

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชั่นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด
ที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี

ANTIOXIDANT CAPACITIES OF ENZYMATIC AND CHEMICAL
MODIFIED SOY PROTEIN ISOLATE

สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์
SUPAWADEE SUBSIRIPAIBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

KMITL-2007-AI-M-053-055

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด
ที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี

ANTIOXIDANT CAPACITIES OF ENZYMATIC AND CHEMICAL
MODIFIED SOY PROTEIN ISOLATE

สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์

SUPAWADEE SUBSIRIPAIBOON

เลขานุ.....
เลขทะเบียน..... **76751**
วัน,เดือน,ปี..... - 6 S.ค. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

KMITL-2007-AI-M-053-055

**ANTIOXIDANT CAPACITIES OF ENZYMATIC AND CHEMICAL
MODIFIED SOY PROTEIN ISOLATE**

SUPAWADEE SUBSIRIPAIBOON

**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 LADKRABANG**

2007

KMITL-2007-AI-M-053-055

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์
รหัสประจำตัว	48068515
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
พ.ศ.	2550
อาจารย์ปรึกษา	ดร.ยุพร พิชกมุทร

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี โดยใช้เอ็นไซม์ 2 ชนิด คือเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม เอ็นไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อย 15 30 และ 60 นาที และใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 15 30 60 และ 120 นาที ในกรณีของเอ็นไซม์ปาเปนพบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ หน่วยย่อยของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) พบว่าส่วนของ 7S และ acidic subunit จางหายไป แต่จะพบแถบของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล เช่นเดียวกับในกรณีของเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า 7S และ 11S โกลบูลินจางหายไป และพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองมีความสามารถในการละลายดีขึ้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปร และความสามารถจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการคัดแปรเพิ่มขึ้นจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาทีและความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีแนวโน้มให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

ในกรณีของกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์พบว่า การคัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิกเลชันไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน่วยย่อยของโปรตีน และพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีน

ถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรมีค่าสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปรรูสูงขึ้น ความสามารถในการต้านออกเคชั่นเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปรรูเพิ่มขึ้นจาก 0 ไปเป็น 60 นาที แต่จะลดลงถ้าเพิ่มเวลาในการคัดแปรรูเป็น 120 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับคัดแปรรูด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสพบว่า แนวโน้มของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรรูด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนที่ผ่านการคัดแปรรูด้วยกระบวนการซัคซินิเลชัน

Thesis Title	Antioxidant Capacities of Enzymatic and Chemical Modified Soy Protein Isolate
Student	Miss Supawadee Subsiripaiboon
Student ID.	48068515
Degree	Master of Science
Program	Food Science
Year	2007
Thesis Advisor	Dr. Yuporn Puechkamut

ABSTRACT

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

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

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

In the case of succinylation, it was found that the succinylation did not affect the protein subunit as determined by SDS-PAGE. The modified proteins were increased in the solubility. The

antioxidant capacities of the modified proteins were strongly increased when the reaction time was increased from 15 min to 60 min. However, the activities were decreased when the reaction time was 120 min. The results showed that the scavenging activity against ABTS of the protein modified by enzyme was higher than the activity of the protein modified by succinylation.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. บุพร พิชกมุทร ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ อันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.เขาวลัทธิชัย สุรพันธ์พิศิษฐ์ ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม และ ดร. โสธยา เกิดพิบูลย์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมแก่ข้าพเจ้าทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ช่วยประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการศึกษาจนกระทั่งข้าพเจ้ามีโอกาสประสบความสำเร็จ รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกให้แก่ข้าพเจ้าในงานปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการในงานเอกสารต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณย่า คุณพ่อ และพี่ๆ ที่เคารพรัก รวมทั้งเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจและสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกด้าน ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่คณาจารย์และผู้มีพระคุณ หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่ผู้เดียว

สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	X
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 โพรตีนถั่วเหลือง.....	3
2.2 โพรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	4
2.3 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน.....	5
2.3.1. การคัดแปรโปรตีนด้วยการใช้เอ็นไซม์.....	5
2.3.1.1 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส.....	6
2.3.1.2 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ทรานส์กลูตามิเนส.....	9
2.2.1.3 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส.....	9
2.2.1.4 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต.....	10
2.3.2. การคัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์.....	10
2.3.2.1 การคัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี.....	10
2.3.2.2 การคัดแปรโปรตีนโดยการใช้ความร้อน.....	12
2.4 อนุโมลิสระ.....	13
2.5 สารต้านออกซิเดชัน.....	14
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านออกซิเดชันในโปรตีน.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 วัตถุประสงค์.....	19
3.2 อุปกรณ์ในการตัดแปรรูโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	20
3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์.....	20
3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง.....	21
3.5 วิธีการดำเนินงาน.....	21
3.5.1 ศึกษาสมบัติด้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	21
3.5.2 การตัดแปรรูโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน.....	21
3.5.3 การตัดแปรรูโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส.....	22
3.5.4 การตัดแปรรูโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	24
4.1 ผลการศึกษาสมบัติการด้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	24
4.2 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการด้านออกซิเดชันของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรรูด้วยเอนไซม์ปาเปน.....	26
4.3 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการด้านออกซิเดชันของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรรูด้วยเอนไซม์อัลคาเลส.....	32
4.4 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการด้านออกซิเดชันของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรรูด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	47
ภาคผนวก.....	53
ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน.....	54
ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน.....	63
ค ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ.....	65
ประวัติผู้เขียน.....	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด....	24
4.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	25
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกโตอกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	25
4.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	26
4.5 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	28
4.6 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	29
4.7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	30
4.8 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกโตอกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน.....	31
4.9 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	32
4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	34
4.11 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	35
4.12 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	36
4.13 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกโตอกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ถูกคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส.....	37
4.14 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.15 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	41
4.16 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	42
4.17 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกโตอกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน	43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาระหว่างกรดอะซิติคแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์กับหมู่ ϵ -อะมิโนของไลซีน.....	11
2.2 ปฏิกริยาฟอสโฟริเลชันระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอร์รินและทรีโอนีน.....	12
4.2 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน.....	27
4.3 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส.....	33
4.4 SDS-PAGE patterns ของ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชัน.....	39
ก 1 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการย่อยสลายของเอนไซม์.....	55
ก 2 ขั้นตอนการหาความสามารถในการละลาย.....	55
ก 3 ขั้นตอนการหาเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน.....	57
ก 4 ขั้นตอนการทำปฏิกริยาของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS.....	60
ก 5 ขั้นตอนการทำปฏิกริยาการยับยั้งปฏิกริยาออกไดออกซิเดชันของกรคลิโนเลอิก.....	61
ก 6 ขั้นตอนการทำปฏิกริยาการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	62
ข 1 Centrifuge Beckman Coulter	64
ข 2 Eppendorf Centrifuge.....	64
ข 3 Spectrophotometer	64
ข 4 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System.....	64
ข 5 Electrophoresis PowerSupply EPS 301.....	64
ข 6 Eazy Breeze Drying Frame	64
ข 7 Matched glass plates for Hoefer miniVE electrophoresis system, Spacer,Comb	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นผลผลิตอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนั้นยังสามารถเกิดจากปัจจัยภายนอกที่มากระทบต่อร่างกาย เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) โอโซน ควันทันจากท่อไอเสียต่างๆ ควันทันหรี เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้โดยทั่วไปจะทำลายชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ก่อให้เกิดความเสียหายและอันตรายแก่ร่างกายอันนำไปสู่ภาวะการเกิดพยาธิสภาพของโรคบางโรคได้ (วิลยา และ พชร, 2542) นอกจากนี้อนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับเกิดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปัญหาที่สำคัญของอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีผลทำให้เกิดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ต่อความต้องการของผู้บริโภค เช่น การเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ มีสีดำ หรือเกิดสารที่เป็นพิษต่างๆ ดังนั้นการควบคุมปฏิกิริยาปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงเป็นสิ่งจำเป็น สารต้านออกซิเดชันชนิดสังเคราะห์ได้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งและป้องกันปฏิกิริยาชนิดนี้ แต่เนื่องจากในระยะหลัง มีงานวิจัยหลายฉบับ (Bishov และ Henick, 1975 ; Nagai และคณะ, 2003 ; Shahidi และ Wanasaudara, 1992) ที่บอกถึงความไม่ปลอดภัยของการใช้สารต้านออกซิเดชันชนิดสังเคราะห์ต่อสุขภาพของมนุษย์ อีกทั้งผู้บริโภคหันมาสนใจในสุขภาพร่างกายมากขึ้น สารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นที่นิยม

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

ถั่วเหลืองเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วนที่มนุษย์ต้องการเพื่อไปสร้างโปรตีนในร่างกายและโปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่ย่อยง่าย ถั่วเหลืองเป็นแหล่งที่ตีมากของธาตุเหล็กและแคลเซียม นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่ง

ของสารต้านอนุมูลอิสระที่ชื่อว่า ไอโซฟลาโวน ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน สารไอโซฟลาโวนที่มีพบในถั่วเหลืองนี้มีผลช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือดและยังป้องกันโรคหัวใจได้ (Setchell และ Cassidy, 1999) เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองมีขนาดใหญ่ จึงทำให้โปรตีนถั่วเหลืองมีความสามารถในการละลายจำกัด คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจึงอาจน้อยลงไป การตัดแปร โครงสร้าง การลดขนาดโมเลกุล หรือเพิ่มความเป็นประจุของโปรตีนถั่วเหลืองเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ที่เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ (Sakanka และคณะ, 2004 ; Hattori และคณะ, 1998) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมีที่มีผลต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปเป็นสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปน
2. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส
3. ศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้ทำการตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยกระบวนการทางเอนไซม์และทางเคมี พร้อมทั้งศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนที่ได้ เปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการตัดแปรเพื่อให้ได้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน
2. เป็นแนวทางในการปรับปรุงให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่างๆ
3. เป็นแนวทางในการนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดไปใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ ในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภคและใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมได้มีการนำถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น น้านมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็น โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นและโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ซึ่งเป็นโปรตีนจากถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ดี ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีปริมาณสูง 35-38 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี ร่างกายสามารถย่อยได้ง่าย มีกรดอะมิโนไลซีนสูง แต่มีเมทไทโอนีนและซิสทีนค่อนข้างน้อย ในเนื้อถั่วเหลืองมีโปรตีนสะสมอยู่ในเซลล์ เรียกว่า โปรตีนบอดี (protein bodies) โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโกลบูลิน (globulin) สามารถละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจาง ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยคือ 2S 7S 11S และ 15S โปรตีนหน่วยย่อยเหล่านี้แยกได้ตามลักษณะการตกตะกอนด้วยวิธีการอัลตราเซนตริฟิว (ultracentrifuge) โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลในหน่วย KDa ดังนี้ (Nakai และ Modler, 1996) 2S fraction หรือที่เรียกว่า แอลฟา-คอนโกลิซินิน (α -conglycinin) มีน้ำหนักโมเลกุล 8-22 KDa 7S fraction หรือที่เรียกว่า เบต้า-คอนโกลิซินิน (β -conglycinin) มีน้ำหนักโมเลกุล 180-210 KDa 11S fraction หรือที่เรียกว่า โกลิซินิน (glycinin) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 KDa และ 15S fraction มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600 KDa

