

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราโดยกระบวนการ
ทางเอ็นไซม์และเคมี

ENZYMATIC AND CHEMICAL MODIFICATION OF OKARA PROTEIN
FUNCTIONALITY



จพ.
พ 229ก
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 60872
วัน,เดือน,ปี..... 6 ก.ค. 2549

b. 115ด1๗๑1
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1889-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ENZYMATIC AND CHEMICAL MODIFICATION OF OKARA PROTEIN
FUNCTIONALITY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LANDGRABANG**

2005

ISBN 974-15-1889-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2005

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โอคารา โดยกระบวนการทางเอ็นไซม์และเคมี
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรชนัน เทียวทั่ว
รหัสประจำตัว	46066609
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. บุพร พิษกมฺุทร

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีน โอคาราหรือ โปรตีนที่สกัดจากกากถั่วเหลือง โดยกระบวนการทางเอ็นไซม์และเคมี โดยใช้เอ็นไซม์ 3 ชนิดคือเอ็นไซม์อัลคาเลส เอ็นไซม์ปาเปนและเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีน โอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อย 30 60 และ 90 นาที และใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 30 60 และ 120 นาที ในกรณีของเอ็นไซม์อัลคาเลสพบว่า การวิเคราะห์ subunit ของ โปรตีน โอคาราด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) พบส่วนของ subunit 7S และ 11S globulin จางหายไปแค่จะพบแถบสีเข้มของ โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจด โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายและการเกิดฟองเพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity ของ โปรตีน ส่วนความคงตัวของฟอง และความสามารถในการเกิดอิมัลชันมีแนวโน้มลดลง ในกรณีของเอ็นไซม์ปาเปนพบว่า เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นผลการวิเคราะห์ subunit ของ โปรตีนที่ได้ มีความเข้มของแถบโปรตีนในแต่ละ subunit ลดลง โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลาย ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ในกรณีของเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง subunit ของ โปรตีน โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดฟอง และความคงตัวของฟองมีแนวโน้มลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง

ผลการทดลองโดยใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์พบว่า โปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิกเลชันจะพบแถบโปรตีนของ subunit ที่มีขนาด 14 KDa จางหายไป ความสามารถในการละลายของโปรตีน ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ส่วนความสามารถในการเกิดฟองมีแนวโน้มลดต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ยूपร พืชกมูทร ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำและคำปรึกษาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ. เขียวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฐ์ และ ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมแก่ข้าพเจ้าทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทศรัทธาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการศึกษาจนกระทั่งข้าพเจ้ามีโอกาสประสบความสำเร็จรวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกให้แก่ข้าพเจ้าในงานปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการในงานเอกสารต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ บริษัทกรีนสไปด (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ค่าค่ารถเหมาใช้ในการวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่เคารพรัก รวมทั้งเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้าน ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่คณาจารย์และผู้มีพระคุณ หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่ผู้เดียว

พรชนัน เทียวทั่ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา.....	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ไพรตินถั่วเหลือง.....	3
2.2 ไอคารา.....	5
2.3 ไพรตินสกัดจากไอคารา.....	6
2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ของไพรติน.....	7
2.4.1 สมบัติการละลาย.....	7
2.4.2 สมบัติการเกิดอิมัลชัน.....	10
2.4.3 สมบัติการเกิดฟอง.....	11
2.5 Surface hydrophobicity.....	13
2.6 การปรับปรุงสมบัติของไพรติน.....	13
2.6.1 การคัดแปร ไพรตินโดยใช้เอ็นไซม์.....	14
2.6.1.1 การคัดแปร ไพรตินโดยใช้เอ็นไซม์โปรติเอส.....	15
2.6.1.2 การคัดแปร ไพรตินโดยใช้เอ็นไซม์ทรานซีกลูตามิเนส.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.1.3 การตัดแปรโปรตีนโดยใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส ...	19
2.6.1.4 การตัดแปรโปรตีนโดยใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต.....	19
2.6.2 การตัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์.....	20
2.6.2.1 การตัดแปรโปรตีนโดยวิธีทางเคมี.....	20
2.6.2.2 การตัดแปรโปรตีนโดยใช้ความร้อน.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 วัตถุประสงค์	23
3.2 อุปกรณ์ในการผลิตโปรตีนสกัดจากโอคารา.....	24
3.3 อุปกรณ์ในการตัดแปรโปรตีน.....	25
3.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์.....	25
3.5 สถานที่ดำเนินการทดลอง.....	26
3.6 วิธีการดำเนินงาน.....	27
3.6.1 การเตรียมโปรตีนสกัดจากโอคารา	27
3.6.2 การวิเคราะห์ subunit ของโปรตีน โอคาราโดยใช้ SDS-PAGE	28
3.6.3 การทดสอบสมบัติของโปรตีน.....	28
3.6.4 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	29
3.6.5 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	29
3.6.6 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลส.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
4.1 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	31
4.1.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE.....	31
4.1.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส	32
4.2 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	35
4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE.....	35
4.2.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	36
4.3 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	39
4.3.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้ SDS-PAGE.....	39
4.3.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	40
4.4 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยกระบวนการซัดชนิดเลชัน	43
4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัดชนิดเลชันโดยใช้ SDS-PAGE.....	43
4.4.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัดชนิดเลชัน.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	48
ข้อเสนอแนะ.....	50
บรรณานุกรม.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก.....	
ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน.....	56
ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน.....	65
ค ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ.....	69
ประวัติผู้เขียน.....	78



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 กรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์โปรตีนถั่วเหลืองและปริมาณความต้องการของร่างกาย	4
2.2 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน โยอาหาร คาร์โบไฮเดรต ค่อน้ำหนักแห้งของโอคารา	6
2.3 แสดงสมบัติที่สำคัญของโปรตีนในอาหาร.....	8
4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	32
4.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	33
4.3 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	34
4.4 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	37
4.5 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	38
4.6 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟอง โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	39
4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	41
4.8 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส	42
4.9 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	42
4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	44
4.11 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการ ซัคซินิลเลชัน.....	45
4.12 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการ ซัคซินิลเลชัน.....	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนเวย์ โซเดียมเคซิเนต และโปรตีนจากปลา ที่ความเป็นกรดต่างๆ.....	9
2.2 บทบาทของหมู่ไม่มีขั้วต่อการดูดซับของ โปรตีนที่พื้นผิวระหว่างชั้นอากาศกับของเหลว.....	11
2.3 ปฏิกริยาของทรานส์กลูตามิเนส.....	18
2.4 ปฏิกริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัลฟอนิกแอนไฮไดรด์ กับหมู่ ϵ -อะมิโนของไลซีน.....	21
2.5 ปฏิกริยาฟอสโฟไรเลชัน ระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซิคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรินและทรีโอนีน.....	21
3.1 ขั้นตอนการสกัด โปรตีนจากโอคารา.....	27
4.1 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที.....	31
4.2 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที.....	35
4.3 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที.....	40
4.4 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัลฟอนิเลชันเป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที.....	43
ก 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน.....	57
ก 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน.....	58
ก 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน.....	59
ก 4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน.....	60
ข 1 Homogenizer.....	66
ข 2 Ultrasonic.....	66
ข 3 Eppendorf Centrifuge.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข 4 Spectrofluorometer.....	66
ข 5 Spectrophotometer.....	67
ข 6 Matched glass plates, Spacer, Comb.....	67
ข 7 Electrophoresis Power Supply.....	67
ข 8 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis system.....	67
ข 9 Easy Breeze Gel Dryer	67
ข 10 Easy Breeze Drying Frame.....	68



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีคุณภาพดีและคุณค่าทางโภชนาการสูง องค์การอนามัยโลก (WHO) กล่าวไว้ว่า ในโปรตีนคุณภาพที่ได้จากถั่วเหลือง มีสารพฤกษเคมีที่น่าสนใจคือ ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) สูงถึง 100 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 100 กรัม ของถั่วเหลือง ซึ่งเป็นสารที่มีผลดีต่อสุขภาพ ช่วยลดโคเลสเตอรอลในเลือด ยับยั้งมะเร็งเต้านม ป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนและหลอดเลือดหัวใจตีบตัน ทางคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) สหรัฐอเมริกา แนะนำให้บริโภค โปรตีนถั่วเหลือง อย่างน้อย 6.25 กรัม ต่อหนึ่งหน่วยบริโภค เพื่อช่วยเสริมสร้างสุขภาพร่างกาย (นที อัมฤตธา, 2546) โปรตีนถั่วเหลืองผลิตได้จากการสกัดแยกโปรตีนออกจากแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมันหรือกากถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมัน นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด การผลิตโปรตีนถั่วเหลืองสกัดในประเทศไทยมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง อีกทั้งการผลิตจากถั่วเหลืองทั้งเมล็ด มีต้นทุนสูง สำหรับการผลิตจากกากถั่วที่ได้จากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนสกัดเนื่องจาก โปรตีนที่ได้เกิดการเสถียรภาพธรรมชาติ ทำให้คุณสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นผลกระทบจากการใช้ความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิต

การผลิตโปรตีนสกัดจากโอคาราหรือกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by product) จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง ถือเป็นทางเลือกต้นทุนการผลิตและเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากในการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคารา 1.1 ปอนด์ และมีปริมาณโปรตีน 25-28 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณโอคาราที่ได้ถือว่ามีความสูงและ โปรตีนที่เหลืออยู่ยังเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพ (O'Toole, 1999) จึงได้มีการศึกษากรรมวิธีในการสกัดโปรตีนจากโอคาราเพื่อนำไปใช้ประโยชน์กันมากขึ้น โดยนิยมใช้วิธีการสกัดด้วยด่างและตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) วิธีนี้สามารถสกัดโปรตีนได้ในปริมาณมาก แต่โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งยังได้รับผลกระทบจากความร้อน สารเคมี และสภาวะความเป็นกรดด่างในระหว่างการผลิต ทำให้เกิดการเสถียรภาพธรรมชาติของโปรตีน สมบัติเชิงหน้าที่บางอย่างเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร โปรตีนที่สกัดได้จะมีสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟอง รวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า แต่มีค่าการละลายต่ำ (Ma et al., 1997) ดังนั้นการใช้เอ็นไซม์และสารเคมีในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ลดขนาด โมเลกุลหรือเพิ่มความเป็นประจุของโปรตีน จึงเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยปรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีน โอคารา งานวิจัยนี้จึง ได้ศึกษาการตัดแปร โปรตีน โอคาราด้วยเอ็นไซม์และสารเคมี รวมทั้งศึกษาสมบัติของ โปรตีนที่ได้ เพื่อให้สามารถผลิต โปรตีน โอคาราที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสมบัติของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการตัดแปร โดยเอ็นไซม์ โปรติเอสที่สภาวะต่างกัน
2. ศึกษาสมบัติของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการตัดแปร โดยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่สภาวะต่างกัน
3. ศึกษาสมบัติของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการตัดแปร โดยกระบวนการซัดซินิลเลชันที่สภาวะต่างกัน

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ทำการสกัด โปรตีน โอคาราด้วยสารละลายต่างและนำมาตัดแปร โดยกระบวนการทางเอ็นไซม์และเคมี พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของ โปรตีนที่ได้ เปรียบเทียบกับโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการตัดแปร

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการตัดแปร โปรตีน โอคารา
2. เป็นแนวทางในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีน โอคาราเพื่อให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์อาหาร
3. เป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จาก โปรตีนที่ผลิตจาก โอคาราซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by product) จาก อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภคและใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมได้มีการนำถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น นํ้านมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็น โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและ โปรตีนถั่วเหลืองสกัด ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน แสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ดี ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีปริมาณสูง 35 – 38 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี ร่างกายสามารถย่อยได้ง่าย มีกรดอะมิโนไลซีนสูง แต่มีเมทไธโอนีนและซิสทีนค่อนข้างน้อย ในเนื้อถั่วเหลืองมีโปรตีนสะสมอยู่ในเซลล์ เรียกว่าโปรตีนบอดี (protein bodies) โปรตีนส่วนใหญ่เป็น โปรตีนโกลบูลิน (globulin) สามารถละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจาง ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยคือ 2S 7S 11S และ 15S โปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้แยกตามลักษณะการตกตะกอนด้วยวิธีการอัลตราเซนตริฟิว (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 ของโปรตีนถั่วเหลือง โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วย β -conglycinin ประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด β -conglycinin ประกอบด้วย 3 subunit หลักคือ α (80 KDa), α (76 KDa) และ β (50 KDa) ส่วน 11S globulin ของโปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วย 12 subunit (6 acidic and 6 basic) acidic polypeptide (35 KDa) มีจุดไอโซอิเล็กตริกอยู่ในช่วง pH 4.75-5.4 ส่วน basic polypeptide (20 KDa) มีจุดไอโซอิเล็กตริกอยู่ในช่วง pH 8.0-8.5 โมเลกุลของโปรตีนเหล่านี้เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Bacon *et al.*, 1990)

ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลโปรตีนถั่วเหลืองสามารถจับตัวเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่โดยอาศัยการเชื่อมกันของพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง กรดอะมิโนที่สามารถสร้างพันธะประเภทนี้คือกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮดริล เช่น ซิสเตอีน เมื่อหมู่ซัลไฮดริลถูกออกซิไดส์จะเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างปลายโมเลกุลของซิสเตอีน 2 โมเลกุล

โปรตีนถั่วเหลืองที่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลมาก พันธะไดซัลไฟด์จะไปลดความยืดหยุ่นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกพันไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีน การลดหรือกำจัดพันธะไดซัลไฟด์มีผลช่วยให้การเกิดฟองของโปรตีนดีขึ้น โดยพบว่า การลดจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ลงประมาณ 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 (กฤษณา ยากรกฤษณ์, 2544)

ตารางที่ 2.1 กรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์โปรตีนถั่วเหลืองและปริมาณความต้องการของร่างกาย

Essential amino acid	FAO / WHO			Protein	
	2-5	10-12	Adult	Concentrates	Isolates
	mg/protein				
Histidine	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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณ โปรตีนสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ผลิตได้จากการสกัดแยกโปรตีนออกจากเบ้งถั่วเหลืองสกัด ไขมันหรือกากถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหาร ได้หลากหลายประเภท โดยทั่วไปการผลิต โปรตีนถั่วเหลืองสกัดสามารถผลิตได้จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ดซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีส่วนผสมของไขมันอยู่ด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมจะผลิตจากกากถั่วที่เหลือจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิตสามารถทำได้หลายวิธีโดยอาศัยตัวทำละลายในการสกัด ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารละลายค่างหรือเกลือเป็นตัวทำละลาย เช่นการผลิตโปรตีนสกัดที่ใช้ในทางการค้าจะใช้สารละลายค่างช่วง pH 7 ถึง 10 ในการสกัดและทำการตกตะกอนที่ pH 4.5 หรือการผลิตโปรตีน โดยใช้สารละลายเกลือในการสกัดซึ่งอาศัยความแรงของประจุเป็นตัวแยก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เมมเบรน (membrane) ในการผลิตโปรตีนสกัด โดยใช้วิธีการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และ ไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) หลังจากกระบวนการสกัดตามปกติ เพื่อแยกส่วนของ โปรตีนออกจากสารละลายที่สกัดได้ โปรตีนที่ได้จะละลายได้ดีเนื่องจากไม่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรด (Hensley and Lawhon, 1979)

การสกัด โปรตีนจากถั่วเหลืองได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่นการให้ความร้อน กระบวนการในการสกัด ไขมัน ขนาดของอนุภาค อุณหภูมิ และอัตราส่วนตัวทำละลายต่อกากในการเตรียมกากถั่ว มีการใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัด โปรตีนจากกากถั่วที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว ตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำ น้ำผสมสารละลายค่างเจือจาง pH 7 ถึง 9 หรือสารละลายของเกลือ (0.5 - 2M) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีในการสกัด โปรตีนและเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลายเจือจาง โปรตีนที่ได้จึงไม่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดส่วนใหญ่จะทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังมีการสกัด โปรตีนที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2.2 โอคารา

