สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสกัดและการดัดแปลงคุณสมบัติด้านหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดจากโอคารา (ผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง)

ISOLATION AND FUNCTIONAL MODIFICATION OF PROTEIN FROM OKARA, THE SOYBEAN RESIDUE FROM SOY MILK PRODUCTION

โดย

ยุพร พืชกมุทร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TX
558
.S7
ย395ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 64367
วัน,เดือน,ปี 11 ก.ย. 2549

.b 11624991
.i.....

รายงานผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนเงินงบประมาณ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย : การสกัดและการดัดแปลงคุณสมบัติด้านหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดจากโอคารา (ผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง)

ISOLATION AND FUNCTIONAL MODIFICATION OF PROTEIN FROM OKARA, THE SOYBEAN RESIDUE FROM SOY MILK PRODUCTION

ชื่อผู้วิจัย : นางยุพร พืชกมุทร

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2547

หน่วยงานที่สังกัด : โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นในโอคาราที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (4, 8 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราสด) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (1 และ 2 ชั่วโมง ที่ 80 องศาเซลเซียส) ต่อปริมาณโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า โอคาราแห้งที่ได้จากการอบโอคาราสดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้น 4 หรือ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาสกัดโปรตีนพบว่า มีผลผลิตไม่แตกต่างจากโอคาราสด การเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 1 เป็น 2 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ แต่การใช้เวลาในการสกัดหรือการทำแห้งวัตถุดิบให้มีความชื้นตามต้องการ ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ให้ความร้อนกับโปรตีน การศึกษาพบว่า ปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อค่า Surface hydrophobicity (S_0) โดยการอบแห้งโอคาราจากโอคาราสด เป็นโอคาราแห้ง และการเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 เป็น 2 ชั่วโมง ทำให้ค่า S_0 สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับความร้อนในกระบวนการอบแห้งและการสกัด ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายในจึงออกมาอยู่ที่ผิวมากขึ้น ความสามารถในการละลายของโอคาราโปรตีนที่ได้จากโอคาราสด เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า S_0 ต่ำสุด จะมีความสามารถในการละลายสูงสุด ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดมีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความสามารถในการอุ้มน้ำของโอคาราโปรตีน โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้งดูดซับน้ำได้น้อยกว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสด และโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถดูดซับน้ำได้น้อยกว่าตัวอย่างที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามคุณสมบัติด้านการดูดซับน้ำมัน พบว่า โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำมันได้มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ ความคงตัวของฟองเมื่อใช้โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้งจะมากกว่าตัวอย่างที่ใช้โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสด เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่าง ๆ กับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และคุณสมบัติด้านความสามารถในการเกิดฟอง และความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีนดีกว่าของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า

ผลการวิเคราะห์ subunit ด้วย SDS-PAGE พบว่า subunit ของโปรตีนที่สกัดจากโอคาราไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า นอกจากนี้ subunit ของโอคาราโปรตีนที่สกัดเมื่อใช้โอคาราแห้งหรือโอคาราสด ทั้งที่ระยะเวลาการสกัด 1 และ 2 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีนพบว่ามีโปรตีน 56-60 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรต 38-40 เปอร์เซ็นต์ และมีเถ้า 3-4 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่า คาร์โบไฮเดรตคงจะอยู่ในรูปที่จับกับโปรตีน (Protein – polysaccraride conjugated) ผลการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของกรดอะมิโนของโอคาราโปรตีนพบว่า โอคาราโปรตีนมีชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็นเช่นเดียวกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า โอคาราโปรตีนมีปริมาณ Cystenine และ Threonine สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่า กรดอะมิโนส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น Cystenine, Methionine และ Tyrosine ซึ่งมีอยู่ในปริมาณต่ำ โดยธรรมชาติของโปรตีนถั่วเหลือง

การศึกษาวิธีการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคารา หรือโปรตีนที่สกัดจากการถั่วเหลืองโดยกระบวนการทางเอ็นไซม์ โดยใช้เอ็นไซม์ 3 ชนิดคือ เอ็นไซม์อัลคาเลส เอ็นไซม์ปาเปน และ เอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัม เอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อย 30 60 และ 90 นาที ในกรณีของเอ็นไซม์อัลคาเลสพบว่า การวิเคราะห์ subunit ของโปรตีนโอคาราด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) พบส่วนของ subunit 7S และ 11S globulin จางหายไปแต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจล โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายและการเกิดฟองเพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ส่วนความคงตัวของฟอง และความสามารถในการเกิดอิมัลชันมีแนวโน้มลดลง ในกรณีของเอ็นไซม์ปาเปนพบว่า เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ผลการวิเคราะห์ subunit ของโปรตีนที่ได้มีความเข้มของแถบโปรตีนในแต่ละ subunit ลดลง โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลาย ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ในกรณีของเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง subunit ของโปรตีน โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดฟอง และความคงตัวของฟองมีแนวโน้มลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Study on the interaction between moisture content of okara (4%, 8% and fresh >80%) and extraction time (1 and 2 hours at 80°C) on extracted protein yield was done. The result showed that extracted protein yield of okara which was dried at 60°C untill their moisture reached 4% and 8% were not different from that of fresh okara. Extracted protein yield were increased if extraction time increased from 1 hr to 2 hr

The functional properties of protein would be effected by heating process (extraction and drying). Surface hydrophobicity (S_0) of okara protein extracted at various conditions was elucidated. S_0 of okara protein was increased when increasing in extraction time and drying time. Protein would be partialy denatured and their structure would be unfolded during heating. The unfolding protein would expose buried hydrophobic groups to the surface of molecule. Okara protein extracted from fresh okara and used extraction time of 1 hr had S_0 and solubility higher than other samples. The result found that there were signigicant interaction between moisture content of okara and extraction time on the emulsion activity and water holding capacity (WHC) of okara protein. WHC of okara protein extracted from dried okara was lower than those of wet okara. If the extraction time was increased from 1 to 2 hr, WHC of okara protein would be decreased. However, fat binding capacity (FBC) of okara protein would be increased if extraction time was increased from 1 to 2 hr. Moreover, foaming stability was effected by drying process. Foaming stability of okara protein that extracted from dried okara was better than that of fresh okara.

Functional properties of okara protein and conventional soy protein isolate (SPI) were compared. The result showed that there was no different in functional properties of okara protein and SPI. However, foaming activity and FBC of okara protein were better than those of SPI.

Subunit of okara protein was determined by using SDS-PAGE in the presence of 2 – Mercaptoethanol. The result showed that subunit of okara protein was looked like subunits of SPI. Moreover, subunits of okara protein extracted at various experimental conditions were not different. The chemical composition of okara protein was also elucidated. The approximate analysis showed that okara protein contained 56-60% protein, 38-40% carbohydrate and 3-4% ash. The carbohydrate might be conjugated with partialy denatured protein, therefore, it was difficult to eliminate them during extraction. Amino acid composition of okara protein and SPI were not different. The cysteine and threonine contents of okara protein were higher than those of SPI. The essential amino acid compositions and contents of okara protein were comparable to the FAO/WHO standard, with the exception of the cysteine, methionine and tyrosine which usually were lower in the soy proteins.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enzymatic modification of okara protein (protein from soymilk residue) functionality were studied. The enzymatic reactions was performed using 3 different enzymes; alcalase, papain, and α–amylase at the concentration of 1 g of enzyme per 100 g of okara protein and the hydrolysis periods were varied at 30, 60 and 90 minutes. In the case of alcalase, SDS-PAGE of the hydrolysate showed that 7S and 11S globulin subunits were disappeared, while the increased intensity of low molecular weight bands were observed at the bottom of the gel. Protein solubility and foaming activity of the okara protein hydrolysate were increase compared to the initial okara protein. However, there was no effect on the change of surface hydrophobicity of okara protein, but foaming stability and emulsion activity tended to decrease.

In the case of the papain, it was found that when the hydrolysis times were increased, the intensity of band of each protein subunits were decreased. Okara protein hydrolysates were increased in protein solubility, surface hydrophobicity, emulsion activity, foaming activity and foaming stability.

In the case of α–amylase, it was found that the hydrolysis by α–amylase did not effect the protein subunits as determined by SDS-PAGE. These hydrolysates were increased in protein solubility. While other functional properties including surface hydrophobicity, foaming activity and foam stability were decreased, but emulsion activity was unchanged.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		III
สารบัญ		V
สารบัญตาราง		VII
สารบัญภาพ		IX
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
	1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	2.1 โปรตีนถั่วเหลือง	4
	2.2 โอคารา	6
	2.3 โปรตีนสกัดจากโอคารา	7
	2.4 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน	8
	2.4.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์	8
	2.4.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส	9
	2.4.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส	11
	2.4.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส	13
	2.4.1.4 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต	13
	2.4.2 การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์	13
	2.4.2.1 การดัดแปรโปรตีนโดยวิธีทางเคมี	13
	2.4.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน	16
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	**ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**	25
บทที่ 5	**สรุปผลการทดลอง**	51
บรรณานุกรม		53
ภาคผนวก		58
	ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน	59
	ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน	64
	ค การศึกษาองค์ประกอบของโอคาราโปรตีน	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์โปรตีนถั่วเหลืองและปริมาณความต้องการของร่างกาย	5
2	เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร คาร์โบไฮเดรต ต่อน้ำหนักแห้งของโอคารา	6
3	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์ ต่อ 100 กรัมของโอคาราแห้ง)	25
4	ผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน	26
5	แสดงค่า Solubility Index ของโอคาราโปรตีน	27
6	ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน	28
7	แสดงค่า Emulsion Stability ของอิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีน	28
8	ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน	29
9	ผลการทดสอบความคงตัวของฟองของโอคาราโปรตีน	30
10	ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโอคาราโปรตีน	30
11	ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน	31
12	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในโอคารา	35
13	องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสกัดจากโอคาราและโปรตีนสกัดทางการค้าต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง	36
14	ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดทางการค้า	38
15	ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	40
16	ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	41
17	ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	42
18	ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	45
19	ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

20 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน 47

21 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส 49

22 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส 50

23 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาของทรานซ์กลูตามิเนส	12
2	ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์ และซัคซินิกแอนไฮไดรด์ กับหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน	15
3	ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน ระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน	15
4	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากโอคารา	21
5	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์)	32
6	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์)	33
7	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราสด)	34
8	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที	39
9	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 60 และ 60 นาที	43
10	SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที	48
ก 1	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน	60
ก 2	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน	61
ก 3	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน	62
ก 4	ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน	63
ข 1	Homogenizer	65
ข 2	Ultrasonic	65
ข 3	Eppendorf Centrifuge	65
ข 4	Spectrofluorometer	6566
ข 5	Spectrophotometer	66
ข 6	Matched glass plates, Spacer, Comb	66
ข 7	Electrophoresis Power Supply	66
ข 8	Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis system	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่

ข 9 Easy Breeze Gel Dryer 66

ข 10 Easy Breeze Drying Frame 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่เป็นที่นิยมบริโภคและนำไปใช้ประโยชน์ในประเทศแถบเอเชีย เนื่องจากถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีราคาต่ำกว่าเนื้อสัตว์ อีกทั้งยังสามารถย่อยได้ง่ายกว่าเนื้อสัตว์ มีการนำถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็นโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soy protein concentrate, SPC) โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate, SPI) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และนำไปเป็นอาหารสัตว์

ในกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง เมื่อทำการสกัดแยกส่วนของแข็งที่ละลายน้ำได้แล้ว เหลือส่วนที่เป็นกากถั่วเหลืองหรือโอคารา (okara) ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองนั้น ยังคงมีโปรตีนและสารอาหารอื่น ๆ อยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยทั่วไปในการผลิตถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคาราสดประมาณ 1.1 ปอนด์ มีโปรตีนประมาณ 25-28 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 11 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันมีการใช้โอคาราเป็นอาหารสัตว์ ใช้เลี้ยงไหม ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงในผลิตภัณฑ์เซรามิก ใช้ทำอาหารหมัก เช่น นัตโต โคจิ เทมเป หรือเติมในผลิตภัณฑ์อาหารอบ ผลิตบิสกิต snack bar การแยกโพลิแซคคาร์ไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้เพื่อนำมาผลิตเป็นสาร emulsifier นอกจากนี้ยังมีการผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปของสารที่ได้จากการหมักเพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อรา มีผลในการต้านโรคในพืช การผลิตสารลดแรงตึงผิว การผลิตกรดซิตริก

soy protein isolate เป็น food ingredient ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท และในหลายคุณลักษณะตามแต่คุณสมบัติของ soy protein isolate นั้น ๆ ที่ผลิตขึ้นในทางการค้า ซึ่งมีการปรับปรุงคุณลักษณะต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติที่ผลิตภัณฑ์นั้นต้องการ เช่น ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ ไส้กรอก เพื่อเพิ่มคุณสมบัติในเรื่องการอุ้มน้ำหรือใช้เป็น emulsifier หรือใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรส เพื่อเพิ่มรสเนื้อสัตว์ และมีการใช้ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีกมาก การผลิต soy protein isolate จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ดจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง การผลิตจากกากที่ได้จากกากบีบ น้ำมันหรือสกัดน้ำมันออกแล้วโปรตีนจะได้รับผลกระทบจากกระบวนการให้ความร้อนในการผลิตน้ำมันซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติ ทำให้คุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไป การใช้โอคาราซึ่งเป็น by product จากการผลิต น้ำนมถั่วเหลืองจะเป็นการลดต้นทุนการผลิต และกระบวนการในการให้ความร้อนไม่รุนแรงเหมือนการสกัดน้ำมันออกจากถั่วเหลือง และยังเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีอีกด้วย O'Toole (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) พบว่า โอคารามีค่า PER สูงถึง 2.71 ซึ่งสูงกว่าถั่วเหลืองเล็กน้อย (PER 2.51) อย่างไรก็ตาม แรงกลและความร้อนมีผลต่อคุณลักษณะและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน การใช้โอคาราเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาจทำให้คุณสมบัติของ Protein isolate ที่ได้แตกต่างจากที่ผลิตจากถั่วเมล็ดหรือกากน้ำมัน จึงควรที่จะทำการศึกษาถึงคุณสมบัติทั้งทางเคมีกายภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ okara

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

protein isolate ที่ผลิตได้ นอกจากนี้โอคาราสดมีความชื้นสูงมาก (80%) ซึ่งเป็นปัญหาต่อการเก็บรักษาโอคารา การศึกษาผลของการอบแห้งโอคาราต่อผลผลิตและคุณลักษณะของโปรตีนที่สกัดได้จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจ

การใช้ความร้อน และแรงบีบอัดในระหว่างการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองอาจทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนไป การดัดแปลงคุณสมบัติด้านหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดด้วยวิธีการใช้เอ็นไซม์ อาจทำให้สมบัติด้านหน้าที่ดีในงานวิจัยนี้ จึงศึกษาการดัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ รวมทั้งศึกษาสมบัติของโปรตีนที่ได้ เพื่อให้ได้โปรตีนโอคาราที่เหมาะสม นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของปริมาณความชื้นของโอคาราที่มีผลต่อการสกัดโปรตีนจากโอคารา
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ okara protein isolate ที่สกัดจากโอคาราที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง
3. ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรโดยเอ็นไซม์โปรติเอสที่สภาวะต่างกัน
4. ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรโดยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่สภาวะต่างกัน

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

ขอบเขตของการวิจัยนี้จะครอบคลุมเนื้อหาของกระบวนการผลิต okara protein isolate รวมถึงการศึกษาวิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ประกอบด้วย

1. ทดลองหาวิธีการในการผลิต okara protein isolate ตามวิธีของ Ma และคณะ (1997) โดยใช้โอคาราจากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง และทำการปรับปรุงวิธีการผลิตให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่ใช้ เพื่อให้การสกัดโปรตีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด

2. ศึกษาถึงผลของปริมาณความชื้นของโอคาราที่มีต่อการสกัดโปรตีน โดยทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณความชื้นของโอคาราและเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีนที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

3. ศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดที่ผลิตได้จากโอคาราเทียบกับโปรตีนสกัดทางการค้า โดยทำการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญ

4. ดัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยกระบวนการทางเอ็นไซม์ พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของโปรตีนที่สกัดได้ เปรียบเทียบกับโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการดัดแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนโอคารา
2. เป็นแนวทางในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราเพื่อให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์อาหาร
3. เป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากโปรตีนที่ผลิตจากโอคาราซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by product) จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภคและใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมได้มีการนำถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่นน้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็นโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งร่างการสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ดี ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีปริมาณสูง 35 – 38 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี ร่างกายสามารถย่อยได้ง่าย มีกรดอะมิโนไลซีนสูง แต่มีเมทไธโอนีนและซิสทีนค่อนข้างน้อย ในเนื้อถั่วเหลืองมีโปรตีนสะสมอยู่ในเซลล์ เรียกว่าโปรตีนบอดี้ (protein bodies) โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโกลบูลิน (globulin) สามารถละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจาง ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยคือ 2S 7S 11S และ 15S โปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้แยกตามลักษณะการตกตะกอนด้วยวิธีการอัลตราเซนตริฟิล (ultracentrifuge) โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลในหน่วย KDa ดังนี้ (Nakai and Modler, 1996)