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

ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองสามารถจับตัวกันเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ โดยอาศัยการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง กรดอะมิโนที่สามารถสร้างพันธะประเภทนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฮดริล เช่น ซิสเตอีน เมื่อหมู่ซัลไฮดริลถูกออกซิไดส์จะ

เกิดเป็นพันธะไคซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างปลายโมเลกุลของซิสเตอีน 2 โมเลกุล โปรตีนถั่วเหลืองที่มีพันธะไคซัลไฟด์ในโมเลกุลมาก พันธะไคซัลไฟด์จะไปลดความยืดหยุ่นของ โมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลต่อสมบัติการเกิดฟองของโปรตีน การลดหรือกำจัดพันธะไคซัลไฟด์มีผล ช่วยให้การเกิดฟองของโปรตีนดีขึ้น โดยพบว่า การลดจำนวนพันธะไคซัลไฟด์ลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้โปรตีนคลายตัวและเกิดการดูดซับที่ชั้นรอยต่อของน้ำและอากาศได้ง่ายขึ้น (Hettiarachchy และ Ziegler, 1990)

ถั่วเหลืองนอกจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีปริมาณสูงแล้ว ยังมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่เป็นไขมันจำเป็น ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพและไม่มีคอเลสเตอรอล มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ และ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นใยอาหาร ซึ่งมีประโยชน์ในการ ป้องกันมะเร็งลำไส้ และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่วนวิตามินที่พบมากในถั่วเหลืองคือ วิตามิน บี 1 และ บี 2 และมีแร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น (กฤษณชาติ , 2544)

2.2 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงมากกว่า 90% ของน้ำหนักแห้ง ผลิตได้จากการสกัดแยกโปรตีนออกจากแป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน หรือจากถั่วเหลืองที่ได้จาก อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและการสกัดน้ำมัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโปรตีนที่มีความ บริสุทธิ์สูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหารได้หลากหลายประเภท โดยทั่วไปการผลิตโปรตีน ถั่วเหลืองสกัดสามารถผลิตได้จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ด ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีส่วนผสมของไขมันอยู่ ด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมจะผลิตจากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิต สามารถทำได้หลายวิธี โดยอาศัยตัวทำละลายในการสกัด ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารละลายด่างหรือเกลือเป็นตัวทำละลาย เช่น การผลิตโปรตีนสกัดที่ใช้ในการค้า จะใช้สารละลายด่างช่วงพีเอช 7 ถึง 10 ในการสกัดและทำการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point) พีเอช 4.5 หรือการผลิต โปรตีนโดยใช้สารละลายเกลือในการสกัด ซึ่งอาศัยความแรงของประจุเป็นตัวยแยก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เมมเบรน (membrane) ในการผลิตโปรตีนสกัด โดยใช้วิธีการอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และ ไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) หลังจากกระบวนการสกัดตามปกติเพื่อแยกส่วน ของโปรตีนออกจากสารละลายที่สกัดได้ โปรตีนที่ได้จะละลายได้ดีเนื่องจากไม่ผ่านการตกตะกอน ด้วยกรด (Hensley และ Lawhon, 1979)

2.3 การปรับปรุงสมบัติของโปรตีน

อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันมีการนำโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะให้คุณค่าสารอาหารแล้ว ยังเป็นการเพิ่มบทบาทการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืช และอาศัยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมาใช้เป็นส่วนผสมหรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น สมบัติการดูดซับน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร

สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนถั่วเหลือง นิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันของเนื้อสัตว์และไส้กรอก เพื่อปรับปรุงด้านเนื้อสัมผัส เพิ่มความนุ่ม และความสามารถในการอุ้มน้ำ รวมทั้งใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท dairy food และสารทดแทนน้ำนม จากการศึกษาของ Lin และ Mei (2000) พบว่า การเติมโปรตีนถั่วเหลืองจะช่วยให้สมบัติด้านความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดีขึ้น จึงส่งผลให้มีสัดส่วนของปริมาณไขมันในผลิตภัณฑ์ลดลง ให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lecomte และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์แฟรงเฟอ์เตอร์ นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองยังมีสมบัติในการเกิดเจลที่ดี สามารถฟอร์มเจลได้โดยการให้ความร้อน หรือการใช้สารตกตะกอนโปรตีน (coagulant) เช่น เจลเด้าหัว อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์ในการเป็นสารให้ฟอง ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ขนมมาชเมลโล เมอร์แรงส์ ไอศกรีม เป็นต้น ฟองที่เกิดจากโปรตีนถั่วเหลืองสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความคงตัวต่อไขมันได้ง่าย (ปาริฉัตร และ สุปราณี, 2541)

อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรดต่ำ ซึ่งสภาวะความเป็นกรดต่ำที่รุนแรง หรือการได้รับความร้อน ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ง่าย จึงควรปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากสมบัติต่างๆของโปรตีนจะเกี่ยวเนื่องกับโครงสร้างเป็นสำคัญ การปรับปรุงสมบัติของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี

2.3.1. การดัดแปรโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic Modifications)

เอนไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวาง ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ในการดัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ที่ใช้ในการดัดแปรโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น ทรานกลูตามิเนส (transglutaminase)

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

2.3.1.1 การตัดแปรโปรตีนโดยการใช้อินไซม์โปรติเอส

อินไซม์กลุ่มนี้มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแตกต่างกันไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง โมเลกุล โมเลกุลที่ผ่านการย่อยสลายจะมีขนาดและน้ำหนัก โมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นกับระดับการย่อย ความจำเพาะของอินไซม์และสภาวะอุณหภูมิเวลาที่เหมาะสมในการเข้าทำปฏิกิริยา การทำงานของอินไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีนนั้น อินไซม์จะเข้าไปตัดพันธะเปปไทด์ ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้นๆ เช่น di, tri – peptide และเมื่อมีการย่อยสลายต่อไปก็จะได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ อินไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆคือ เอกโซเปปติเดส (Exopeptidase) เป็นกลุ่มอินไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายโปรตีนและอินไซม์เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นกลุ่มอินไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระแบบสุ่ม (randomly) ภายในสายโปรตีน (ปราณี, 2547)

ประเภทของโปรติเอส

1. โปรติเอสเซรีน (Serine proteases)

เป็นอินไซม์ในกลุ่มอินไซม์เอนโดเปปติเดส โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อลำดับกรดอะมิโนที่มียูนิทกรดอะมิโน ไทโรซีน (Tyr) เฟนิลอะลานีน (Phe) และทริปโตเฟน (Tryp) เช่น อินไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ซับทีลิสิน (Subtilisin) หรืออนุโมลกรดอะมิโนไลซีน (Lys) และ อาร์จินีน (Arg) เช่น อินไซม์ทริปซิน (Trypsin) อินไซม์ทรอมบิน (Thrombin) อินไซม์เหล่านี้เป็นพวกอัลคาไลโปรติเอส มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 7-11 (ปราณี, 2547) จากการศึกษาของ Chan และ Ma (1999) พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีน โอคาราด้วยอินไซม์ทริปซินจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการละลายและดูดซับน้ำได้ดี ช่วยเพิ่มสมบัติในการเกิดฟองและอิมัลชันได้ดีขึ้นด้วย

อินไซม์อัลคาเลสเป็นอินไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรติเอส ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* บริเวณเร่งของอินไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ แอสปาร์เตท อินไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสเปกตรัมค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986) อินไซม์อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติต่างๆของโปรตีนถั่วเหลืองให้ดีขึ้น เช่น สมบัติด้านการเกิดฟอง การเกิดอิมัลชัน เมื่อทำการย่อยที่ระดับจำกัด เป็นอินไซม์ที่ค่อนข้างทนความร้อน อุณหภูมิที่ใช้คือ 55-60 องศาเซลเซียส แต่อาจสูงได้ถึง 70 องศาเซลเซียส มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 7-11 ที่ pH 4 อินไซม์จะถูกยับยั้งปฏิกิริยา สูญเสียความสามารถในการทนความร้อนซึ่งเป็นประโยชน์ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายของอินไซม์ได้ จากงานวิจัยของ Waish และ

คณะ (2003) ซึ่งศึกษาการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส พบว่า อัลคาเลสสามารถปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนได้โดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่ระดับการย่อยสลาย 20 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ได้จะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นในช่วง pH 3-5 ส่วนที่ pH 6-8 ค่าการละลายของโปรตีนจะลดต่ำลง Govindaraju และ Srinivas (2004) ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน arachin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอส พบว่าที่ระดับการย่อยสลายสูง โปรตีนที่ได้มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเป็น 55-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำ จะให้ค่าการละลายในช่วง pH 4-4.5 เพิ่มขึ้น 14-16 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการเกิดฟองเพิ่มสูงขึ้น โดยโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการเกิดฟองสูงกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปน และ fungal protease แต่ไม่ส่งผลให้ค่าความคงตัวของฟองโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป พรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โอคาราที่ถูกตัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน โอคารา 100 กรัม พบว่า โปรตีนโอคาราที่ถูกตัดแปรนั้นมีความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า Surface hydrophobicity ส่วนความสามารถในการเกิดฟองมีค่าสูงขึ้น ฟองที่ได้มีความคงตัวลดต่ำลง ในขณะที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโอคารามีแนวโน้มลดลง

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulphydryl protease)

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

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

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal-containing protease)

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

4. โปรติเอสกรด (Acid protease)

เป็นโปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วงของพีเอชเป็นกรด (pH<7) โดยทั่วไปเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชเหมาะสมระหว่าง pH 2-4 และไม่แสดงชัดเจนถึงอนุโมลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณา pH activity profile ของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ ซึ่งให้พิกัดที่มีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุโมลกรดแอสพาดิก อยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอ็นไซม์เรนนินและเปปซิน เป็นต้น เอ็นไซม์เปปซิน (Pepsin) เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มแอซิดโปรติเอส มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เหมาะสมระหว่างพีเอช 4-8 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน เช่น ไทโรซีน (Tyr) เชนิลอะลานีน (Phe) และ ทริปโตเฟน (Tryp) (ปราณี, 2547) เอ็นไซม์เปปซินเหมาะในการนำมาย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟอง เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองจับตัวกันแน่นมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดฟองได้ต่ำ ปาริฉัตรและปราณี (2541) ทำการย่อยสลายโปรตีนจากถั่ว

เหลืองเพื่อผลิตเป็นสารให้ฟองสำหรับทดลองกับผลิตภัณฑ์เมอแรงส์ พบว่าการใช้เอ็นไซม์เปปซิน ที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 4.5 จะให้ค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองเพิ่มขึ้น ซึ่งถือว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากไข่ขาวได้

2.3.1.2 การตัดแปร โปรตีน โดยการใช้เอ็นไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส

ทรานซ์กลูตามิเนส (Transglutaminase, TGase) มีสมบัติในการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (ปราณี, 2547) ในสภาวะที่มีหมู่เอมีน TGase จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งเอมีนของสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลจากแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ -carboxamide) ของกลูตามีนในโปรตีนกับหมู่เอมีน (RNH_2) ในสภาวะที่ไม่มีหมู่เอมีน จะเกิดปฏิกิริยาแยกหมู่เอมีน (deamidation) โดยเกิดการไฮโดรไลซิสของหมู่แกมมาคาร์บอกซิล (γ -carboxyl group) ของกลูตามีน ทำให้เร่งหมู่แอมโมเนียหลุดออกมาได้เป็นกรดกลูตามิก ส่วนกรณีที่ปฏิกิริยามีหมู่เอมีนเป็น NH_2 -Lys (อนุโมลิสระของไลซีน) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้โปรตีนสายยาวเชื่อมระหว่าง กลูตามีนและไลซีน เรียกว่าปฏิกิริยาเชื่อมข้าม (crosslinking) ทำให้ได้โปรตีนสายใหม่ที่มีสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น โปรตีนที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำดีขึ้น ยืดหยุ่นมากขึ้น ทนต่อการตกตะกอนด้วยความร้อน ลักษณะดังกล่าวส่งผลที่ดีต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยได้มีการทดลองนำโปรตีนจากนมและถั่วเหลืองที่ผ่านการตัดแปรโดยใช้ TGase มาเป็นส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกจากเนื้อไก่เพื่อลดการใช้ฟอสเฟต พบว่าโปรตีนที่ผ่านปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม ทนความร้อนได้ดี เพิ่มความเสถียรของฟองซึ่งส่งผลต่อการเกิดเจลที่แข็งแรง และมีสมบัติการเกิดอิมัลชันที่ดี สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกได้ (Muguruma และคณะ, 2002)

2.2.1.3 การตัดแปร โปรตีน โดยการใช้เอ็นไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

เปปทิโดกลูตามิเนส (Peptidoglutaminase, Pgage) เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายกลูตามีนออกจากสายโพลีเปปไทด์ที่ตำแหน่งเอมีน การทำงานของเอ็นไซม์สามารถย่อยได้ตั้งแต่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนไข่ขาว จนถึงโมเลกุลขนาดเล็กของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการ deamidation แล้ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรใช้เอ็นไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในระดับหนึ่งก่อนที่จะมีการใช้ Pgage จะช่วยในการย่อยสลายกลูตามีนได้มากขึ้น (Hudson, 1992)

2.2.1.4 การตัดแปร โปรตีน โดยการใช้เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต (amylolytic enzyme)

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

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

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

2.3.2. การตัดแปรโปรตีนโดยไม่ใช้เอ็นไซม์ (Non-Enzymatic Modifications)

เป็นวิธีการตัดแปรโปรตีนโดยการใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการคลายตัวหรือจับตัวกันใหม่ของพันธะเคมีต่างๆทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

2.3.2.1 การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมี

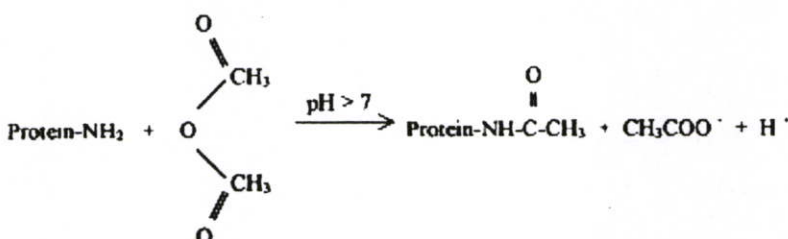
การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีเป็นอีกกระบวนการหนึ่ง ที่นิยมนำมาปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกระบวนการผลิตอาหาร สามารถทำได้อย่างรวดเร็วแต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบางอย่างค่อนข้างรุนแรง ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนและคุณค่าสารอาหารบางอย่างได้ การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น

เอซิลเลชัน (acylation) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารประเภทแอซิดแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนของไลซีน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารประกอบอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นกลางของอะซิติล (acetyl) เรียกว่ากระบวนการอะซิติลเลชัน (acetylation) หรือการใช้สารประกอบซักซินิกแอนไฮไดรด์ (succinic anhydride) เข้าแทนที่หมู่ ϵ -อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีนด้วยกลุ่มที่มีประจุลบของซักซินิล (succinyl) เรียกว่ากระบวนการซักซินิลเลชัน (succinylation) (ภาพที่ 2.1) ซึ่งส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีประจุลบมากขึ้น เกิดแรงผลักระหว่างหมู่คาร์บอกซิลในอีกโมเลกุลของโปรตีน มีผลให้การเกาะตัวกันของโปรตีนลดน้อยลง การละลายจึงเพิ่มมากขึ้น (Damodaran, 1996)

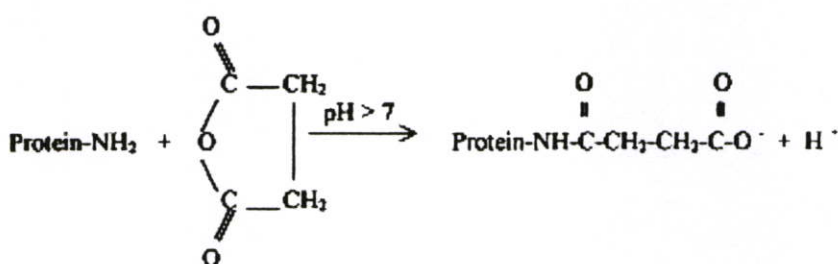
El-Adawy (2000) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียว (Mung bean protein) ที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชันและอะซิติลเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซักซินิลเลชัน มีความสามารถในการละลายน้ำและการละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์เพิ่มขึ้น ส่วนกระบวนการอะซิติลเลชัน ช่วยปรับปรุงความสามารถในการ

ละลายน้ำแต่การละลายในโซเดียมคลอไรด์ลดลง ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น

Acylation with acetic acid



Succinylation with succinic acid



ภาพที่ 2.1 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์และซัคซินิกแอนไฮไดรด์กับหมู่ε-อะมิโนของไลซีน

ที่มา : El-Adawy (2000)

พรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากโอคารา (กากถั่วเหลือง) ที่ถูกตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ พบว่า โปรตีนสกัดจากโอคาราที่ถูกตัดแปรนั้นมีความสามารถในการละลายดีขึ้น ค่า Surface hydrophobicity ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของฟองสูงขึ้น ในขณะที่ความสามารถในการเกิดฟองมีแนวโน้มลดลง

ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) เกิดจากการที่สารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (phosphorus oxychloride; POCl₃) (ภาพที่ 2.2) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอร์รีนและทรีโอนีน หรือหมู่ε-อะมิโนของไลซีน ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มขึ้น มีผลต่อการปรับปรุงสมบัติด้านการละลาย การเกิดฟองและการเกิดอิมัลชันของโปรตีน Mathesis และคณะ (1989) พบว่าการใช้ POCl₃ ในการตัดแปรสมบัติของยีสต์โปรตีน แม้จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของโปรตีน แต่สมบัติในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้การเกิดฟอสโฟริเลชัน ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงๆ จะส่งผลให้เกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ทำให้โปรตีนมีความเป็นประจุเพิ่มขึ้น (Damodaran, 1996)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันระหว่างสารฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลของ เซอรีนและทรีโอนีน

ที่มา : Matheis และคณะ (1989)

2.3.2.2 การตัดแปรรูปโปรตีนโดยใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมในการตัดแปรรูปสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร การตัดแปรรูปโดยใช้ความร้อนจะขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของโปรตีน และสถานะความร้อนที่ใช้เพื่อให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วนหรือเกิดโดยสมบูรณ์ ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป (Petruccelli และ Anon, 1995)

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

เปลี่ยนแปลงสมบัติการละลาย แต่ทำให้ค่าไฮโครโฟบิกซิตี (hydrophobicity) ของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาานาน 30 นาที จะทำให้ 7S และ 11S โกลบูลิน ถูกทำลาย โปรตีนเกิดการตกตะกอน สมบัติการละลายและค่าไฮโครโฟบิกซิตี (hydrophobicity) ลดลง

2.4 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ กลุ่มของสารที่มีอิเล็กตรอนวงนอกที่ยังไม่ได้จับคู่ มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่ง อิเล็กตรอนและมีอายุสั้นประมาณ 1 หรือ 10^{-3} - 10^{-10} วินาที ดังนั้นจึงมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ของร่างกาย อนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำ อนุมูลอิสระที่สำคัญได้แก่ อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, OH^{\cdot}) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ไฮโปคลอไรต์ (hypochlorous, HOCl) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของอนุพันธ์ไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive nitrogen species, RNS) ที่สำคัญได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO^{\cdot}) และ เปอร์ออกซินไนไตรต์ (peroxynitrite, ONOO $^{\cdot}$) เป็นต้น ทั้งกลุ่มของ ROS และ RNS จัดเป็นแหล่งของอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย (วัลยาและพัชรี, 2542) อนุมูลอิสระเกิดได้ทั้งจากภายในร่างกายและภายนอกร่างกาย เช่น เกิดที่ไมโทคอนเดรีย ไมโครโซม เพอร์รอกซิโซม โดยเกิดจากระบบการขนส่งอิเล็กตรอน การเกิดเมตาบอลิซึม ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) หรือเกิดจากสารเคมี รังสี ยาบางชนิด และความร้อน (Punchard และ Kelly, 1996) อนุมูลอิสระ ไซว่าจะมีแต่ผลเสียอย่างเดียว ร่างกายต้องใช้อนุมูลอิสระเพื่อเป็นตัวนำสารเคมีบางอย่างที่จำเป็นในการผลิตฮอร์โมน และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน อนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันร่างกายจากการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส ดังนั้นปัญหาจากอนุมูลอิสระที่พบทุกวันนี้เกิดจากการมีอนุมูลอิสระล้นเกิน (นิทรภาพร, 2542) หรือที่เรียกว่า สภาวะ oxidative stress ซึ่งก็คือ สภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกาย เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก การสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของโปรตีน เป็นต้น (วัลยาและพัชรี, 2542) และพบว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือด โรคต่อกระจก โรคจอตาเสื่อม โรคข้ออักเสบ เป็นต้น (นิทรภาพร, 2542)

2.5 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants)

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

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

2.5.2. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของสารและโปรตีนบางชนิด ได้แก่ กลูตาไธโอน (glutathione) ยูเรต (urate) ไบลิรูบิน (bilirubin) ยูบิควิรอล (ubiquinol) อัลบูมิน (albumin) แครูโรพลาสมีน (caeruloplasmin) ทรานเฟอริน (transferrin) เป็นต้น

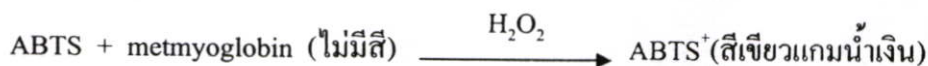
2.5.3. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันกลุ่มของสารอาหารบางชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี แคโรทีนอยด์ เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างจะมีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการเป็นสารต้านออกซิเดชันในอาหาร เช่น ความสามารถในการกระจายตัวในเฟสของน้ำมันและน้ำของสารต้านออกซิเดชัน สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น จากอิทธิพลของพารามิเตอร์เหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีใดเพียงวิธีเดียวในการตรวจสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารใด ๆ วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารหรือสารประกอบต่างๆมีหลายวิธี ดังนี้