โอคาราหรือกากถั่วเหลืองเป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและเต้าหู้ ในการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคารา 1.1 ปอนด์ มีความชื้น 76 – 80 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณโปรตีน 25-28 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จากเดิมมักนำไปผสมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ แต่ในปัจจุบันได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นมากขึ้น เนื่องจากโอคาราที่ได้ยังคงมีโปรตีนและสารอื่นๆอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.2 เช่น มีการนำโอคารามาใช้ประโยชน์ทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารหมัก นัตโต โทจิ เทมเป หรือใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตขนมอบ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับการผลิตจากถั่วเหลืองเมล็ด มีการใช้โอคาราในการลดต้นทุนผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์โดยใช้ในการเลี้ยงหนอนไหม ทำให้ตัวอ่อนเจริญดีและไม่มีโรค นอกจากนี้ที่ญี่ปุ่นยังมีการใช้โอคาราในการเพิ่มความคงทนในผลิตภัณฑ์เซรามิกด้วย (O'Toole, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนูญาติเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 เปรอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน โยอาหาร และ คาร์โบไฮเดรต ต่อน้ำหนักแห้งของโอคารา

โปรตีน	ไขมัน	โยอาหาร	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 <i>et al.</i> , (1996)

2.3 โปรตีนสกัดจากโอคารา

ในโอคาราจะมีอัตราส่วนของโปรตีนที่มีคุณภาพอยู่สูง มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ FAO จากการวิเคราะห์หาค่า protein efficiency ratio (PER) พบว่าโอคารามีค่า PER 2.71 ซึ่งสูงกว่าถั่วเหลืองที่มีค่า PER 2.57 (O'Toole, 1999) Khare และคณะ (1995) ศึกษาความสามารถในการใช้โอคาราเป็นแหล่งโปรตีน และความสามารถในการย่อยโปรตีน โอคาราในร่างกาย พบว่า ร่างกายสามารถย่อยโปรตีนได้ถึง 80 เปรอร์เซ็นต์ แต่การประยุกต์ใช้โอคาราในผลิตภัณฑ์อาหารยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โดยส่วนใหญ่จะใช้โอคาราในด้านการเพิ่มเส้นใยในอาหาร เช่น นำมาใช้เป็นส่วนผสมทดแทนแป้งในผลิตภัณฑ์ขนมอบ เค้ก คุกกี้ ลูกกวาด ขนมขบเคี้ยว ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจทำการสกัดโปรตีน โอคาราและศึกษาสมบัติของ โปรตีนที่ได้รวมทั้งทำการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

การสกัด โปรตีนจากโอคาราสามารถทำได้โดยใช้การสกัดด้วยค่า pH 9.0 กวนผสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้โปรตีนละลาย จากนั้นทำการตกตะกอนที่ pH 4.5 และแยกส่วนของเหลวออกจากเครื่องหมุนเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้มาปรับ pH ให้เป็นกลาง และนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จากการทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีน โอคาราที่สกัดได้พบว่ามีความสามารถในการละลาย การดูดซับน้ำและ ไขมัน การเกิดอิมัลชัน และการเกิดฟองดีกว่าโปรตีนสกัดทางการค้าแต่โปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณต่ำประมาณ 12.8 เปรอร์เซ็นต์ (ฉวีชา สุพิชญางกูร, 2545) ในขณะที่ Ma และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาสมบัติของโปรตีน โอคารา พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการละลายต่ำ แต่สมบัติด้านอื่นเช่น การเกิดอิมัลชัน การเกิดฟองและการเกาะเกี่ยวต่างๆเทียบได้กับ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และจากการศึกษาการละลายของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการสกัดเปรียบเทียบกับแป้งถั่วเหลือง พบว่าตัวอย่างแป้งถั่วเหลืองละลายได้ดีกว่าโปรตีน โอคารา แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั่วไปมีความสามารถในการละลายดีกว่าโปรตีนสกัดที่เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างกระบวนการผลิต

ดังนั้นการนำโอคารามาสกัด โปรตีนและทำการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารและเพิ่มมูลค่าให้กับโปรตีนจากพืช Chan และ Ma (1999) พบว่าโปรตีน โอคาราที่สกัดได้จากกากที่เหลือจากการผลิต น้านมถั่วเหลือง มีความสามารถในการละลายได้น้อย ทำให้การนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารต่างๆทำได้ยาก จึงทำการดัดแปร โปรตีน โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งช่วยให้ความสามารถในการละลายของ โปรตีนเพิ่มขึ้นและสามารถละลายได้ดีในช่วง pH กว้างขึ้น อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่นๆของ โปรตีน โอคาราให้ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการดัดแปร โปรตีน โอคาราโดยการย่อยด้วยกรดอ่อน ช่วยให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น สามารถนำไปใช้เป็น food ingredient ได้มากขึ้น

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

บทบาทของ โปรตีนมีความสำคัญมากต่อผลิตภัณฑ์อาหารทั้งในกระบวนการผลิต การแปรรูป และในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา นอกจากนี้โปรตีนยังเป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับไขมัน น้ำตาล แป้ง โพลีฟีนอล และกรดอื่นๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเลือกใช้โปรตีนที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิด เช่นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต้องการสมบัติการละลาย ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ต้องการสมบัติที่ช่วยให้เกิดการยึดหยุ่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความสามารถในการดูดซับไขมัน สมบัติในการเกิดอิมัลชัน และสมบัติในการเกิดเจล สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับ โครงสร้างของโปรตีนและความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาร่วม (interaction) กับองค์ประกอบอื่นๆของอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบในปริมาณมากมักจะต้องการสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีนที่แตกต่างกันตามชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดอาจต้องการเพียงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเพียงสมบัติเดียวหรือมากกว่า แสดงดังตารางที่ 2.3

2.4.1 สมบัติการละลาย

โปรตีนถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็น โปรตีน โกลบูลิน สามารถจับตัวกันเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งมีสมบัติในการละลายน้ำได้น้อยหรือเกิดการตกตะกอนที่จุด ไอโซอิเล็กทริก สำหรับ โปรตีนถั่วเหลืองในกระบวนการผลิตจะมีการใช้ความร้อนทั้งความร้อนเปียกและความร้อนแห้ง ซึ่งความร้อนจะลดการทำงานของเอนไซม์ lipoxxygenase และ trypsin inhibitor แต่การให้ความร้อนก็ส่งผลให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติและทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง นอกจากกระบวนการให้ความร้อนแล้ว ในส่วนของการสกัดด้วยตัวทำละลายและการกำจัดตัวทำละลายก็จะส่งผลให้ความสามารถในการละลายของ โปรตีนถั่วเหลืองลดลงด้วย การปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธีโดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่ม โปรติเอสหรือใช้สารเคมีช่วยย่อยสลายพันธะ Bora (2002) พบว่าการดัดแปรโปรตีน โดยกระบวนการซัลฟิเนชันช่วยให้ค่าการละลายของ โปรตีนในช่วง pH เป็นกลางและด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการแทนที่หมู่ α -อะมิโนของไลซีน ด้วยหมู่คาร์บอกซิลที่เป็นประจุลบ ทำให้จุด ไอโซอิเล็กทริกมีค่าลดลง โปรตีนละลายได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงสมบัติที่สำคัญของโปรตีนในอาหาร

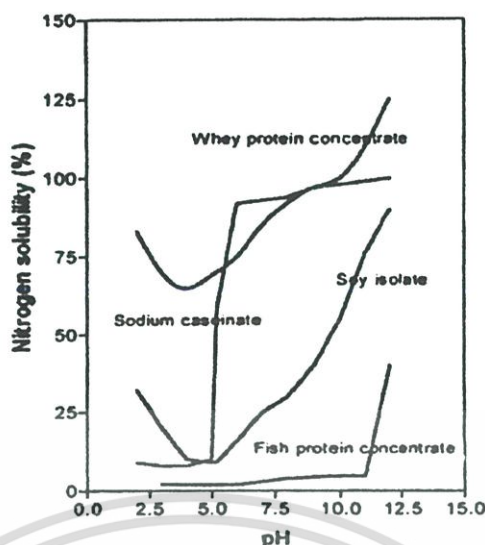
Function	Mechanism	Food system
1. Solubility	Hydrophilicity	Beverages
2. Viscosity	Water binding, hydrodynamic, size, shape	Soups, gravies, salad dressing
3. Water binding	H- bonding, ion, hydration	Meat sausages, cake, bread
4. Gelation	Water entrapment and immobilization, network	Meats, gel, cakes, bakeries, cheese
5. Cohesion / Adhesion	Hydrophobic, ionic and H- bonding	Meat, sausages, pasta, baked goods
6. Elasticity	Hydrophobic bonding, disulfide, Cross-links	Meat, bakery
7. Emulsification	Adsorption at interfaces film formation	Sausages, bologna, soup, cakes, dressing
8. Foaming	Interfacial adsorption, film formation	Whipped toppings, ice cream, cakes, dressing
9. Fat and flavor binding	Hydrophobic bonding, entrapment	Simulated meats, bakery, doughnuts

ที่มา: คัดแปลงจาก Damodaran (1996)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน

1. ความเป็นกรดด่าง

หากสถานะแวดล้อมของโปรตีนส่งผลให้โปรตีนมีประจุโดยรวมเป็นศูนย์ pH เท่ากับ pI ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ละลายได้น้อยสุด แต่เมื่อ pH ของระบบสูงกว่า pI จะทำให้ประจุโดยรวมเป็นลบ หรือเมื่อ pH ต่ำกว่า pI ประจุโดยรวมจะเป็นบวก ซึ่งทั้งสองสถานะจะส่งผลให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.1 แต่เมื่อระบบเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปอาจทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ โปรตีนเกิดการคลายตัวเนื่องจากการลดลงของ electrostatic bond ทำให้ปริมาณหมู่ hydrophobic เพิ่มมากขึ้น การละลายของโปรตีนจะลดต่ำลง (Damodaran, 1996)



ภาพที่ 2.1 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนเวย์ โซเดียมเคซิเนต และโปรตีนจากปลา ที่ความเป็นกรดต่าง ๆ
ที่มา: ปาริฉัตร หงส์ประภาส (2545)

2. ชนิดและความเข้มข้นของไอออน

การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของไอออนจะทำให้สมดุลระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลายเปลี่ยนไป เช่น การเพิ่มการละลายหรือการตกตะกอนของโปรตีน การใช้ความเข้มข้นของไอออนต่ำๆ จะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น ความเข้มข้นของเกลือและไอออนที่มากเกินไปจะทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อยลง ไอออนของเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 – 1 M อาจทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (salting in) โดยไอออนของเกลือจะจับกับหมู่ที่มีประจุตรงข้ามในโปรตีน เกิดเป็น double layer ของหมู่ไอออนิก ซึ่งจะทำให้ electrostatic interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลง (zayas, 1997) แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 1 M ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลง (salting out) เนื่องจากไอออนของเกลือส่วนใหญ่จะจับกับโมเลกุลของน้ำมากกว่าจับกับโมเลกุลโปรตีน ทำให้เกิดปฏิกริยาร่วมระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับโปรตีนและขัดขวางการจับตัวระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับน้ำ

3. อุณหภูมิ

โดยทั่วไปโปรตีนจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง 40-50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ส่งผลต่อพันธะที่เป็น non-covalent ซึ่งเป็นพันธะที่ยึดโมเลกุลของโปรตีน เมื่อโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิเกิดการคลายตัว หมู่ hydrophobic จะเพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อยลง เกิดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนมากขึ้นและเกิดการตกตะกอนของโปรตีน อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิต่ำมากบางครั้งก็ทำให้โปรตีนไม่คงตัว โดยจะส่งผลให้พันธะไฮโดรเจนมีความแข็งแรงลด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลง โปรตีนเช่น IIS globulin, gliadin และ โปรตีนจากไข่และนมบางชนิดจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ทำให้โปรตีนเกิดการจับตัวกันและตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิแช่แข็ง

2.4.2 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

อิมัลชันเป็นระบบคอลลอยด์ที่พบในอาหาร โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ของเหลวทั้งสองชนิดนี้จะไม่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน อิมัลชันที่เกิดขึ้นจะไม่ค่อยคงตัว ต้องอาศัยอิมัลซิไฟเออร์ซึ่งเป็นตัวช่วยลดแรงตึงผิวของของเหลว ป้องกันไม่ให้อนุภาคคอลลอยด์รวมตัวกัน สามารถกระจายตัวและคงตัวอยู่ในตัวกลางได้ อิมัลชันที่พบในอาหารมี 2 ชนิด ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w; oil in water) และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o; water in oil) ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอิมัลชัน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีกลไกในการเกิดอิมัลชันและการรักษาความคงตัวของอิมัลชันแตกต่างกัน

การวิเคราะห์การเกิดอิมัลชันมี 3 วิธี (Nakai and Powerie, 1981) คือ

1. Emulsion Capacity (EC) เป็นการวัดปริมาณน้ำมันสูงสุด(มิลลิลิตร) ที่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้ ทดสอบได้โดยการเติมน้ำมันลงไปผสมกับสารละลายที่มีอิมัลซิไฟเออร์อยู่ เติมเรื่อยๆ จนกระทั่งอิมัลชันที่ได้เกิดการแยกชั้น

2. Emulsion Activity (EA) เป็นค่าที่แสดงพื้นที่ผิวสัมผัสสูงสุด(ตารางเซนติเมตร) ต่อปริมาณโปรตีนหนึ่งกรัมในระบบอิมัลชัน ซึ่งเป็นผลมาจากการที่โปรตีนสามารถกระจายตัวและรวมตัวอยู่ได้ทั้งในส่วนของไขมันและน้ำ และทำให้แรงตึงผิวระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำลดลง โปรตีนซึ่งประกอบด้วยส่วน hydrophilic และ hydrophobic ของกรดอะมิโน มีการจัดเรียงโมเลกุลโปรตีนให้ส่วนที่เป็น hydrophilic หันเข้าหาน้ำ ส่วน hydrophobic หันเข้าหาน้ำมัน เกิดการดูดซับโมเลกุลโปรตีนไว้บนพื้นผิวของเม็ดไขมัน ดังนั้นโปรตีนที่มีสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงจะทำให้เม็ดไขมันดูดซับไว้มาก จึงเกิดอิมัลชันได้ดี (ฉัชชา สุพิชญางกูร, 2545)

3. Emulsion Stability (ES) เป็นค่าที่แสดงถึงความคงตัวของอิมัลชัน นิยามวัดเป็นปริมาณน้ำมันที่เกิดการแยกชั้นภายหลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลาและอุณหภูมิที่กำหนด การทำให้อิมัลชันมีความคงตัวจำเป็นต้องใช้สารอิมัลซิไฟเออร์เช่น โปรตีน โมโนและไดกลีเซอไรด์ ในการป้องกันการเกาะกลุ่ม (coalescence) และ การรวมตัวกัน (flocculation) ของเม็ดไขมันในระบบอิมัลชัน (Damodaran, 1996) ซึ่งโดยธรรมชาติอิมัลชันจะไม่คงตัว เมื่อเวลาผ่านไปเม็ดไขมันที่กระจายตัวอยู่จะเคลื่อนที่มาชนกัน เกิดการรวมตัวและการแยกชั้นของไขมันและน้ำ การทำให้อิมัลชันและการรักษาความคงตัวของอิมัลชันเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่ต้องการในอาหารบางชนิด เช่น นมพร้อมดื่ม นมข้นหวาน มาของเนส น้ำสลัด เป็นต้น แต่ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดเช่น การแยกครีม การทำเนย ต้องอาศัยการทำให้อิมัลชันเสียความคงตัว (ปาริฉัตร หงส์ประภาส, 2545)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