2S fraction (α -conglycinin) น้ำหนักโมเลกุล 8 - 22 KDa

7S fraction (β and α -conglycinin) น้ำหนักโมเลกุล 180 - 210 KDa

11S fraction (glycinin) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 KDa

15S fraction น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600 KDa

โปรตีนถั่วเหลืองมี 7S และ 11S globulin เป็นองค์ประกอบหลัก ที่มีความสำคัญในการกำหนดสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน 7S globulin ของโปรตีนถั่วเหลืองโดยส่วนใหญ่ประกอบด้วย β-conglycinin ประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด β-conglycinin ประกอบด้วย 3 subunit หลักคือ ά (80 KDa), α (76 KDa) และ β (50 KDa) ส่วน 11S globulin ของโปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วย 12 subunit (6 acidic and 6 basic) acidic polypeptide (35 KDa) มีจุดไอโซอิเล็คตริคอยู่ในช่วง pH 4.75-5.4 ส่วน basic polypeptide (20 KDa) มีจุดไอโซอิเล็คตริคอยู่ในช่วง pH 8.0-8.5 โมเลกุลของโปรตีนเหล่านี้เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Bacon *et al.*, 1990)

ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลโปรตีนถั่วเหลืองสามารถจับตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่โดยอาศัยการเชื่อมกันของพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง กรดอะมิโนที่สามารถสร้างพันธะประเภทนี้คือกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮดริล เช่น ซีสเตอีน เมื่อหมู่ซัลไฮดริลถูกออกซิไดส์จะเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างปลายโมเลกุลของซีสเตอีน 2 โมเลกุล โปรตีนถั่วเหลืองที่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลมาก พันธะไดซัลไฟด์จะไปลดความยืดหยุ่นของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีน การลดหรือกำจัดพันธะไดซัลไฟด์มีผลช่วยให้การเกิดฟองของโปรตีนดีขึ้น โดยพบว่าการลดจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธะไดซัลไฟด์ลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้โปรตีนคลายตัวและเกิดการดูดซับที่ชั้นรอยต่อของน้ำและอากาศง่ายขึ้น (Hettiarachchy and Ziegler, 1990)

ถั่วเหลืองนอกจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีปริมาณสูงแล้ว ยังมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 18–20 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่เป็นไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพและไม่มีโคเลสเตอรอล มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นใยอาหาร ซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันมะเร็งลำไส้ และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่วนวิตามินที่พบมากในถั่วเหลืองคือ วิตามิน บี 1 และ บี 2 และมีแร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น (กุณฑลิยา ครุฑกะ , 2544)

ตารางที่ 1 กรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์โปรตีนถั่วเหลืองและปริมาณความต้องการของร่างกาย

Essential	**FAO / WHO**			**Protein**	
amino acid	**2-5**	**10-12**	**Adult**	**Concentrates**	**Isolates**
			mg/protein		
Histidic	19	19	16	25	28
Isoleucine	28	28	13	48	49
Leucine	66	44	19	79	82
Lysine	58	44	16	64	64
Methionine + cystine	25	22	17	28	26
Phenylalanine + tyrosine	63	22	19	89	92
Threonine	34	28	9	45	38
Tryptophan	11	9	5	16	14
Valine	35	25	13	50	50

ดัดแปลงจาก : Endres (2001)

โปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ผลิตได้จากการสกัดแยกโปรตีนออกจากแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมันหรือกากถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหารได้หลากหลายประเภท โดยทั่วไปการผลิตโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสามารถผลิตได้จากถั่วเหลืองทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีส่วนผสมของไขมันอยู่ด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมจะผลิตจากกากถั่วที่เหลือจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิตสามารถทำได้หลายวิธีโดยอาศัยตัวทำละลายในการสกัด ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารละลายด่างหรือเกลือเป็นตัวทำละลาย เช่นการผลิตโปรตีนสกัดที่ใช้ในทางการค้าจะใช้สารละลายด่างช่วง pH 7 ถึง 10 ในการสกัดและทำการตกตะกอนที่ pH 4.5 หรือการผลิตโปรตีนโดยใช้สารละลายเกลือในการสกัดซึ่งอาศัยความแรงของประจุเป็นตัวแยก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เมมเบรน (membrane) ในการผลิตโปรตีนสกัด โดยใช้วิธีการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และ ไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) หลังจากกระบวนการสกัดตามปกติ เพื่อแยกส่วนของโปรตีนออกจากสารละลายที่สกัดได้ โปรตีนที่ได้จะละลายได้ดีเนื่องจากไม่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรด (Hensley and Lawhon, 1979)

การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่นการให้ความร้อน กระบวนการในการสกัดไขมัน ขนาดของอนุภาค อุณหภูมิ และอัตราส่วนตัวทำละลายต่อกากในการเตรียมกากถั่ว มีการใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัดโปรตีนจากกากถั่วที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว ตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำ น้ำผสมสารละลายด่างเจือจาง pH 7 ถึง 9 หรือสารละลายของเกลือ (0.5 - 2M) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีในการสกัดโปรตีนและเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลายเจือจาง โปรตีนที่ได้จึงไม่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดส่วนใหญ่จะทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังมีการสกัดโปรตีนที่อุณหภูมิตู้เย็น ซึ่งมีประโยชน์ในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์

2.2 โอคารา

โอคาราหรือกากถั่วเหลืองเป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองและเต้าหู้ ในการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคารา 1.1 ปอนด์ มีความชื้น 76 – 80 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณโปรตีน 25-28 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จากเดิมมักนำไปผสมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ แต่ในปัจจุบันได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นมากขึ้น เนื่องจากโอคาราที่ได้ยังคงมีโปรตีนและสารอื่นๆอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังแสดงในตารางที่ 2 เช่น มีการนำโอคารามาใช้ประโยชน์ทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารหมักนัตโต โคจิ เทมเป หรือใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตขนมอบ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับการผลิตจากถั่วเหลืองเมล็ด มีการใช้โอคาราในการลดต้นทุนผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์โดยใช้ในการเลี้ยงหนอนไหม ทำให้ตัวอ่อนเจริญดีและไม่มีโรค นอกจากนี้ที่ญี่ปุ่นยังมีการใช้โอคาราในการเพิ่มความคงทนในผลิตภัณฑ์เซรามิกด้วย (O'Toole, 1999)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร และ คาร์โบไฮเดรต ต่อน้ำหนักแห้งของโอคารา

โปรตีน	ไขมัน	ใยอาหาร	คาร์โบไฮเดรต	อ้างอิง
25.4-28.4	9.3-10.9	52.8-58.2	5.3	O'Toole (1999)
26.8	12.3	-	52.9	Ma *et al.*, (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 โปรตีนสกัดจากโอคารา

ในโอคาราจะมีอัตราส่วนของโปรตีนที่มีคุณภาพอยู่สูง มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ FAO จากการวิเคราะห์ค่า protein efficiency ratio (PER) พบว่าโอคารามีค่า PER 2.71 ซึ่งสูงกว่าถั่วเหลืองที่มีค่า PER 2.57 (O'Toole, 1999) Khare และคณะ (1995) ศึกษาความสามารถในการใช้โอคาราเป็นแหล่งโปรตีน และความสามารถในการย่อยโปรตีนโอคาราในร่างกายพบว่า ร่างกายสามารถย่อยโปรตีนได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แต่การประยุกต์ใช้โอคาราในผลิตภัณฑ์อาหารยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โดยส่วนใหญ่จะใช้โอคาราในด้านการเพิ่มเส้นใยในอาหาร เช่น นำมาใช้เป็นส่วนผสมทดแทนแป้งในผลิตภัณฑ์ขนมอบ เค้ก คุกกี้ ลูกกวาด ขนมขบเคี้ยวปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจทำการสกัดโปรตีนโอคาราและศึกษาสมบัติของโปรตีนที่ได้รวมทั้งทำการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

การสกัดโปรตีนจากโอคาราสามารถทำได้โดยใช้การสกัดด้วยด่าง pH 9.0 กวนผสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้โปรตีนละลาย จากนั้นทำการตกตะกอนที่ pH 4.5 และแยกส่วนของเหลวออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้มาปรับ pH ให้เป็นกลาง และนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จากการทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราที่สกัดได้พบว่ามีความสามารถในการละลาย การดูดซับน้ำและไขมัน การเกิดอิมัลชัน และการเกิดฟองดีกว่าโปรตีนสกัดทางการค้า แต่โปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณต่ำประมาณ 12.8 เปอร์เซ็นต์ (ณัชชา สุพิชญางกูร, 2545) ในขณะที่ Ma และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคารา พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการละลายต่ำแต่สมบัติด้านอื่นเช่น การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟองและการเกาะเกี่ยวต่างๆเทียบได้กับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และจากการศึกษาการละลายของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการสกัดเปรียบเทียบกับแป้งถั่วเหลือง พบว่าตัวอย่างแป้งถั่วเหลืองละลายได้ดีกว่าโปรตีนโอคารา แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั่วไปมีความสามารถในการละลายดีกว่าโปรตีนสกัดที่เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างกระบวนการผลิต

ดังนั้นการนำโอคารามาสกัดโปรตีนและทำการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารและเพิ่มมูลค่าให้กับโปรตีนจากพืช Chan และ Ma (1999) พบว่าโปรตีนโอคาราที่สกัดได้จากกากที่เหลือจากการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองมีความสามารถในการละลายได้น้อย ทำให้การนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆทำได้ยาก จึงทำการดัดแปรโปรตีนโดยการย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน ซึ่งช่วยให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นและสามารถละลายได้ดีในช่วง pH กว้างขึ้น อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่น ๆ ของโปรตีนโอคาราให้ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการดัดแปรโปรตีนโอคาราโดยการย่อยด้วยกรดอ่อนช่วยให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น สามารถนำไปใช้เป็น food ingredient ได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการนำโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะให้คุณค่าสารอาหารแล้วยังเป็นการเพิ่มบทบาทการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืชและอาศัยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้เป็นส่วนผสมหรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น สมบัติการดูดซึมน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร

สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนถั่วเหลืองนิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันของเนื้อสัตว์และไส้กรอก เพื่อปรับปรุงด้านเนื้อสัมผัส เพิ่มความนุ่ม และความสามารถในการอุ้มน้ำ รวมทั้งใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท dairy food และสารทดแทนน้ำนม จากการศึกษาของ Lin และ Mei (2000) พบว่าการเติมโปรตีนถั่วเหลืองจะช่วยทำให้สมบัติด้านความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดีขึ้น จึงส่งผลให้มีสัดส่วนของปริมาณไขมันในผลิตภัณฑ์ลดลง ให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lecomte และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์แฟรงเฟอร์เตอร์ นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองยังมีสมบัติในการเกิดเจลที่ดี สามารถฟอร์มเจลได้โดยการให้ความร้อนหรือการใช้สารตกตะกอนโปรตีน (coagulant) เช่น เจลเต้าหู้ อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์ในการเป็นสารให้ฟอง ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ขนมมาชเมลโล เมอร์แรงส์ ไอศครีม เป็นต้น ฟองที่เกิดจากโปรตีนถั่วเหลืองสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความคงตัวต่อไขมันในอาหาร ซึ่งอาหารบางประเภทที่มีไขมันเป็นส่วนผสม อาจส่งผลให้ฟองอากาศเกิดการยุบตัวลงได้ง่าย (สุกัญญา วงศ์วาท, 2545)

แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดด่างที่รุนแรงหรือการได้รับความร้อน ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพได้ง่าย จึงควรปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากสมบัติต่างๆของโปรตีนจะเกี่ยวเนื่องกับโครงสร้างเป็นสำคัญ การปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี

2.4.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ (Enzymatic Modifications)

เอ็นไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอ็นไซม์ในการดัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอ็นไซม์แต่ละชนิดจะให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการดัดแปรสภาพโปรตีนมีหลายประเภทขึ้นกับการทำงานของเอ็นไซม์แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เอ็นไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน ส่วนเอ็นไซม์ชนิดอื่นๆเช่น ทรานซ์กลูตามิเนส (transglutaminase) โปรตีนไคเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(protein kinase) เพกทิเนส (pectinases) เปปทิโดกลูตามิเนส (peptidoglutaminase) เป็นต้น ได้เริ่มมีการนำมาใช้แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากในระดับอุตสาหกรรม (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

2.4.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส

เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแตกต่างกันไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โมเลกุลที่ผ่านการย่อยสลายจะมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อย ความจำเพาะของเอ็นไซม์และสภาวะอุณหภูมิ เวลาที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยา การทำงานของเอ็นไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีนนั้น เอ็นไซม์จะเข้าไปตัดพันธะเปปไทด์ทำให้ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เช่น di, tri – peptide และเมื่อมีการย่อยสลายต่อไปก็จะได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆคือ เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีนและเอนโดเปปติเดส (Endopeptidases)ซึ่งเป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระแบบสุ่ม (randomly) ภายในสายโปรตีน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

<u>ประเภทของโปรติเอส</u>

1. โปรติเอสเซรีน (Serine proteases)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่มีอนุมูลกรดอะมิโนเป็น ไทโรซีน (Tyr) เฟนิลอะลานีน (Phe) และทริปโตเฟน (Trp) เช่นเอ็นไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ซับทิไลซิน (Subtilisin) หรืออนุมูลกรดอะมิโนเป็น ไลซีน (Lys) และ อาร์จินีน (Arg) เช่น เอ็นไซม์ทริปซิน (Trypsin) เอ็นไซม์ทรอมบิน (Thrombin) เอ็นไซม์เหล่านี้เป็นพวกอัลคาไลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 7-11 (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) จากการศึกษาของ Chan และ Ma (1999) พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ทริปซินจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำและดูดซับน้ำได้ดี ช่วยเพิ่มสมบัติในการเกิดฟองและอิมัลชันได้ดีขึ้นด้วย

เอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรติเอส ผลิตจาก *Bacillus lichenifomis* บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ แอสปาร์เตท เอ็นไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986) เอ็นไซม์อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนถั่วเหลืองให้ดีขึ้น เช่น สมบัติด้านการเกิดฟอง การเกิดอิมัลชัน เมื่อทำการย่อยที่ระดับจำกัดเป็นเอ็นไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อน อุณหภูมิที่ใช้คือ 55 – 60 องศาเซลเซียส แต่อาจสูงได้ถึง 70 องศาเซลเซียส มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 7 – 11 ที่ pH 4 เอ็นไซม์จะถูกยับยั้งปฏิกิริยา สูญเสียความสามารถในการทนความร้อนซึ่งเป็นประโยชน์ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอ็นไซม์ได้ จากงานวิจัยของ Waish และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่าอัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนได้โดยการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยอัลคาเลส ที่ระดับการย่อยสลาย 2 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ได้จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นในช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 3.0- 5.0 ส่วนที่ pH 6.0- 8.0 ค่าการละลายของโปรตีนจะลดต่ำลง Govindaraju และ Srinivas (2004) ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน arachin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายสูงโปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มเป็น 55 - 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำจะให้ค่าการละลายในช่วง pH 4 – 4.5 เพิ่มเป็น 14 - 16 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการเกิดฟองเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน และ fungal protease แต่ไม่ส่งผลให้ค่าความคงตัวของฟองโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfhydryl proteases)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยส่วนใหญ่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เอ็นไซม์ปาเปน (Papain) จากมะละกอ เอ็นไซม์ไฟซิน (Ficin) จากมะเดื่อ และเอ็นไซม์โบรมิเลน (Bromelain) จากสับปะรด สมบัติของโปรติเอสซัลไฟดริลเป็นพวกนิวทรัลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 6-7.5 (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) จากงานวิจัยของ Were และคณะ (1997) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้สารละลายด่างที่ pH 10.0 ร่วมกับเอ็นไซม์ปาเปน พบว่ามีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น และยังส่งผลให้สมบัติการเกิดฟอง การจับน้ำและค่า Surface hydrophobicity เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นแต่ไม่มีผลต่อสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีน และจากงานวิจัยของ Ortiz และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์โบรมิเลน โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และยับยั้งเอ็นไซม์ด้วยการเติม 18.8 เปอร์เซ็นต์ TCA (trichloroacetic acid solution) หรือการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากการทดลองพบว่าเอ็นไซม์โบรมิเลนสามารถย่อยสลาย α- , α-7S subunit และ A-11S subunit และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า 94 kDa ให้เล็กลงพร้อมทั้งช่วยเพิ่มประจุของโมเลกุลโปรตีนและปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองให้ดีขึ้น ค่าการละลายของโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายเพิ่มขึ้นในทุกช่วง pH โดยเฉพาะช่วง pH 4.5 -5.8 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการละลายต่ำสุด โปรตีนที่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก ให้ค่าการละลายสูงกว่าการใช้18.8 เปอร์เซ็นต์TCA Scilingo และคณะ (2002) ศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนสกัดจาก Amaranth ที่ทำการดัดแปรโดยใช้เอ็นไซม์ cucurbita และเอ็นไซม์ปาเปน พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็งให้ค่าการละลายเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์ cucurbita ส่วนโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาด้วยความร้อน จะให้ค่าการละลายสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ cucurbita จึงเหมาะในการเลือกใช้เอ็นไซม์ปาเปนปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสกัดจาก Amaranth เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องมีการให้ความร้อน เพื่อยังคงค่าการละลายที่ดีอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing proteases)

เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเอกโซเปปติเดสตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการไอออนของโลหะคือ Zn^{+2} มีช่วงปฏิกิริยาของ pH เป็นกลาง (pH 6.5-7.5) เรียกนิวทรัลโปรติเอส เป็นโปรติเอสที่มีไอออนและโลหะรวมในโมเลกุลเอ็นไซม์หรืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ เอ็นไซม์นิวเทรสเป็นนิวทรัลโปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนจากพืชและสัตว์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโน นิวเทรสเป็นเอ็นไซม์โปรติเอสที่มีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยา อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในช่วง pH 5.5- 7.5 และอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เอ็นไซม์นิวเทรส สามารถช่วยปรับปรุงสมบัติในการอุ้มน้ำและความคงตัวของอิมัลชัน ของโปรตีนที่ผลิตจากปลาแซลมอนให้สูงขึ้นได้ (Sathivel and Bechtel, , 2004)

4. โปรติเอสกรด (Acid proteases)

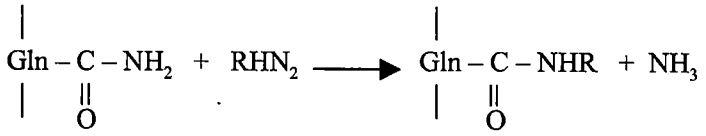
เป็นโปรติเอสที่มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วง pH ของกรด (pH< 7) โดยทั่วไปเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วง pH เหมาะสมระหว่าง pH2-4 และไม่แสดงชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณา pH activity profile ของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุมูลกรดแอสปาติกอยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอ็นไซม์เรนนินและเปปซิน เป็นต้น เอ็นไซม์เปปซินมีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาย่อยสลายที่เหมาะสมระหว่าง pH 8 – 4 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน เช่น Phe, Tyr และ Tryp (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) เหมาะในการนำมาย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง จากงานวิจัยของปาริฉัตร ทัพภะสุต และปราณี อ่านเปรื่อง (2541) ซึ่งทำการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง สำหรับทดลองกับผลิตภัณฑ์เมอแรงส์ พบว่าการใช้เอ็นไซม์เปปซินที่ pH 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 4.5 จะให้ค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ซึ่งถือว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากไข่ขาวได้

2.4.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส

ทรานซ์กลูตามิเนส (Transglutaminase, TGase) มีสมบัติในการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ในสภาวะที่มีหมู่เอมีน TGase จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งเอมีนของสายโพลิเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลระหว่าง γ -carboxyamide ของกลูตามีนในโปรตีนกับหมู่เอมีน (RNH_2) เกิดเป็นโปรตีนรูปใหม่ซึ่งมีสายยาวขึ้น แสดงดังภาพที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) acyl-transfer reaction



(2) crosslinking reaction

(3) deamidation

ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาของทรานซ์กลูตามิเนส (1) ปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิล (2) ปฏิกิริยาเชื่อมขวาง (3) ปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน

ที่มา : Motoki and Seguro (1998)

ในสภาวะที่ไม่มีหมู่เอมีนจะเกิดปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน (deamidation) โดยเกิดการไฮโดรไลซีสของหมู่แกมมาคาร์บอกซิล (γ -carboxyl group) ของกลูตามีน ซึ่งมี TGase เป็นตัวเร่ง ทำให้หมู่แอมโมเนียหลุดออกมาและได้เป็นกรดกลูตามิก ส่วนกรณีที่ปฏิกิริยามีหมู่เอมีนเป็น NH_2- Lys (อนุมูลอิสระของไลซีน) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้โปรตีนสายยาวเชื่อมระหว่างกลูตามีนและไลซีน เรียกว่าปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (crosslinking) ทำให้ได้โปรตีนสายใหม่ที่มีสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น โปรตีนมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ยืดหยุ่นมากขึ้น ทนต่อการตกตะกอนด้วยความร้อน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ลักษณะดังกล่าวส่งผลที่ดีต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยได้มีการทดลองนำโปรตีนจากนมและถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้ TGase มาเป็นส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกจากเนื้อไก่เพื่อลดการใช้ฟอสเฟต พบว่าโปรตีนที่ผ่านปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม ทนความร้อนได้ดีขึ้น เพิ่มความเสถียรของฟองซึ่งส่งผลต่อการเกิดเจลที่แข็งแรงและมีสมบัติการเกิดอิมัลชันที่ดี สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกได้ (Muguruma *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

เปปทิโดกลูตามิเนส (Peptidoglutaminase, Pgase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลาย กลูตามีนออกจากสายโพลิเปปไทด์ที่ตำแหน่งเอมีน การทำงานของเอ็นไซม์สามารถย่อยได้ตั้งแต่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น โปรตีนไข่ขาว จนถึงโมเลกุลขนาดเล็กของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการ deamidation แล้ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรใช้เอ็นไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในระดับหนึ่งก่อนที่จะมีการใช้ PGase จะช่วยในการย่อยสลายกลูตามีนได้มากขึ้น (Hudson, 1992)

2.4.1.4 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสตาร์ช เช่น แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส นิยมใช้ในการผลิตสตาร์ชดัดแปรหรือการสกัดโปรตีนจากรำข้าว เพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน ส่งผลให้สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ง่ายขึ้น เอ็นไซม์ที่นำมาใช้มากในระดับอุตสาหกรรมคือ แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายภายในโมเลกุลที่พันธะแอลฟา 1, 4 ไกลโคซิดิก มีชื่อทางการค้าคือ เทอร์มามิล (Termamyl) เป็นเอ็นไซม์ชนิดทนร้อน pH เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 -7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 90 องศาเซลเซียส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

จากงานวิจัยของ ณัชชา (2545) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง โดยวิธีการใช้สารละลายด่าง มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 56-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีสูงถึง 38-39 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโปรตีนโอคาราที่สูง สันนิษฐานว่าเกิดจากโปรตีนเมื่อผ่านการใช้ความร้อนหรือแรงบีบอัด เกิดการเชื่อมต่อกับหมู่ของคาร์โบไฮเดรต (protein – polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ได้จึงน้อยและยังส่งผลต่อสมบัติการละลายด้วย ดังนั้นการปรับปรุงโปรตีนโอคาราจึงใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสตาร์ชเพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เอ็นไซม์เหล่านี้ในการผลิตและปรับปรุงโปรตีนรำข้าว เนื่องจากเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการแยกสตาร์ชที่สร้างพันธะกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน และเส้นใยอาหารออกมาได้ (Wang *et., al.* 1999)

2.4.2 การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์ (Non - Enzymatic Modifications)

เป็นวิธีการดัดแปรสภาพโปรตีนโดยการใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการคลายตัวหรือจับตัวกันใหม่ของพันธะเคมีต่างๆ ทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2.4.2.1 การดัดแปรโปรตีนโดยวิธีทางเคมี

การดัดแปรด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกกระบวนการหนึ่งซึ่งนิยมนำมาปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วแต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบางอย่างค่อนข้างรุนแรงซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและคุณค่าสารอาหารบางอย่างได้ การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เอซิลเลชัน (acylation)

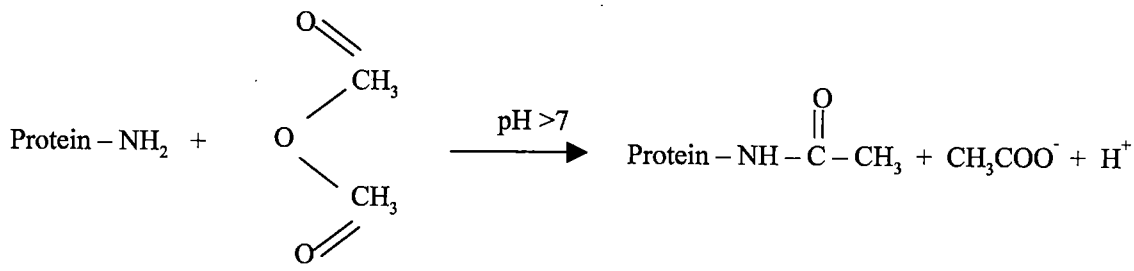
เป็นกระบวนการทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารประเภทแอซิดแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ε-อะมิโนของไลซีน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้กรดอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แทนที่หมู่ ε-อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นกลางของอะซิทิล (acetyl) เรียกว่ากระบวนการอะซิทิลเลชัน (acetylation) หรือการใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ (succinic anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ε-อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นลบของซัคซินิล (succinyl) เรียกว่ากระบวนการซัคซินิลเลชัน (succinylation) ซึ่งส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีประจุลบเพิ่มมากขึ้น เกิดแรงผลักระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในอีกโมเลกุลหนึ่งของโปรตีน มีผลให้การเกาะตัวกันของโปรตีนลดน้อยลง การละลายจึงเพิ่มสูงขึ้น (Damodaran, 1996)

Gruener และคณะ (1997) ศึกษากระบวนการซัคซินิลเลชันและอะซิทิลเลชัน ของโปรตีน Conola พบว่าการเพิ่มระดับของการซัคซินิลเลชัน มีผลต่อการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีน โดยที่ระดับ 62 เปอร์เซ็นต์ซัคซินิลเลชัน จะเกิดการย่อยสลาย 12 S globulin อย่างสมบูรณ์เป็นสาเหตุให้จุดไอโซอิเล็คตริคลดลง และเมื่อเพิ่มระดับของการซัคซินิลเลชัน มีผลทำให้ค่า aromatic hydrophobicity ลดลงจาก 97.5 เหลือเพียง 58.1 เปอร์เซ็นต์

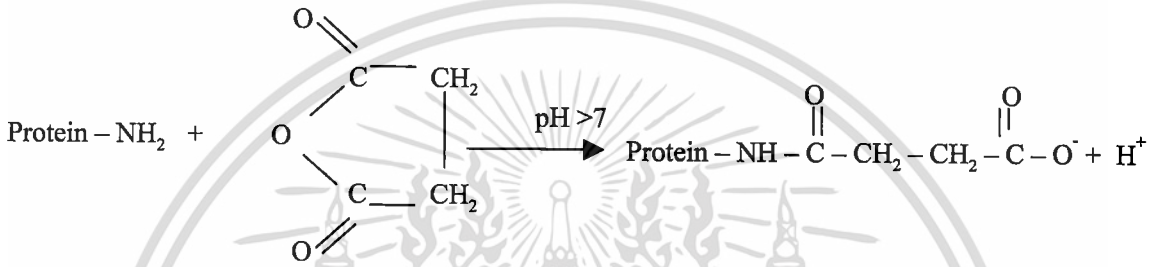
El-Adawy (2000) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียว (Mung bean protein) ที่ผ่านขบวนการซัคซินิลเลชันและอะซิทิลเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีความสามารถในการละลายน้ำและการละลายในโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 M เพิ่มขึ้น ส่วนขบวนการอะซิทิลเลชัน ช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำแต่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ได้ลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้จะส่งผลให้ค่าอิมัลชันลดลง สมบัติการเกิดฟองเพิ่มขึ้นโดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซิติกแอนไฮไดรด์ และซัคซินิกแอนไฮไดรด์ ที่สัดส่วน 1 กรัมสารต่อกรัมโปรตีน จะให้ค่าการเกิดฟองเพิ่มขึ้นเป็น 135 เปอร์เซ็นต์ และ 129 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acylation with acetic acid



Succinylation with succinic acid

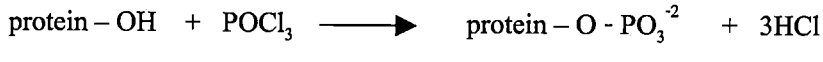


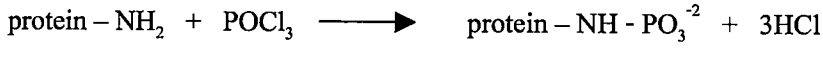
ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์ กับหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน

ที่มา : El-Adawy (2000)

- ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation)

เกิดจากการที่สารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (phosphorus oxychloride; $POCl_3$) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน หรือหมู่ ε -อะมิโนของไลซีน แสดงดังภาพที่ 3 ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้น มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ในงานวิจัยของ Matheis และคณะ (1989) พบว่าการใช้ $POCl_3$ ในการดัดแปรสมบัติของยีสต์โปรตีน แม้จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของโปรตีนแต่สมบัติในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้การเกิดฟอสโฟริเลชันที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูง ๆ จะส่งผลให้เกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ทำให้โปรตีนมีความเป็นประจุเพิ่มขึ้น (Damodaran, 1996)





ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน ระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนและทรีโอนีน

ที่มา : Matheis *et., al.* (1989)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมใช้ในการดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร การดัดแปรโดยใช้ความร้อนจะขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของโปรตีนและสภาวะความร้อนที่ใช้เพื่อให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วนหรือเกิดโดยสมบูรณ์ ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป (Petruccelli and Anon, 1995)

การใช้ความร้อนในระดับที่เหมาะสมถือเป็นวิธีการหนึ่งในการดัดแปรสมบัติของโปรตีนสกัด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส โปรตีนจะเกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 –80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้พันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลาย และที่อุณหภูมิ 80 –90 องศาเซลเซียส จะเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ใหม่ระหว่างโมเลกุลโปรตีน (Davis and Williams, 1998) และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลต่อพันธะที่เป็น non – covalent ซึ่งเป็นพันธะที่ยึดโมเลกุลของโปรตีนในการเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก และ electrostatic bond เมื่อโครงสร้างเกิดการคลายตัว ส่วน hydrophobic จะเพิ่มมากขึ้นทำให้โปรตีนจับกับโมเลกุลน้ำได้น้อยลง เกิดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนมากขึ้นและเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Scilingo และ Anon (1996) พบว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65-73 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อการทำลาย 7S และ11S globulin ของโปรตีนถั่วเหลือง และเมื่อได้รับความร้อนในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส โครงสร้างโปรตีนจะแตกตัวและจับตัวกันใหม่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับความร้อนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมประเภทเนื้อสัตว์ จะทำให้ 11S acidic-basic subunit ของโปรตีนถั่วเหลือง เกิดการแตกตัวออกและสร้างพันธะไดซัลไฟด์กับไมโอซิน (myosin) ขึ้นมาใหม่ ส่งผลให้เกิดลักษณะของเจลที่มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Petruccelli และคณะ (1994) พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ 80 และ 92 องศาเซลเซียสในช่วงระยะเวลาสั้น 6-12 นาที ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติการละลายแต่ทำให้ค่า hydrophobicity ของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 นาที จะทำให้ 7S และ 11S globulin ถูกทำลาย โปรตีนเกิดการตกตะกอนสมบัติการละลายและค่า hydrophobicity ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 กากถั่วเหลือง จากบริษัทกรีนสปอต (ประเทศไทย) จำกัด

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

3.1.3 เอ็นไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) 3.0 units/mg solid บริษัท SIGMA-ALDRICH Inc.