1. ABTS free radical scavenging method

ABTS⁺ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก เกิดจากสาร ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)) ทำปฏิกิริยากับเปอร์ออกซิเดชันของเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) จะทำให้สารละลายสีน้ำเงินแกมเขียว ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ อัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Landrault และคณะ, 2001)



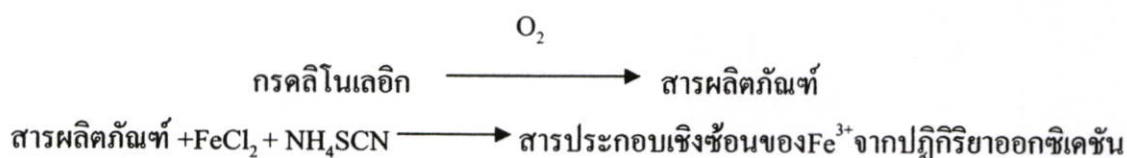
2. DPPH radical scavenging method

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrozyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาร โดยมีหลักการคือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน จะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียร เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากสารที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลง ซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul และคณะ, 2006)



3. Ferric Thiocyanate Colorimeter method (FTC)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate (FTC) เป็นตัวแทนในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร (antilipoperoxidant) โดยวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้

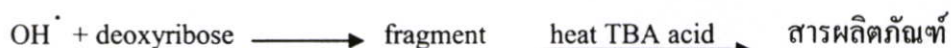


กรดไขมันไม่อิ่มตัวเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดสารผลิตภัณฑ์ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิลคาร์บอน (R[•]) อนุมูลเพอร์ออกไซด์ (ROO[•]) สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl₂) โดยปรีควิลซ์เฟอร์รัส (Fe²⁺) ให้เป็นเฟอร์ริก (Fe³⁺) และในสถานะที่มีแอมโมเนียมไซโอไอซายานด์ (NH₄SCN) จะเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลแดงของเฟอร์ริก (Fe³⁺) ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (Larrauri และคณะ, 1997)

4. Hydroxyl radical assay (deoxyribose assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) เป็นตัวแทนในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันอันเนื่องมาจาก อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) โดยมีหลักการคือเฟอร์รัส (Fe²⁺) จะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) ทำปฏิกิริยากับดีออกซีไรโบส (deoxyribose) ในขณะที่มีการให้ความร้อนร่วมกับกรดไทโอบาบิทูริก (thiobarbituric acid, TBA) จะเกิดเป็นสารสี

ชมพู สามารถติดตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^\cdot) ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Halliwell และคณะ, 1987)



2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านออกซิเดชันในโปรตีน

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนและเปปไทด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อย ระดับการย่อยสลายของโปรตีน สภาวะในการย่อย ชนิดและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่อยู่ในสายเปปไทด์และโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น

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

Hattori และคณะ (1998) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของอีลาสตินเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยอีลาสตินด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก พบว่า อีลาสตินที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซินและกรดไฮโดรคลอริก มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันดีกว่าตัวควบคุม และเมื่อใส่กรดซิตริก (citric acid) ในปริมาณ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับอีลาสตินที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์และกรด จะทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และ พบว่าเปปไทด์ของอีลาสตินที่มีขนาด 1000 Da มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol)

Park และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงที่ไม่มีเลซีตินโดยใช้เอ็นไซม์อัลคาเลสในการคัดแปร พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa มีความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้มากกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol) และพบสายเปปไทด์ 2 สายที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาด 5 KDa สายที่ 1 คือ Leu-Met-Ser-Tyr-

Met-Tryp-Ser-Thr-Ser-Met และสายที่ 2 คือ Leu-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Arg-Ser-Ser-His-Trp-Phe-Ser-Arg-Arg

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

Pena - Ramos และ Xiong (2003) ได้นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ chymotrypsin มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปร พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอิน (conjugated dienes) และความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทดสอบด้วยวิธีการ TBARS (thiobarbituric acid - reactive substances) ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

Sakanaka และคณะ (2003) ได้ทำการย่อยโปรตีนไข่แดงด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไฮโดรไลเซตที่ได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1000 Da และพบว่าที่ 0.025 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่าตัวควบคุม และพวกเขาได้นำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงเป็นส่วนผสมในคุกกี้ก็เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่แดงและกรดอะมิโนผสมเพื่อหาค่าเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในคุกกี้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน พบว่าคุกกี้ที่ผสมด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงมีค่าเปอร์ออกไซด์ต่ำกว่าคุกกี้ที่ผสมด้วยโปรตีนไข่แดงและกรดอะมิโนผสม และในปี 2006 Sakanaka และคณะ ได้นำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงมาทดสอบหาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดง มีความสามารถในการยับยั้งการเปลี่ยนสีของเบต้าแคโรทีนได้ดีกว่าตัวควบคุม และที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน(O₂⁻) และ ไฮดรอกซิลแรดิคคอล (OH[•]) เป็น 83.5% 90% และ 74.2% ตามลำดับ และนอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่แดงยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทดสอบด้วยวิธีการ TBARS ในเนื้อวัวได้ถึง 91.7%

Pena - Ramos และ Xiong (2003) ได้นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปร พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอิน (conjugated dienes) และการเกิดสีแดงของ TBARS ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

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

Saiga และคณะ (2003) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอซินไมโอไฟบริลลาโปรตีน (Porcine Myofibrillar Proteins) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์แอคทีเนสอี (actinase E) พบว่า พอซินไมโอไฟบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าพอซินไมโอไฟบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอคทีเนสอี เนื่องจากพอซินไมโอไฟบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีจำนวนของกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ซึ่งมีความสามารถละลายในไขมันมากกว่าพอซินไมโอไฟบริลลาโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอคทีเนสอี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

- 3.1.1 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด จาก บริษัท The Solae Company (USA)
- 3.1.2 เอ็นไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) 3.0 units/mg บริษัท Sigma-Aldrich Inc.
- 3.1.3 (Alcalase[®]) 2.4 AU/mg บริษัท Novo Nordisk Co., Ltd.
- 3.1.4 succinic anhydride บริษัท Sigma-Aldrich Inc.
- 3.1.5 สารเคมี
 - Sodium hydroxide
 - Hydrochloric acid
 - Monosodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - Disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)
 - Copper (II) Sulfate
 - Trichloroacetic acid (TCA)
 - 2, 2 – Azino- bis (3-ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic) (ABTS)
 - Tris (hydroxymethyl) Aminomethane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
 - Glycerol
 - Bromophenol Blue
 - Ammonium persulfate
 - Acrylamide
 - N, N-Methylene-bis (acrylamide)
 - N,N,N,N – Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)
 - Bromophenol Blue
 - Methanol
 - Coom assie brilliant blue
 - 2 – Mercaptoethanol
 - Hydrogen peroxide
 - Linoleic acid

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

3.2 อุปกรณ์ในการตัดแปรโปรตีนด้วยเสียงสกัด

- | | |
|----------------------|---|
| - Freeze Dryer | Vacuum freeze drier FT33 |
| - Spectrophotometer | Spectro 22, Labomed, Inc., USA |
| - SDS-PAGE | Amersham phamacia biotech, Sweden |
| - Centrifuge | Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R |
| - หลอดเซนตริฟิว | |
| - Water bath shaker | |
| - multistirrer | |
| - Water bath | |
| - เครื่องชั่งละเอียด | |
| - เครื่องแก้ว | |

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.3.1 อุปกรณ์ในการทดสอบระดับการย่อยสลาย

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

3.3.2 อุปกรณ์ในการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| - Electrophoresis set | Amersham phamacia biotech, Sweden |
| - Easy Breeze Gel Dryer | Hofer scientific instruments |
| - Micropipette P1000 pipetman | Gilson Medical Electronic |
| - เครื่องชั่งละเอียด | |
| - เครื่องแก้ว | |

3.3.3 อุปกรณ์ในการทดสอบความสามารถในการละลาย

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

3.3.4 อุปกรณ์ในการทดสอบสมบัติการต้านออกซิเดชัน

- Spectrophotometer Spectro 22, Labomed, Inc., USA
- Quartz cuvette
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องแก้ว

3.4 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 ศึกษาสมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ทำการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีดังนี้

3.5.1.1 ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ตามวิธีของ Landrault และคณะ (2001)

3.5.1.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามวิธีของ Yen และคณะ (1995)

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

3.5.2 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

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

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นตกตะกอน โปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ป่าเปนมหาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Kim และคณะ (1989) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

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

3.5.3 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

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

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

3.5.4 การศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิกแอนไฮไดรด์

ตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ตามวิธีของ El-Adawy (2000) โดยละลายตัวอย่างโปรตีนสกัดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วนโปรตีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1:10 จากนั้นเติมกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม กวนผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 8.0 และควบคุมให้คงที่ตลอดปฏิกิริยา เป็นระยะเวลาต่างกัน 4 ระดับ คือ 15 30 60 และ 120 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนที่พีเอช 4.5 แยกส่วนของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ทำให้เป็นกลางโดยปรับพีเอชเป็น 7.0 แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์มาหาค่าประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) ตรวจวัดความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยวิธีของ Voutsinas และคณะ (1983) และทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามวิธีในข้อ 3.5.1.1 ถึง 3.5.1.3

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

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.1.1 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS

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

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

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

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

4.1.2 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซี แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้บ้าง และความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% แต่เมื่อเทียบกับวิตามินซีแล้วพบว่า วิตามินซีมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีมาก ทั้งนี้เนื่องจากวิตามินซีมีความว่องไวในการจับกับอนุมูลอิสระต่างๆ จึงมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้สูง (นิทรพร, 2542)

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

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

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

4.1.3 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโทลอกซ์ (Trolox) แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้เล็กน้อย และความสามารถในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% แต่เมื่อเทียบกับโทลอกซ์พบว่า โทลอกซ์มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเลอิกได้ดีมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McCarthy และคณะ (2001) ที่ว่า วิตามินอีสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในแพคซีหมูทอดที่เก็บไว้เป็นเวลา 9 วันได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโทลอกซ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเลอิก (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	2.77 ± 0.2 ^a	4.69 ± 0.4 ^b	7.76 ± 0.8 ^c
โทลอกซ์	93.26 ± 1.0 ^d	95.83 ± 0.19 ^e	97.44 ± 0.9 ^f

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

4.2 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน

4.2.1 ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ปาเปน

ผลการศึกษา ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน 3 ระดับคือ 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็นเวลา 15 นาที มีค่าต่ำกว่า 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ที่เวลา 30 และ 60 นาที ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม เอ็นไซม์สามารถจับกับโมเลกุลโปรตีนได้มากจึงเกิดการย่อยสลายในระดับที่ค่อนข้างสูงในช่วง 30 นาทีแรก หลังจากนั้นมีความโน้มคองที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ทั้งนี้ระดับการย่อยสลายโปรตีนของเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรตีนเอสซีน้อยอยู่กับความจำเพาะของเอ็นไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยา จำนวนพันธะเปปไทด์ที่เอ็นไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ โดยมีเวลาความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิเป็นปัจจัยเสริม (Hudson, 1992)