1. ความเข้มข้นของ โปรตีน

ถ้าความเข้มข้นของ โปรตีนต่ำ ฟิล์มที่เกิดขึ้นรอบเม็ดไขมันจะบางและไม่แข็งแรงทำให้อิมัลชันเกิดได้ยากและไม่คงตัว เม็ดไขมันจะเกิดการเคลื่อนที่มารวมกันได้ง่าย ส่วนที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูง โปรตีนจะเกิดเป็น multilayer รอบเม็ดไขมัน

2. ความเป็นกรดต่าง

โปรตีนบางชนิดเกิดอิมัลชัน ได้ดีที่ pH เท่ากับ pI เช่น ไข่ขาว แต่โปรตีนส่วนใหญ่จะสามารถเกิดอิมัลชันได้ดีที่ระดับ pH ที่ไม่ใช่ pI โดยระบบ pH จะส่งผลกระทบต่ออาการเกิดอิมัลชัน

3. ความแรงของประจุ

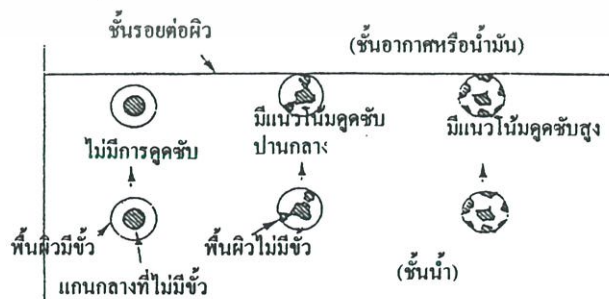
ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ โปรตีนถั่วเหลืองจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยเมื่อเติม 1 M NaOH ลงในระบบอิมัลชันที่ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นอิมัลซิไฟเออร์ จะทำให้ฟิล์มโปรตีนรอบเม็ดไขมันมีความแข็งแรงมากขึ้น

2.4.3 สมบัติการเกิดฟอง

ฟองเป็นระบบคอลลอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งประกอบด้วยอากาศที่กระจายตัวอยู่ในของเหลว โดยฟองอากาศขนาดเล็กๆจะถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มบางๆของของเหลว

Foaming Activity เป็นค่าที่แสดงความสามารถในการเกิดฟองเมื่อมีการให้ฟองแก่สารละลายโปรตีน ทำให้เกิดการดูดซับและกระจายตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสของชั้นอากาศและน้ำ จากนั้น โปรตีนจะเกิดการคลายตัวที่บริเวณผิวสัมผัส และหันส่วนที่มีขั้วเข้าจับกับน้ำ และส่วนไม่มีขั้วจะหันเข้าสู่อากาศ เกิดการจับกันเป็นฟิล์มบางห่อหุ้มฟองอากาศไว้ภายใน

Foaming Stability เป็นความสามารถในการต้านการรวมตัวกันและทนต่ออัตราการสลายตัวของฟองกลายเป็นของเหลว หรือเป็นความสามารถของฟองที่ทนต่ออัตราการลดลงของปริมาตรฟอง ในช่วงเวลาหนึ่งๆ (Damodaran,1996) ความเร็วของ โปรตีนที่ถูกดูดซับอยู่ที่ชั้นระหว่างผิวอากาศและของเหลว ขึ้นอยู่กับรูปแบบการกระจายตัวของหมู่มีขั้วและหมู่ไม่มีขั้วที่มีใน โปรตีน หากมีหมู่ไม่มีขั้วเพิ่มขึ้นการดูดซับที่ชั้นระหว่างผิวจะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน แสดงดังภาพที่2.2



ภาพที่ 2.2 บทบาทของหมู่ไม่มีขั้วต่อการดูดซับของ โปรตีนที่พื้นผิวระหว่างชั้นอากาศกับของเหลว

เอกสารที่นำ: Damodaran (1996) สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง

1. ความเป็นกรดต่าง

โปรตีนสามารถทำให้เกิดฟองที่มีความคงตัวสูงสุดได้ที่ระดับ pH เท่ากับ pI เนื่องจากเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล โปรตีนสูง โปรตีนจะ ไปดูคั้งอยู่ที่ผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับสารละลายมาก แรงดึงดูดลดลงมาก ซึ่งจะทำให้ฟิล์มที่เกิดรอบฟองอากาศมีความหนาและยืดหยุ่นดี จะได้ฟองที่มีความคงตัวสูง

2. ความเข้มข้นของ โปรตีน

ถ้าความเข้มข้นของ โปรตีนสูงฟองที่ได้จะมีความหนาแน่นมากและมีความคงตัวสูง เพราะฟิล์มของเหลวที่ล้อมรอบอากาศมีความแข็งแรงและอาจจะช่วยลดการเสียน้ำออกจากโครงสร้าง lamellar ได้ทำให้ฟองมีความคงตัวดี

3. ลักษณะของ โมเลกุล

โมเลกุล โปรตีนประเภทเกลียวอิสระ เช่น บีตา-เคซีน จะเกิดการดูคั้งที่ชั้นระหว่างผิวและจัดเรียงตัวบริเวณชั้นอากาศและน้ำ ได้ดี แต่โปรตีนที่มีโครงสร้างทรงกลม เช่น โลโซไซม์ จะขาดตัวแน่น มีโมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะ ไคซัลไฟด์ เกิดการคลายตัวและยืดเกาะที่ชั้นระหว่างผิวได้น้อย โปรตีนที่เกิดฟองอากาศได้ดีไม่จำเป็นต้องมีความคงตัวสูงเสมอไป โดยการเกิดฟองที่ดีจะขึ้นกับอัตราการดูคั้งของ โปรตีนที่ชั้นระหว่างผิว ความยืดหยุ่นของ โปรตีนและลักษณะ ไม่มีขั้ว แต่ความคงตัวของฟองขึ้นกับลักษณะทางการไหลของฟิล์ม โปรตีน ความหนาของฟิล์มและการเกิดปฏิกิริยาภายในโมเลกุล โปรตีนที่คลายรูปร่างบางส่วนมักจะทำให้เกิดฟองที่มีความคงตัวสูงกว่า เพราะสามารถสร้างฟิล์ม โปรตีนที่มีความหนาแน่นกว่า โปรตีนที่ขดตัวเต็มที่ (Damodaran,1996) ดังนั้นการเกิดฟองที่ดีและมีความคงตัวสูงควรมีความสมดุลระหว่าง โมเลกุลที่ยืดหยุ่นและไม่ยืดหยุ่น นอกจากนี้สมบัติด้านความคงตัวของฟองจะมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับความหนาแน่นของประจุ โปรตีนที่มีอยู่ ยิ่งประจุมีความหนาแน่นสูงยิ่งขัดขวางการดูคั้งของ โปรตีนที่ชั้นระหว่างผิว

4. น้ำตาล

การเติมน้ำตาลในสารละลายมักทำให้เกิดฟองอากาศลดลง เนื่องจากน้ำตาลจะทำให้โมเลกุล โปรตีนคลายตัวยากขึ้นและยืดเกาะที่ชั้นระหว่างผิวยากขึ้นด้วย แต่น้ำตาลจะทำให้ฟองอากาศคงตัวได้ดีขึ้นเนื่องจากน้ำตาลจะเพิ่มความหนืดของ โปรตีน ทำให้ของเหลวจากส่วนชั้นบางมีอัตราการไหลออกลดลง

5. ไขมัน

ไขมัน เช่น ฟอสโฟไลปิด เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ฟองอากาศที่เกิดจาก โปรตีนมีปริมาตรลดลง เนื่องจากไขมันสามารถยืดเกาะที่ชั้นรอยต่อระหว่างผิวอากาศและน้ำได้ดีกว่าโปรตีน ทำให้การยืดเกาะของ โปรตีนลดลง แต่ฟิล์มที่ได้จากไขมันขาดความยืดหยุ่นและแรงดึงดูดระหว่างอนุภาค ทำให้ฟองอากาศขยายตัวอย่างรวดเร็วและยุบตัวลงระหว่างที่มีการตีฟอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับผูกพันหาไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนจากถั่วเหลืองในธรรมชาติมีความสามารถในการเกิดฟองค่อนข้างต่ำ เพราะโครงสร้างโปรตีนที่จับตัวกันแน่นมีขนาดใหญ่ ด้านทานการถูกดูดซับและคลายตัวที่ชั้นรอยต่อของอากาศและน้ำ ทำให้เกิดฟิล์มโปรตีนไม่ดีพอ จากการศึกษาของ German และคณะ (1985) พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองมีโครงสร้างที่ทำให้เกิดฟองที่ดี แต่ถูกบดบังด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างสายโปรตีน ดังนั้นการตัดแปรโครงสร้างโปรตีนโดยการย่อยสลายพันธะเหล่านี้จะทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวแบบเกลียวอิสระที่ชั้นรอยต่อจึงเกิดฟองได้ดีขึ้น

2.5 Surface hydrophobicity

โมเลกุลโปรตีนโดยทั่วไปจะมีส่วน hydrophobic อยู่ภายใน เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อโปรตีน จะทำให้โครงสร้างเกิดการคลายตัว ส่วน hydrophobic จะถูกปล่อยออกมา เป็นผลให้ค่า Surface hydrophobicity เพิ่มมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของส่วน hydrophobic จะช่วยให้การจับกับน้ำมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งค่า hydrophobicity ของสายเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยสลายมีความสำคัญมากต่อการเพิ่มสมบัติที่ผิวหน้าของโปรตีนและยังส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ประการอื่นด้วย

การวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปจะใช้วิธี Probe spectrofluorometry นิยมทำการวิเคราะห์โดยใช้ anionic probes ของ aromatic sulfonic acid เช่น amphiphilic 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) หรือ ใช้ dimeric form bis-ANS นอกจากนี้มีการใช้สารในกลุ่มอื่น ได้แก่ *cis*-parinaric acid (CPA) และ *trans*-parinaric acid ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนและเนื้อเยื่อ ข้อจำกัดในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือ การเปลี่ยนแปลงของค่า relative fluorescence intensity นั้น มีปัจจัยที่ส่งผลคือระดับความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ หรือการเติมสารที่ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติไป การวิเคราะห์โดยใช้สาร ANS ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์คือ pH 2 – 8 ส่วนการใช้สาร CPA ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจะต้องมีระดับความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5 ซึ่งเป็นข้อจำกัดของตัวอย่างที่ไม่สามารถละลายได้ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า pH 5 (Nakai *et al.*, 1996)

2.6 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการนำโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะให้คุณค่าสารอาหารแล้วยังเป็นการเพิ่มบทบาทการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืชและอาศัยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้เป็นส่วนผสมหรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น สมบัติการดูดซึมน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของ โปรตีนถั่วเหลืองนิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันของเนื้อสัตว์และ ไข่กรอก เพื่อปรับปรุงด้านเนื้อสัมผัส เพิ่มความนุ่ม และความสามารถในการอุ้มน้ำ รวมทั้งใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท dairy food และสารทดแทนน้ำนม จากการศึกษาของ Lin และ Mei (2000) พบว่าการเติม โปรตีนถั่วเหลืองจะช่วยทำให้สมบัติด้านความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์ไข่กรอกดีขึ้น จึงส่งผลให้มีสัดส่วนของปริมาณไขมันในผลิตภัณฑ์ลดลง ให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lecomte และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์เฟรซเฟอ์เตอร์ นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองยังมีสมบัติในการเกิดเจลที่ดี สามารถฟอร์มเจลได้โดยการให้ความร้อน หรือการใช้สารตกตะกอนโปรตีน (coagulant) เช่น เจลเด้าหัว อีกทั้งยังมีการใช้ประโยชน์ในการเป็นสารให้ฟอง ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ขนมมาชเมลโล เมอร์แรงส์ ไอศกรีม เป็นต้น ฟองที่เกิดจากโปรตีนถั่วเหลืองสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความคงตัวต่อไขมันในอาหาร ซึ่งอาหารบางประเภทที่มีไขมันเป็นส่วนผสม อาจส่งผลให้ฟองอากาศเกิดการยุบตัวลงได้ง่าย (สุกัญญา วงศ์วาท, 2545)

แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดต่ำที่รุนแรง หรือการได้รับความร้อน ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพได้ง่าย จึงควรปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากสมบัติต่างๆของ โปรตีนจะเกี่ยวเนื่องกับ โครงสร้างเป็นสำคัญ การปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี

2.6.1 การตัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic Modifications)

เอนไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ในการตัดแปร โปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแปรสภาพโปรตีนมีหลายประเภทขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นๆเช่น ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) โปรตีนไคเนส (protein kinase) เพกทิเนส (pectinases) เปปติโดกลูตามิเนส (peptidoglutaminase) เป็นต้น ได้เริ่มมีการนำมาใช้แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากในระดับอุตสาหกรรม (ปรางค์ อำนเป็รื่อง, 2547)

2.6.1.1 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแตกต่างกันไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โมเลกุลที่ผ่านการย่อยสลายจะมีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อย ความจำเพาะของเอนไซม์และสภาวะอุณหภูมิ เวลาที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยา การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีนนั้น เอนไซม์จะเข้าไปตัดพันธะเปปไทด์ทำให้ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เช่น di, tri – peptide และเมื่อมีการย่อยสลายต่อไปก็จะได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆคือ เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีนและเอนโดเปปติเดส (Endopeptidases) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระแบบสุ่ม (randomly) ภายในสายโปรตีน (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547)

ประเภทของโปรติเอส

1. โปรติเอสเซรีน (Serine proteases)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่มีอนุโมลกรดอะมิโนเป็น ไทโรซีน (Tyr) เชนิลอะลานีน (Phe) และทริปโตเฟน (Trp) เช่นเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ซับทิไลซิน (Subtilisin) หรืออนุโมลกรดอะมิโนเป็นไลซีน (Lys) และอาร์จินีน (Arg) เช่นเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) เอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) เอนไซม์เหล่านี้เป็นพวกอัลคาไลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 7-11 (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547) จากการศึกษาของ Chan และ Ma (1999) พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีน โอคาราด้วยเอนไซม์ทริปซินจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำและดูดซับน้ำได้ดี ช่วยเพิ่มสมบัติในการเกิดฟองและอิมัลชันได้ดีขึ้นด้วย

เอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรติเอส ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ แอสปาร์เตท เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรตค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน ไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986) เอนไซม์อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติต่างๆของโปรตีนถั่วเหลืองให้ดีขึ้น เช่น สมบัติด้านการเกิดฟอง การเกิดอิมัลชัน เมื่อทำการย่อยที่ระดับจำกัด เป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อน อุณหภูมิที่ใช้คือ 55 – 60 องศาเซลเซียส แต่อาจสูงได้ถึง 70 องศาเซลเซียส มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 7 – 11 ที่ pH 4 เอนไซม์จะถูกยับยั้งปฏิกิริยา สูญเสียความสามารถในการทนความร้อน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ได้ จากงานวิจัยของ Waish และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าอัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนได้โดยการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยอัลคาเลส

ที่ระดับการย่อยสลาย 2 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ได้จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นในช่วง pH 3.0- 5.0 ส่วนที่ pH 6.0- 8.0 ค่าการละลายของโปรตีนจะลดต่ำลง Govindaraju และ Srinivas (2004) ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน arachin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายสูง โปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มเป็น 55 - 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำจะให้ค่าการละลายในช่วง pH 4 - 4.5 เพิ่มเป็น 14 - 16 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการเกิดฟองเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน และ fungal protease แต่ไม่ส่งผลให้ค่าความคงตัวของฟองโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfhydryl proteases)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโคเปปติเดสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยส่วนใหญ่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เอนไซม์ปาเปน (Papain) จากมะละกอ เอนไซม์ไฟซิน (Ficin) จากมะเดื่อ และเอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) จากสับปะรด สมบัติของโปรติเอสซัลไฟดริลเป็นพวกนิวทริลโปรติเอส มีสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 6-7.5 (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547) จากงานวิจัยของ Were และคณะ (1997) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้สารละลายด่างที่ pH 10.0 ร่วมกับเอนไซม์ปาเปน พบว่ามีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น และยังส่งผลให้สมบัติการเกิดฟอง การจับน้ำและค่า Surface hydrophobicity เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นแต่ไม่มีผลต่อสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีน และจากงานวิจัยของ Ortiz และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมิเลน โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และยับยั้งเอนไซม์ด้วยการเติม 18.8 เปอร์เซ็นต์ TCA (trichloroacetic acid solution) หรือการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากการทดลองพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนสามารถย่อยสลาย α - , α -7S subunit และ A-11S subunit และ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า 94 kDa ให้เล็กลงพร้อมทั้งช่วยเพิ่มประจุของโมเลกุลโปรตีนและปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองให้ดีขึ้น ค่าการละลายของโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายเพิ่มขึ้นในทุกช่วง pH โดยเฉพาะช่วง pH 4.5 -5.8 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการละลายต่ำสุด โปรตีนที่ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก ให้ค่าการละลายสูงกว่าการใช้ 18.8 เปอร์เซ็นต์ TCA Scilingo และคณะ (2002) ศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนสกัดจาก Amaranth ที่ทำการคัดแปรโดยใช้เอนไซม์ cucurbita และเอนไซม์ปาเปน พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็ง ให้ค่าการละลายเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับการย่อยด้วยเอนไซม์ cucurbita ส่วนโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและทำการยับยั้งปฏิกิริยาด้วยความร้อนจะให้ค่าการละลายสูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ cucurbita จึงเหมาะในการเลือกใช้เอนไซม์ปาเปนปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสกัดจาก Amaranth เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องมีการให้ความร้อน เพื่อยังคงค่าการละลายที่ดีอยู่

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing proteases)

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

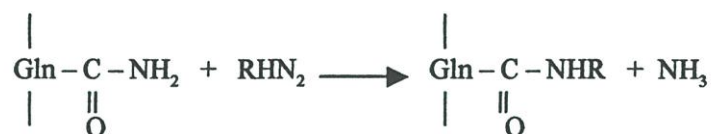
4. โปรติเอสกรด (Acid proteases)

เป็นโปรติเอสที่มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วง pH ของกรด (pH < 7) โดยทั่วไปเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วง pH เหมาะสมระหว่าง pH 2-4 และ ไม่แสดงชัดเจนถึงอนุโมลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณา pH activity profile ของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุโมลกรดแอสปาดิกอยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอ็นไซม์เรนินและเปปซิน เป็นต้น เอ็นไซม์เปปซินมีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เหมาะสมระหว่าง pH 8 – 4 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน เช่น Phe, Tyr และ Tryp (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) เหมาะในการนำมาย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง จากงานวิจัยของปาริฉัตร ทักษะสุด และปราณี อ่านเปรื่อง (2541) ซึ่งทำการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง สำหรับทดลองกับผลิตภัณฑ์เมอแรงส์ พบว่าการใช้เอ็นไซม์เปปซินที่ pH 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 4.5 จะให้ค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ซึ่งถือว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากไข่ขาวได้

2.6.1.2 การตัดแปรรูปโปรตีนโดยใช้เอ็นไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

ทรานส์กลูตามิเนส (Transglutaminase, TGase) มีสมบัติในการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ในสภาวะที่มีหมู่เอมีน TGase จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งเอมีนของสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลระหว่าง γ -carboxamide ของกลูตามีนในโปรตีนกับหมู่เอมีน (RNH_2) เกิดเป็นโปรตีนรูปแบบใหม่ซึ่งมีสายยาวขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.3

(1) acyl-transfer reaction



(2) crosslinking reaction



(3) deamidation



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาของทรานส์กลูตามีน (1) ปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิล (2) ปฏิกิริยาเชื่อมขวาง (3) ปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน

ที่มา : Motoki and Seguro (1998)

ในสถานะที่ไม่มีหมู่เอมีนจะเกิดปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน (deamidation) โดยเกิดการไฮโดรไลซิสของหมู่แกมมาคาร์บอกซิล (γ -carboxyl group) ของกลูตามีน ซึ่งมี TGase เป็นตัวเร่ง ทำให้หมู่แอมโมเนียหลุดออกมาและได้เป็นกรดกลูตามิก ส่วนกรณีที่ปฏิกิริยามีหมู่เอมีนเป็น NH_2 -Lys (อนุพลอิสระของไลซีน) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้โปรตีนสายยาวเชื่อมระหว่างกลูตามีนและไลซีน เรียกว่าปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (crosslinking) ทำให้ได้โปรตีนสายใหม่ที่มีสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น โปรตีนมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ยืดหยุ่นมากขึ้น ทนต่อการตกตะกอนด้วยความร้อน (ปราณี อานเป็เรือง, 2547) ลักษณะดังกล่าวส่งผลที่ดีต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยได้มีการทดลองนำโปรตีนจากนมและถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดแปรโดยใช้ TGase มาเป็นส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกจากเนื้อไก่เพื่อลดการใช้ฟอสเฟต พบว่าโปรตีนที่ผ่านปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม ทนความร้อนได้ดีขึ้น เพิ่มความเสถียรของฟองซึ่งส่งผลต่อการเกิดเจลที่แข็งแรงและมีสมบัติการเกิดอิมัลชันที่ดี สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกได้ (Muguruma *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.3 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

เปปทิโดกลูตามิเนส (Peptidoglutaminase, Pgage) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายกลูตามีนออกจากสายโพลีเปปไทด์ที่ตำแหน่งเอมีน การทำงานของเอ็นไซม์สามารถย่อยได้ตั้งแต่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น โปรตีนไข่ขาว จนถึงโมเลกุลขนาดเล็กของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการ deamidation แล้ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรใช้เอ็นไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในระดับหนึ่งก่อนที่จะมีการใช้ PGase จะช่วยในการย่อยสลายกลูตามีนได้มากขึ้น (Hudson, 1992)

2.6.1.4 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสตาร์ช เช่น แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส นิยมใช้ในการผลิตสตาร์ชคัดแปรหรือการสกัดโปรตีนจากรำข้าว เพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน ส่งผลให้สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ง่ายขึ้น เอ็นไซม์ที่นำมาใช้มากในระดับอุตสาหกรรมคือ แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) เป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายภายในโมเลกุล ที่พันธะแอลฟา 1, 4 โกลโคซิดิก มีชื่อทางการค้าคือ เทอร์มามิล (Termamyl) เป็นเอ็นไซม์ชนิดทนร้อน pHเหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 -7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 90 องศาเซลเซียส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

จากงานวิจัยของ ฉัชชา (2545) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง โดยวิธีการใช้สารละลายต่าง มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 56-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีสูงถึง 38-39 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโปรตีนโอคาราที่สูงสันนิษฐานว่าเกิดจากโปรตีนเมื่อผ่านการใช้ความร้อนหรือแรงบีบอัด เกิดการเชื่อมต่อกับหมู่ของคาร์โบไฮเดรต (protein – polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ได้จึงน้อยและยังส่งผลต่อสมบัติการละลายด้วย ดังนั้นการปรับปรุงโปรตีนโอคาราจึงใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสตาร์ช เพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีน ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เอ็นไซม์เหล่านี้ในการผลิตและปรับปรุงโปรตีนรำข้าว เนื่องจากเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการแยกสตาร์ชที่สร้างพันธะกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน และเส้นใยอาหารออกมาได้ (Wang *et. al.* 1999)

2.6.2 การดัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอนไซม์ (Non - Enzymatic Modifications)

เป็นวิธีการดัดแปรสภาพโปรตีน โดยการใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการคลายตัวหรือจับตัวกันใหม่ของพันธะเคมีต่างๆ ทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2.6.2.1 การดัดแปรโปรตีนโดยวิธีทางเคมี

การดัดแปรด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกกระบวนการหนึ่งซึ่งนิยมนำมาปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วแต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบางอย่างค่อนข้างรุนแรงซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและคุณค่าสารอาหารบางอย่างได้ การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น

- เอซิลเลชัน (acylation)

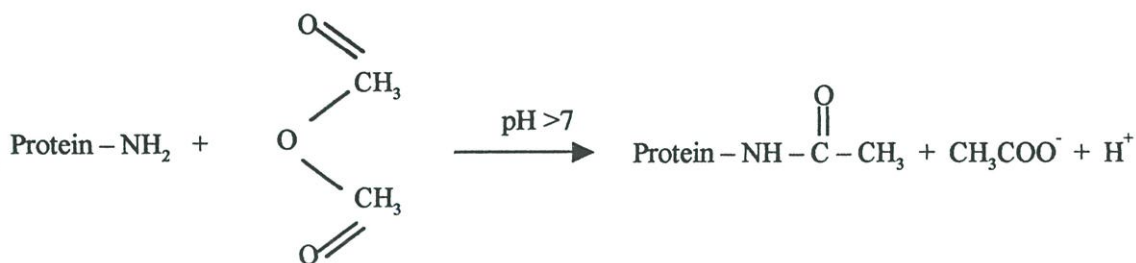
เป็นกระบวนการทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารประเภทแอซิดแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนของไลซีน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้กรดอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นกลางของอะซิทิล (acetyl) เรียกว่ากระบวนการอะซิทิลเลชัน (acetylation) หรือการใช้กรดซักซินิกแอนไฮไดรด์ (succinic anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นลบของซักซินิล (succinyl) เรียกว่ากระบวนการซักซินิลเลชัน (succinylation) แสดงคิงภาพที่ 2.4 ซึ่งส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีประจุลบเพิ่มมากขึ้น เกิดแรงผลักระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในอีกโมเลกุลหนึ่งของโปรตีน มีผลให้การเกาะตัวกันของโปรตีนลดน้อยลง การละลายจึงเพิ่มสูงขึ้น (Damodaran, 1996)

Gruener และคณะ (1997) ศึกษากระบวนการซักซินิลเลชันและอะซิทิลเลชัน ของโปรตีน Conola พบว่าการเพิ่มระดับของการซักซินิลเลชัน มีผลต่อการสลายตัวของ โครงสร้างโปรตีน โดยที่ระดับ 62 เปอร์เซ็นต์ซักซินิลเลชัน จะเกิดการย่อยสลาย 12 S globulin อย่างสมบูรณ์เป็นสาเหตุให้จุดไอโซอิเล็กทริคลดลง และเมื่อเพิ่มระดับของการซักซินิลเลชัน มีผลทำให้ค่า aromatic hydrophobicity ลดลงจาก 97.5 เหลือเพียง 58.1 เปอร์เซ็นต์

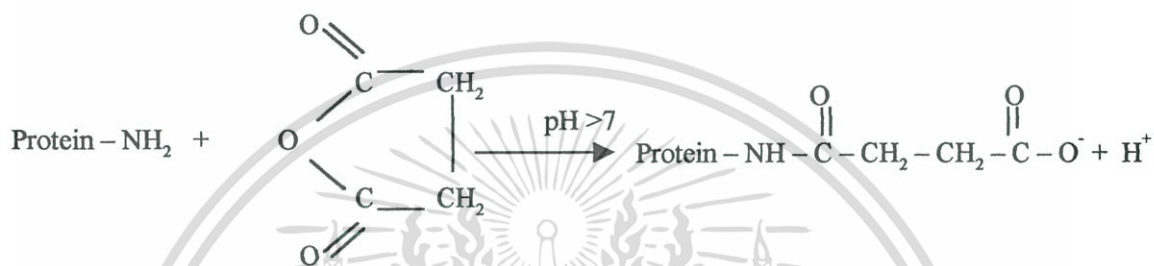
El-Adawy (2000) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียว (Mung bean protein) ที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชันและอะซิทิลเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชัน มีความสามารถในการละลายน้ำและการละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 M เพิ่มขึ้น ส่วนกระบวนการอะซิทิลเลชัน ช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำแต่การละลายในโซเดียมคลอไรด์ได้ลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้จะส่งผลให้ค่าอิมัลชันลดลง สมบัติการเกิดฟองเพิ่มขึ้น โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซิติกแอนไฮไดรด์ และซักซินิกแอนไฮไดรด์ ที่สัดส่วน 1 กรัมสารต่อกรัมโปรตีน จะให้ค่าการเกิดฟองเพิ่มขึ้นเป็น 135 เปอร์เซ็นต์ และ 129 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acylation with acetic acid



Succinylation with succinic acid



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์ กับหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน

ที่มา : El-Adawy (2000)

- ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation)

เกิดจากการที่สารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (phosphorus oxychloride; POCl₃) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรินและทรีโอนีน หรือหมู่ ε-อะมิโนของไลซีน แสดงดังภาพที่ 2.5 ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้น มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ในงานวิจัยของ Matheis และคณะ (1989) พบว่าการใช้ POCl₃ ในการดัดแปรสมบัติของยีสต์โปรตีน แม้จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของโปรตีนแต่สมบัติในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้การเกิดฟอสโฟริเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงๆ จะส่งผลให้เกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ทำให้โปรตีนมีความเป็นประจุเพิ่มขึ้น (Damodaran, 1996)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน ระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรินและทรีโอนีน

ที่มา : Matheis *et. al.* (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.2 การคัดแปรโปรตีนโดยใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมใช้ในการคัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร การคัดแปรโดยใช้ความร้อนจะขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของโปรตีนและสภาวะความร้อนที่ใช้เพื่อให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วนหรือเกิดโดยสมบูรณ์ ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป (Petruccelli and Anon, 1995)

การใช้ความร้อนในระดับที่เหมาะสมถือเป็นวิธีการหนึ่งในการคัดแปรสมบัติของโปรตีนสกัด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 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 การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65-73 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อการทำลาย 7S และ 11S globulin ของโปรตีนถั่วเหลือง และเมื่อได้รับความร้อนในช่วง 75-90 องศาเซลเซียส โครงสร้างโปรตีนจะแตกตัวและจับตัวกันใหม่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 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 ส่วนการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้น 30 นาที จะทำให้ 7S และ 11S globulin ถูกทำลาย โปรตีนเกิดการตกตะกอนสมบัติการละลายและค่า hydrophobicity ลดลง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุคิบ

- 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 กรด Succinic anhydride บริษัท SIGMA-ALDRICH Inc.
- 3.1.6 สารเคมี
 - 3.1.6.1 Acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$)
 - 3.1.6.2 Ammonium Persulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)
 - 3.1.6.3 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS)
 - 3.1.6.4 Bromophenol Blue ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)
 - 3.1.6.5 Bovine Serum Albumin (BSA)
 - 3.1.6.6 Coomassie Brilliant Blue
 - 3.1.6.7 Copper (II) Sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
 - 3.1.6.8 Disodium Hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4)
 - 3.1.6.9 3,5-dinitrosalicylic acid ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$)
 - 3.1.6.10 Ethyl alcohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
 - 3.1.6.11 Folin Phenol reagent
 - 3.1.6.12 Glacial Acetic acid (CH_3COOH)
 - 3.1.6.13 Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
 - 3.1.6.14 Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)
 - 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-Methylene-bis(acrylamide) ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)
- 3.1.6.26 Sodium Dihydrogen Phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
- 3.1.6.27 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)
- 3.1.6.28 Sodium Hydroxide (NaOH)
- 3.1.6.29 Sodium potassium tatrte ($COOK(CHOH)_2COONa$)
- 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