3.1.4 เอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Termamyl 120 L Type LS) บริษัท Novo Nordisk Co., Ltd. มีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ 120 KNU (Kilo Novo alpha-amylase Unit) ต่อกรัมของเหลว

3.1.5 โปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า Supro Ex33

3.1.6 สารเคมี

3.1.6.1 Acrylamide ($CH_2CHCONH_2$)

3.1.6.2 Ammonium Persulfate ($(NH_4)_2S_2O_8$)

3.1.6.3 8 –anilino – 1 – naphthalene sulfonic acid (ANS)

3.1.6.4 Bromophenol Blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)

3.1.6.5 Bovine Serum Albumin (BSA)

3.1.6.6 Coomassie Brilliant Blue

3.1.6.7 Copper (II) Sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)

3.1.6.8 Disodium Hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4)

3.1.6.9 3, 5- dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)

3.1.6.10 Ethyl alcohol (CH_3CH_2OH)

3.1.6.11 Folin Phenol reagent

3.1.6.12 Glacial Acetic acid (CH_3COOH)

3.1.6.13 Glycerol ($C_3H_8O_3$)

3.1.6.14 Glycine ($C_2H_5NO_2$)

3.1.6.15 Hexane

3.1.6.16 Hydrochloric acid

3.1.6.17 2- Mercaptoethanol (2ME)

3.1.6.18 Methanol (CH_3OH)

3.1.6.19 N,N - Metheylene – bis (acrylamide) ($C_7H_{10}N_2O_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

64367

3.1.6.20 N,N,N,N – Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ($C_6H_{16}N_2$)

3.1.6.21 Phosphoric acid $(HPO_3)_n$

3.1.6.22 Potassium Sulfate (K_2SO_4)

3.1.6.23 Sodium Carbonate (Na_2CO_3)

3.1.6.24 Sodium Chloride (NaCl)

3.1.6.25 Sodium Citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)

3.1.6.26 Sodium Dihydrogen Phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)

3.1.6.27 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)

3.1.6.28 Sodium Hydroxide (NaOH)

3.1.6.29 Sodium potassium tatrate ($COOK(CHOH)_2COONa$)

3.1.6.30 Soybean Oil

3.1.6.31 Tris (hydroxymethyl) Aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)

3.1.6.32 Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)

3.2 อุปกรณ์ในการผลิตโปรตีนสกัดจากโอคารา

- Freeze dryer — Freeze dry LABCONCO
- pH meter — Mettler Toledo MP 220, Switzerland
- Hot plate stirrer — Thermolyne Nuova Stir Plate, USA
- Centrifuge — Centrifon T-42 k Konton Instruments
- หลอด Centrifuge
- Water bath
- Thermometer
- Suction flask
- Vacuum pump
- กระดาษกรอง Whatman No.4
- Soxlet Equipment
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ในการดัดแปรโปรตีน

- Multistirrer
- Water bath
- ถุง Dislysis
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.4.1 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน

- Centrifuge — Centrifon T-42 k Konton Instruments
- Spectrophotometer — Spectro 22, LaboMed, Inc., USA
- Quartz cuvette
- Magnetic stirrer
- Eppendorf Centrifuge
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4.2 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

- Ultrasonic — Sonic Vibra Cell VC 750, Sonic & Materials
- Spectrophotometer — Spectro 22, LaboMed, Inc., USA
- Quartz cuvette
- Eppendorf Centrifuge
- เครื่องแก้ว

3.4.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง

- Homogenizer — Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, IKA Work
- Homogenizer probe — S25N 10 G IKA-Dispersing Tool
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ค่า Surface hydrophobicity

- Centrifuge — Centrifon T-42 k Konton Instruments
- Spectrofluorometer — Modle FP- 6200, JASCO, USA
- Rectangular quartz cell
- Vortex mixer — VM – 300 Gemmy industrial Corp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Magnetic stirrer
- Water bath
- เครื่องแก้ว

3.4.5 อุปกรณ์ในการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

- Electrophoresis set Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Easy Breeze Gel Dryer Hoefer scientific Instruments
- Micrppipette P1000 Pipetman Gilson Medical Electronics
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.5 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการดำเนินงาน

3.6.1 การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสกัดจากโอคารา

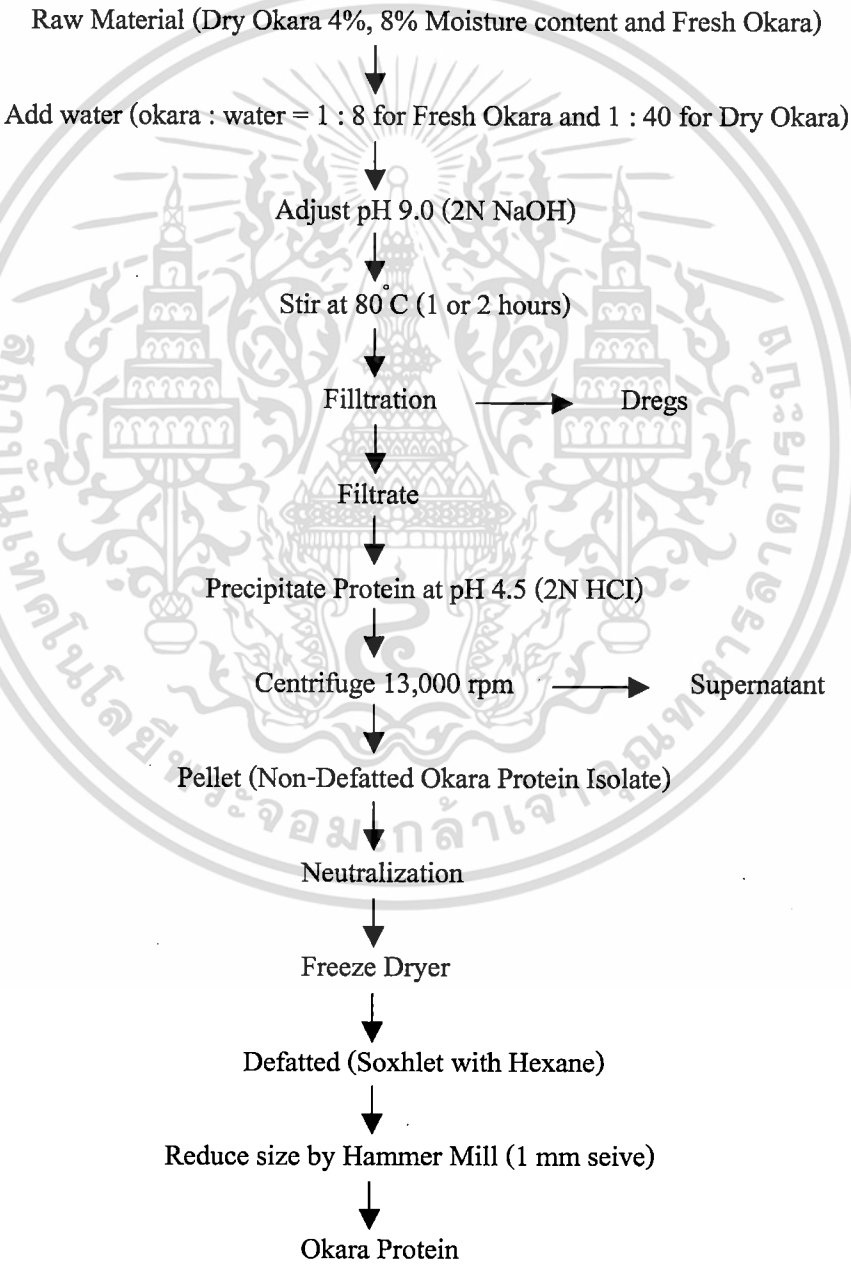
จะเตรียมตัวอย่าง 3 ส่วน คือ

1. ตัวอย่างสด จะนำกากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานมาทำการบีบน้ำออกในรอบแรกเพื่อลดปริมาณน้ำในวัตถุดิบ จากนั้นจะทำการแบ่งเป็นส่วน ส่วนละ 100 กรัม เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนต่อหนึ่งครั้งในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า –20 องศาเซลเซียส
2. ตัวอย่างแห้ง จะนำกากถั่วเหลืองจากโรงงานมาทำการบีบน้ำออกเช่นเดียวกับตัวอย่างสด และแบ่งเป็นถุงเล็ก ๆ จากนั้นนำไปแช่แข็งเพื่อคงคุณภาพให้สม่ำเสมอ (เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่ได้รับจากโรงงานมีปริมาณมากเกินกว่าที่จะอบได้ในหนึ่งครั้ง) เมื่อทำการอบจะนำกากถั่วมาทำการละลายและนำมาบีบน้ำออกอีกครั้งเพื่อลดปริมาณน้ำ ทำให้ใช้เวลาในการอบน้อยลง จากนั้นจะนำกากถั่วเหลืองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-60 นาที เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณความชื้น 8-10 เปอร์เซ็นต์ และอบเป็นเวลา 75-80 นาที เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณความชื้น 4-5 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างแห้งที่ได้จะทำการแบ่งบรรจุถุงละ 20 กรัม เพื่อทำการสกัดโปรตีนต่อหนึ่งครั้งในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดผนึกถุงด้วยระบบสุญญากาศ

3.6.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อผลผลิตโอคาราโปรตีนที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอคาราที่มีปริมาณความชื้น 3 ระดับ คือ โอคาราสดความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราอบแห้ง ที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการสกัดโปรตีนตามวิธีการของ Ma และคณะ (1997) ดังภาพที่ 4 โดยโอคาราสดจะใช้อัตราส่วนของโอคาราสดต่อน้ำเป็น 1:8 ส่วนโอคาราแห้งจะใช้อัตราส่วนของโอคาราแห้งต่อน้ำเป็น 1:40 วางแผนการทดลองแบบ CRD และจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (3x2) ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคือ 1 และ 2 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อผลผลิตโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ (% dry basis) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 9.01



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากโอคารา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้

นำตัวอย่างโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 3.6.2 มาทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ และเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่กับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33)

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีน โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 9.01

3.6.3.1 การทดสอบความสามารถละลายได้ของโอคาราโปรตีน

หาค่า Solubility index ของโอคาราโปรตีนทำได้จากวิธีการของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ 1 (ภาคผนวก ก) และนำค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่หาได้มาทำการวิเคราะห์ค่า % solubility index ดังสมการที่ 1

$$\% \text{ solubility index} = \frac{\text{protein in supernatant}}{\text{protein in suspension}} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

3.6.3.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

ทดสอบคามสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน ทำการวิเคราะห์ค่า Emulsion Activity และ Emulsion Stability โดยค่า Emulsion Activity จะทำการวัดค่า Emulsion Turbidity ของอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hill (1996) ดังภาพที่ 2 (ภาคผนวก ก)

3.6.3.3 การทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการเกิดฟอง (foaming) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีของ Phillips (1987) ดังภาพที่ 3 (ภาคผนวก ก)

3.6.3.4 การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีของ Quinn และ Paton (1979)

3.6.3.5 การทดสอบความสามารถในการดูดซับไขมันของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการดูดซับไขมัน (fat adsorption) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีการของ Lin และคณะ (1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.6 การทดสอบหาค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน

หาค่า Surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีการของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ 4 (ภาคผนวก ก) และทำการวิเคราะห์ค่า Surface hydrophobicity ของโปรตีนหาได้โดยการหาค่าความข้นของกราฟระหว่าง ค่า Fluorescence Intensity กับความเข้มข้นของโปรตีนไอโซเลต (%)

3.6.4 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

ย่อยโปรตีนโอคาราที่สกัดได้ด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ตามวิธีของ Waish และคณะ (2003) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 8.0 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปรับตะกอนที่ได้ให้เป็นกลาง pH 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมาทดสอบสมบัติของโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 3.6.3

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

3.6.5 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ย่อยโปรตีนโอคาราที่สกัดได้ด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ตามวิธีของ Adriana และคณะ (2002) โดยละลาย ตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.01M pH 8.5 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาทีเพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมาทดสอบสมบัติของโปรตีนตามวิธีการในข้อ 3.6.3

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

3.6.6 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เนื่องจากโปรตีนโอคาราที่สกัดได้มีส่วนของคาร์โบไฮเดรตจับอยู่กับโปรตีน(Protein-Polysaccharide conjugate) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการกำจัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตออกโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม กวนผสมที่ระยะเวลาในการย่อยของเอ็นไซม์ต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ90 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 70 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาในการย่อย จากนั้นนำของเหลวที่ผ่านการย่อยในส่วนที่เหลือมาปรับ pH เป็น 4.5 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์และตกตะกอนโปรตีน แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมาทดสอบสมบัติของโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 3.6.3

3.6.7 การศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโอคารา (ภาคผนวก ค)

3.6.7.1 ศึกษา subunit ของโอคาราโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการแยก subunit ของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก จ) โดยใช้ 12% acylamide gel ในการแยก subunit และเติม 2 – ME (mercaptoethanol) 2% ทำการแยก subunit ของโอคาราโปรตีน เทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และใช้ Low Molecular Weight Standard Marker เป็นตัวอย่างในการเทียบน้ำหนักโมเลกุลของ subunit แต่ละตัว

3.6.7.2 การศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโอคาราโปรตีน

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโอคาราโปรตีน ตามวิธีของ Cohen และ Michaud (1993) วิเคราะห์โดย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.6.7.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีน (AOAC, 1995)

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน
- วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

โอคาราที่มีปริมาณความชื้น 3 ระดับ คือ โอคาราสดความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราอบแห้งที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการสกัดโปรตีน โดยโอคาราสดจะใช้อัตราส่วนของโอคาราสดต่อน้ำเป็น 1:8 ส่วนโอคาราแห้งจะใช้อัตราส่วนของโอคาราแห้งต่อน้ำเป็น 1:40 การที่ปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เนื่องจากในกรณีของโอคาราแห้ง ถ้าปริมาณน้ำที่เติมน้อย ผงโอคาราจะดูดซับน้ำนั้นไว้แน่น เกิดเป็นลักษณะของ paste เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ไม่สามารถแยกน้ำออกได้ จึงต้องเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อให้ผงโอคาราที่แห้งดูดซับน้ำได้อิ่มตัว อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำลงไปในปริมาณมาก เมื่อปรับอัตราส่วนของน้ำและโอคาราให้เท่ากับในกรณีที่ใช้เป็นโอคาราสด จะให้ผลผลิตของโปรตีนที่สกัดได้ต่อครั้งต่ำมาก ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการทดลองในหัวข้อต่อไป เนื่องจากมีข้อจำกัดของอุปกรณ์ในการทดลองที่ไม่สามารถผลิต Batch ใหญ่ได้ ประกอบกับเมื่อพิจารณาในด้านประสิทธิภาพการสกัดจริง ๆ การใช้น้ำปริมาณมาก พลังงานที่ใช้ในการแยกน้ำและของแข็งจะเพิ่มมากขึ้นด้วย

ปริมาณโอคาราโปรตีนที่สกัดได้เมื่อใช้โอคาราสด โอคาราที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มาทำการสกัดโดยใช้เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราที่สภาวะการสกัดต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์ต่อ 100 กรัมของโอคาราแห้ง)

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	11.59^{a}	11.53^{a}	11.98^{a}
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	12.30^{b}	12.48^{b}	12.85^{b}

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยศึกษาความสัมพันธ์แบบแฟคทอเรียลของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า ไม่พบอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัยต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากโอคารา เมื่อพิจารณาถึงปริมาณความชื้นของโอคาราต่อปริมาณโปรตีน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปริมาณความชื้นของโอคาราในสภาวะการสกัดที่ใช้ในการทดลอง ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในขั้นตอนการอบตัวอย่างใช้ระดับความร้อนเพียง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งระดับความร้อนนี้อาจไม่ส่งผลต่อการสกัดโปรตีน ในการทดลอง Pre – test เมื่อใช้โอคาราแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งโอคาราของโรงงานสูงมากกว่า 100 องศาเซสเซียส เป็นผลให้ในการสกัดโปรตีนออกจากโอคาราต้องใช้เวลามากกว่า 5 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ถ้าต้องการอบโอคาราสดเพื่อเก็บรักษาไว้ และยังทำการสกัดโปรตีนจากโอคาราแห้งได้ดี ควรอบโอคาราสดที่อุณหภูมิต่ำ (~ 60 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการสกัดโปรตีนพบว่า ระยะเวลาในการสกัดโปรตีนเป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่อปริมาณโปรตีน โดยเมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมงจะได้ปริมาณโปรตีนมากกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากผลผลิตที่สกัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนที่มีในโอคาราแห้ง (24-25 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นว่ายังมีส่วนที่สูญเสียไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Ma และคณะ (1997) การที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อให้ได้โอคารา มีการใช้ความร้อนสูง รวมถึงแรงกลที่อัดบดเมล็ดถั่วเหลือง เพื่อสกัดน้ำนมออกมา ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพ คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของโปรตีนในโอคาราเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เป็นผลให้ความสามารถในการละลายที่เคยมีอยู่ลดลง (Zayas, 1997) ในการทดลองเลือกใช้หลักการละลายของโปรตีนที่ pH เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำง่าย ประหยัด ได้ผลดีมากในกรณีของ soy protein isolate (Vojdani, 1996) และเป็นวิธีการที่ไม่ทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ไม่มีผลต่อการย่อยโปรตีนของร่างกาย (protein digestibility) ถ้าต้องการเพิ่มปริมาณผลผลิตของโปรตีนสกัดจากโอคารา อาจเลือกใช้วิธีการสกัดแบบอื่น เช่น การใช้เอ็นไซม์หรือสารเคมีที่เข้าไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้าน ionic ของโปรตีน เพื่อทำให้คุณสมบัติการละลายสูงขึ้น

4.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อคุณ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากโอคารา

โปรตีนนอกจากจะเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายแล้ว ในอุตสาหกรรมอาหาร คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และอื่น ๆ ทำให้โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ผู้ผลิตสามารถเลือกใช้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ ดังนั้นในการทดลองจึงทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากสภาวะต่าง ๆ

4.2.1 ผลของการวิเคราะห์หาค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	$356.50^{b,c}$	$358.47^{b,c}$	320.74^{a}
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	381.93^{d}	$375.77^{c,d}$	352.43^{b}

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีของ globular protein เช่น โปรตีนจากถั่วเหลือง ค่า Surface hydrophobicity สามารถใช้คำนวณถึง Degree of Denaturation ของโปรตีนได้ ถ้าโปรตีนเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติ โครงสร้างที่เคยขดม้วนงอเริ่มมีการคลายตัวออก เป็นผลให้กลุ่ม hydrophobic ที่อยู่ด้านในโมเลกุลออกมาที่ผิวทำให้ค่า surface hydrophobicity สูงขึ้น (Nakai และคณะ, 1996)

จากการวิเคราะห์หาค่า surface hydrophobicity พบว่า ปริมาณความชื้นของตัวอย่างมีผลต่อค่า surface hydrophobicity โดยโปรตีนที่สกัดจากโอคาราแห้งจะมีค่า surface hydrophobicity สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากโอคาราสด ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนในระหว่างการอบแห้งมีผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวออก ค่า surface hydrophobicity ที่วัดได้จึงสูงกว่าโปรตีนจากโอคาราสดซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อนในกระบวนการทำแห้ง ส่วนระยะเวลาในการสกัดโปรตีนก็ส่งผลต่อค่า surface hydrophobicity เช่นกัน โดยเมื่อทำการสกัดที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ค่า surface hydrophobicity จะสูงกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง เนื่องจากในกระบวนสกัดมีการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาการสกัด ซึ่งส่งผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวออกเช่นเดียวกัน แต่เมื่อทำการพิจารณาถึงอิทธิพลของปริมาณความชื้นและระยะเวลาในการสกัดร่วมกันต่อค่า surface hydrophobicity จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อค่า surface hyddrophobicity

