7.83 ± 0.3^{c}
วิตามินซี	100^{d}	100^{d}	100^{d}

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

4.1.2 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)		
	0.05%	0.07%	0.1%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.63 ±0.2[a]	7.00± 0.3 [b]	11.37± 0.7[c]
วิตามินซี	100[d]	100[d]	100[d]

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

4.1.3 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

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

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโทรอกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

4.2.1 ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ปาเปน

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

ตารางที่ 4.4 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาต่าง ๆกัน

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

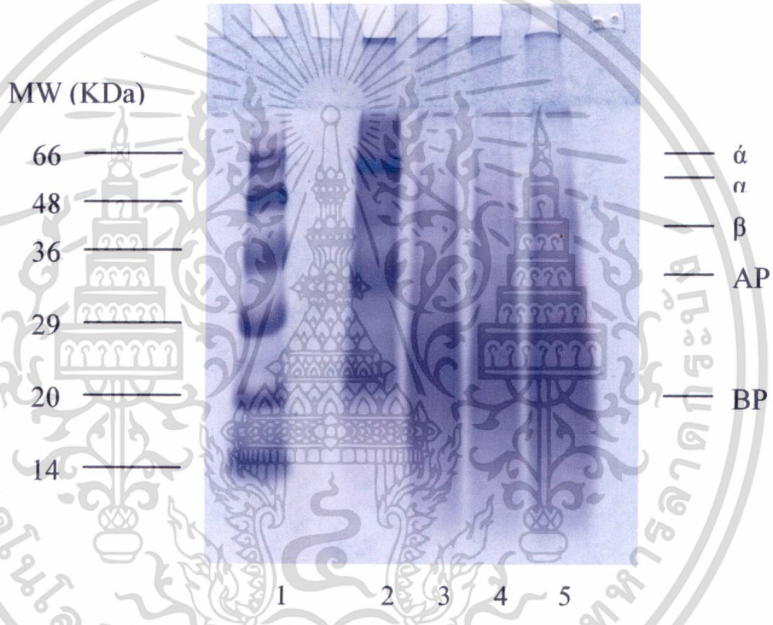
^{abc} แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ความสามารถในการละลาย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม ในระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที แสดงในตารางที่ 4.5 จากการทดลองพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุล ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง มีกลุ่ม ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น (Wu และคณะ 1998) และมีประจุสุทธิ (net charge) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการละลายดีขึ้น และเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการย่อย พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาที มีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 15 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของระดับการย่อยสลาย (ตารางที่ 4.4) โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาที มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่สูงกว่า

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

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

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

* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

4.2.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

การวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.6 ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีน 3 ระดับคือ 0.1% 0.3% และ 0.5% พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาที ไปเป็น 60 นาที พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.2.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปร	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)		
(นาที)	0.05%	0.07%	0.1%
0	2.63±0.3 [a]	7.00±0.4 [b]	11.37 ±0.7[c]
15	18.78±1.3 [d]	32.48±0.9[f]	50.57±0.8[h]
30	19.17±0.7 [d]	33.88±0.2[f]	53.70± 0.4[i]
60	22.25±1.5 [e]	36.61±0.7 [g]	57.38±2.0 [j]

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

4.2.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

4.3.1 ระดับการย่อยสลาย

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

ตารางที่ 4.9 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
15	54.47 ± 2.0^{a}
30	63.75 ± 2.0^{b}
60	70.00 ± 0.8^{c}