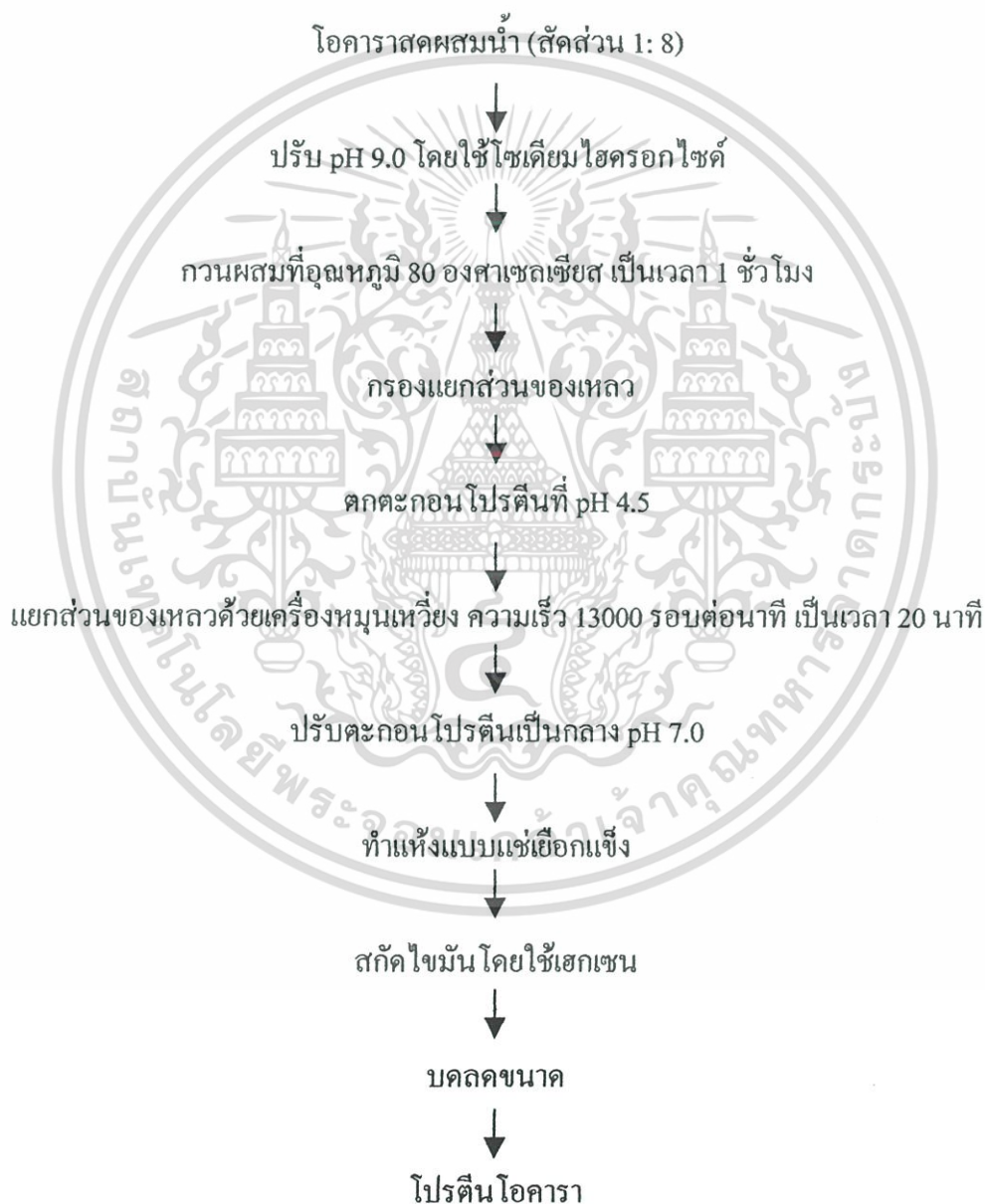
- Freeze dryer Freeze dry LABCONCO
- pH meter Mettler Toledo MP 220, Switzerland
- Hot plate stirrer Thermolyne Nuova Stir Plate, USA
- Centrifuge Centrifon T-42 k Konton Instruments
- หลอด Centrifuge
- Water bath
- Thermometer
- Suction flask
- Vacuum pump
- กระดาษกรอง Whatman No.4
- Soxlet Equipment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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการดำเนินงาน

3.6.1 การเตรียมโปรตีนสกัดจากโอคารา

สกัดโปรตีนจากโอคาราสดตามวิธีของฉัซซา สุพิชญางกูร (2545) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยนำโอคาราสดจากโรงงานมากดทับเพื่อแยกน้ำออก แบ่งบรรจุถุงละ 100 กรัม เพื่อนำมาใช้ในการสกัดครั้งละ 100 กรัม และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยในขั้นตอนการสกัดจะนำโอคารามาละลายน้ำแข็ง ซึ่งโอคาราสดที่ใช้ในการสกัดมีค่าความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโปรตีนโอคาราที่สกัดได้มาทดสอบสมบัติต่างๆของโปรตีน ดังนี้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากโอคารา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (subunit) ของโปรตีนโอคาราด้วยวิธี SDS-PAGE

แยก subunit ของ โปรตีน ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ในสภาวะที่มี denaturing agent (2-ME) โดยใช้วิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ก) และใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ subunit แต่ละตัว

3.6.3 การทดสอบสมบัติของโปรตีน

3.6.3.1 ทดสอบความสามารถในการละลาย

โดยใช้วิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ ก 1 (ภาคผนวก ก) เพื่อหาปริมาณโปรตีนและนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ % solubility index ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อย ดังสมการ

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

3.6.3.2 ทดสอบหาค่า surface hydrophobicity

โดยใช้วิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ ก 4 (ภาคผนวก ก) ค่า surface hydrophobicity ที่ได้ วิเคราะห์จากค่าความชันของกราฟระหว่างค่า Fluorescence Intensity กับความเข้มข้นของโปรตีน ความชันของกราฟที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายใน โมเลกุลออกมาบริเวณพื้นผิวมากขึ้น

3.6.3.3 ทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชัน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะทำการวัดค่า Emulsion Turbidity ของอิมัลชัน ในรูปค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hill (1996) ดังภาพที่ ก 2 (ภาคผนวก ก) ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันดี

3.6.3.4 ทดสอบสมบัติในการเกิดฟอง

ทดสอบความสามารถในการเกิดฟองโดยวัดค่าความสูงของฟองที่เกิดจากการตีฟองโปรตีน ใช้วิธีของ Phillip (1987) ดังภาพที่ ก 3 (ภาคผนวก ก)

3.6.4 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

ย่อยโปรตีน โอคาราที่สกัดได้ด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ตามวิธีของ Waish และคณะ (2003) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 8.0 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีนโอคารา 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ จากนั้นตกตะกอน โปรตีนที่ pH 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปรับตะกอนที่ได้ให้เป็นกลาง pH 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมาทดสอบสมบัติของโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 3.6.2 ถึง 3.6.3

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

3.6.5 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ย่อยโปรตีน โอคาราที่สกัดได้ด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ตามวิธีของ Adriana และคณะ (2002) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 8.5 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีนโอคารา 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 นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลาง โดยปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมาทดสอบสมบัติของโปรตีนตามวิธีการในข้อ 3.6.2 ถึง 3.6.3

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

3.6.6 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เนื่องจากโปรตีน โอคาราที่สกัดได้มีส่วนของคาร์โบไฮเดรตจับอยู่กับโปรตีน (Protein-Polysaccharide conjugate) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการกำจัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตออกโดยการย่อยโปรตีน โอคาราด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเติมเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม กวนผสมที่ระยะเวลาในการย่อยของเอ็นไซม์ต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 70 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาในการย่อย จากนั้นนำของเหลวที่ผ่านการย่อยในส่วนที่เหลือมาปรับ pH เป็น 4.5 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์และตกตะกอนโปรตีน แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส มาทดสอบสมบัติของโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 3.6.2 ถึง 3.6.3

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

3.6.7 ศึกษาสมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการตัดแปรโดยกระบวนการแช่จลินลั่น

ตัดแปรโปรตีน โอคาราที่สกัดได้ตามวิธีของ El-Adawy (2000) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01M pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 เติมกรดซักซินิกแอนไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายโปรตีน กวนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ของสารละลายเป็น 8.0 และควบคุมให้คงที่ตลอดปฏิกิริยา วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 120 นาที และนำมาผ่านกระบวนการไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.5 และแยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดซักซินิกแอนไฮไดรด์ มาทดสอบสมบัติของโปรตีนตามวิธีการในข้อ 3.6.2 ถึง 3.6.3

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

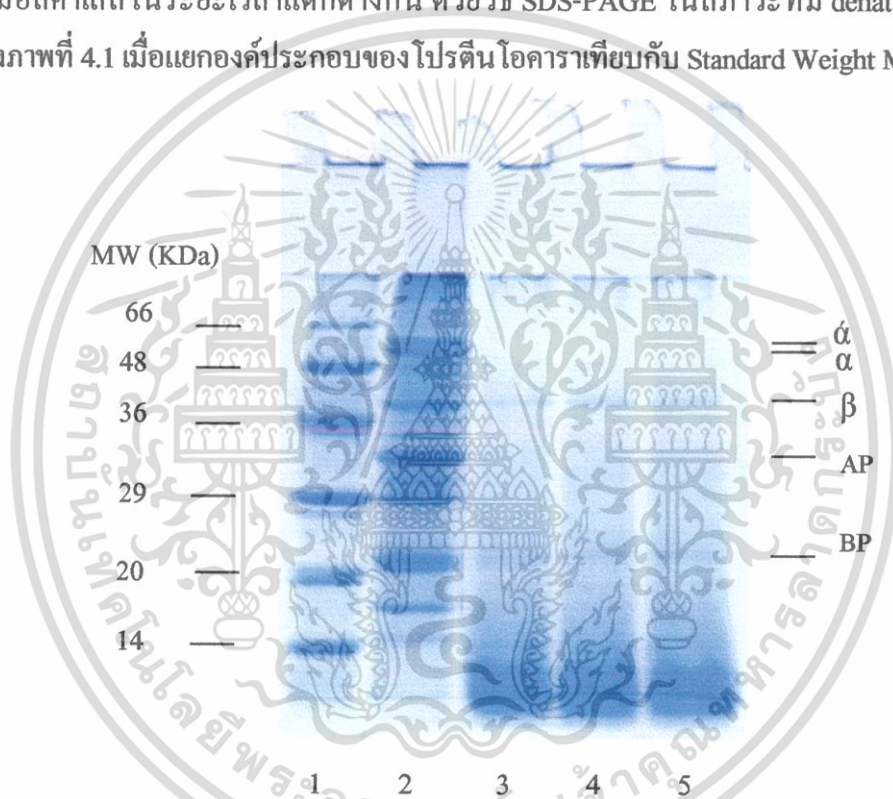
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

4.1.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสในระยะเวลาแตกต่างกัน ด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.1 เมื่อแยกองค์ประกอบของ โปรตีน โอคาราเทียบกับ Standard Weight Marker



ภาพที่ 4.1 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที

- 1 Standard Weight Marker
- 2 โปรตีน โอคารา (OPI)
- 3 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 30 นาที (A1 30)
- 4 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 60 นาที (A1 60)
- 5 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เป็นเวลา 90 นาที (A1 90)

α , α และ β คือ α , α และ β - subunit ของ β -conglycin

AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะพบส่วนของ α , α และ β -subunit ของ 7S globulin และ acidic-basic polypeptide ของ 11S globulin ซึ่งเป็น subunit ที่เป็นองค์ประกอบหลักในโปรตีนถั่วเหลือง (Ma และคณะ, 1997) แต่ในกรณีของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที พบว่ามี subunit ที่เป็นองค์ประกอบไม่แตกต่างกันในทุกๆ ระยะเวลาการย่อยที่เพิ่มขึ้น พบว่าแถบของ α , α -subunit ของ 7S globulin และ acidic polypeptide ของ 11S globulin จางหายไป และจะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจล เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกว้างทำให้เกิดการย่อยในทุกๆ subunit ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน โมเลกุลที่ผ่านการย่อยจะมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง อีกทั้งระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้อาจมีค่าสูง ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายมากเกินไปทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากสามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนของเจลได้

4.1.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอนไซม์ต่อ โปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 4.1 จากการทดลองพบว่า โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายสูงกว่า โปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

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

^{NS} แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

¹ ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

เนื่องจากเอ็นไซม์สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายใน โมเลกุล โปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ประจุสุทธิเพิ่มขึ้น และมีกลุ่ม hydrophilic ที่สามารถจับกับ โมเลกุลของน้ำ ได้มากขึ้น (Wu *et al.*, 1998) ส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการละลายดีขึ้น โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 90 นาที สามารถละลายได้ดีกว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่เวลา 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน โอคารา แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity

การวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โดยวัดในรูปค่าการคูกกลืนแสงของอิมัลชัน พบว่าค่าการคูกกลืนแสงที่สูงแสดงว่า โปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันดี ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันต่ำกว่าโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากผลกระทบจากการสูญเสีย โครงสร้าง globular และขนาดสายเปปไทด์ที่สั้นลง (ภาพที่ 4.1) ส่งผลให้การเกิดฟิล์มโปรตีนรอบๆหยดไขมันบางลง ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจึงลดลง เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้นจะพบว่า โปรตีน โอคารามีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง โดยโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันต่ำกว่าการย่อยที่เวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส

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 ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองโปรตีน โดยวัดในรูปความสูงของฟองที่เกิดขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ความสามารถในการเกิดฟองที่เพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากการใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายพันธะภายใน โมเลกุลของโปรตีนที่มีเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดใหญ่ โครงสร้างจับกันแน่น ทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและจัดเรียงตัวเข้าสู่ชั้นรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศได้ดี

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส

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 ($p \leq 0.05$)