4.2.2 ผลของการทดสอบความสามารถละลายได้ของโอคาราโปรตีน

ตารางที่ 5 แสดงค่า Solubility Index ของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	81.76^{a}	$89.84^{a,b}$	93.21^{b}
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	81.09^{a}	$89.87^{a,b}$	$86.81^{a,b}$

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการทดสอบ ความสามารถในการละลายในรูปของ Solubility Index ของโปรตีนสกัดจากโอคาราแสดงในตารางที่ 5 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณความชื้นของโอคารา ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า โปรตีนที่ได้จากโอคาราสดมีค่า Solubility index สูงกว่าตัวอย่างที่ได้จากโอคาราแห้ง (ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับค่า Surface hydrophobicity การที่ค่า surface hydrophobicity สูง แสดงว่ามีส่วน hydrophobic ที่ไม่ชอบน้ำอยู่ที่ผิวของโมเลกุลมาก เป็นเหตุให้การจับตัวกับน้ำได้น้อยลง เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาในการสกัดต่อค่า Solubility index พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อใช้เวลาในการสกัด 1 หรือ 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ (Emulsion Activity) ซึ่งวัดอยู่ในรูปของค่า Turbidity (Absorbance) แสดงดังตารางที่ 6 ถ้าค่า Absorbance สูง แสดงว่าค่า Emulsion Activity สูง

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	2.77^{c}	$2.74^{a,b}$	2.73^{a}
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	$2.76^{b,c}$	2.81^{d}	2.72^{a}

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบโอคาราสดกับโอคาราแห้ง โดยเฉพาะโอคาราที่มีความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่ว่าระยะเวลาการสกัดจะเป็น 1 หรือ 2 ชั่วโมง ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราที่มีความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของค่า surface hydrophobicity เมื่อโมเลกุลของโปรตีนได้รับความร้อนในกระบวนการอบแห้ง โมเลกุลเกิดการคลายตัวทำให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ด้านในจะออกมาที่ผิว สามารถจับกับโมเลกุลของไขมัน ทำให้ค่า Emulsion Activity สูงขึ้น

ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion Stability) เป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญอีกอย่างหนึ่งของโปรตีน อิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่าง ๆ นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปทดสอบค่า Emulsion Turbidity ถ้าค่า Emulsion Turbidity สูง แสดงว่าอิมัลชันมีความคงตัวดี ผลของค่า Emulsion Stability ซึ่งแสดงในรูปของค่า Emulsion Turbidity ของอิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า Emulsion Stability ของอิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%^{NS}	โอคาราความชื้น 8%^{NS}	โอคาราสด^{NS}
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	0.20	0.21	0.13
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	0.17	0.26	0.18

^{NS} แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีความคงตัวของอิมัลชัน พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความคงตัวของอิมัลชัน แสดงว่าโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถให้อิมัลชันที่มีความคงตัวใกล้เคียงกัน ความคงตัวของอิมัลชันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง นอกจากโปรตีนแล้วยังขึ้นกับขนาดของเม็ดไขมัน ความเป็นกรดด่าง ค่า ionic (Pearce & Kinsella, 1978)

4.2.4 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน (Foaming Activity)

ความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน วัดอยู่ในรูปของความสูงของฟองที่เกิดขึ้น (เซนติเมตร) ถ้าความสูงของฟองที่วัดได้มีค่าสูง แสดงว่าความสามารถในการเกิดฟองดี ผลของความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีนที่สกัดในสภาวะต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%[NS]	โอคาราความชื้น 8%[NS]	โอคาราสด[NS]
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	7.33	7.50	7.45
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	7.50	7.40	7.60

[NS] แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีความสามารถในการเกิดฟอง พบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการเกิดฟอง ถึงแม้ว่าค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีนที่ได้จากโอคาราแห้งจะสูงกว่าโอคาราสดก็ตาม ความสามารถในการเกิดฟองก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่โมเลกุลมีลักษณะกลมพับม้วนงอกันแน่น โครงสร้างภายในประกอบด้วย subunit ที่จับกันด้วยพันธะที่แข็งแรง เช่น พันธะ disulfide การผ่านความร้อนในระหว่างการผลิตโอคารา ในขั้นตอนของการอบแห้งโอคารารวมถึงการสกัดทำให้โครงสร้างเพียงบางส่วนมีการคลายตัวออก ถ้าต้องการปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน อาจต้องใช้การดัดแปร (modify) ด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้เอ็นไซม์ กรด ด่าง ทำให้โครงสร้างคลายตัวออกมากทำให้เกิดการส่วนตัวเป็นฟิล์มบาง ๆ ล้อมรอบ air cell ได้ง่ายขึ้น

เมื่อนำฟองที่เกิดจากโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่าง ๆ มาทำการตรวจสอบความคงตัวของฟองโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดความสูง (เซนติเมตร) ของฟองที่เวลาต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของฟองของโอคาราโปรตีน

ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ของฟองที่เหลืออยู่		
	10 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง
OPI 4*1	15.90	11.17	7.45
OPI 4*2	10.67	0	0
OPI 8*1	12.00	8.66	5.33
OPI 8*2	0	0	0
OPI F*1	0	0	0
OPI F*2	9.21	0	0

OPI 4*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI 4*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
OPI 8*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI 8*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
OPI F*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI F*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากผลการวิเคราะห์ความคงตัวของฟอง พบว่า ความคงตัวของฟองที่ได้จากโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสดจะน้อยกว่าของตัวอย่างที่ได้จากโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้ง ส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic group) ที่ผิวที่เพิ่มขึ้นของโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้ง ทำให้สามารถจับกับอากาศได้มาก ทำให้ฟองที่เกิดมีความคงตัวมากขึ้น

4.2.5 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโอคาราโปรตีน

ความสามารถในการดูดซับน้ำของโอคาราโปรตีน คำนวณจากค่า กรัมของน้ำที่โอคาราโปรตีน 1 กรัม ดูดซับ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	5.63^{c}	5.97^{d}	6.01^{d}
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	4.12^{a}	4.82^{b}	5.02^{b}

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีความสามารถในการดูดซับน้ำของโอคาราโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน โดยโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราแห้งจะดูดซับน้ำได้น้อยกว่าโปรตีนที่สกัดจากโอคาราสด และโอคาราโปรตีนที่สกัดที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จะดูดซับน้ำได้น้อยกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง

4.2.6 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโปรตีนสกัดจากโอคารา

ความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน คำนวณจากค่า กรัมของน้ำมันที่โอคาราโปรตีน 1 กรัม ดูดซับไว้ ผลจากการทดสอบแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4%	โอคาราความชื้น 8%	โอคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	3.05^{a}	$3.28^{a,b,c}$	$3.11^{a,b}$
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	$3.39^{b,c,d}$	3.68^{d}	$3.54^{c,d}$

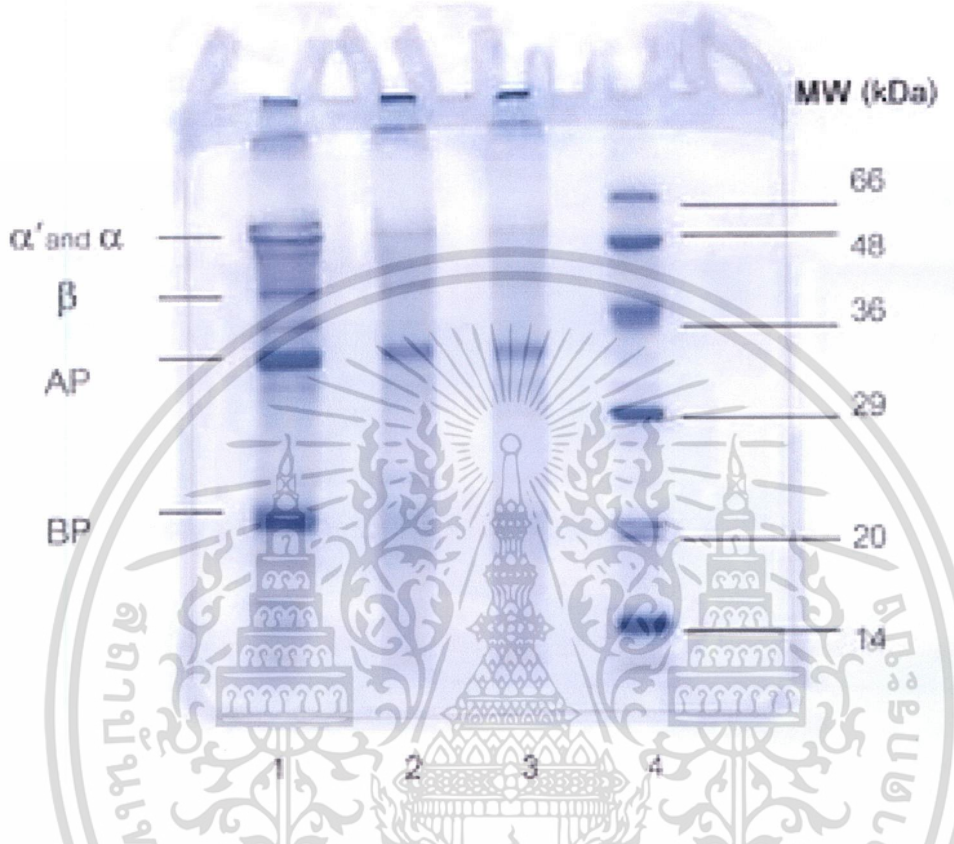
ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัด ที่มีต่อความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของระยะเวลาในการสกัด พบว่า เมื่อระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง ความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีนสูงขึ้น การที่โอคาราโปรตีนที่ได้จากโอคาราแห้ง มีความสามารถในการดูดซับน้ำมันไม่แตกต่างจากโอคาราโปรตีนที่จะได้จากโอคาราสด ทั้ง ๆ ที่มีค่า surface hydrophobicity สูงกว่า อาจเกิดจาก site ที่ตำแหน่งของ hydrophobic group ที่ผิวยังไม่ยืดหยุ่น (flexible) ยังมีโมเลกุลของกลุ่มอื่นบัง ทำให้ site ที่จะจับกับน้ำมันไม่สะดวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโอคารา

4.3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโปรตีนสกัดจากโอคารา



ภาพที่ 5 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโอคาราความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์

1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (Supro EX33)

2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราแห้งความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 1 ชั่วโมง

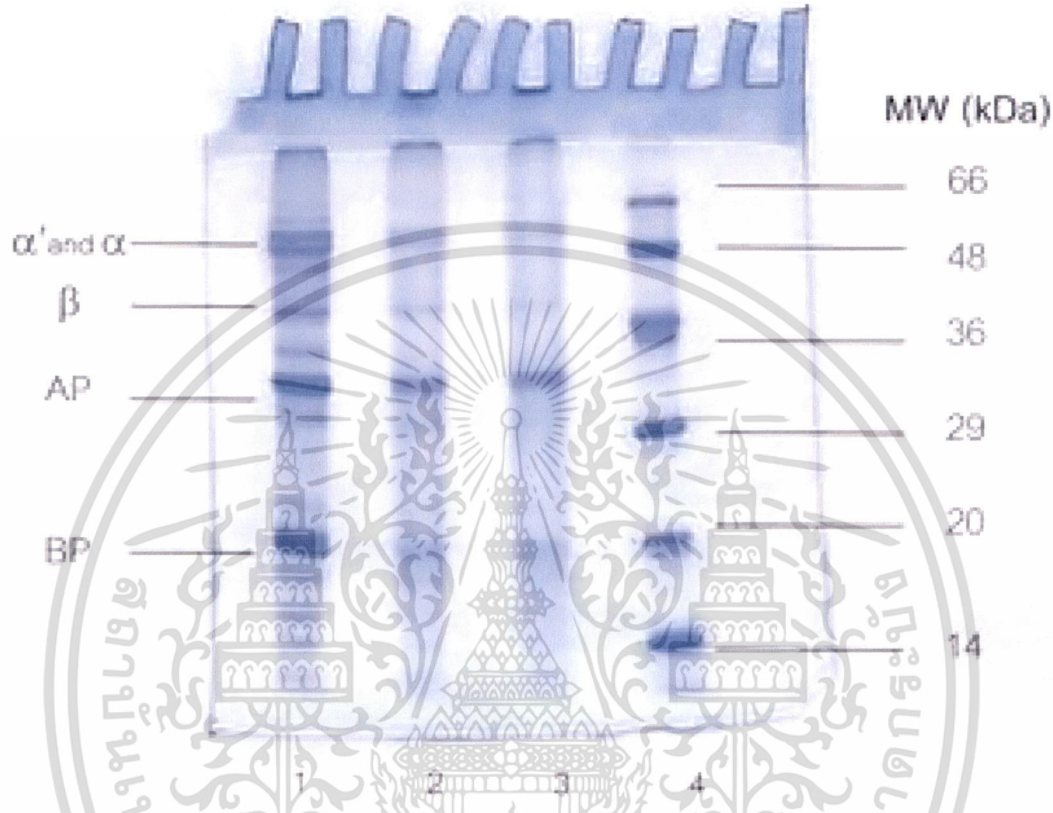
3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราแห้งความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 2 ชั่วโมง

4 : Low Molecular Weight Marker

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ - conglycinin

AP : Acidic polypeptide และ BP : Basic polypeptide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโอคาราความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์

1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (Supro EX33)

2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราแห้งความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 1 ชั่วโมง

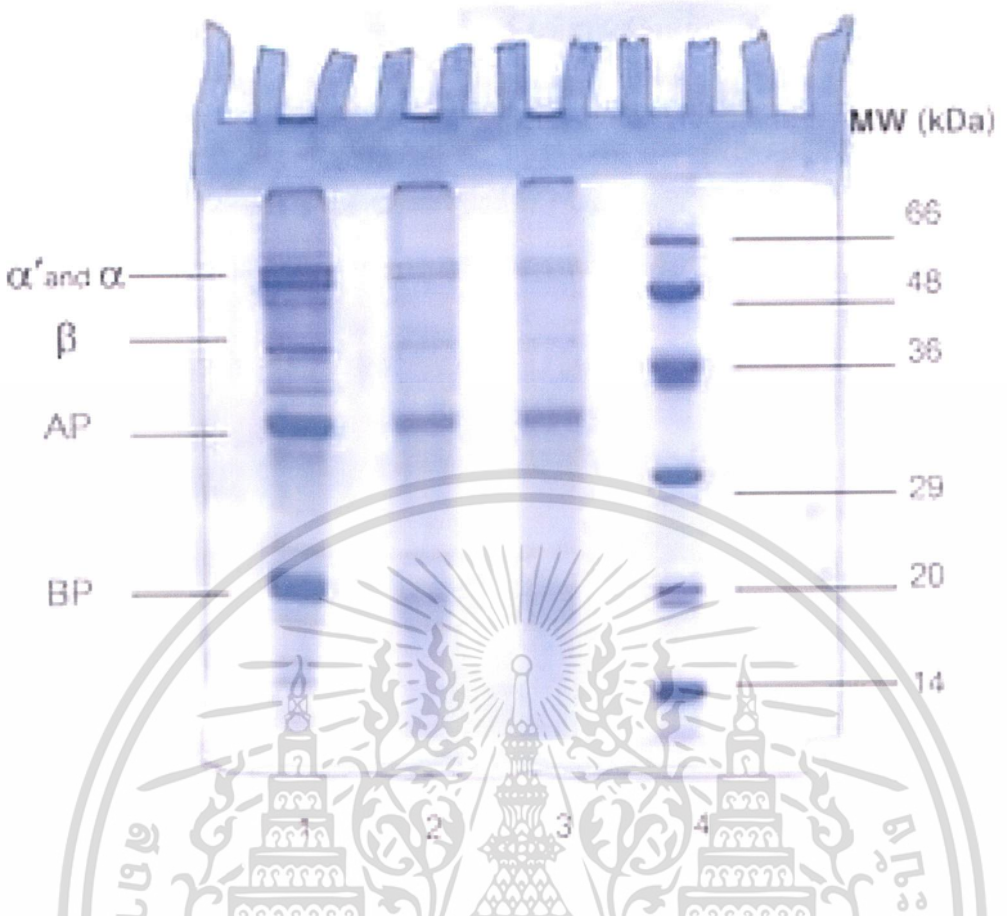
3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราแห้งความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 2 ชั่วโมง

4 : Low Molecular Weight Marker

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ - conglycinin

AP : Acidic polypeptide และ BP : Basic polypeptide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโอคาราสด

1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (Supro EX33)