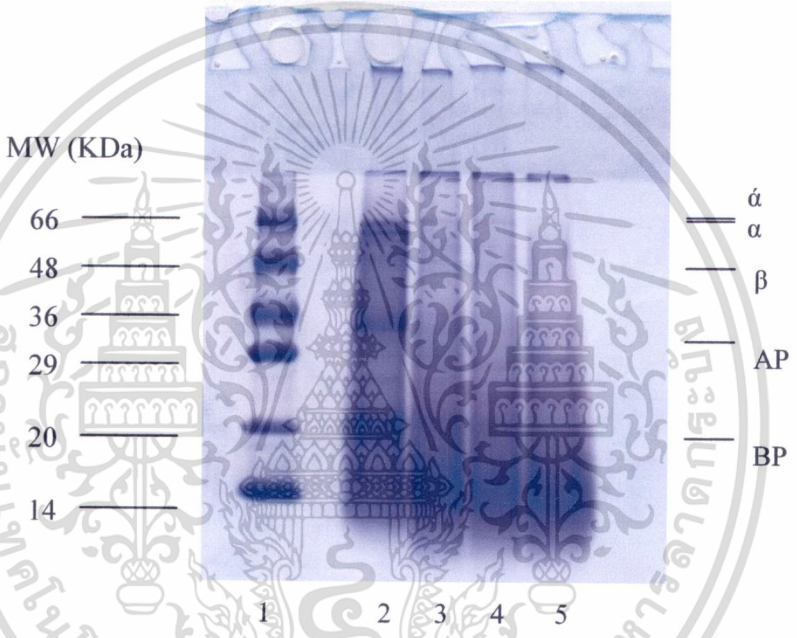
^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ความสามารถในการละลาย

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

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

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

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

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

4.3.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTSของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

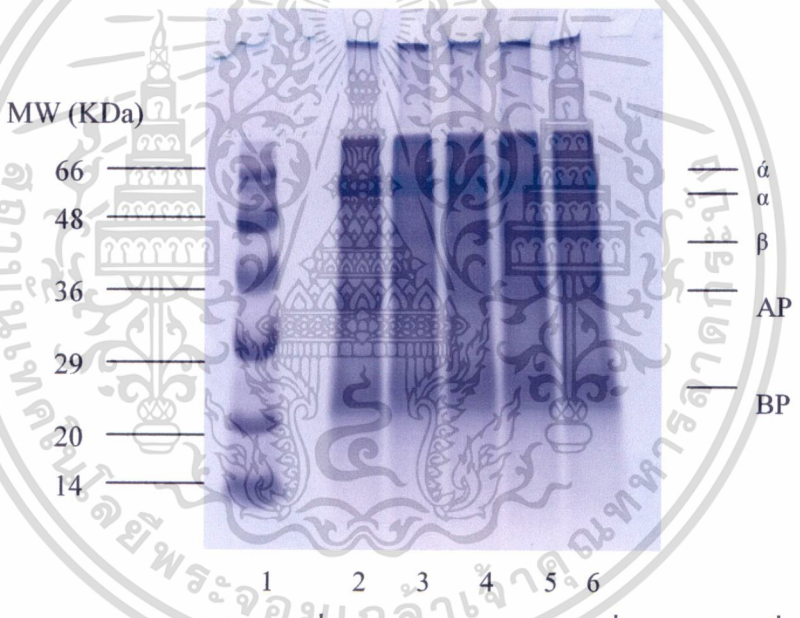
วิตามินในกระบวนการแปรรูปมีจำกัด ควรทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสและวิตามินซีหรือโทรอกซ์ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ทั้งสามชนิดนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

4.4.1 องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้ SDS-PAGE

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



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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ความสามารถในการละลาย

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

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันระยะเวลาต่าง ๆ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

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

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTSของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

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

ตารางที่ 4.16 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)		
	0.05%	0.07%	0.1%
0	2.90±0.2 [a]	5.13±0.3 [ab]	7.00±0.7 [b]
15	11.96±1.0 [c]	19.37±0.9 [d]	31.86±0.6 [f]
30	27.04±0.6 [e]	37.40±1.0 [g]	50.25±0.7 [h]
60	32.30±0.3 [f]	53.55±1.2 [i]	52.29±1.4 [j]
120	12.54±1.1 [c]	19.19±2.4 [d]	30.57±2.1 [f]