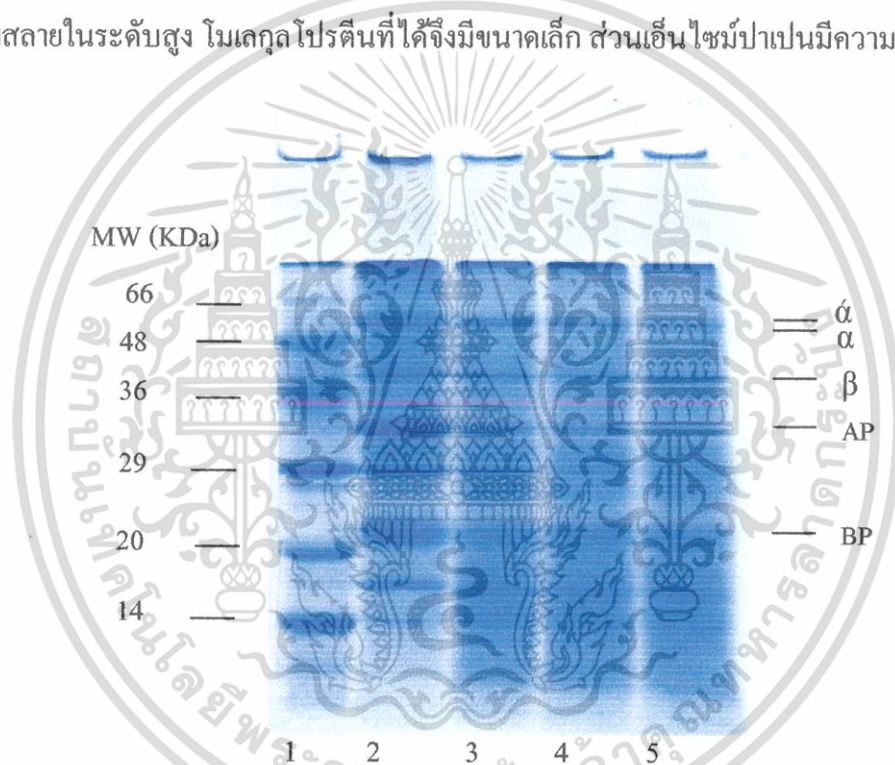
Fennema (1985) ศึกษาพบว่า การเกิดฟองของ โปรตีน จะขึ้นอยู่กับค่า surface activity ลักษณะการเกิดฟิล์มและชั้นรอยต่อระหว่างอากาศกับของเหลวเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่ง โปรตีนที่จะเป็นสารให้ฟองที่ดีจะต้องทำให้ผิวรอยต่อระหว่างอากาศกับของเหลวมีเสถียรภาพได้อย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการเกิดฟอง สามารถคลายตัวและดูดซับได้เร็วที่ชั้นรอยต่อ เมื่อพิจารณาความคงตัวของฟอง โปรตีน โดยวัดจากความสูงของฟองที่เหลืออยู่ภายหลังการตีฟองและตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ (ตารางที่ 4.3) พบว่า โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความคงตัวของฟองต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีแนวโน้มลดต่ำลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น โดยโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยที่เวลา 90 นาที จะมีความคงตัวของฟองต่ำที่สุด เนื่องจากการย่อยโปรตีน โอคาราด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีอัตราการย่อยสลายสูง ทำให้เกิดการตัดสายพันธะเปปไทด์ที่มากเกินไป ได้โมเลกุลโปรตีนสายสั้นอาจทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง อีกทั้งปริมาณประจุสุทธิจำนวนมากที่เกิดจากการย่อย อาจจะลดการเกิดปฏิกริยาร่วมระหว่าง โปรตีนกับอากาศและขัดขวางการเกิด elastic film ระหว่างชั้นอากาศกับของเหลวทำให้ความคงตัวของฟองลดลง (Chan and Ma, 1999) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Adler-Nissen (1986) ซึ่งทำการศึกษาการย่อยสลาย โปรตีนถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำ โปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติการเกิดฟองสูงและมีความคงตัวดี แต่เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น ความคงตัวของฟองโปรตีนจะเริ่มลดลง ในขณะที่ Govindaraju และ Srinivas (2004) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม โปรติเอสในระดับที่มากเกินไปจะ ทำให้ความคงตัวของฟองและสมบัติการเกิดอิมัลชันลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอนไซม์ปาเปน

4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโอคารา โดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มี subunit ของ 7S และ 11S globulin เช่นเดียวกับโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่จะมีความเข้มของแถบโปรตีนจางลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มสูงขึ้น โดยจะพบแถบของ subunit ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงอยู่บริเวณด้านล่างของเจล ซึ่ง subunit ที่ได้นี้จะมีลักษณะแตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกว้าง เกิดการย่อยสลายในระดับสูง โมเลกุลโปรตีนที่ได้จึงมีขนาดเล็ก ส่วนเอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อ



ภาพที่ 4.2 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที

- 1 Standard Weight Marker
- 2 โปรตีนโอคารา (OPI)
- 3 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เป็นเวลา 30 นาที (Papain 30)
- 4 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เป็นเวลา 60 นาที (Papain 60)
- 5 โปรตีนโอคาราที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เป็นเวลา 90 นาที (Papain 90)

α, α และ β คือ α, α และ β- subunit ของ β-conglycin

AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์สูงกว่า จึงเกิดการย่อยสลายโปรตีนอย่างจำกัด โมเลกุลโปรตีนที่ได้จึงแตกต่างกัน ขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคารา

4.2.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 4.4 โปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Govindaraju และ Srinivas (2004) ซึ่งสาเหตุของการละลายที่เพิ่มขึ้นสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ในหัวข้อ 4.1.2 จากการศึกษาโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบว่ามีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในแนวทางเดียวกันคือ สามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยปาเปนจะมีความสามารถในการละลายที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอ็นไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อหมู่อะมิโน hydrophilic ของโปรตีน เมื่อเกิดการย่อยจะให้หมู่ hydrophilic เพิ่มมากขึ้นสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี จึงให้ค่าการละลายที่เพิ่มสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส จากการศึกษาของ Mahmoud (1994) และ Frokjaer (1994) พบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยจะมีช่วงการละลายที่กว้างขึ้น โดยเฉพาะช่วง pH เป็นกรด ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้เสริมในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด เพื่อช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่ผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถนำไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางชนิดซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักหรือผู้สูงอายุ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Were และคณะ (1997) ซึ่งสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้สารละลายด่างร่วมกับเอ็นไซม์ปาเปน และนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มคุณสมบัติและคุณค่าทางโภชนาการแก่ผลิตภัณฑ์นมได้

ผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาต่างกัน พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.4) โปรตีนทรงกลมที่ผ่านการย่อยจะเกิดการคลายตัวบางส่วน ทำให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายในออกมาด้านนอกของโมเลกุล ช่วยให้ค่า hydrophobicity ของโปรตีนเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อพิจารณาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสพบว่า มีค่า surface hydrophobicity ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

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

อาจเป็นเพราะการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลาย ได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ขนาดเล็ก ทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำรวมตัวกัน (hydrophobic interaction) ส่วนของ free hydrophobic ที่ จะ จับ กับ Fluorescence probe ลดลง ค่า surface hydrophobicity ที่วิเคราะห์ได้จึงไม่เปลี่ยนแปลง การเพิ่มขึ้นของหมู่ hydrophobic จะช่วยให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการจับตัวกับส่วนของไขมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.5 โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่เวลา 30 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างจากโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มเป็น 60 และ 90 นาที ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนที่ได้จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง globular ของโปรตีน โมเลกุลโปรตีนซึ่งเดิมขดกันแน่นคลายตัวออกให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายใน โมเลกุลมีโอกาสกระจายออกมาด้านนอกมากขึ้น ช่วยเพิ่มการจับตัวของโปรตีนกับเม็ดไขมัน (Li-Chan and Nakai, 1991) นอกจากนี้ความสามารถในการกระจายตัวในน้ำหรือในน้ำมัน (Hydrophilic-lipophilic balance) ที่เหมาะสม สามารถบอกได้ถึง การเกิดอิมัลชันที่ดีของโปรตีน อีกทั้งความสามารถในการละลายก็เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการเกิดอิมัลชันเช่นกัน โปรตีนที่สามารถเกิดอิมัลชันได้ดี จะต้องละลายและจับตัวอยู่ที่ผิวของเม็ดไขมัน ได้มาก (Zayas, 1997)

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

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 ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาสมบัติในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองชนิด ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาเดียวกันพบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนช่วยปรับปรุงความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีขึ้น ในทางกลับกันการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสในระดับที่มากเกินไป ทำให้โปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดต่ำลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าการละลายที่ต่ำกว่า ส่งผลให้โปรตีนมีการกระจายตัวและจับตัวอยู่บริเวณพื้นผิวระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำได้น้อย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถการเกิดฟอง แสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนในช่วง 30 นาทีแรก มีความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่าโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยเป็น 90 นาที เช่นเดียวกับเอนไซม์อัลคาเลส ความสามารถในการเกิดฟองมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยจะมี โครงสร้างยืดหยุ่นและดูดซับอยู่ที่ชั้นระหว่างผิวได้ดีจึงมีความสามารถในการเกิดฟองที่ดีกว่าโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นลักษณะก้อนกลม นอกจากนี้จากการศึกษาของปาริฉัตรและปราณี (2540) ยังพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่อะมิโน hydrophobic จะให้สมบัติการเกิดฟองที่ดี แสดงให้เห็นว่าหมู่อะมิโน hydrophobic น่าจะมีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองได้ดีขึ้น ส่วนความคงตัวของฟองโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนพบว่า มีความคงตัวของฟองเมื่อทดสอบที่เวลา 10 และ 30 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การย่อยโปรตีน โอคาราด้วยเอนไซม์ปาเปนจะช่วยปรับปรุงความคงตัวของฟองโปรตีน ได้ดีกว่าเอนไซม์อัลคาเลส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sorgentini และคณะ (1995) พบว่าโปรตีนสกัดที่มีส่วนที่ละลายน้ำได้มาก จะส่งผลให้มีความคงตัวของฟองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีขนาดโมเลกุลเล็กมาก ได้เปปไทด์สายสั้น ทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง โปรตีนที่ได้จึงมีความคงตัวของฟองต่ำกว่า

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

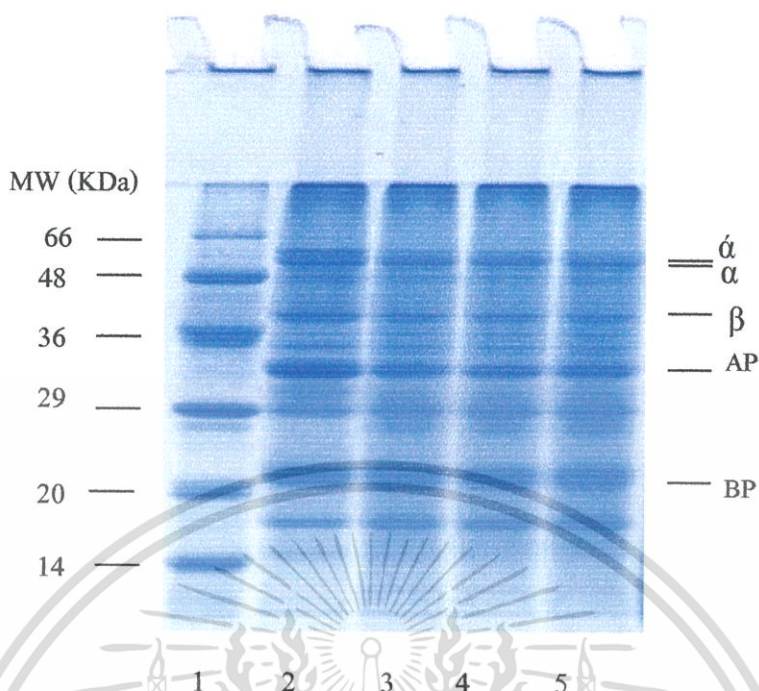
Sample	Foaming Activity	Foaming Stability (%)	
		10 min	30 min
OPI	2.4 ± 0.1 ^b	70.4 ^a	66.6 ^a
Papain 30	2.1 ± 0.1 ^a	83.9 ^b	71.2 ^b
Papain 60	2.9 ± 0.1 ^b	91.5 ^c	83.6 ^c
Papain 90	2.8 ± 0.1 ^c	95.5 ^d	88.9 ^d

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3 ผลการคัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

4.3.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้ SDS-PAGE

ณัชชา สุพิชญานุกร (2545) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีน โอคาราที่สกัดจากโอคาราสดด้วยวิธีการละลายในสารละลายค่าง ประกอบด้วยโปรตีน 56-60 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 38-40 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่าในระหว่างการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง ความร้อน แรงเค้นที่เกิดระหว่างการบดถั่ว อาจทำให้โปรตีนจับกับคาร์โบไฮเดรต (Protein-Polysaccharide conjugate) ทำให้การสกัดโปรตีนจากโอคาราด้วยวิธีการละลายในสารละลายค่างได้ผลผลิต (yield) ของโปรตีนต่ำ ไม่สามารถแยกคาร์โบไฮเดรตออกได้ อาจต้องใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเข้าไปช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรตที่จับกับโปรตีนทำให้ผลผลิต (yield) ของโปรตีนในโปรตีนโอคาราสูงเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาการย่อยโปรตีน โอคาราด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอนไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม เป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโอคาราด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่ามี subunit 7S และ 11S globulin ไม่แตกต่างจากโปรตีนโอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทำหน้าที่ย่อยส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมกับโมเลกุลโปรตีนแต่ไม่มีผลในการย่อยพันธะเปปไทด์ จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง subunit ของโปรตีน ลักษณะ band ที่พบใน SDS-PAGE จึงไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.3 SDS-PAGE patterns ของโปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ แอลฟา-อะไมเลสเป็นระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที

- 1 Standard Weight Marker
 - 2 โปรตีน โอคารา (OPI)
 - 3 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 30 นาที (Amy 30)
 - 4 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 60 นาที (Amy 60)
 - 5 โปรตีน โอคาราที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส เป็นเวลา 90 นาที (Amy 90)
- α, α และ β คือ α, α และ β- subunit ของ β-conglycin
 AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

4.3.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน โอคาราและ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน โอคารา 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที แสดงดังตารางที่ 4.7 โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่เวลา 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีแนวโน้มละลายได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-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

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวนิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

¹ ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

เนื่องจากโปรตีนโอคาราที่สกัดได้มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนหรือแรงบดในระหว่างกระบวนการผลิตทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เกิดการสร้างพันธะเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต (Protein-Polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ (ฉะชชา สุพิชญางกูร, 2545) ดังนั้นการย่อยหุ้มคาร์โบไฮเดรตด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จะทำให้โมเลกุลที่เกิดการ conjugate มีขนาดเล็กลงและมีส่วนของโปรตีนที่มีอิสระจากการยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีส่งผลให้ค่าการละลายเพิ่มสูงขึ้น ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity พบว่ามีค่าต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.7) ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองชนิดที่ทำการศึกษาเนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส มีทั้งส่วน hydrophobic และ hydrophilic จำนวนมากขึ้น ดังนั้นฐานว่ากลุ่ม hydrophobic ที่เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่บริเวณใกล้เคียงกันอาจเกิดการรวมตัวกันเองมีลักษณะเป็น aggregate บดบังกลุ่ม hydrophobic ไว้ภายในโครงสร้าง ทำให้มีส่วนของ free hydrophobic ที่จะจับกับ Fluorescence probe ลดน้อยลง เป็นผลให้ค่า surface hydrophobicity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน แสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่าโปรตีนโอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่เวลา 30 60 และ 90 นาที มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วย เอ็นไซม์แอลฟา-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 ($p > 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน โอคารา แสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่าโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีแนวโน้มลดต่ำลงเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น การที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีค่าต่ำ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของโปรตีนที่ยังคงอัดกันแน่น (compact structure) ทำให้การคลายตัวที่ชั้นอากาศและของเหลวเพื่อลดแรงตึงผิวมีข้อจำกัด รวมทั้งโครงสร้างที่อัดกันแน่นทำให้การเชื่อมพันธะเพื่อให้เกิดฟิล์มบางๆ ล้อมรอบฟองอากาศทำได้ยาก จึงทำให้ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองที่ได้จากโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลส น้อยกว่าโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟา-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	-