2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราสด ทำการสกัด 1 ชั่วโมง

3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราสด ทำการสกัด 2 ชั่วโมง

4 : Low Molecular Weight Marker

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ β - conglycinin

AP : Acidic polypeptide และ BP : Basic polypeptide

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบย่อยของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีการใช้ SDS – PAGE ในสภาวะที่มี Denaturing agent (2-ME) ในกรณีที่ใช้โอคาราความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ โอคาราความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราสด แสดงดังภาพที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ โดยเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33) ผลการวิเคราะห์พบว่า มี subunit ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า อย่างไรก็ตามในการเตรียมตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในช่องแต่ละเจลเท่ากัน การที่ Band (แถบ) ของโอคาราโปรตีนมีสีจางกว่ามาก แสดงว่าปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ต่ำกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และจะเห็นว่ามีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถผ่านสู่เจลได้ ซึ่งอาจเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนกับโมเลกุลอื่น ซึ่งจะอธิบายในลำดับต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acid) ในโอคาราโปรตีน พบเช่นเดียวกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า ส่วนปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น พบว่าปริมาณ Cysteine และ Threonine ในโอคาราโปรตีนมีมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า ส่วน Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine และ Valine ในโอคาราโปรตีนมีปริมาณน้อยกว่าในโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่า กรดอะมิโนที่จำเป็นในโอคาราโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น Cysteine, Methionine และ Tyrosine ซึ่งจะมีอยู่ในปริมาณต่ำโดยธรรมชาติของถั่วเหลืองอยู่แล้ว ส่วน Threonine จะมีมากกว่ามาตรฐานกำหนด

4.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีนและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (ต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง)

ตัวอย่าง	โปรตีน (%)	เถ้า (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)
OPI 4*1	57.69	4.27	38.04
OPI 4*2	58.28	3.87	37.85
OPI 8*1	57.99	3.46	38.55
OPI 8*2	59.20	3.55	37.25
OPI F*1	56.01	3.58	40.41
OPI F*2	56.90	3.90	39.11
Supro EX33	84.31	3.82	11.87

OPI 4*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI 4*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
OPI 8*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI 8*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
OPI F*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
OPI F*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
Supro EX33 โปรตีนสกัดทางการค้า

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 13 พบว่าปริมาณโปรตีนที่พบในโอคาราโปรตีนที่สกัดได้มีค่าประมาณ 56-60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้ามีมากถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง SDS – PAGE (ภาพที่ 5-7) ที่พบ band ของโอคาราโปรตีนจางกว่า band ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า ในทางตรงข้ามปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในโอคาราโปรตีนมีค่าสูงถึง 38-39 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่พบปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงในโอคาราโปรตีน สันนิษฐานว่าเกิดจากความร้อน แรงบด ที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับหมู่ของคาร์โบไฮเดรต (Protein – Polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

Dickinson และ McClements (1996) กล่าวว่าการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะเกิดในรูป biopolymer โดยอาจเกิดจากโมเลกุลที่มีประจุเดียวกันหรือประจุตรงข้ามก็ได้ โดยมากสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก globular โปรตีนที่สามารถละลายได้กับโพลิแซคคาร์ไรด์ที่มีประจุลบจะมีประจุโดยรวมเป็นลบ โพลิแซคคาร์ไรด์ที่ประกอบด้วยหมู่ carboxyl จะไม่เกิดเป็นสารประกกอบกับ globular protein ที่ระดับ pH มากกว่า pl แต่โพลิแซคคาร์ไรด์ที่มีประจุของ sulfate สูง เช่น dextran sulfate สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถละลายได้กับโปรตีนที่ระดับ pH มากกว่า pl สายโซ่ของโปรตีนที่มีประจุบวก เช่น ε-amino, α- amino, guanidium และ imidazole จะมีส่วนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้มากขึ้น เมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ

มีการสันนิษฐานถึงการเกิดการจับตัวกันของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตไว้ 2 แบบคือ แบบแรก โปรตีนได้รับความร้อนและเกิดการจับตัวกับคาร์โบไฮเดรตจำนวนเล็กน้อยด้วยพันธะ covalent และอีกแบบหนึ่งคือ โปรตีนเกิดการจับตัวเป็น monomer เมื่อได้รับความร้อน การจัดเรียงตัวไม่เป็นเส้นตรง แต่มีโครงสร้างที่มีช่องว่างภายในทำให้เกิดการกักส่วนของคาร์โบไฮเดรตจำนวนมากไว้ในโครงสร้าง (Marchall & Chrastill)

Matsudomi และคณะ (1995) ศึกษาพบว่า โปรตีนในพลาสมา สามารถที่จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับ galactomannan ได้ ด้วยกระบวนการ Maillard ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ดีขึ้นและอิมัลชันที่ได้มีความคงตัวมากขึ้น โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนนี้เกิดจากกระบวนการการให้ความร้อน

ถึงแม้ว่า คาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อกับโปรตีนจะไม่ได้ทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนลดลง แต่ในแง่ของคุณค่าทางโภชนาการถ้าต้องการปริมาณโปรตีนสูงขึ้น อาจต้องปรับปรุงวิธีการสกัด โดยอาจต้องใช้เอ็นไซม์หรือสารเคมีเข้าไปทำลายพันธะที่โปรตีนจับกับคาร์โบไฮเดรต หรือนำโอคาราโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเทคนิคที่ละเอียดขึ้น เช่น Chromatography, gel filtration แต่ค่าใช้จ่ายของการดำเนินการจะสูงขึ้น และขั้นตอนการทำงานจะซับซ้อนขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนกับโปรตีนสกัดทางการค้า

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33)

คุณสมบัติเชิงหน้าที่	ผลการทดสอบ
ค่า Surface hydrophobicity	344.46
ความสามารถในการละลาย (ค่า Solubility Index)	24.55
ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Activity)	2.72
ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion Stability)	0.085
ความสามารถในการเกิดฟอง (ความสูงของฟอง, cm)	5.90
ความคงตัวของฟอง (% ความสูงของฟองที่เหลือที่เวลา 1 ชั่วโมง)	16.95
ความสามารถในการดูดซับน้ำ (กรัมน้ำต่อ 1 กรัมโปรตีน)	4.75
ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (กรัมน้ำต่อ 1 กรัมโปรตีน)	1.07

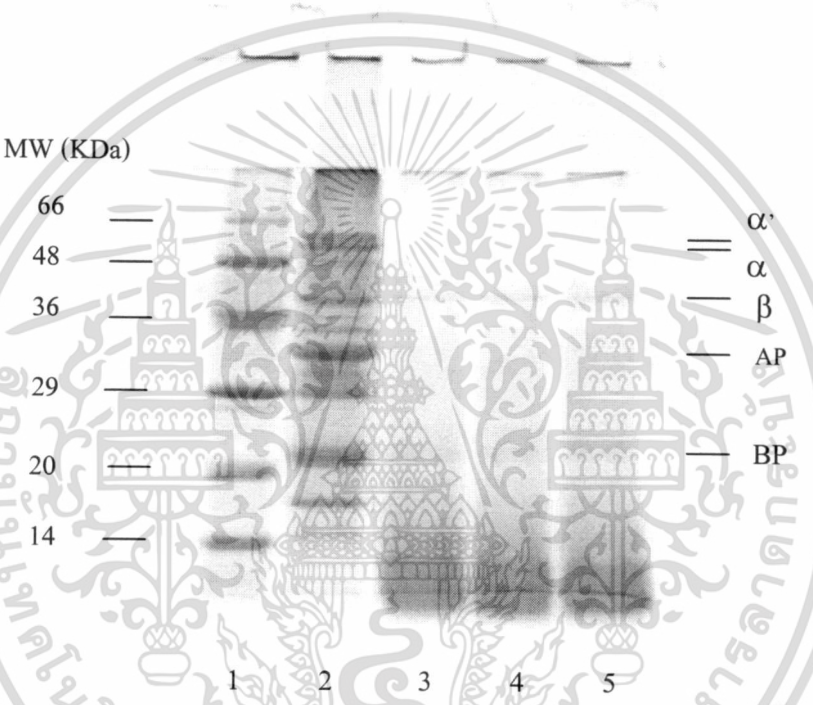
เพื่อจะหาข้อสรุปในการนำไปใช้งานของโอคาราโปรตีน จึงควรทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า Supro EX33 เป็นโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาสูง นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อ สัตว์บดลดขนาด ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของ Supro EX33 แสดงดังตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบพบว่าคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนในหลายด้านไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้าเลย และมีบางด้านเช่น ความสามารถในการเกิดฟอง ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน โอคาราโปรตีนทำได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า การที่เป็นเช่นนี้ สามารถอธิบายได้ว่า โดยปกติโปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนขนาดใหญ่มีโครงสร้างกลมอัดกันแน่น (globular structure) การที่จะคลายตัวเพื่อสร้างเป็นฟิล์มบาง ๆ ล้อมรอบ air cell ทำได้ยากกว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็กมีโครงสร้างยืดหยุ่นกว่า เช่น ovalbumin และ Bovine Serum Albumin (Meste และคณะ, 1990) แต่เมื่อโปรตีนจากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่นในกรณีของโอคาราโปรตีน ซึ่งผ่านความร้อนในช่วงต่าง ๆ ตั้งแต่การสกัดเอาน้ำนมถั่วเหลืองออก การอบแห้ง ซึ่งทำให้โครงสร้างเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติมีการคลายตัวออก ไม่อัดแน่นเหมือนเดิม นอกจากนั้นการที่โครงสร้างคลายตัวออกทำให้หมู่ hydrophobic ออกมาที่ผิวสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำมันได้มากขึ้น ความสามารถในการดูดซับน้ำมันสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการดัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

4.5.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสในระยะเวลาแตกต่างกัน ด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 8 เมื่อแยกองค์ประกอบของโปรตีนโอคาราเทียบกับ Standard Weight Marker



ภาพที่ 8 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที

1 Standard Weight Marker

2 โปรตีนโอคารา (OPI)

3 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 30 นาที (Al 30)

4 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 60 นาที (Al 60)

5 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 90 นาที (Al 90)

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ β - conglycinin

AP : Acidic polypeptide และ BP : Basic polypeptide ของ glycinin

จะพบส่วนของ α', α และ β-subunit ของ 7S globulin และ acidic-basic polypeptide ของ 11S globulin ซึ่งเป็น subunit ที่เป็นองค์ประกอบหลักในโปรตีนถั่วเหลือง (Ma และคณะ, 1997) แต่ในกรณีของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที พบว่ามี subunit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เป็นองค์ประกอบไม่แตกต่างกันในทุกระยะเวลาการย่อยที่เพิ่มขึ้น พบว่าแถบของ α', α -subunit ของ 7S globulin และ acidic polypeptide ของ 11S globulin จางหายไป และจะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจล เนื่องจากเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะกว้างทำให้เกิดการย่อยในทุก ๆ subunit ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน โมเลกุลที่ผ่านการย่อยจะมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง อีกทั้งระดับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ใช้อาจมีค่าสูง ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายมากเกินไปทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากสามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนของเจลได้

4.5.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 15 จากการทดลองพบว่า โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

Sample	Solubility (%)	[1]Surface hydrophobicity[NS]
OPI	48.7 ± 2.8 [a]	355.9 ± 1.3
Al 30	51.2 ± 2.9 [b]	364.8 ± 21.5
Al 60	52.3 ± 3.0 [b]	386.2 ± 4.6
Al 90	57.3 ± 3.6 [c]	426.7 ± 29.7

[NS] แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

[1] ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ประจุสุทธิเพิ่มขึ้นและมีกลุ่ม hydrophilic ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น (Wu *et al.*, 1998) ส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายดีขึ้น โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 90 นาที สามารถละลายได้ดีกว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่เวลา 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนโอคารา แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโดยวัดในรูปค่าการดูดกลืนแสงของอิมัลชัน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันดี ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 16 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันต่ำกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากผลกระทบจากการสูญเสียโครงสร้าง globular และขนาดสายเปปไทด์ที่สั้นลง ส่งผลให้การเกิดฟิล์มโปรตีนรอบๆหยดไขมันบางลง ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจึงลดลง เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้นจะพบว่า โปรตีนโอคารามีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง โดยโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันต่ำกว่าการย่อยที่เวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

Sample	Emulsion Activity
OPI	2.61 ± 0.04^{a}
AI 30	1.57 ± 0.07^{b}
AI 60	1.28 ± 0.06^{c}
AI 90	1.18 ± 0.07^{c}

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองโปรตีนโดยวัดในรูปความสูงของฟองที่เกิดขึ้น แสดงดังตารางที่ 17 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ความสามารถในการเกิดฟองที่เพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายพันธะภายในโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ โครงสร้างจับกันแน่น ทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและจัดเรียงตัวเข้าสู่ชั้นรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

Sample	Foaming Activity	Foaming Stability (%)	
		10 min	30 min
OPI	2.4 ± 0.1^{a}	70.4^{a}	66.6^{a}
Al 30	3.2 ± 0.2^{b}	57.9^{b}	50.9^{b}
Al 60	3.2 ± 0.3^{b}	52.8^{bc}	45.7^{bc}
Al 90	3.5 ± 0.1^{b}	44.2^{c}	41.5^{c}

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

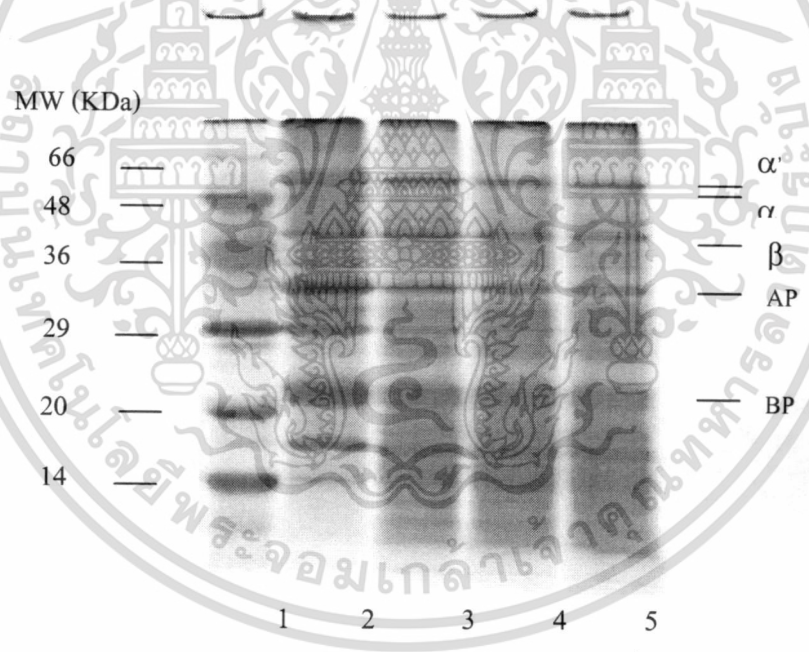
Fennema (1985) ศึกษาพบว่า การเกิดฟองของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับค่า surface activity ลักษณะการเกิดฟิล์มและชั้นรอยต่อระหว่างอากาศกับของเหลวเป็นสำคัญ ซึ่งโปรตีนที่จะเป็นสารให้ฟองที่ดีจะต้องทำให้ผิวรอยต่อระหว่างอากาศกับของเหลวมีเสถียรภาพได้อย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการเกิดฟอง สามารถคลายตัวและดูดซับได้เร็วที่ชั้นรอยต่อ เมื่อพิจารณาความคงตัวของฟองโปรตีนโดยวัดจากความสูงของฟองที่เหลืออยู่ภายหลังการตีฟองและตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ (ตารางที่ 17) พบว่า โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความคงตัวของฟองต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีแนวโน้มลดต่ำลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 90 นาที จะมีความคงตัวของฟองต่ำที่สุด เนื่องจากการย่อยโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีอัตราการย่อยสลายสูง ทำให้เกิดการตัดสายพันธะเปปไทด์ที่มากเกินไป ได้โมเลกุลโปรตีนสายสั้นอาจทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง อีกทั้งปริมาณประจุสุทธิจำนวนมากที่เกิดจากการย่อยอาจจะลดการเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างโปรตีนกับอากาศและขัดขวางการเกิด elastic film ระหว่างชั้นอากาศกับของเหลวทำให้ความคงตัวของฟองลดลง (Chan and Ma, 1999) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Adler-Nissen (1986) ซึ่งทำการศึกษาการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำ โปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติการเกิดฟองสูงและมีความคงตัวดี แต่เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น ความคงตัวของฟองโปรตีนจะเริ่มลดลง ในขณะที่ Govindaraju และ Srinivas (2004) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอสในระดับที่มากเกินไปจะทำให้ความคงตัวของฟองและสมบัติการเกิดอิมัลชันลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการดัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

4.6.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโอคารา โดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 9 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มี subunit ของ 7S และ11S globulin เช่นเดียวกับโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่จะมีความเข้มของแถบโปรตีนจางลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มสูงขึ้น โดยจะพบแถบของ subunit ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงอยู่บริเวณด้านล่างของเจล ซึ่ง subunit ที่ได้นี้จะมีลักษณะแตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะกว้าง เกิดการย่อยสลายในระดับสูง โมเลกุลโปรตีนที่ได้จึงมีขนาดเล็ก ส่วนเอ็นไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อ



ภาพที่ 9 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที

1 Standard Weight Marker

2 โปรตีนโอคารา (OPI)

3 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 นาที (Papain 30)

4 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 60 นาที (Papain 60)

5 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน เป็นเวลา 90 นาที (Papain 90)

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ β - conglycinin

AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สับสเตรตสูงกว่า จึงเกิดการย่อยสลายโปรตีนอย่างจำกัด โมเลกุลโปรตีนที่ได้จึงแตกต่างกัน ขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคารา

4.6.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 18 โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และสามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Govindaraju และ Srinivas (2004) ซึ่งสาเหตุของการละลายที่เพิ่มขึ้นสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ในหัวข้อ 4.5.2 จากการศึกษาโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้ พบว่ามีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในแนวทางเดียวกันคือ สามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยปาเปนจะมีความสามารถในการละลายที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอ็นไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อหมู่อะมิโน hydrophilic ของโปรตีน เมื่อเกิดการย่อยจะให้หมู่ hydrophilic เพิ่มมากขึ้น สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี จึงให้ค่าการละลายที่เพิ่มสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส จากการศึกษาของ Mahmoud (1994) และ Frokjaer (1994) พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยจะมีช่วงการละลายที่กว้างขึ้นโดยเฉพาะช่วง pH เป็นกรด ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้เสริมในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด เพื่อช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่ผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถนำไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางชนิดซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักหรือผู้สูงอายุ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Were และคณะ (1997) ซึ่งสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้สารละลายด่างร่วมกับเอ็นไซม์ปาเปน และนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มคุณสมบัติและคุณค่าทางโภชนาการแก่ผลิตภัณฑ์นมได้

ผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาต่างกัน พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) (ตารางที่ 18) โปรตีนทรงกลมที่ผ่านการย่อยจะเกิดการคลายตัวบางส่วน ทำให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายในออกมาด้านนอกของโมเลกุล ช่วยให้ค่า hydrophobicity ของโปรตีนเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อพิจารณาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสพบว่ามีค่า surface hydrophobicity ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

Sample	Solubility (%)	[1]Surface hydrophobicity
OPI	48.7 ± 2.8 [a]	355.9 ± 1.3 [a]
Papain 30	57.2 ± 2.6 [b]	393.4 ± 5.6 [b]
Papain 60	62.8 ± 2.0 [bc]	432.1 ± 13.7 [c]
Papain 90	68.1 ± 2.4 [c]	466.7 ± 15.0 [d]

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

[1] ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

อาจเป็นเพราะการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลายได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ขนาดสั้น ทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำรวมตัวกัน (hydrophobic interaction) ส่วนของ free hydrophobic ที่จะจับกับ Fluorescence probe ลดลง ค่า surface hydrophobicity ที่วิเคราะห์ได้จึงไม่เปลี่ยนแปลง การเพิ่มขึ้นของหมู่ hydrophobic จะช่วยให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการจับตัวกับส่วนของไขมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น แสดงดังตารางที่ 19 โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่เวลา 30 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มเป็น 60 และ 90 นาที ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนที่ได้จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง globular ของโปรตีน โมเลกุลโปรตีนซึ่งเดิมขดกันแน่นคลายตัวออกให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายในโมเลกุลมีโอกาสกระจายออกมาด้านนอกมากขึ้น ช่วยเพิ่มการจับตัวของโปรตีนกับเม็ดไขมัน (Li-Chan and Nakai, 1991) นอกจากนี้ความสามารถในการการกระจายตัวในน้ำหรือในน้ำมัน (Hydrophilic-lipophilic balance) ที่เหมาะสม สามารถบอกได้ถึงการเกิดอิมัลชันที่ดีของโปรตีน อีกทั้งความสามารถในการละลายก็เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการเกิดอิมัลชันเช่นกัน โปรตีนที่สามารถเกิดอิมัลชันได้ดี จะต้องละลายและจับตัวอยู่ที่ผิวของเม็ดไขมันได้มาก (Zayas, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

Sample	Emulsion Activity
OPI	2.61 ± 0.04^{a}
Papain 30	2.59 ± 0.06^{a}
Papain 60	2.67 ± 0.05^{b}
Papain 90	2.76 ± 0.05^{c}

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาสมบัติในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรติ-เอส ทั้งสองชนิด ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาเดียวกันพบว่า การย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนช่วยปรับปรุงความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีขึ้น ในทางกลับกันการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสในระดับที่มากเกินไปทำให้โปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดต่ำลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าการละลายที่ต่ำกว่า ส่งผลให้โปรตีนมีการกระจายตัวและจับตัวอยู่บริเวณพื้นผิวระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำได้น้อย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถการเกิดฟอง แสดงดังตารางที่ 20 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในช่วง 30 นาทีแรก มีความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยเป็น 90 นาที เช่นเดียวกับเอ็นไซม์อัล-คาเลส ความสามารถในการเกิดฟองมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยจะมีโครงสร้างยืดหยุ่นและดูดซับอยู่ที่ชั้นระหว่างผิวได้ดีจึงมีความสามารถในการเกิดฟองที่ดีกว่าโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นลักษณะก้อนกลม นอกจากนี้จากการศึกษาของปาริฉัตรและปราณี (2540) ยังพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่อะมิโน hydrophobic จะให้สมบัติการเกิดฟองที่ดี แสดงให้เห็นว่าหมู่อะมิโน hydrophobic น่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองได้ดีขึ้น ส่วนความคงตัวของฟองโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน พบว่า มีความคงตัวของฟองเมื่อทดสอบที่เวลา 10 และ 30 นาที เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การย่อยโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ปาเปนจะช่วยปรับปรุงความคงตัวของฟองโปรตีนได้ดีกว่าเอ็นไซม์อัลคาเลส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sorgentini และคณะ (1995) พบว่าโปรตีนสกัดที่มีส่วนที่ละลายน้ำได้มาก จะส่งผลให้มีความคงตัวของฟองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสจะมีขนาดโมเลกุลเล็กมาก ได้เปปไทด์สายสั้น ทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง โปรตีนที่ได้จึงมีความคงตัวของฟองต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

Sample	Foaming Activity	Foaming Stability (%)	
		10 min	30 min
OPI	2.4 ± 0.1^{b}	70.4^{a}	66.6^{a}
Papain 30	2.1 ± 0.1^{a}	83.9^{b}	71.2^{b}
Papain 60	2.9 ± 0.1^{b}	91.5^{c}	83.6^{c}
Papain 90	2.8 ± 0.1^{c}	95.5^{d}	88.9^{d}

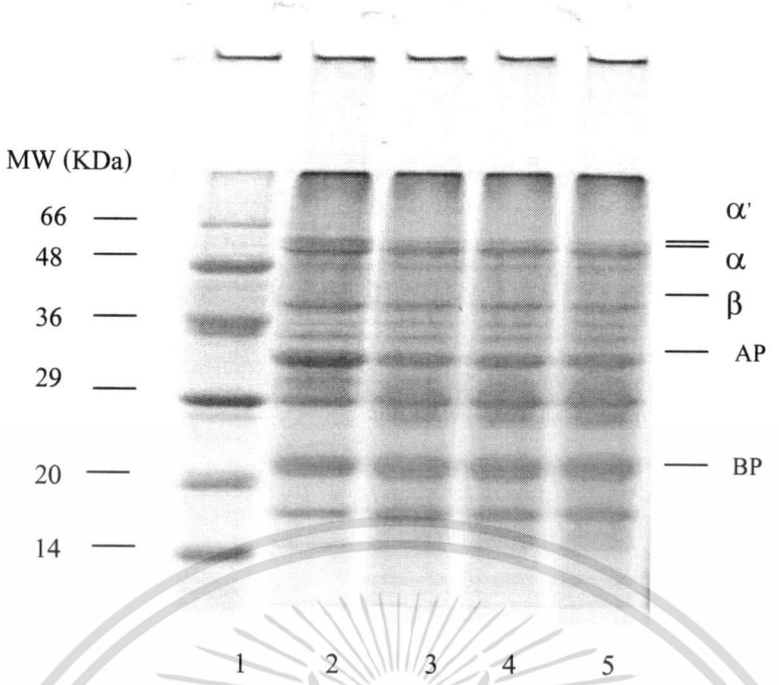
ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.7 ผลการดัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.7.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยใช้ SDS-PAGE

ณัชชา สุพิชญางกูร (2545) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนโอคาราที่สกัดจากโอคาราสดด้วยวิธีการละลายในสารละลายด่าง ประกอบด้วยโปรตีน 56-60 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 38-40 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่าในระหว่างการสกัดน้ำนมถั่วเหลือง ความร้อน แรงเค้นที่เกิดระหว่างการบดถั่วอาจทำให้โปรตีนจับกับคาร์โบไฮเดรต (Protein-Polysaccharide conjugate) ทำให้การสกัดโปรตีนจากโอคาราด้วยวิธีการละลายในสารละลายด่างได้ผลผลิต (yield) ของโปรตีนต่ำ ไม่สามารถแยกคาร์โบไฮเดรตออกได้ อาจต้องใช้เอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสเข้าไปช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรตที่จับกับโปรตีนทำให้ผลผลิต (yield) ของโปรตีนในโปรตีนโอคาราสูงเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม เป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโอคาราด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 10 พบว่ามี subunit 7S และ 11S globulin ไม่แตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย เนื่องจากเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสทำหน้าที่ย่อยส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมกับโมเลกุลโปรตีนแต่ไม่มีผลในการย่อยพันธะเปปไทด์ จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง subunit ของโปรตีน ลักษณะ band ที่พบใน SDS-PAGE จึงไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

1 Standard Weight Marker

2 โปรตีนโอคารา (OPI)

3 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 30 นาที (Amy 30)

4 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 60 นาที (Amy 60)

5 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 90 นาที (Almy 90)

α', α และ β คือ α', α และ β - subunit ของ β - conglycinin

AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

4.7.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา - อะไมเลส

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 21 โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่เวลา 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีแนวโน้มละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

Sample	Solubility (%)	[1]Surface hydrophobicity
OPI	48.7 ± 2.8 [a]	355.9 ± 1.3 [a]
Amy 30	51.0 ± 2.8 [ab]	222.2 ± 21.0 [b]
Amy 60	52.1 ± 3.0 [b]	214.2 ± 17.3 [b]
Amy 90	56.6 ± 2.9 [c]	199.5 ± 29.4 [b]

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

[1] ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

เนื่องจากโปรตีนโอคาราที่สกัดได้มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนหรือแรงบดในระหว่างกระบวนการผลิตทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เกิดการสร้างพันธะเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต (Protein-Polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ (ณัชชา สุพิชญางกูร, 2545) ดังนั้นการย่อยหมู่คาร์โบไฮเดรตด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส จะทำให้โมเลกุลที่เกิดการ conjugate มีขนาดเล็กลงและมีส่วนของโปรตีนที่มีอิสระจากการยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีส่งผลให้ค่าการละลายเพิ่มสูงขึ้น ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity พบว่ามีค่าต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น(ตารางที่ 21) ซึ่งแตกต่างจากเอ็นไซม์โปรติเอสทั้งสองชนิดที่ทำการศึกษา เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีทั้งส่วน hydrophobic และ hydrophilic จำนวนมากขึ้น สันนิษฐานว่ากลุ่ม hydrophobic ที่เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่บริเวณใกล้กันอาจเกิดการรวมตัวกันเองมีลักษณะเป็น aggregate บดบังกลุ่ม hydrophobic ไว้ภายในโครงสร้าง ทำให้มีส่วนของ free hydrophobic ที่จะจับกับ Fluorescence probe ลดน้อยลง เป็นผลให้ค่า surface hydrophobicity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน แสดงดังตารางที่ 22 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

Sample	Emulsion Activity [NS]
OPI	2.61 ± 0.04
Papain 30	2.58 ± 0.03
Papain 60	2.59 ± 0.04
Papain 90	2.61 ± 0.02

[NS] แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนโอคารา แสดงดังตารางที่ 23 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และมีแนวโน้มลดต่ำลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น การที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีค่าต่ำ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของโปรตีนที่ยังคงอัดกันแน่น (compact structure) ทำให้การคลายตัวที่ชั้นอากาศและของเหลวเพื่อลดแรงตึงผิวมีข้อจำกัด รวมทั้งโครงสร้างที่อัดกันแน่นทำให้การเชื่อมพันธะเพื่อให้เกิดฟิล์มบางๆล้อมรอบฟองอากาศทำได้ยาก จึงทำให้ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองที่ได้จากโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลส น้อยกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

Sample	Foaming Activity	Foaming Stability (%)	
		10 min	30 min
OPI	2.4 ± 0.1 [a]	70.4 [a]	66.6 [a]
Amy 30	1.5 ± 0.1 [b]	13.6 [b]	4.5 [b]
Amy 60	1.4 ± 0.1 [bc]	11.2 [c]	3.4 [b]
Amy 90	1.2 ± 0.1 [c]	10.2 [c]	-

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. โอคาราแห้งที่ได้จากการอบโอคาราสดที่ 60 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ หรือ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาสกัดโปรตีน พบว่ามีผลผลิตไม่แตกต่างจากโอคาราสด การเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 ชั่วโมงเป็น 2 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตที่สกัดได้

2. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่
   2.1 การอบแห้งโอคาราจากโอคาราสดเป็นโอคาราแห้ง หรือการเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 ชั่วโมงเป็น 2 ชั่วโมง ทำให้ค่า Surface hydrophobicity สูงขึ้น
   2.2 ความสามารถในการละลายของโอคาราโปรตีนที่ได้จากโอคาราสด เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าสูงสุด
   2.3 ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดมีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งสองไม่มีอิทธิพลร่วมต่อค่าความคงตัวของอิมัลชัน
   2.4 ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัด ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน อย่างไรก็ตามความคงตัวของฟองเมื่อใช้โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้ง มีมากกว่าตัวอย่างที่ใช้โอคาราที่เตรียมจากโอคาราสด
   2.5 คุณสมบัติในการดูดซับน้ำ พบว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้งดูดซับน้ำได้น้อยกว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสด และโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัด 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำได้น้อยกว่าตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 1 ชั่วโมง
   2.6 คุณสมบัติในการดูดซับน้ำมัน พบว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำมันได้มากกว่า ตัวอย่างโอคาราโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่ใช้เวลา 1 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโอคารา
   3.1 ผลของ SDS – PAGE แสดงให้เห็นว่ามี subunit ที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนถั่วเหลืองอยู่ในโปรตีนสกัดจากโอคารา และมี subunit ไม่แตกต่างจากของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และ subunit ของโอคาราโปรตีนที่สกัด เมื่อใช้ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นของโอคาราโปรตีน พบชนิดของกรดอะมิโนในโอคาราโปรตีน พบเช่นเดียวกับในโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และในโอคาราโปรตีนมีปริมาณ Cys และ Thr สูงกว่า และเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น Cys, Met และ Try มีปริมาณต่ำกว่าส่วน Thr มีสูงกว่ามาตรฐาน

3.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีน พบว่า มีโปรตีน 56-60 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรต 38-40 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่า คาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปที่จับกับโปรตีน (Protein – polysaccharide conjugate)

4. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนในหลายด้าน ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และคุณสมบัติในการเกิดฟอง และความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน ทำได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า

5. โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม มีส่วนของ subunit 7S และ 11S globulin จางหายไปแต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจล โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ส่วนความสามารถในการเกิดฟองมีค่าสูงขึ้น ฟองที่ได้มีความคงตัวลดต่ำลง ในขณะที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารามีแนวโน้มลดลง

6. โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที พบแถบของ subunit 7S และ 11S globulin มีความเข้มลดลง และพบแถบสีของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กบริเวณด้านล่างเจล โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลาย ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มสูงขึ้น

7. โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์อัลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที มี subunit ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE ไม่แตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่ความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองมีค่าลดลง แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กุณฑลิยา ครุฑกะ. 2544. "การผลิตโยเกิร์ตแช่แข็งจากน้ำนมถั่วเหลือง น้ำนมข้าวกล้องและรำข้าว." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

นที อิ่มฤทธา. 2546. **อาหารเสริมสุขภาพ.** [online]. Available:http:// www.phama.chula.ac.th.

ณัชชา สุพิชญางกูร. 2545. "การสกัดและการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนจากโอคารา." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอ็นไซม์ทางอาหาร.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปาริฉัตร ทัพภะสุต และปราณี อ่านเปรื่อง. 2540. "การผลิตสารให้ฟองจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอ็นไซม์." : วารสารอาหาร. 27:108-118.

ปาริฉัตร ทัพภะสุต และปราณี อ่านเปรื่อง. 2541. "สมบัติของสารให้ฟองผงจากโปรตีนถั่วเหลืองและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร." : วารสารอาหาร. 28:42-53.

ปาริฉัตร หงส์ประภาส. 2545. **เคมีกายภาพอาหาร คอลลอยด์ อิมัลชันและเจล.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

Adler-Nissen, J. 1986. "Enzymic hydrolysis of food proteins." New York : Elsevier Publishing. pp. 77-363.

Adler-Nissen, J. 1993. **Enzyme in food processing.** Academic Press, Inc. USA.

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

Bora, P. S. 2002. "Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins." **Food Chemistry.** 77:171-176.

Chan, W. M. and Ma, C. Y. 1999. "Modification of proteins from soymilk residue (okara) by trypsin." **J. Food Sci.** 64: 781-785.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Damodaran, S. 1996. **Amino Acids, Peptides and Proteins.** *In* Food chemistry. Fennema, 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.

Dua, S., Mahajan, A. and Mahajan, A. 1996. "Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var.Toria) preparation by chemical modification." **J.Agric Food Chem.** 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.

Endres, J. G. 2001. **Soy Protein Products.** AOCS Press and the Soy Protein Council. The Endres Group, Inc. Indiana.

Fennema, O.R. 1985. **Food Chemistry**, 2nd (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.

Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. **J. Food Sci.** 59: 86-88.

German, J. B., Onell, T.E. and Kinsella, J.E. 1985. "Film foaming behavior of food protein." **J. AOCS.** 62: 1358-1366.