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

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ 4.17 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรทั้งสามวิธี คือขบวนการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เอ็นไซม์อัลคาเลสและกระบวนการซัคซินิลเลชัน พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรที่สูงขึ้น จึงส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้เอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลือง 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าหน่วยย่อย 7S โกลบูลินและ acidic subunit มีปริมาณลดลง แต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร และมีสมบัติต้านออกซิเดชันมากขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.1% ไปเป็น 0.5%

2. SDS-PAGE โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าหน่วยย่อย 7S และ 11S โกลบูลิน มีปริมาณลดลง แต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ด้านล่างของเจล โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร และมีสมบัติต้านออกซิเดชันมากขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.1% ไปเป็น 0.5%

3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้กรดซัคซินิคแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที มี หน่วยย่อยที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร แต่มีความสามารถในการละลายสูงขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร การเพิ่มประจุสุทธิโดยกระบวนการซัคซินิลเลชัน ช่วยทำให้สมบัติต้านออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มประจุสุทธิมากเกินไป ทำให้สมบัติต้านออกซิเดชันลดลง

4. การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทั้งสามวิธี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งส่งผลให้สมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลง จากการทดลองพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามวิธีมีความสามารถในการละลายดีขึ้น และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กุณฑลิยา ครุฑกะ. 2544. การผลิตโยเกิรต์แช่แข็งจากน้ำนมถั่วเหลือง น้ำนมข้าวกล้องและรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547. *เอ็นไซม์ทางอาหาร*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปาริฉัตร ทัพภะสุต และ ปราณี อ่านเปลื่อง. 2541. สมบัติของสารให้ฟองผงจากโปรตีนถั่วเหลืองและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร : อาหาร. 28 : 42-53

นิทราพร รุจนวิศาล. 2542. สารปรับสมดุลจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระ. *ในกันแก่ แก้ป่วยด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตัวเก่ง*. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์รวมทรรศน์. 9-29.

พรชนัน เที่ยวทั่ว. 2548. การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราโดยกระบวนการทางเอ็นไซม์และเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศิริ. 2542. โปรออกซิแดนท์ : อีกโฉมหน้าของแอนติออกซิแดนท์. *วารสารวิทยาศาสตร์*. 53 : 196-198

Abd-El-Aim, S. S. L., Lugasi, A., Hovari, J. and Dworschak, E. 1999. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of the Science of Food and Agricuture*. 79 : 277-285.

Achouri, A., Zhang, W. and Shiyaing X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Research International*. 31(9) : 617-623.

Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymatic hydrolysis of food protein*. NewYork: Elsevier Publishing. pp. 77-363.

Bacon, J. R., Norl, R. and Lambert, N. 1990. Soybean Proteins. [online] . Available : http : // www. Class.fst.ohio-state edu./Soy.hym.

Bishov, S. J. and Henick, A. S. 1975. Antioxidant effect of protein hydrolysates in freeze-dried model systems. *Journal of Food Science*. 40: 345-348.

Chan, W. M. and Ma, C. Y. 1999. Modification of proteins from soymilk residue (okara) by trpsin. *Journal of Food Science*. 64: 781-785

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Chiue, H., Kusano, T., Iwami, K. (1997). Deamidation-induced fragmentation of maize zein, and its linked reduction in fatty acid-binding capacity as well as antioxidative effect. *Food Chemistry.*58:111-117.

Damodaran, S. 1996. *Amino Acids, Peptides and Proteins*. In Food Chemistry. Fennama, O.R.(ed). NewYork: Marcel Dekker INC.pp 380.

Davis, P. J. and Williams, S. C. 1998. *Protein modification by thermal processing*. Allergy.53 : 102-105.

Decker, E. A. and Crum, A. D. 1993. Antioxidant activity of canosine in cooked ground pork. *Meat Science*. 58 : 337-341.

Dua, S., Mahajan, A., Mahajan, A. 1996. Improvement of functional properties of rapeseed (Brassica campertris Var.Toria) preparation by chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 706-710.