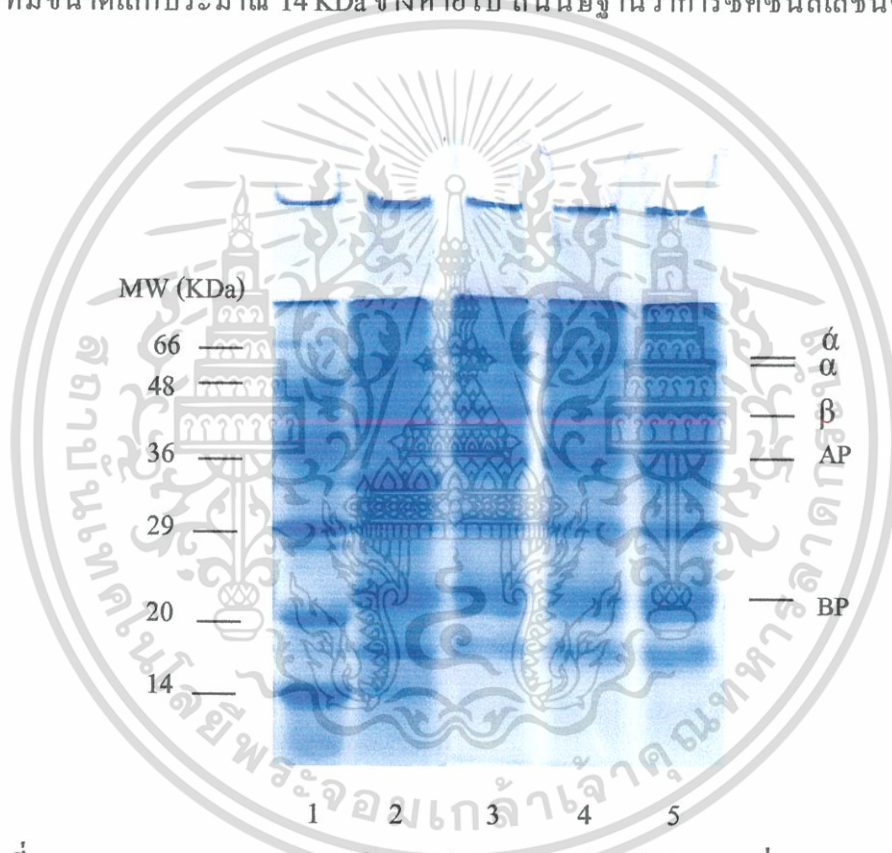
ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการตัดแปรโปรตีนโอคาราด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน โอคารา ด้วยวิธี SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที มี subunit 7S และ 11S globulin ไม่แตกต่างกัน แต่จะมีการย้ายตำแหน่ง แถบโปรตีนของ subunit เหล่านี้ โดยจะพบแถบโปรตีนของ subunit 7S และ acidic subunit ของ 11S globulin อยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าแถบโปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันและแถบของ subunit ที่มีขนาดเล็กประมาณ 14 KDa จางหายไป สันนิษฐานว่าการซัคซินิลเลชันซึ่งเป็นการ



ภาพที่ 4.4 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนโอคาราและโปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน เป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที

- 1 Standard Weight Marker
- 2 โปรตีนโอคารา (OPI)
- 3 โปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นเวลา 30 นาที (Suc 30)
- 4 โปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นเวลา 60 นาที (Suc 60)
- 5 โปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นเวลา 120 นาที (Suc 120)

α , α และ β คือ α , α และ β - subunit ของ β -conglycin

AP : acidic polypeptide และ BP : basic polypeptide ของ glycinin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการค้าเท่านั้น เมื่อผู้จัดทำเห็นว่าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มประจุลบให้แก่โมเลกุลของโปรตีน โอคารา เป็นผลให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ electrostatic interaction โมเลกุลของ subunit ที่มีขนาดเล็ก อาจเกิดการรวมตัวกันหรือรวมกับ subunit อื่น

4.4.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีนโอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน

ผลการวิเคราะห์สมบัติของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันด้วยกรดซัค-ซินิกแอนไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าความสามารถในการละลายของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะที่เวลา 120 นาที เนื่องจากกระบวนการซัคซินิลเลชันจะเป็นการแทนที่หมู่เอมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นลบของซัคซินิล (succinyl) ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้น สามารถจับกับ โมเลกุลของน้ำได้ดีขึ้น และมีแนวโน้มละลายได้มากขึ้นเมื่อระดับการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากกระบวนการซัคซินิลเลชันทำให้โครงสร้าง โปรตีนเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง เป็นผลมาจากผลรวมของประจุที่เพิ่มขึ้น เป็นผลให้สายโพลีเปปไทด์เกิดการคลายตัว หรือเกิดจากกระบวนการซัคซินิลเลชันเหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลที่เพิ่มเข้าไปและหมู่คาร์บอกซิลที่มีอยู่ใน โมเลกุลเดิม เป็นผลให้เกิด electrostatic attraction ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและแอม โมเนียมที่อยู่ใกล้กันใน โมเลกุล โปรตีนมีค่าลดลง (Lawal, 2005) นอกจากนี้ การเกิด intra- และ inter- molecular electrostatic repulsion ช่วยให้โปรตีนสามารถคลายตัวและเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างโปรตีนกับน้ำได้ดีขึ้น (Achouri *et al.*, 1998) ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นของ โปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dua *et al.*, (1996) และ Lawal (2005)

ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน

Sample	Solubility (%)	¹ Surface hydrophobicity
OPI	48.7 ± 2.8 ^a	355.9 ± 1.3 ^a
Suc 30	77.7 ± 1.8 ^b	449.9 ± 5.8 ^b
Suc 60	78.7 ± 0.5 ^b	452.3 ± 7.1 ^b
Suc 120	84.4 ± 2.3 ^c	503.0 ± 6.7 ^c

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

¹ ความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีส่วน Surface hydrophobic บริเวณพื้นผิวมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้กระบวนการซัคซินิลเลชันจะช่วยให้ค่าการละลายของโปรตีนในช่วง pH เป็นกลางและด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการแทนที่หมู่ α -อะมิโนของไลซีนด้วยหมู่คาร์บอกซิลที่เป็นประจุลบ ทำให้จุดไอโซอิเล็กทริกมีค่าลดลง โปรตีนละลายได้มากขึ้น (Bora, 2002) ในขณะที่ Achouri และคณะ (1998) พบว่าสมบัติการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสและปรับปรุงด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีค่าสูงขึ้นเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ pH สูงกว่า 5 จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมขั้นต่อไปเพื่อปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์ร่วมกับสารเคมี

ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า Surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคารา (ตารางที่ 4.10) พบว่ามีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการซัคซินิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคลายตัวให้หมู่ hydrophobic ที่อยู่ภายในออกมาที่ผิว และเมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการซัคซินิลเลชันพบว่าค่า Surface hydrophobicity ของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่เวลา 120 นาที สูงกว่าการซัคซินิลเลชันที่เวลา 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งจากการศึกษาของ Kim และ Rhee (1989) พบว่าการเกิดกระบวนการเอซิลเลชัน (acylation) ในระดับสูงจะให้ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเกิดเอซิลเลชันในระดับกลางจะให้ค่า surface hydrophobicity ค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gruener และ Ismond (1997) พบว่าค่า hydrophobicity ของ canola 12S globulin มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันที่ระดับสูงกว่า 53 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน มีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้น แสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลชันของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการการซัคซินิลเลชัน

Sample	Emulsion Activity
OPI	2.61 \pm 0.04 ^a
Suc 30	2.82 \pm 0.02 ^b
Suc 60	2.82 \pm 0.02 ^b
Suc 120	2.81 \pm 0.03 ^b

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่สูงขึ้นมีสาเหตุมาจาก โมเลกุล โปรตีนที่ผ่านกระบวนการ ซักซินิลเลชันเกิดการคลายเกลียวให้ส่วน hydrophobic จำนวนมากขึ้น นอกจากนี้ค่าการละลายที่เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ โปรตีนเกิดการกระจายตัวบริเวณพื้นผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน ใ้่ง่ายขึ้น ส่งผลดี ต่อการเกิดอิมัลชันของโปรตีน (Achouri *et al.*,1998)

ในทางตรงกันข้าม ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองพบว่า โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชันมีความสามารถในการเกิดฟองต่ำกว่า โปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการ ซักซินิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่มีผลทำให้ฟอง โปรตีนที่ได้มีความคงตัวดีขึ้น และมีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.12 เนื่องจากปริมาณซักซินิล (succinyl) ในปฏิกิริยาช่วยให้โปรตีนเกิดการฟอร์ม เป็น multilayer cohesieve film บริเวณพื้นผิว ยึดเกาะที่ชั้นระหว่างผิวอากาศและน้ำได้ดีซึ่งจะขัดขวางการรวมตัวกันของฟองอากาศ (Lawal, 2005) ช่วยให้ฟองมีความคงตัวมากขึ้น ความคงตัวของ ฟองที่เพิ่มขึ้นให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Adawy (2000) ซึ่งทำการศึกษาใน โปรตีนถั่วเขียว แต่ Townsend และ Nakai (1983) พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชันมีประจุลบมากขึ้น ความหนาแน่นของประจุสุทธิเพิ่มขึ้น ซึ่งจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่าง โปรตีนกับโปรตีน ในชั้นของฟอง ฟองที่ได้จะไม่เสถียรและมีความคงตัวของฟองต่ำลง ในขณะที่ Sheen (1991) และ Sitohy และคณะ (1992) พบว่า กระบวนการซักซินิลเลชัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความคงตัวของฟอง โปรตีน

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดฟองของโปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการการ ซักซินิลเลชัน

Sample	Foaming Activity	Foaming Stability (%)	
		10 min	30 min
OPI	2.4 ± 0.1 ^a	70.4 ^a	66.6 ^a
Suc 30	1.7 ± 0.1 ^b	92.8 ^b	72.3 ^b
Suc 60	1.8 ± 0.1 ^b	93.6 ^b	76.4 ^b
Suc 120	1.9 ± 0.1 ^b	93.9 ^b	77.0 ^b

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของ โปรตีนที่ผ่านการตัดแปรทั้งสี่วิธีพบว่า ทุกวิธีทำให้ความสามารถในการละลายดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มประจุด้วยกระบวนการซัลฟิเนชัน ทำให้โปรตีนโอคารา มีความสามารถในการละลายและค่า surface hydrophobicity เพิ่มมากกว่าวิธีการอื่น โดยเฉพาะเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 120 นาที แต่การใช้สารเคมีในอุตสาหกรรมอาหารมีข้อจำกัด อาจเลือกใช้การตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนโอคาราคลายตัวออก ซึ่งทำให้ค่าการละลายและค่า surface hydrophobicity เพิ่มขึ้นเช่นกัน ในกรณีของอิมัลชันพบว่า การตัดแปรด้วยวิธีซัลฟิเนชัน และการย่อยเพียงบางส่วนด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารา ในกรณีการเกิดฟองพบว่า การย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ทำให้ได้สายโพลีเปปไทด์ขนาดสั้น ทำให้ความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าการตัดแปรด้วยวิธีอื่น ส่วนความคงตัวของฟองพบว่า การตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและการใช้กระบวนการซัลฟิเนชัน ทำให้ความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีน โอคารา 100 กรัม มีส่วนของ subunit 7S และ 11S globulin จางหายไปแต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างเจด โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ส่วนความสามารถในการเกิดฟองมีค่าสูงขึ้น ฟองที่ได้มีความคงตัวลดต่ำลง ในขณะที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคารามีแนวโน้มลดลง

2. โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีน โอคารา 100 กรัม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที พบแถบของ subunit 7S และ 11S globulin มีความเข้มลดลง และพบแถบสีของ โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กบริเวณด้านล่างเจด โปรตีนที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการละลาย ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มสูงขึ้น

3. โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอ็นไซม์อัลฟา-อะไมเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อ โปรตีน โอคารา 100 กรัม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที มี subunit ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE ไม่แตกต่างจากโปรตีน โอคาราที่ไม่ผ่านการย่อย แต่ความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองมีค่าลดลง แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน โอคารา

4. โปรตีน โอคาราที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน โดยใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 60 และ 120 นาที พบแถบของ subunit ที่มีขนาด 14 KDa จางหายไป ส่วนความสามารถในการละลาย ค่า surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของฟองโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ความสามารถในการเกิดฟองมีแนวโน้มลดลง

5. การดัดแปร โปรตีน โอคาราด้วยวิธีการที่ต่างกัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

โปรตีนในลักษณะที่แตกต่างกันไป ซึ่งจะส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีนที่ได้เปลี่ยนแปลงไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาดเห็นาไปไซบอร์เอชชานการคำ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า การตัดแปร โปรตีน โอคาราด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันมีผลในการปรับปรุงความสามารถในการละลายของโปรตีนได้ดีกว่าการใช้กระบวนการทางเอ็นไซม์ ในขณะที่การใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสเหมาะในการปรับปรุงความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน โอคารา ส่วนความคงตัวของฟองโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนหรือผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันจะมีค่าสูงกว่าการตัดแปรด้วยวิธีการอื่น และหากต้องการ โปรตีนที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ดีควรเลือกโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนหรือกระบวนการซัคซินิลเลชัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำโปรตีนโอคาราที่ผ่านการคัดแปรมาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานได้จริงของโปรตีน เพื่อสามารถเลือกนำมาปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลายตรงกับความต้องการ

2. เนื่องจากเอ็นไซม์และสารเคมีที่ใช้ในการคัดแปรโปรตีนมีหลากหลายชนิด แต่ละชนิดมีความสามารถในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนได้แตกต่างกันไป จึงควรทำการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์หรือสารเคมีในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เพื่อให้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

3. การทดลองที่ได้เป็นการศึกษาเบื้องต้น หากต้องการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราให้มีประสิทธิภาพดีและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างเหมาะสม ควรทำการศึกษาควบคู่กับโปรตีนสกัดทางการค้า เพื่อสามารถพัฒนาให้มีศักยภาพทัดเทียมและนำไปใช้ทดแทนกันได้จริง

บรรณานุกรม

คุณทลิตา ครุฑทกะ. 2544. “การผลิตโยเกิร์ตแช่แข็งจากน้ำนมถั่วเหลือง น้ำนมข้าวกล้องและรำข้าว.”

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

นที อิ่มอุทธา. 2546. อาหารเสริมสุขภาพ. [online]. Available: [http:// www.phama.chula.ac.th](http://www.phama.chula.ac.th).

ณัชชา สุพิชญางกูร. 2545. “การสกัดและการศึกษาคุณลักษณะของ โปรตีนจากโอคารา.”

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอ็นไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปาริฉัตร ทัพพะสุด และปราณี อ่านเปรื่อง. 2540. “การผลิตสารให้ฟองจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง
ด้วยเอ็นไซม์.” : วารสารอาหาร. 27:108-118.

ปาริฉัตร ทัพพะสุด และปราณี อ่านเปรื่อง. 2541. “สมบัติของสารให้ฟองผงจากโปรตีนถั่วเหลือง
และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร.” : วารสารอาหาร. 28:42-53.

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

Achouri, A., Zhang, W., and Shiyong, 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](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.

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 :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.
- 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 T₄." **Nature.** 227:680-685.
- Lawal, O. S. 2005. "Functionality of native and succinylated Lablab bean (*Lablab purpureus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 heating temperature on reduced-fat meat batter in model system.” **J. Food Sci.** 65: 97-100.
- Lowry, O. H., Rosebroug, 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 improves 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.
- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 protein 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.
- 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.