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

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

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

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

Hill, S. E. 1996. **Emulsion.** *In* Methods of Testing Protein Functionality. Hall, G. M. (ed.). London: Chapman & Hall.

Hudson, B.J.F. 1992. **Modification of Food Protein by Enzymatic Method.** London: E A S.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khare, S.K., Jha, K. and Gandhi, A. P. 1995. "Physicochemical and functional properties of okara protein isolate." **Food Sci.** Technol. Abstr. 95-02- G 0025.

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

Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T_4." **Nature.** 227:680-685.

Lawal, O. S. 2005. "Functionality of native and succinylated Lablab bean (*Lablab purpureus*) protein concentrate." **Food Hydrocolloids.** 19: 63-72.

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

Lin, K. W. and Mei, M. Y. 2000. "Influence of gum, soy protein and heatiog temperature on reduced-fat meat batter in model system." **J. Food Sci.** 65: 97-100.

Lowry, O. H., Rosembroug, H.J., Lewis, A., and Randall, R. J. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent." **J. Bio Chem.** 193: 265-275.

Ma, C.-Y., Lui, W.-S., Kwok, K.C. and Kwok, F. 1997. "Isolate and Characterization of Protein from Soy Milk Residue(Okara)." **Food Res Intl.** 29(8): 799-805.

Mahmoud, M. I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **J. Food Sci.** 59: 89-95.

Motoki, M. and Seguro, K. 1998. "Transglutaminase and its ude for food processing." **Trends Food Sci.** Technol. 9: 204-210.

Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S.,Yamauchi, M., Sathe, S.K., and Soeda, T. 2002. "Soybean and milk proteins modified by transglutaminase inproves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate." **Meat Sci.** 431:170-177.

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

Nakai, S. and Powerie, W. D. 1981. **Emulsifying Propertiea of Protein.** *In* Zayas, F. J.(ed.). Functionality of Proteins in Food. 1997. Springer- Veriag, Berlin, Heidelberg, Germany. Nakai, S., Li- Chan, E. and Arteaga, G.. E. 1996. **Measurement of Surface Hydrophobicity.** *In* Hall, G. M. (ed.). Methods of Testing Protein Functionality, Chapman & Hall. UK.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nir, I., Feldman, Y., Aserin, A. and Garti, N. 1994. "Surface Properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy Proteins." **J. Food Sci.** 59: 606-608.

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

O,Toole, D. K. 1999. "Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production-A Review." **J.Agric Food Chem.** 47: 363-371.

Phillips, L. G. Haque, Z. and Kinsella, J.E. 1987. "A Method for the Measurement of Foam Formation and Stability." **J. Food Sci.** 52 (4): 1074-1077.

Sathivel, S. and Bechtel, P. J. 2004. **Properties of protein hydrolysates from pink salmon heads.** [online]. Available: http://www.cazv.cz/2004/2003/potr1_02/karamac

Scilingo, A. A. and Anin, M. C. 1996. "Calorimetric study of soybean protein isolates. Effect of calcium and thermal treatment." **J.Agric Food Chem.** 44: 3751.

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

Scope, R.K. 1987. **Protein purification principles and practice.** Solution for measuring protein concentration. Springer-Verlag. New York. p 305.

Sheen, S. J. 1991. "Effect of succinylation on molecular and functional properties of soluble tobacco leaf proteins." **J.Agric Food Chem.** 36: 1070-1074.

Sitohy, M. Z., Sharobeem, S. F. and Abdel-Ghany, A. A. 1992. "Functional properties of some succinylated protain preparations." **Acta Alimentaria.** 21(1):31-38.

Townsend, A and Nakai, S. 1983. "Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins." **J. Food Sci.** 48 : 588-594.

Voutsinas, L. P., Cheung. E. and Nakai,, S. and S. 1983. "Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatural Proteins." **J. Food Sci.** 48 : 26-32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Walsh, D.J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S. and FitzGerald, R. J. 2003. "Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking." **Food Res Intl.** 36: 677-683.

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

Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. and Qi, M. 1998. "Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Soy Protein Peptides Prepared by Papain Modification and Ultrafiltration." **JAOCS.** 75(7): 845-850.

Zayas, J. F. 1997. **Functionality of Proteins in Food.** Springer- Veriag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Zhang, T. and Oates, C.G. 1999. "Relationship between α–amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches." **Food Chemistry.** 65: 157-163.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การทดสอบสมบัติของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบสมบัติของโปรตีน

1. ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน (Voutsinas และคณะ, 1983)

ภาพที่ ก 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน

<u>หมายเหตุ</u> : นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ % solubility index ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อย

ดังสมการ $$\% \text{ Solubility index} = \frac{\text{protein in supernatant}}{\text{protein in suspension}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน (Hill,1996)

เตรียมโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้น 0.5% w/v

(ใน 0.01M phosphate buffer, pH 7.4)

↓

ปิเปตสารละลายโปรตีนสกัด 2.8 มิลลิลิตร ผสมน้ำมันถั่วเหลือง 1.2 มิลลิลิตร

↓

Ultrasonic 2 นาที

↓

เก็บตัวอย่างอิมัลชันทันที ที่ก้นหลอด 1 มิลลิลิตร

↓

เจือจางด้วย 0.1% SDS สัดส่วน 1:100

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร

ภาพที่ ก 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

<u>หมายเหตุ</u> : ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน (Phillip, 1987)

เตรียมตัวอย่างโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้น 1% w/v

(0.01M phosphate buffer, pH 7.4)

↓

นำสารละลายโปรตีนสกัด 30 มิลลิลิตร ใส่หลอด centrifuge polycarbonate

↓

Homogenize ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที

↓

วัดความสูงของฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่เกิดขึ้นจากการตีฟอง

↓

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟอง

↓

บันทึกความสูงของฟองภายหลังการตีฟองและตั้งทิ้งไว้ที่เวลา 10 และ 30 นาที

↓

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความความคงตัวของฟองโปรตีน

ภาพที่ ก 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีน

<u>หมายเหตุ</u> :

$$\text{ความสามารถในการเกิดฟอง} = \frac{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ผ่านการดัดแปร}}{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ไม่ผ่านการดัดแปร}} \times 100$$

$$\text{ความคงตัวของฟอง} = \frac{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ผ่านการดัดแปรและตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่าง ๆ}}{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ไม่ผ่านการดัดแปร}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การทดสอบค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน (Voutsinas และคณะ,1983)

เตรียมตัวอย่างโปรตีนสกัดที่มีความเข้มข้น 0.1% w/v
(0.01M phosphate buffer, pH 9.0)

↓

คนให้เข้ากัน 5 นาที

↓

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20000 รอบต่อนาที , 1 นาที

↓

ตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนละลายอย่างสมบูรณ์

↓

เจือจางโปรตีนให้มีช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.05 %

↓

นำตัวอย่างโปรตีนในแต่ละความเข้มข้นมา 6 มิลลิลิตร
ผสม 30 ไมโครลิตร ANS (0.1M phosphate buffer , pH9)

↓

วัดค่า fluorescence intensity
ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร (excitation), 420 นาโนเมตร (emission)

ภาพที่ ก 4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน

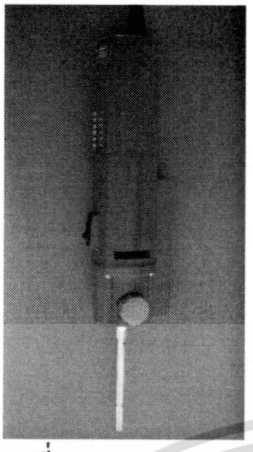
<u>หมายเหตุ</u> : ค่าที่วัดได้จะแสดงในรูปความชันของกราฟระหว่างค่า fluorescence intensity กับความเข้มข้นของโปรตีน ค่าความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีหมู่ hydrophobic บริเวณพื้นผิวที่สามารถจับกับ fluorescence probe ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

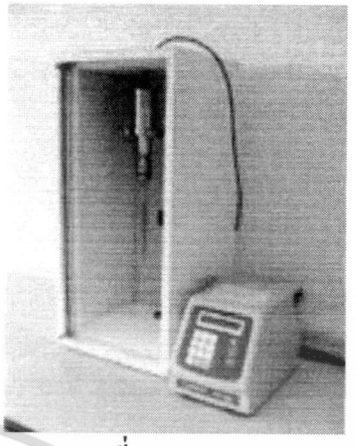
ภาคผนวก ข

ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน

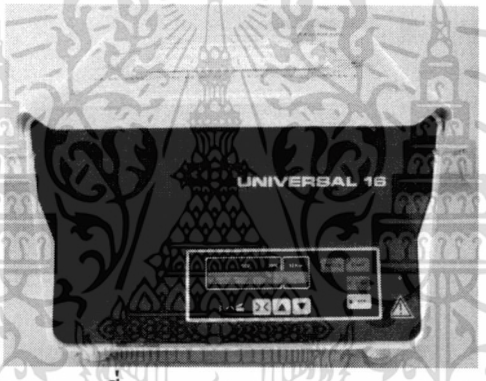
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข 1 Homogenizer



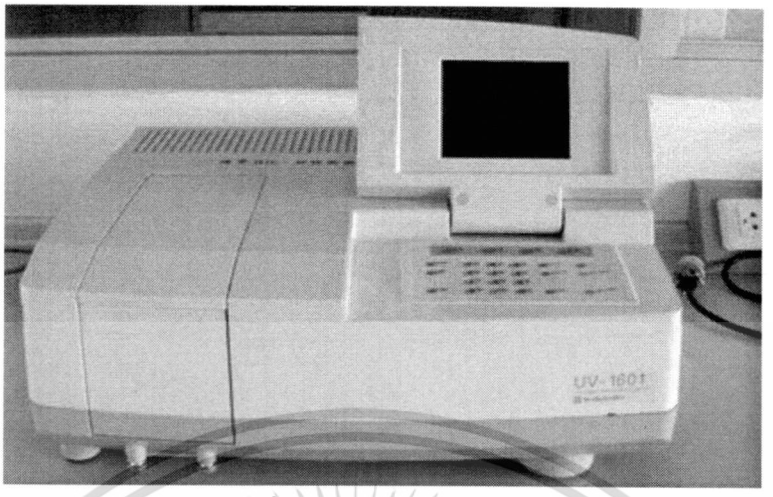
ภาพที่ ข 2 Ultrasonic



ภาพที่ ข 3 Eppendorf Centrifuge

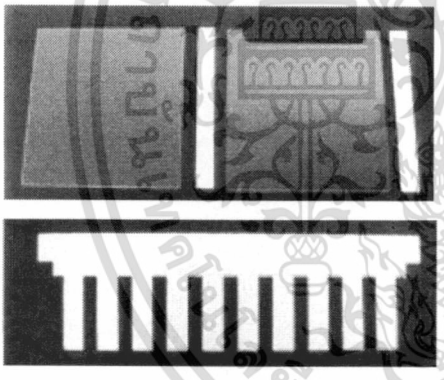
ภาพที่ ข 4 Spectrofluorometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

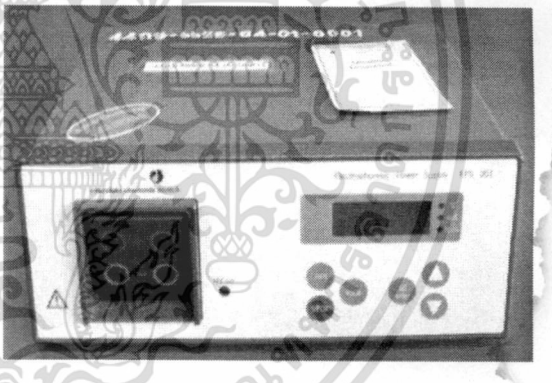


ภาพที่ ข 5 Spectrophotometer

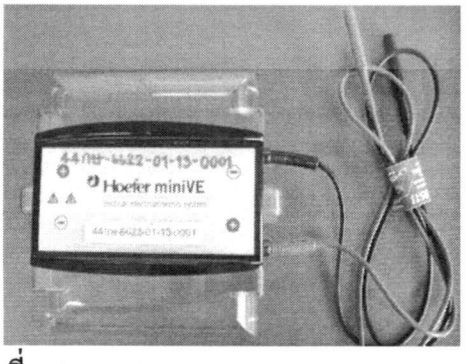
Electrophoresis set



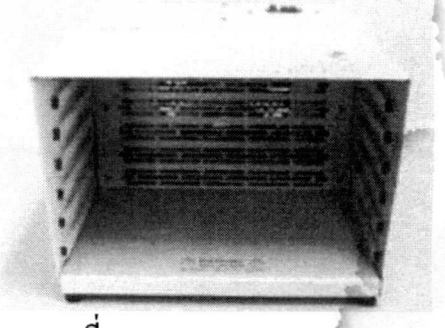
ภาพที่ ข 6 Matched glass plates, Spacer, Comb



ภาพที่ ข 7 Electrophoresis Power Supply

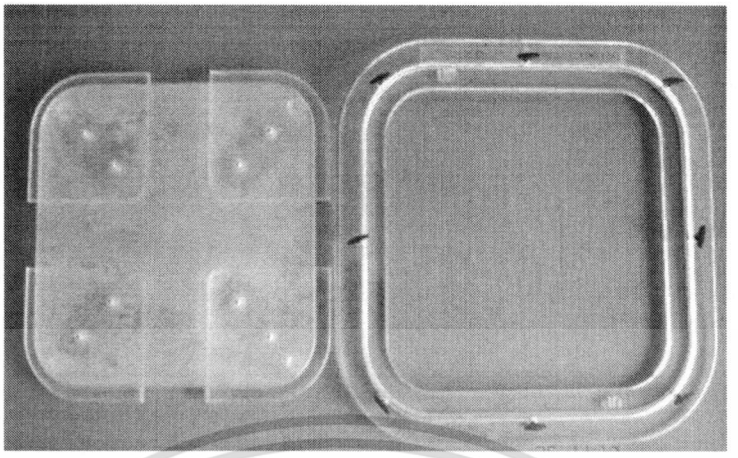


ภาพที่ ข 8 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis system



ภาพที่ ข 9 Easy Breeze Gel Dryer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข 10 Easy Breeze Drying Frame

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การศึกษาองค์ประกอบของโอคาราโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ทำการแยก subunit ของโปรตีนโอคาราปรียบเทียบกับโปรตีนโอคาราที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ และใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ subunit

<u>สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE</u>

A – Solution	
Acrylamide ($CH_2CHCONH_2$)	29.2 g
N,N – Methylene - bis (acrylamide)	0.8 g
With H_2O	100 ml
B – Solution	
1.5 M Tris – HCl (pH 8.8)	18.17 g
0.4 % SDS	0.4 g
With H_2O	100 ml
C – Solution	
0.5 M Tris – HCl (pH 6.8)	6.06 g
0.4 % SDS	0.4 g
With H_2O	100 ml
D – Solution	
10% Ammonium persulfate	0.5 g
With H_2O	5 ml
E – Solution	
Electrophoresis buffer	
0.025 M Tris – HCl	3 g
0.192 M glycine	14.4 g
0.1 % SDS	1 g
With H_2O	1000 ml
BFB color	
Bromophenol Blue	1 mg
Glycerol	100 µl
With H_2O	900 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sample buffer	
Tris	7.57 g
SDS	20.0 g
Glycerol	100 ml
With H_2O	500 ml

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างโปรตีน 0.05 กรัม

↓

เติม Sample buffer 10 มิลลิลิตร

↓

เติม 2- Mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร

↓

เติม BFB color 1 มิลลิลิตร

↓

ต้มในน้ำเดือด 10 นาที

การเตรียมเจล

Seperating Gel (12.5%)	
A- Solution	7.5 ml
B- Solution	4.5 ml
Distilled H_2O	6.0 ml
D- Solution	0.07 ml
TEMED	0.01 ml
Stacking Gel (4.4%)	
A- Solution	0.9 ml
C- Solution	1.5 ml
Distilled H_2O	3.6 ml
D- Solution	0.018 ml
TEMED	0.006 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมสารละลาย seperating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด electrophoresis จากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
2. เตรียมสารละลาย stacking gel
3. เทน้ำออกจากผิวหน้าเจลที่แข็งตัวแล้ว rinse ผิวหน้าเจลด้วย stacking gel หนึ่งครั้ง จากนั้นเทส่วน stacking gel จนเต็ม เสียบ comb พักไว้ให้เจลแข็งตัว
4. ดึง comb ออก ล้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างด้วย Electrophoresis buffer

<u>การทำ Electrophoresis</u>

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

<u>การย้อมสีแผ่นเจล</u>

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

ขั้นตอนการย้อมสีแผ่นเจล

1. นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก วางลงในภาชนะที่มี staining solution อยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที
2. เมื่อครบเวลาเท staining solution ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ใน destaining solution จนแผ่นเจลใสเห็นแถบชัดเจน
3. เท destaining solution ทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นแล้วนำแผ่นเจลไปอบแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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. นำเจลวางบนแผ่น cellophane เติมน้ำกลั่น 5-10 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกให้หมด
5. นำแผ่น cellophane อีกแผ่นวางทับ
6. นำกรอบสดึงมาครอบ ล็อคกรอบให้เป็นมุมตั้งฉาก
7. ยกกรอบออกจากฐานพลิกด้านล่างขึ้นด้านบนแล้วนำเข้าเครื่องอบเจล อบประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเจลแห้งแล้วจึงนำออกจากกรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้