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

Govindaraju, K and Srinivas, H. 2004. Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. *Food Science and Technology*. 56 : 183-191.

Gruener, L. and Ismond, M. A. H. 1997. Effects of acetylation and succinylation on physicochemical properties of canola 12S globulin. Part I. *Food Chemistry*. 60:357.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Aruoma, O. I. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 165: 215-219.

Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K., Kumagai, H., Feng, Y. and Takahashi, K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2167-2170.

Hensley, D. W. and Lawhon, J. T. 1979. Economic Evaluation of Soy Isolate Production by a Membrane Isolation Process. *Food Technology*. 33:46.

Hettiarachchy, N. S and Ziegler, G. R. 1990. *Protein Fuctionality in Food System*. New York

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hu, M., McClements, D. J., and Decker, E.A. 2003. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1696-1700.

Hudson, B. J. F. 1992. Modification of food protein by enzymic method. London : E A S.

Karpinska, M. Borowski, J. and Danowska-Oziewicz, M. 2001. The use of antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*. 72 : 5-9

Karel, M., Tannenbuam, S. R., and Maloney, H. 1966. Antioxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. Effects of added amino acid. *Journal of Food Science*. 31 : 892-896.

Kinsella, J. E. 1979. Functional Properties of Soy Protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 56: 242.

Kim, K. S. and Rhee, J. S. 1989. Effects of acylation on physicochemical properties of 11S soy protein. *Journal of Food Science*. 13 : 187-199.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of head of bacterophage T_4. *Nature*. 227: 680-685.

Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, P. L. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wine from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3341-3348.

Larrauri, J. A., Ruperez, P. and Suara-Calixto, F. 1997. Mango peel fibers with antioxidant activity. *Z Lebensm unters Forsch A*. 205:39-42.

Lecomte, N. B., Zayas, J. F. and Kasther, C. L. 1993. Soya proteins functional and sensory characteristics improved in comminuted meats. *Journal of Food Science*. 58: 464-472.

Lin, K. W. and Mei, M. Y. 2000. Influence of gum, soy protein and heating temperature on reduce-fat meat batter in model system. *Journal of Food Science*. 65: 97-100.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M and Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigeneous plants. *Food Chemistry*. 100(4) : 1407-1418.

Mansour, E. H. and Khalil, A. H. 2000. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their applications to ground beef patties. *Food Chemistry*. 69 : 135-141.

Marcuse, R. 1960. Antioxidative effect of amino acid. *Nature*. 186 : 886-887.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McCarthy. T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. and Buckley, D. J. 2001a. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compare with synthetics antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science.* 57 : 45-52.

McCarthy. T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. and Buckley, D. J. 2001b. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science.* 57 : 177-184.

Muguruma,M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, M., Sathe, S. K. and Soeda, T. 2002. Soybean and Milk Protein Modified by Transglutaminase improve Chicken Sausage Texture even at Reduced Levels of Phosphate. *Meat Science.* 431: 170-177.

Murase, H., Nagao, A.,Terao, J. 1993. Antioxidant and emulsifying activity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(long-chain-acyl) carnosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 41: 1601-1604.

Nagai,T., Inoue, R., Inoue, H. and Suzuki, N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Journal of Food Chemistry.* 80: 29-33.

Nakai, S. and Modler, H.W. 1996. Food proteins-Properties and Characterization. New York.

Ortiz, S. E. M. and Wagner, J. R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates : structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International.* 35: 511-518.

Park, P. J., Jung, W.K., Nam, K. S., Shahidi, F. and Kim, S. K. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptide from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651-656.

Pena – Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2001. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Dairy Sceince.* 84: 2557-2583.

Pena – Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cook pork patties. *Meat Science.* 64: 259-263.

Petruccelli, S. and Anon, M.C. 1994. Relationship between the method of obtention and the structure and functional properties of soy protein isolates. 1. structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52 (4) : 1074-1077.