ภาคผนวก



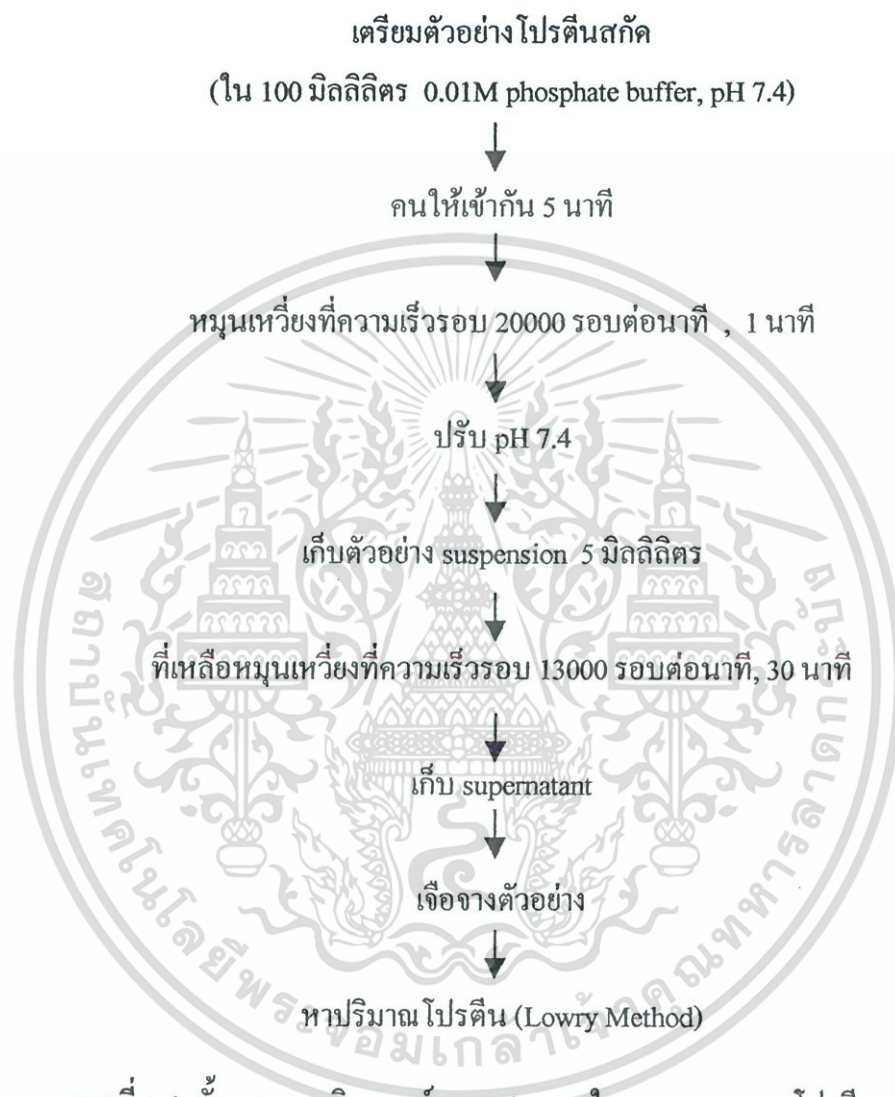
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบสมบัติของโปรตีน

1. ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน (Voutsinas และคณะ, 1983)



ภาพที่ ก 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน

หมายเหตุ : นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ % solubility index ของ โปรตีน โอคาราที่ผ่านการย่อย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 ที่กั้นหลอด 1 มิลลิลิตร

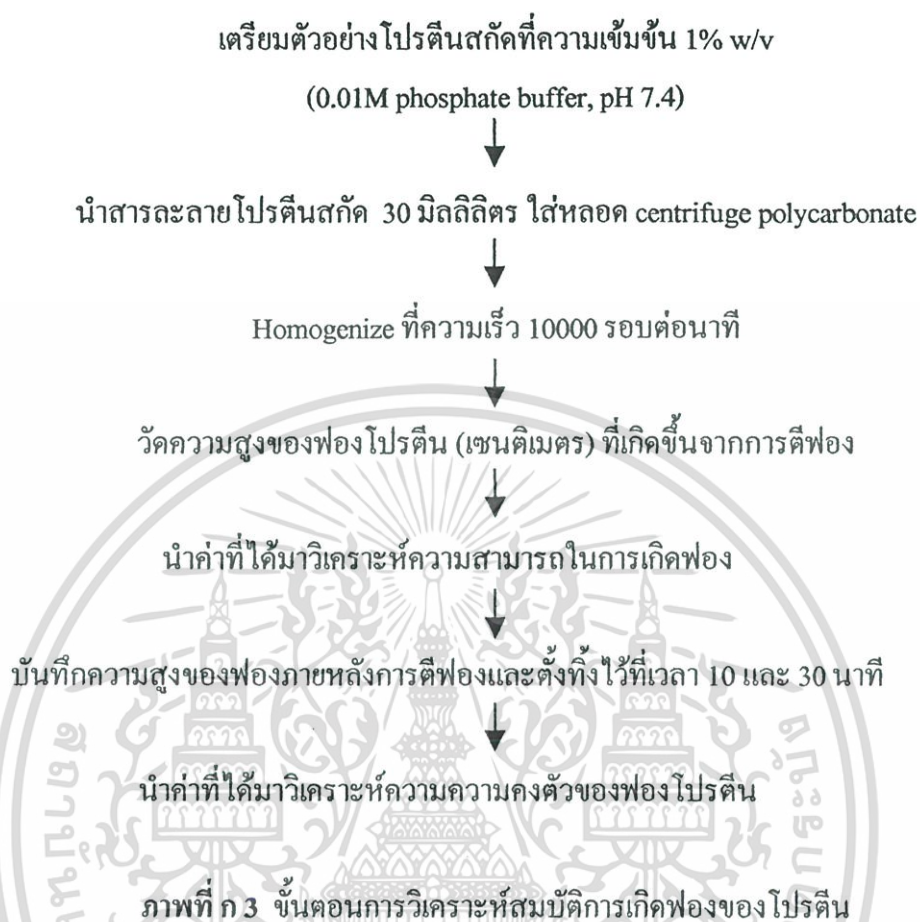
↓
 เจือจางด้วย 0.1% SDS สัดส่วน 1:100

↓
 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร

↓
 ภาพที่ ก 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

หมายเหตุ : ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันดี

3. การทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน (Phillip, 1987)



หมายเหตุ :

$$\text{ความสามารถในการเกิดฟอง} = \frac{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ผ่านการตัดแปร}}{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ไม่ผ่านการตัดแปร}} \times 100$$

$$\text{ความคงตัวของฟอง} = \frac{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ผ่านการตัดแปรและตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ}}{\text{ความสูงฟองโปรตีน (เซนติเมตร) ที่ไม่ผ่านการตัดแปร}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เตรียมตัวอย่าง โปรตีนสกัดที่มีความเข้มข้น 0.1% w/v

(0.01M phosphate buffer, pH 9.0)



คนให้เข้ากัน 5 นาที



หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20000 รอบต่อนาที , 1 นาที



ตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนละลายอย่างสมบูรณ์



เจือจาง โปรตีน ให้มีช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.05 %



นำตัวอย่าง โปรตีนในแต่ละความเข้มข้นมา 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

หมายเหตุ : ค่าที่วัดได้จะแสดงในรูปความชันของกราฟระหว่างค่า fluorescence intensity กับความเข้มข้นของโปรตีน ค่าความชันที่สูงแสดงว่าโปรตีนมีหมู่ hydrophobic บริเวณพื้นผิวที่สามารถจับกับ fluorescence probe ได้ดี

5. การศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ทำการแยก subunit ของโปรตีน โอคาราเปรียบเทียบกับโปรตีน โอคาราที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ และ ใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ subunit สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE

A – Solution	
Acrylamide (CH ₂ CHCONH ₂)	29.2 g
N,N – Methylene - bis (acrylamide)	0.8 g
With H ₂ O	100 ml
B – Solution	
1.5 M Tris – HCl (pH 8.8)	18.17 g
0.4 % SDS	0.4 g
With H ₂ O	100 ml
C – Solution	
0.5 M Tris – HCl (pH 6.8)	6.06 g
0.4 % SDS	0.4 g
With H ₂ O	100 ml
D – Solution	
10% Ammonium persulfate	0.5 g
With H ₂ O	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 ₂ O	1000 ml
BFB color	
Bromophenol Blue	1 mg
Glycerol	100 µl
With H ₂ O	900 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sample buffer	
Tris	7.57 g
SDS	20.0 g
Glycerol	100 ml
With H ₂ O	500 ml

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง โปรตีน 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 ₂ O	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 ₂ O	3.6 ml
D- Solution	0.018 ml
TEMED	0.006 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมสารละลาย separating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด electrophoresis จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
2. เตรียมสารละลาย stacking gel
3. เทน้ำออกจากผิวหน้าเจลที่แข็งตัวแล้ว rinse ผิวหน้าเจลด้วย stacking gel หนึ่งครั้ง จากนั้นเทส่วน stacking gel จนเต็ม เสียบ comb พักไว้ให้เจลแข็งตัว
4. ค้าง comb ออก ล้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างด้วย Electrophoresis buffer

การทำ Electrophoresis

1. ต่อชุด Electrophoresis เข้าด้วยกัน เติม Electrophoresis buffer ที่เตรียมไว้
2. ใช้ micro syring ฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เติมในช่องของ stacking gel
3. ต่อส่วนของ chamber เข้ากับส่วนจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการ run gel
4. ปิดส่วนจ่ายกระแสไฟเมื่อเห็นสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล
5. นำแผ่นเจลออกจากกระบอก ทำการย้อมสีแผ่นเจล

การย้อมสีแผ่นเจล

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

ขั้นตอนการย้อมสีแผ่นเจล

1. นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระบอก วางลงในภาชนะที่มี staining solution อยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที
2. เมื่อครบเวลาเท staining solution ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ใน destaining solution จนแผ่นเจลใสเห็นแถบชัดเจน
3. เท destaining solution ทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นแล้วนำแผ่นเจล ไปอบแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

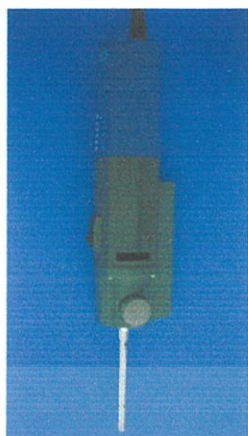
การอบเจล

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. นำกรอบสตีงมาครอบ ล็อคกรอบให้เป็นมุมตั้งฉาก
7. ยกกรอบออกจากฐานพลิกด้านล่างขึ้นด้านบนแล้วนำเข้าเครื่องอบเจล อบประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเจลแห้งแล้วจึงนำออกจากกรอบ





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข 1 Homogenizer



ภาพที่ ข 2 Ultrasonic



ภาพที่ ข 3 Eppendorf Centrifuge



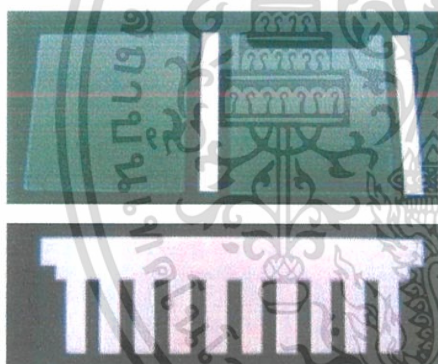
ภาพที่ ข 4 Spectrofluorometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

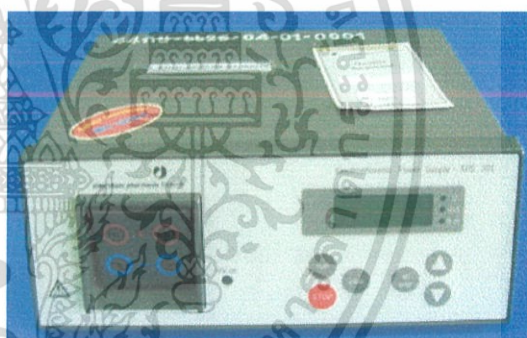


ภาพที่ ข 5 Spectrophotometer

Electrophoresis set



ภาพที่ ข 6 Matched glass plates, Spacer, Comb



ภาพที่ ข 7 Electrophoresis Power Supply



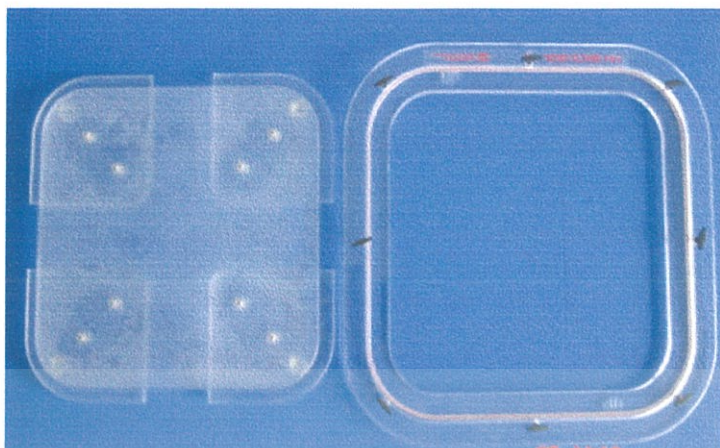
ภาพที่ ข 8 Hoefler miniVE Vertical



ภาพที่ ข 9 Easy Breeze Gel Dryer

Electrophoresis system

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข 10 Easy Breeze Drying Frame



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Alcalase Hydrolysis

Solubility Index

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	48.7300		
Al 30	2		51.1725	
Al 60	2		52.2950	
Al 90	2			57.2850
Sig.		1.000	.172	1.000

Surface Hydrophobicity

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
OPI	2	355.9215
Al 30	2	364.8340
Al 60	2	386.2030
Al 90	2	426.7060
Sig.		.055

Emulsion Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	2.6135		
Al 30	2		1.5675	
Al 60	2			1.2845
Al 90	2			1.1830
Sig.		1.000	1.000	.155

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foaming Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
OPI	2	2.4000	
Al 30	2		3.1500
Al 60	2		3.2000
Al 90	2		3.5000
Sig.		1.000	.166

Foaming Stability (10 min)

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Al 90	2	44.2000		
Al 60	2	52.8050	52.8050	
Al 30	2		57.9300	
OPI	2			70.4100
Sig.		.077	.232	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Papain Hydrolysis

Solubility Index

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	48.7300		
Papain 30	2		57.1545	
Papain 60	2		62.8000	62.8000
Papain 90	2			68.1055
Sig.		1.000	.085	.099

Surface Hydrophobicity

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
OPI	2	355.9215			
Papain 30	2		393.3848		
Papain 60	2			432.0707	
Papain 90	2				466.6813
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Emulsion Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Papain 30	2	2.5905		
OPI	2	2.6135		
Papain 60	2		2.6650	
Papain 90	2			2.7605
Sig.		.478	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foaming Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Papain 30	2	2.0475		
Papain 60	2		2.3750	
OPI	2		2.4000	
Papain 90	2			2.7750
Sig.		1.000	0.830	1.000

Foaming Stability (10 min)

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Papain 90	2	95.4850			
Papain 60	2		91.4950		
Papain 30	2			83.8500	
OPI	2				70.4100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. α - amylase Hydrolysis

Solubility Index

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	48.7300		
Amy 30	2	51.0050	51.0050	
Amy 60	2		52.1300	
Amy 90	2			56.6140
Sig.		.071	.293	1.000

Surface Hydrophobicity

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
OPI	2	355.9215	
Amy 30	2		222.2350
Amy 60	2		214.1759
Amy 90	2		199.4485
Sig.		1.000	.325

Emulsion Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
OPI	2	2.6135
Amy 30	2	2.5805
Amy 60	2	2.5865
Amy 90	2	2.6095
Sig.		.339

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foaming Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	2.4000		
Amy 30	2		1.4500	
Amy 60	2		1.3500	1.3500
Amy 90	2			1.2000
Sig.		1.000	.318	.163

Foaming Stability (10 min)

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	70.4100		
Amy 30	2		13.6050	
Amy 60	2			11.2400
Amy 90	2			10.1800
Sig.		1.000	1.000	.184

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Succinylation

Solubility Index

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	48.7300		
Suc 30	2		77.6515	
Suc 60	2		78.6495	
Suc 120	2			84.3500
Sig.		1.000	.651	1.000

Surface Hydrophobicity

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
OPI	2	355.9215		
Suc 30	2		449.8535	
Suc 60	2		452.2758	
Suc 120	2			502.9738
Sig.		1.000	.693	1.000

Emulsion Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
OPI	2	2.6135	
Suc 30	2		2.8165
Suc 60	2		2.8175
Suc 120	2		2.8200
Sig.		1.000	.902

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foaming Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
OPI	2	2.4000	
Suc 30	2		1.6500
Suc 60	2		1.8250
Suc 120	2		1.8500
Sig.		1.000	.091

Foaming Stability (10 min)

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
OPI	2	70.4100	
Suc 30	2		92.8015
Suc 60	2		93.5600
Suc 120	2		93.8550
Sig.		1.000	.427

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวพรชนัน เที้ยวทั่ว
วัน เดือน ปีเกิด	22 กรกฎาคม 2524
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
ที่อยู่ปัจจุบัน	35 หมู่ 6 ตำบลสระแก้ว อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้