ตารางที่ 4.4 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

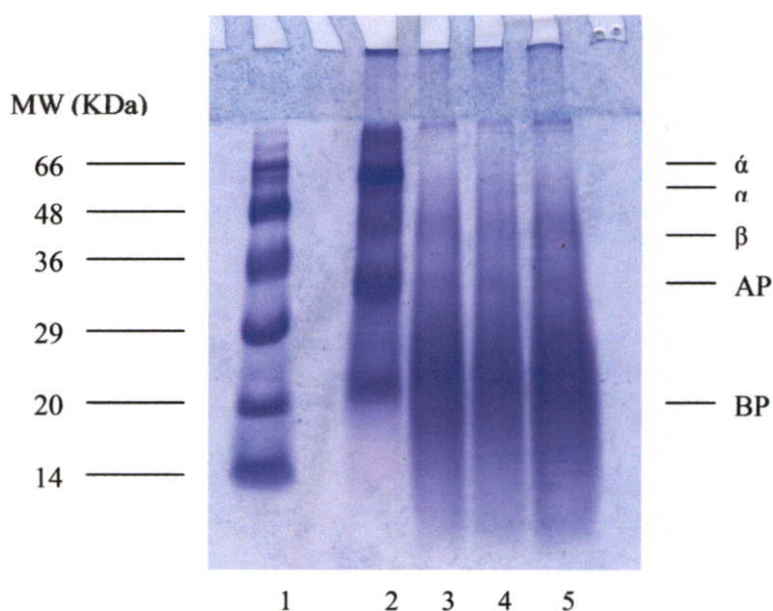
ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
15	77.07 ± 4.81 ^a
30	89.92 ± 1.67 ^b
60	89.92 ± 3.89 ^b

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

4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ปาเปนโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนในระยะเวลาแตกต่างกันโดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent (2-ME) แสดงดังภาพที่ 4.2 เมื่อแยกองค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จะพบส่วนของ α , α และ β - subunit ของ β -conglycinin หรือ 7S โกลบูลินและ acidic - basic subunit ของ glycinin หรือ 11S โกลบูลิน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนถั่วเหลือง (Ma และคณะ, 1997) ส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนเป็น 15 30 และ 60 นาที จะไม่พบแถบของ α , α , β - subunit ของ 7S

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



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

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

$\alpha\alpha$ และ β คือ $\alpha\alpha$ และ β -subunit ของ β -conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.2.3 ความสามารถในการละลาย

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

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

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

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

* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

4.2.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

การวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.6 ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีน 3 ระดับคือ 0.1% 0.3% และ 0.5% พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปร โปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาที ไปเป็น 60 นาที พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนสกัด

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

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.2.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการคัดแปร โปรตีนถั่วเหลืองสกัดพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่เวลา 30 และ 60 นาที มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่เวลา 15 นาที ทั้งนี้เนื่องจาก ระดับการย่อยสลายของโปรตีน และความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นทำให้เพิ่มปริมาณสายเปปไทด์ขนาดเล็กและประจุสุทธิ ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงเพิ่มขึ้น (Sakanaka และคณะ, 2006) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% พบว่า ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.2.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปน แสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเพิ่มขึ้น พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยเอ็นไซม์ปาเปน ทำให้โครงสร้างทรงกลมที่อัดแน่น (compact globular structure) ของโปรตีนถั่วเหลืองคลายตัวออก ทำให้กลุ่มไฮโดรโฟบิกที่อยู่ภายในโมเลกุลเคลื่อนที่มาที่ผิว Puechkamut และ Thiewtua (2006) พบว่า ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจากโอคารา มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนและอัลคาเลส การที่โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีกลุ่มไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้น (Zhu และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านคัดแปรด้วยเอ็นไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

4.3.1 ระดับการย่อยสลาย

ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันไป เอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อสับสเตรทมากกว่าเอนไซม์อัลคาเลส (ปราณี, 2547) พรชนัน (2548) พบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลส 0.5 กรัมเอนไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม ทำให้ 7S และ 11S โกลบูลิน ถูกย่อยจนหมด เหลือแค่เพียงโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าเอนไซม์ปาเปน ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมเอนไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 100 กรัม ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นจาก 15 นาที ไปเป็น 60 นาที ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาในการย่อยเท่ากัน พบว่า ระดับการย่อยสลายของเอนไซม์ปาเปนสูงกว่า การที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากปริมาณของเอนไซม์ปาเปนที่ใช้มากกว่าเอนไซม์อัลคาเลส

ตารางที่ 4.9 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

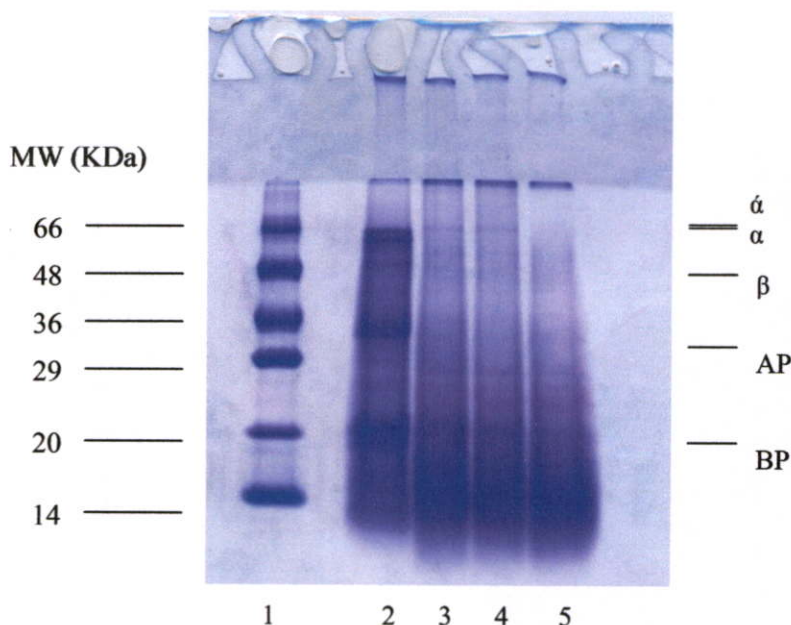
ระยะเวลาที่ใช้ในการตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
15	54.47±2.0 ^a
30	63.75±2.0 ^b
60	70.00±0.8 ^c

^{abc}ตัวอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสในระยะเวลาแตกต่างกัน โดยใช้ SDS-PAGE ในสภาวะที่มี denaturing agent (2-ME) แสดงดังภาพที่ 4.3 จะเห็นว่ามีความแตกต่างจาก SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ปาเปน (ภาพที่ 4.2) การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน (ปราณี, 2547) เป็นผลให้ตำแหน่งในการย่อยของพันธะเปปไทด์ต่างกัน โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกตัดแปรจึงต่างกัน ภาพที่ 4.3 แสดง

ให้เห็นว่า แถบของ α , α และ β - subunit ของ β -conglycinin และ acidic และ basic subunit ของไกลซินินจางลงโดยเฉพาะแถบของ β -conglycinin และ acidic subunit และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาทีซึ่งมีระดับการย่อยสลายที่สูงกว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อย 15 และ 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ จะไม่พบแถบของ β -conglycinin และ acidic subunit แต่จะพบแถบที่เข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (≥ 14 KDa) อยู่บริเวณด้านล่างของเจล เนื่องจากเอ็นไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะกว้างทำให้เกิดการย่อยในทุกๆหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนโมเลกุลที่ผ่านการย่อยจึงมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง



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

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

$\alpha\alpha$ และ β คือ $\alpha\alpha$ และ β -subunit ของ β -conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.3.3 ความสามารถในการละลาย

การวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่เวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และมีค่าสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ

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

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

* เป็นค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

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

4.3.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

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

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

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.5 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาทีแสดงดังตารางที่ 4.12 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่เวลา 60 นาที สามารถทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่เวลา 15 และ 30 นาทีตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% ส่งผลให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 4.13 พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีกลุ่มไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เพิ่มขึ้น (Waish และคณะ, 2003) โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น (Zhu และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

ระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปร โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (นาท)	ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (%)		
	0.1%	0.3%	0.5%
0	1.25±0.1 ^a	2.1±0.1 ^b	4.04±0.2 ^c
15	25.49±0.2 ^d	34.20±0.2 ^e	39.99±0.9 ^f
30	34.18±1.0 ^c	42.83±0.4 ^g	44.39±0.1 ^h
60	39.25±0.3 ^f	44.86±0.2 ⁱ	47.79±0.2 ^j

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

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

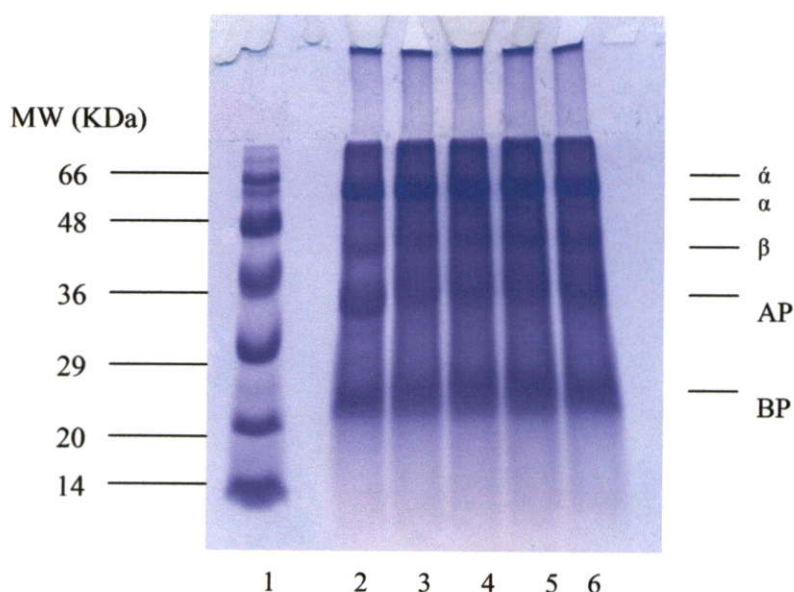
ถึงแม้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส จะถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิตามินซีและ โทรอกซ์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี (ตารางที่ 4.1 ถึง 4.3) พบว่ายังมีค่าต่ำกว่ามาก อย่างไรก็ตาม ความเสถียรของ

วิตามินในกระบวนการแปรรูปมีจำกัด ควรทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสและวิตามินซีหรือโทรอกซ์ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ทั้งสามชนิดนี้

4.4 ผลการศึกษาสมบัติและความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

4.4.1 องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้ SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ด้วยวิธี SDS-PAGE ในสถานะที่มี denaturing agent แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที มีหน่วยย่อยของ 7S และ 11S โกลบูลินไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร กระบวนการซัคซินิลเลชันเป็นกระบวนการที่แทนที่หมู่อะมิโนของไลซีนด้วยประจุลบของซัคซินิก (succinic) ไม่ได้ทำให้โครงสร้างของหน่วยย่อยของโปรตีนเปลี่ยนแปลง จึงทำให้ SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร



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

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

$\alpha\alpha$ และ β คือ $\alpha\alpha$ และ β -subunit ของ β -conglycinin AP: acidic subunit และ BP : basic subunit ของ glycinin