Puechkamut, Y., and Thiewtua, P. 2006. Improvement of functionalities of soymilk residue protein by papain hydrolysis. KMITL Science Journal. Vol 6, No.2b: 571-575

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Punchard, N. A., Kelly, F. J. 1996. *Free radical: a practical approach*. Washington, D.C. Oxford university press, Inc. 310p.

Saiga, A., Tanabe, S. Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 3661-3667.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. K. 2003. Antioxidant activity of Egg-Yolk Protein Hydrolysates in Linoleic acid Oxidation System. *Journal of Food Chemistry*, 86, 99 - 103.

Sakanaka, S. and Tachibana,Y. 2006. Active Oxygen Scavenging Activity of Egg-Yolk Protein Hydrolysates and Their Effects on Lipid Oxidation in Beef and Tuna Homogenates. *Journal of Food Chemistry,* 95, 243 – 249

Sahoo, J. and Verma, S. P. 1999. Oxidative problems in meat and meat products and use of antioxidant vitamins. *Journal of Food Science and Technology*. 36 : 487-499.

Sathivel, S. and Bechtel, P. J. 2004. :"Properties of protein hydrolysates from pink salmon heads." [online]. Available: http://www.cazv.cz/2004/2003/potrl_02/karamac

Sayas, J. F. 1997. *Fuctionality of proteins in food*. Springer-Veriag, Berlin, Heidelberg, Germany

Scilingo, A. A., Ortiz, S. E. M., Martinez, E. N. and Anon, M. C. 2002. Amaranth protein isolate modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Research International*. 35: 855-862.

Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. 1999. Dietary isoflavone: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*. 129, 758S-767S.

Shahidi, F. and Wanasaudara, P. K. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 32: 67-103.

Tang, S., Kerry, J. P., Sheedan, D., Buckley, D. J. and Morrissey, P. A. 2001. Antioxidative effect added tea catechins on susceptibility of cooked meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*. 34 : 651-657.

Waish, D. J.,Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S. and FitzGerald, R. J. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolatenfolowing proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International.* 36 : 677-683.

Were, L., Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U. 1997. Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties. *Journal of Food Science*. 52: 821-823.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu, S. U., and Brewer, M. S. 1994. Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids. *Journal of Food Science*. 49 : 702-706,738.

Voutsinas, L. P., Cheung. E. and Nakai, S. S.1983. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatural proteins. *Journal of Food Science*. 48: 26-32.

Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 41: 1296-1302.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน

ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การทดสอบสมบัติของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบสมบัติของโปรตีน

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

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

↓

วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี kjeldahl

10 ml ของตัวอย่างโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน(2%)

↓

10 ml ของ 20% TCA

↓

Centrifuge 9500 rpm, 20 min

↓

นำส่วนใสไปหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี kjeldahl

ภาพที่ ก1 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์

นำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ % DH (degree of hydrolysis) ด้วยสมการ

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

2. ความสามารถในการละลาย

โปรตีนถั่วเหลืองสกัดละลายใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

↓

vortex 10 min

↓

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

↓

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

ภาพที่ ก2 ขั้นตอนการหาความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลาย = ค่าดูดกลืนแสง X ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ศึกษาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการแยก subunit ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ และใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ subunit

<u>สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE</u>

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีเตรียมตัวอย่าง

ภาพที่ ก3 ขั้นตอนการหาเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน

การเตรียมเจล

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมสารละลาย separating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด electrophoresis จากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

2. เตรียมสารละลาย stacking gel

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

4. ดึงcomb ออก ล้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างด้วย electrophoresis buffer

การทำ Electrophoresis

1.ต่อชุด electrophoresis เข้าด้วยกัน เติม electrophoresis buffer ที่เตรียมไว้

2. ใช้ micro syring ดูดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เติมในช่องของ stacking gel

3. ต่อส่วนของ chamber เข้ากับส่วนจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการ run gel

4. ปิดส่วนจ่ายกระแสไฟเมื่อเห็นสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล

5. นำแผ่นเจลออกจากกระจก ทำการย้อมสีแผ่นเจล

การย้อมสีแผ่นเจล

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการย้อมสีแผ่นเจล

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

การอบเจล

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

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

1. เตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

Stock PBS solution

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

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

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

เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงเป็น 10 เท่า

2. 2.5mM ABTS

0.0137 g ใน 10 ml PBS

3. Metmyoglobin reagent

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Hydrogen Peroxide solution

0.091 ml ของ 30% H_2O_2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml

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

<u>ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา</u>

0.4 ml ABTS solution

0.72 ml Metmyoglobin solution

3.1 ml PBS

0.1 ml sample

↓

120 µl H_2O_2 solution

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

(ทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10-15 นาที)

ภาพที่ ก4 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตามสมการ

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

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

เตรียมสารเคมี ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>วิธีเตรียมตัวอย่าง</u>

0.5 ml sample

0.5 ml linoleic acid in ethanol 99.5%

1.0 ml phosphate buffer pH7

0.5 ml distilled water

↓

เก็บอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40°C

↓

Reaction mixture

<u>ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา</u>

0.1 ml reaction mixture

0.1ml ferrous chloride solution

0.1 ml ammonium thiocyanate

9.7 ml ethanol 75%

↓

เขย่าให้เข้ากัน

↓

วางทิ้งไว้ 3 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

ภาพที่ ก5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก

นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาการต้านปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก มาคำนวณตามสมการ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เตรียมสารเคมี ดังนี้

1. H_2O_2 ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์

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

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

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

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา

4 ml sample

0.6 ml 90 mM H_2O_2

↓

เขย่า10 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 nm

ภาพที่ ก6 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามสมการ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

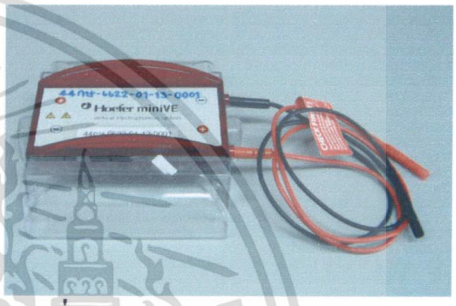
ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

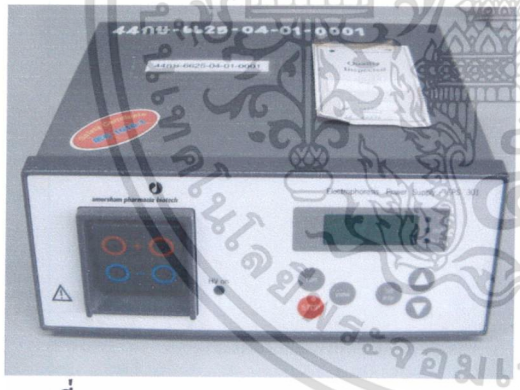
ภาพที่ ข1 Centrifuge Beckman Coulter

ภาพที่ ข2 Eppendorf Centrifuge

ภาพที่ ข3 Spectrophotometer

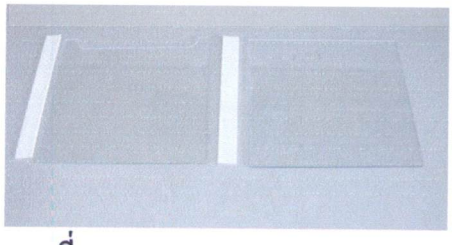


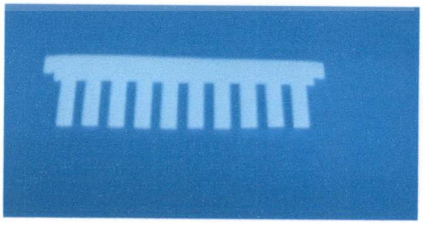
ภาพที่ ข4 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System



ภาพที่ ข5 Electrophoresis Power Supply EPS 301

ภาพที่ ข6 Eazy Breeze Drying Frame





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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้