4.4.2 ความสามารถในการละลาย

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันด้วยกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.14 พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะที่เวลา 120 นาที เนื่องจากกระบวนการซัคซินิลเลชันจะเป็นการแทนที่หมู่อะมิโนที่มีประจุบวกของไลซีน ด้วยกลุ่มที่มีประจุเป็นลบของซัคซินิล (succinyl) ทำให้โปรตีนมีประจุลบเพิ่มมากขึ้น สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีขึ้น และมีแนวโน้มละลายได้มากขึ้นเมื่อระดับการซัคซินิลเลชันเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากกระบวนการซัคซินิลเลชันทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นผลรวมมาจากประจุที่เพิ่มขึ้น เป็นผลให้สายโพลีเปปไทด์เกิดการคลายตัว หรือเกิดจากกระบวนการซัคซินิลเลชันเหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลที่เพิ่มเข้าไปและหมู่คาร์บอกซิลที่มีอยู่ใน โมเลกุลเดิม เป็นผลให้เกิด electrostatic attraction ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและแอมโมเนียมที่อยู่ใกล้กันใน โมเลกุล โปรตีนมีค่าต่ำลง (Lawal, 2005) นอกจากนี้การเกิด intra- และ inter- molecular electrostatic repulsion ช่วยให้โปรตีนสามารถคลายตัวและเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างโปรตีนกับน้ำได้ดีขึ้น (Achouri และคณะ, 1998) ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dua และคณะ (1996) และ Lawal (2005) และเมื่อเปรียบเทียบกระบวนการซัคซินิลเลชันกับการดัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส พบว่ากระบวนการซัคซินิลเลชัน เมื่อใช้เวลา 60 นาที ทำให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ถูกดัดแปรมีความสามารถในการละลายสูงกว่า (ตารางที่ 4.5 และ 4.10)

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซินิลเลชันระยะเวลาต่าง ๆ

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

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

4.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี ABTS free radical scavenging ของ โพรตีนถั่วเหลืองสกัดและ โพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการชักชนิลเลขันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.15 พบว่า โพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการชักชนิลเลขันมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการคัดแปรโพรตีนจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาที พบว่า โพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการชักชนิลเลขันมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามถ้ากระบวนการชักชนิลเลขันเพิ่มขึ้นเป็น 120 นาที ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจาก ประจุสุทธิที่เพิ่มขึ้นของโพรตีนทำให้มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันถ้ามีประจุสุทธิมากเกินไป อาจทำให้โพรตีนเปลี่ยนเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidant) ทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง (Pena และ Xiong, 2001) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายที่เพิ่มมากขึ้นและ โพรตีนมีประจุสุทธิเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Hu และคณะ, 2003)

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของ โพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการชักชนิลเลขันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโพรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.4 สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ผลการวิเคราะห์สมบัติในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซีนิลเลชันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.16 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการซัคซีนิลเลชัน มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาทีพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการซัคซีนิลเลชัน มีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการคัดแปรไปเป็น 120 นาที ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ำลง เป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (ตารางที่ 4.15) เนื่องจากประจุลบที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน แต่ในขณะที่เดียวกันถ้ามีประจุลบมากเกินไปอาจทำให้โปรตีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง (Pena และ Xiong, 2001) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซีนิลเลชันจาก 0.05% ไปเป็น 0.1% ส่งผลให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.16 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซีนิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ

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

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

4.3.6 สมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC)

การวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกไดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซีนิลเลชันที่ระยะเวลา 15 30 60 และ 120 นาที แสดงดังตารางที่ 4.17 พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการซัคซีนิลเลชัน มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกไดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่าน

การคัดแปรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการคัดแปร โพรตีนถั่วเหลืองสกัดจาก 15 นาทีไปเป็น 60 นาที พบว่า โพรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการซัคซีนิลเลชัน มีความสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการคัดแปรไปเป็น 120 นาที พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกต่ำลง ซึ่งเป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ตารางที่ 4.15 และ 4.16) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรจาก 0.1% ไปเป็น 0.5% พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ประจุที่เพิ่มขึ้นของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์จะเหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างโพรตีนกับอนุมูลอิสระ จึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระกับกลุ่มไขมันได้ (Hu และคณะ, 2003) และกระบวนการซัคซีนิลเลชันทำให้โมเลกุลของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดคลายตัวออก ทำให้มีกลุ่มกลุ่มไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เพิ่มขึ้น กลุ่มไฮโดรโฟบิกในโพรตีนจะทำหน้าที่จับกับไขมันแทนที่อนุมูลอิสระ ทำให้ลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันได้ (Chiu และคณะ, 1997)

ตารางที่ 4.17 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการซัคซีนิลเลชันที่ระยะเวลาต่างๆและที่ระดับความเข้มข้นของโพรตีนต่าง ๆ

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

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

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติในการต้านออกซิเดชันของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรทั้งสามวิธี คือขบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เอนไซม์อัลคาเลสและกระบวนการซัคซีนิลเลชัน พบว่า ความสามารถในการละลายของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรที่สูงขึ้น จึงส่งผลให้สมบัติในการต้านออกซิเดชันของโพรตีนสูงขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการละลายเพียงอย่างเดียวก็ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโพรตีนถั่วเหลือง

สกัด โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านกระบวนการชักชีนิลเลขันที่ระยะเวลา 120 นาที มีค่าการละลายสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ แต่ความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ นอกจากนี้พบว่าแนวโน้มความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการคัดแปรด้วยกระบวนการชักชีนิลเลขัน (ตารางที่ 4.6 4.11 และ 4.15) จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่า การใช้เอ็นไซม์โปรติเอสในการคัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเพื่อให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เป็นวิธีที่สามารถคัดแปรให้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีสมบัติในการสารต้านออกซิเดชันที่ดี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. SDS-PAGE ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรโดยใช้เอ็นไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีนถั่วเหลือง 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าหน่วยย่อย 7S โกลบูลินและ acidic subunit มีปริมาณลดลง แต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่บริเวณด้านล่างของเจล โปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีความสามารถในการละลายดีขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร และมีสมบัติด้านออกซิเดชันมากขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.1% ไปเป็น 0.5%

2. SDS-PAGE โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมเอ็นไซม์ต่อโปรตีน 100 กรัม แสดงให้เห็นว่าหน่วยย่อย 7S และ 11S โกลบูลิน มีปริมาณลดลง แต่จะพบแถบสีเข้มของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ด้านล่างของเจล โปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร และมีสมบัติด้านออกซิเดชันมากขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 0.1% ไปเป็น 0.5%

3. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันโดยใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม เป็นเวลา 15 30 60 และ 120 นาที มีหน่วยย่อยที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร แต่มีความสามารถในการละลายสูงขึ้น มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ABTS ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการตัดแปร การเพิ่มประจุสุทธิโดยกระบวนการซัคซินิลเลชัน ช่วยทำให้สมบัติด้านออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มประจุสุทธิมากเกินไป ทำให้สมบัติด้านออกซิเดชันลดลง

4. การตัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทั้งสามวิธี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งส่งผลให้สมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลง จากการทดลองพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรทั้งสามวิธีมีความสามารถในการละลายดีขึ้น และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยกระบวนการซัคซีนิลเลชัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรมาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและการใช้งานได้จริงของโปรตีน เพื่อสามารถเลือกนำมาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลายตามความต้องการ

2. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรควรนำมาทดสอบสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตามน้ำหนักโมเลกุล โดยการสกัดแยกสายเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อทราบถึงโครงสร้างที่แน่ชัดของโปรตีน ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันในอุตสาหกรรม

บรรณานุกรม

- คุณท利亚 ครูทกะ. 2544. การผลิตโยเกิร์ตแช่แข็งจากน้ำนมถั่วเหลือง น้ํามข้ํวกล้ํองและร้ํข้ํว.
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
 คุณฑทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ปราณี อานเป็ร้ํอง, 2547. *เอ็นไซม์ท้ํงอาหาร*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
 ปาริฉัตร ท้ํพะสุต และ ปราณี อานเป็ร้ํอง. 2541. สมบัติของสารให้ฟองผงจากโปรตีนถั่วเหลือง
 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร : อาหาร. 28 : 42-53
- นิตราพร รุจนวิศาล. 2542. สารปรับสมดุลจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระ. *ในกันแก่ แก้วป้วเจ้า
 ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตัวแก่*. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รวมธรรมศน์. 9-29.
- พรชนัน เที้ยวท้ํว. 2548. การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราโดยกระบวนการท้ํง
 เอ็นไซม์และเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณฑทหาร
 ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชร บุญศิริ. 2542. โปรออกซิแดนท้ํ : อีกล้ํมหน้าของแอนติออกซิ
 แคนท้ํ. *วารสารวิทยาศาสตร์*. 53 : 196-198
- Abd-El-Aim, S. S. L., Lugasi, A., Hovari, J. and Dworschak, E. 1999. Culinary herbs inhibit lipid
 oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of the Science of
 Food and Agriculture*. 79 : 277-285.
- Achouri, A., Zhang, W. and Shiyang X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and
 effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food
 Research International*. 31(9) : 617-623.
- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymatic hydrolysis of food protein*. New York: Elsevier Publishing. pp.
 77-363.
- Bacon, J. R., Norl, R. and Lambert, N. 1990. Soybean Proteins. [online] . Available : [http : //
 www. Class.fst.ohio-state edu./Soy.hym](http://www.Class.fst.ohio-state.edu./Soy.hym).
- Bishov, S. J. and Henick, A. S. 1975. Antioxidant effect of protein hydrolysates in freeze-dried
 model systems. *Journal of Food Science*. 40: 345-348.
- Chan, W. M. and Ma, C. Y. 1999. Modification of proteins from soymilk residue (okara) by
 trpsin. *Journal of Food Science*. 64: 781-785

- Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptide based on antioxidative peptide isolated from digested of soy bean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 2619-2623.
- Chiue, H., Kusano, T., Iwami, K. (1997). Deamidation-induced fragmentation of maize zein, and its linked reduction in fatty acid-binding capacity as well as antioxidative effect. *Food Chemistry*.58:111-117.
- Damodaran, S. 1996. *Amino Acids, Peptides and Proteins*. In Food Chemistry. Fennama, O.R.(ed). NewYork: Marcel Dekker INC.pp 380.
- Davis, P. J. and Williams, S. C. 1998. *Protein modification by thermal processing*. *Allergy*.53 : 102-105.
- Decker, E. A. and Crum, A. D. 1993. Antioxidant activity of canosine in cooked ground pork. *Meat Science*. 58 : 337-341.
- Dua, S., Mahajan, A., Mahajan, A. 1996. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var.Toria) preparation by chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 706-710.
- El-Adawy, T. A. 2000. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry*. 70: 83-91.
- Govindaraju, K and Srinivas, H. 2004. Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. *Food Science and Technology*. 56 : 183-191.
- Gruener, L. and Ismond, M. A. H. 1997. Effects of acetylation and succinylation on physicochemical properties of canola 12S globulin. Part I. *Food Chemistry*. 60:357.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Aruoma, O. I. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 165: 215-219.
- Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K., Kumagai, H., Feng, Y. and Takahashi, K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2167-2170.
- Hensley, D. W. and Lawhon, J. T. 1979. Economic Evaluation of Soy Isolate Production by a Membrane Isolation Process. *Food Technology*. 33:46.
- Hettiarachchy, N. S and Ziegler, G. R. 1990. *Protein Fuctionality in Food System*. New York

- Hu, M., McClements, D. J., and Decker, E.A. 2003. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1696-1700.
- Hudson, B. J. F. 1992. Modification of food protein by enzymic method. London : E A S.
- Karpinska, M. Borowski, J. and Danowska-Oziewicz, M. 2001. The use of antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*. 72 : 5-9
- Karel, M., Tannenbaum, S. R., and Maloney, H. 1966. Antioxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. Effects of added amino acid. *Journal of Food Science*. 31 : 892-896.
- Kinsella, J. E. 1979. Functional Properties of Soy Protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 56: 242.
- Kim, K. S. and Rhee, J. S. 1989. Effects of acylation on physicochemical properties of 11S soy protein. *Journal of Food Science*. 13 : 187-199.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature*. 227: 680-685.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, P. L. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wine from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3341-3348.
- Larrauri, J. A., Ruperez, P. and Suara-Calixto, F. 1997. Mango peel fibers with antioxidant activity. *Z Lebensm unters Forsch A*. 205:39-42.
- Lecomte, N. B., Zayas, J. F. and Kastner, C. L. 1993. Soya proteins functional and sensory characteristics improved in comminuted meats. *Journal of Food Science*. 58: 464-472.
- Lin, K. W. and Mei, M. Y. 2000. Influence of gum, soy protein and heating temperature on reduce-fat meat batter in model system. *Journal of Food Science*. 65: 97-100.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M and Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*. 100(4) : 1407-1418.
- Mansour, E. H. and Khalil, A. H. 2000. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their applications to ground beef patties. *Food Chemistry*. 69 : 135-141.
- Marcuse, R. 1960. Antioxidative effect of amino acid. *Nature*. 186 : 886-887.

- McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. and Buckley, D. J. 2001a. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compare with synthetics antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*. 57 : 45-52.
- McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. and Buckley, D. J. 2001b. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*. 57 : 177-184.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, M., Sathe, S. K. and Soeda, T. 2002. Soybean and Milk Protein Modified by Transglutaminase improve Chicken Sausage Texture even at Reduced Levels of Phosphate. *Meat Science*. 431: 170-177.
- Murase, H., Nagao, A., Terao, J. 1993. Antioxidant and emulsifying activity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(long-chain-acyl) carnosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1601-1604.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. and Suzuki, N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Journal of Food Chemistry*. 80: 29-33.
- Nakai, S. and Modler, H.W. 1996. Food proteins-Properties and Characterization. New York.
- Ortiz, S. E. M. and Wagner, J. R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates : structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*. 35: 511-518.
- Park, P. J., Jung, W.K., Nam, K. S., Shahidi, F. and Kim, S. K. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptide from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651-656.
- Pena – Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2001. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Dairy Science*. 84: 2557-2583.
- Pena – Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cook pork patties. *Meat Science*. 64: 259-263.
- Petrucelli, S. and Anon, M.C. 1994. Relationship between the method of obtention and the structure and functional properties of soy protein isolates. 1. structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (4) : 1074-1077.
- Puechkamut, Y., and Thiewtua, P. 2006. Improvement of functionalities of soymilk residue protein by papain hydrolysis. *KMITL Science Journal*. Vol 6, No.2b: 571-575

- Punchard, N. A., Kelly, F. J. 1996. *Free radical: a practical approach*. Washington, D.C. Oxford university press, Inc. 310p.
- Saiga, A., Tanabe, S. Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3661-3667.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. K. 2003. Antioxidant activity of Egg-Yolk Protein Hydrolysates in Linoleic acid Oxidation System. *Journal of Food Chemistry*, 86, 99 - 103.
- Sakanaka, S. and Tachibana, Y. 2006. Active Oxygen Scavenging Activity of Egg-Yolk Protein Hydrolysates and Their Effects on Lipid Oxidation in Beef and Tuna Homogenates. *Journal of Food Chemistry*, 95, 243 – 249
- Sahoo, J. and Verma, S. P. 1999. Oxidative problems in meat and meat products and use of antioxidant vitamins. *Journal of Food Science and Technology*. 36 : 487-499.
- Sathivel, S. and Bechtel, P. J. 2004. :”Properties of protein hydrolysates from pink salmon heads.” [online]. Available: http://www.cazv.cz/2004/2003/potr1_02/karamac
- Sayas, J. F. 1997. *Fuctionality of proteins in food*. Springer-Veriag, Berlin, Heidelberg, Germany
- Scilingo, A. A., Ortiz, S. E. M., Martinez, E. N. and Anon, M. C. 2002. Amaranth protein isolate modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Research International*. 35: 855-862.
- Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. 1999. Dietary isoflavone: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*. 129, 758S-767S.
- Shahidi, F. and Wanasaudara, P. K. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 32: 67-103.
- Tang, S., Kerry, J. P., Sheedan, D., Buckley, D. J. and Morrissey, P. A. 2001. Antioxidative effect added tea catechins on susceptibility of cooked meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*. 34 : 651-657.
- Waish, D. J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S. and FitzGerald, R. J. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolatenfollowing proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International*. 36 : 677-683.
- Were, L., Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U. 1997. Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties. *Journal of Food Science*. 52: 821-823.

- Wu, S. U., and Brewer, M. S. 1994. Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids. *Journal of Food Science*. 49 : 702-706,738.
- Voutsinas, L. P., Cheung. E. and Nakai, S. S.1983. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatural proteins. *Journal of Food Science*. 48: 26-32.
- Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 41: 1296-1302.

ภาคผนวก

ก การทดสอบสมบัติของโปรตีน

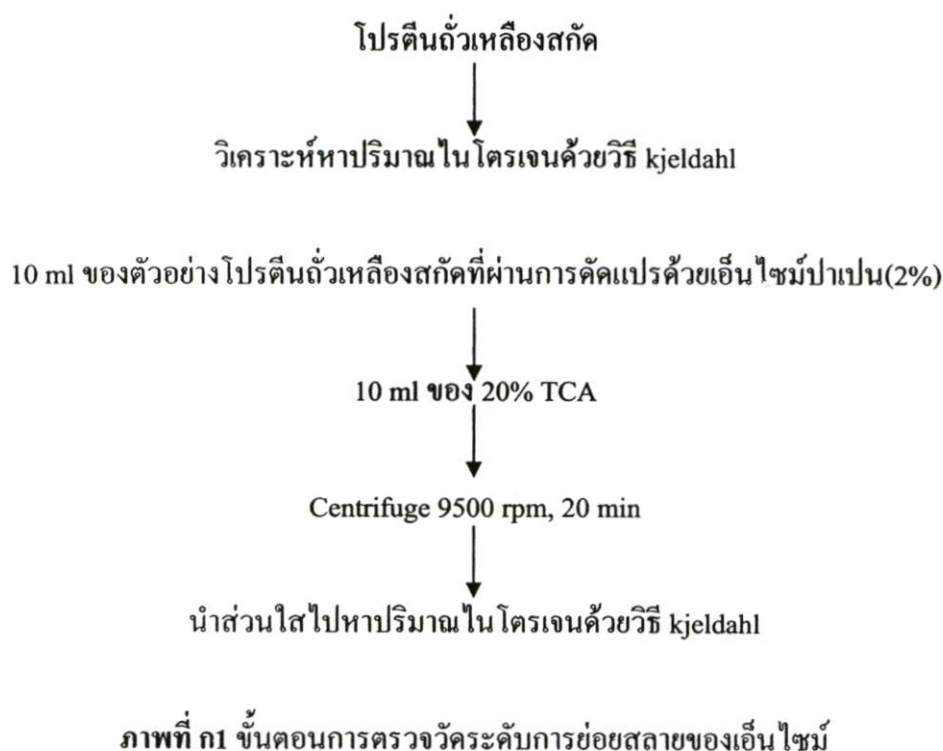
ข ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน

ค ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

ภาคผนวก ก
การทดสอบสมบัติของโปรตีน

การทดสอบสมบัติของโปรตีน

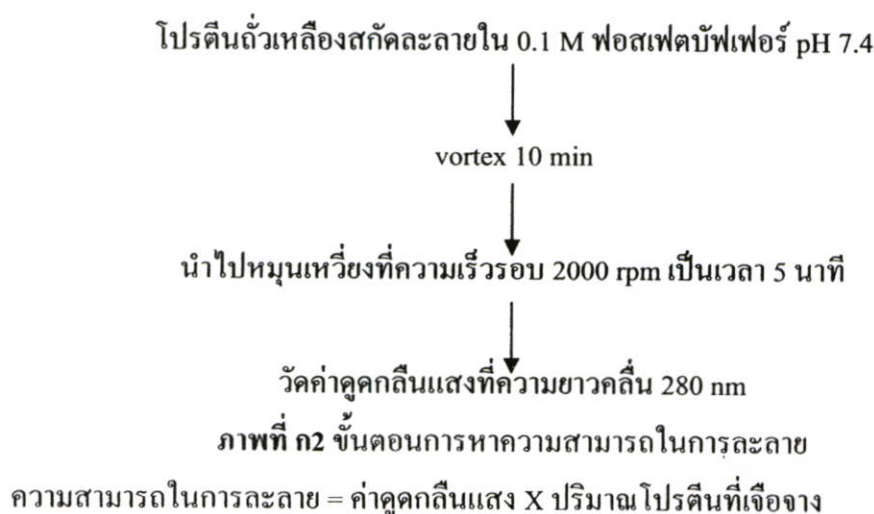
1. ระดับการย่อยสลายของเอ็นไซม์ (Degree of hydrolysis) ตามวิธีของVoutsinas และคณะ,1983



นำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ % DH (degree of hydrolysis) ด้วยสมการ

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

2. ความสามารถในการละลาย



3.ศึกษาองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

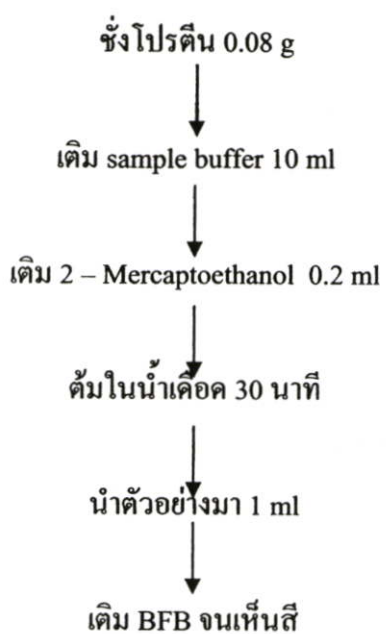
ทำการแยก subunit ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอ็นไซม์ และใช้ Standard Weight Marker เป็นตัวเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ subunit

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE

A solution	
Acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHONH}_2$)	29.2 g
N, N – Methylene – bis (acrylamide)	0.8 g
adjust with distilled water to	100 ml
B solution	
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	18.17 g
0.4% SDS	0.4 g
adjust with distilled water to	100 ml
C solution	
0.5 M Tris-HCl	6.06 g
0.4% SDS	0.4 g
adjust with distilled water to	100 ml
D solution	
10% Ammonium persulfate	0.5g
Water	5ml
E solution Electrophoresis buffer pH 8.4	
0.025 M Tris-HCl	3 g
0.192 M glycine	14.4 g
0.1% SDS (1% w/v)	1 g
adjust with distilled water to	1000 ml
BFB color	
Bromophenol Blue	1 mg
Glycerol	100 μl
Water	900 μl

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

วิธีเตรียมตัวอย่าง



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการหาเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน

การเตรียมเจล

Sepating Gel (12.5%)	
A sol ⁿ	7.5 ml
B sol ⁿ	4.5 ml
Distilled H ₂ O	6.0 ml
D sol ⁿ	0.07 ml
Temed	0.01 ml

Stacking Gel (4.4%)	
A sol ^a	0.9 ml
C sol ^a	1.5 ml
Distilled H ₂ O	6.0 ml
D sol ^a	0.07 ml
Temed	0.01 ml

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมสารละลาย separating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด electrophoresis จากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
2. เตรียมสารละลาย stacking gel
3. เทน้ำออกจากผิวหน้าเจลที่แข็งตัวแล้ว rinse ผิวหน้าเจลด้วย stacking gel หนึ่งครั้ง จากนั้นเทส่วน stacking gel จนเต็ม เสียบ comb พักไว้ให้เจลแข็งตัว
4. คึงcomb ออก ถ้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างด้วย electrophoresis buffer

การทำ Electrophoresis

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

การย้อมสีแผ่นเจล

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

ขั้นตอนการย้อมสีแผ่นเจล

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

การอบเจล

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

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

1. เตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

Stock PBS solution

Solution A : 26.81g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 500 ml

Solution B : 13.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 500 ml

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

เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงเป็น 10 เท่า

2. 2.5mM ABTS

0.0137 g ใน 10 ml PBS

3. Metmyoglobin reagent

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

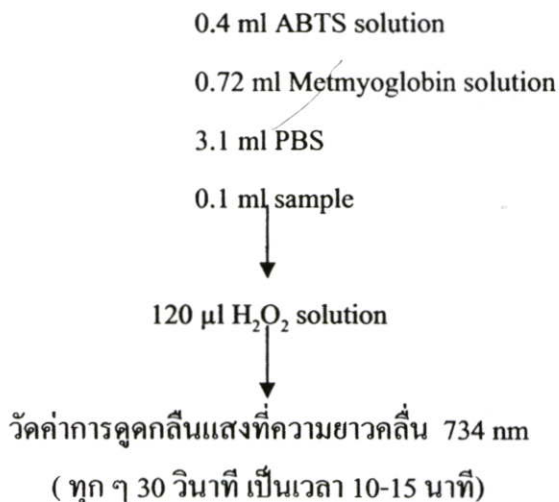
3b. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 0.0122g ใน 200 ml PBS

4. Hydrogen Peroxide solution

0.091 ml ของ 30% H_2O_2 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ml

5. เตรียมโปรตีน 1, 3 และ 5 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 100 ml.

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตามสมการ

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - [(\text{abs sample} / \text{abs control}) \times 100]$$

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

เตรียมสารเคมี ดังนี้

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

วิธีเตรียมตัวอย่าง

0.5 ml sample
 0.5 ml linoleic acid in ethanol 99.5%
 1.0 ml phosphate buffer pH7
 0.5 ml distilled water

↓

เก็บอย่างควบคุมอุณหภูมิ 40°C

↓

Reaction mixture

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา

0.1 ml reaction mixture
 0.1 ml ferrous chloride solution
 0.1 ml ammonium thiocyanate
 9.7 ml ethanol 75%

↓

เขย่าให้เข้ากัน

↓

วางทิ้งไว้ 3 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

ภาพที่ ก5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการยับยั้งปฏิกิริยาออก ไดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก

นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาการต้านปฏิกิริยาออก ไดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก มาคำนวณตามสมการ

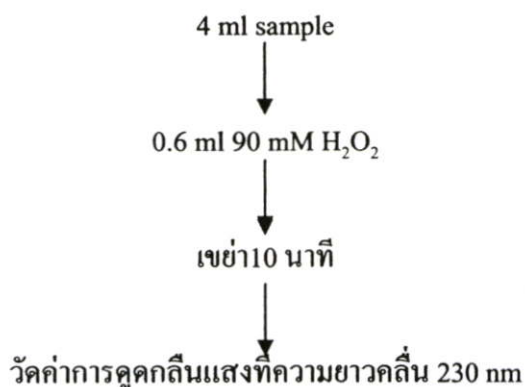
$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{(\text{sample abs 96 hr} / \text{sample abs 0 hr}) \times 100}{(\text{control abs 96 hr} / \text{control abs 0 hr})}$$

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

เตรียมสารเคมี ดังนี้

1. H_2O_2 ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์
 ปิเปต H_2O_2 ความเข้มข้น 30% มา 0.92 ml ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml
2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
3. เตรียมโปรตีน 0.5 0.7 และ 1 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 100 ml.

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 66 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามสมการ

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - [(\text{abs sample}/\text{abs control}) \times 100]$$

ภาคผนวก ข

ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์สมบัติโปรตีน



ภาพที่ ข1 Centrifuge Beckman Coulter



ภาพที่ ข2 Eppendorf Centrifuge



ภาพที่ ข3 Spectrophotometer



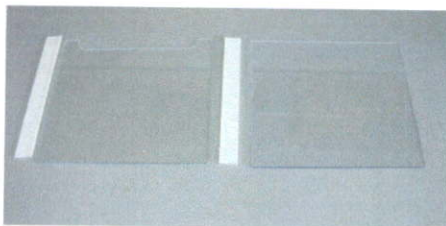
ภาพที่ ข4 Hoefer miniVE Vertical
Electrophoresis System



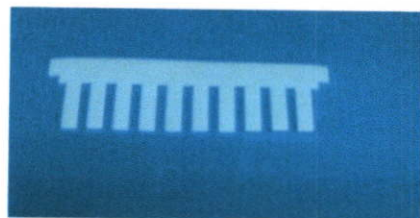
ภาพที่ ข5 Electrophoresis Power Supply EPS 301



ภาพที่ ข6 Eazy Breeze Drying Frame



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



ภาคผนวก ค
ตารางวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

Oneway ANOVA (Duncan)

antioxidant ABTS of soy protein isolate and vitamin C

treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
SPI 0.1%	3	2.8600			
SPI 0.3%	3		5.1233		
SPI 0.5%	3			7.8333	
VitaminC 0.1%	3				100.0000
VitaminC 0.3%	3				100.0000
VitaminC 0.5%	3				100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant H₂O₂ of soy protein isolate and vitamin C

treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
SPI 0.1%	3	2.6300			
SPI 0.3%	3		7.0067		
SPI 0.5%	3			11.3767	
VitaminC 0.05%	3				100.0000
VitaminC 0.07%	3				100.0000
VitaminC 0.1%	3				100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of soy protein isolate and vitamin C

treatment	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
SPI 0.1%	3	2.7700					
SPI 0.3%	3		4.6933				
SPI 0.5%	3			7.7633			
VitaminC 0.1%	3				93.2600		
VitaminC 0.3%	3					95.8300	
VitaminC 0.5%	3						97.4433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

%DH of Papain

เวลาที่ใช้ในการตัดแปร (นาที)	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
15	3	77.0713	
30	3		88.6320
60	3		89.2742
Sig.		1.000	.839

antioxidant ABTS of Papain

treatment	N	Subset for alpha = .05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
0.1% SPI	3	2.8600								
0.3% SPI	3		5.1233							
0.5% SPI	3			7.8333						
0.1% 15 Pa	3				34.4667					
0.1% 30 Pa	3				34.8133					
0.1% 60 Pa	3				36.5867					
0.3% 15 Pa	3					56.6400				
0.3% 30 Pa	3					57.3000				
0.3% 60 Pa	3						60.1667			
0.5% 15 Pa	3							69.0467		
0.5% 30 Pa	3							69.9100		
0.5% 60 Pa	3								72.1867	
Sig.		1.000	1.000	1.000	.075	.547	1.000	.432	1.000	

solubility of Papain

เวลาที่ใช้ในการตัดแปร (นาที)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
0	3	4.8200		
15	3		9.1433	
30	3			9.4900
60	3			9.5100
Sig.		1.000	1.000	.673

Antioxidant H₂O₂ of Papain

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	2.6300									
0.3% SPI	3		7.0067								
0.5% SPI	3			11.3767							
0.1%15Pa	3				18.7800						
0.1%30Pa	3				19.1733						
0.1%60Pa	3					22.2533					
0.3%15Pa	3						32.4867				
0.3%30Pa	3						33.8800				
0.3%60Pa	3							36.6133			
0.5%15Pa	3								50.5700		
0.5%30Pa	3									53.7000	
0.5%60Pa	3										57.3767
Sig.		1.000	1.000	1.000	.597	1.000	.069	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of Papain

		Subset for alpha = .05								
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1% SPI	3	2.7700								
0.3% SPI	3		4.7433							
0.5% SPI	3			7.7633						
0.1% 15 Pa	3				22.4400					
0.1% 30 Pa	3					26.1100				
0.1% 60 Pa	3					26.5733				
0.3% 30 Pa	3						35.2800			
0.3% 15 Pa	3						35.5767			
0.3% 60 Pa	3							37.8533		
0.5% 15 Pa	3								41.6533	
0.5% 30 Pa	3								42.0767	
0.5% 60 Pa	3									47.5467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.196	.403	1.000	.236	1.000

% DH of Alcalase

เวลาที่ใช้ในการตัดแปร (นาที)	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
15.00	3	54.4733		
30.00	3		63.7467	
60.00	3			70.0033
Sig.		1.000	1.000	1.000

Antioxidant ABTS of Alcalase

treatment	N	Subset for alpha = .05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.1% SPI	3	4.0533										
0.3% SPI	3	5.0933	5.0933									
0.5% SPI	3		6.3433									
0.1%15Al	3			20.3033								
0.1%30Al	3				24.3600							
0.1%60Al	3					33.3367						
0.3%30Al	3						38.9100					
0.3%15Al	3							41.6133				
0.3%60Al	3								43.1733			
0.5%15Al	3									49.5833		
0.5%30Al	3										51.4900	
0.5%60Al	3											57.7633
Sig.		.269	.186	1.000	1.000	1.000	1.000	.103	1.000	1.000	1.000	

Antioxidant FTC of Alclase

treatment	N	Subset for alpha = .05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.1% SPI	3	1.2500								
0.3% SPI	3		2.1000							
0.5% SPI	3			4.0433						
0.1%15Al	3				25.4933					
0.1%30Al	3					34.1833				
0.3%15Al	3					34.2033				
0.1%60Al	3						39.2533			
0.5%15Al	3						39.9900			
0.3%30Al	3							42.8300		
0.5%30Al	3								44.3933	
0.3%60Al	3								44.8633	
0.5%60Al	3									47.7900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.958	.060	1.000	.220	1.000

Solubility of Succinylation

เวลาที่ใช้ในการตัด แปรรูป (นาที)	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
0	3	4.8200				
15	3		7.7100			
30	3			9.7233		
60	3				11.3100	
120	3					14.5100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant ABTS of Succinylation

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	4.7067									
0.3% SPI	3		7.8400								
0.5% SPI	3			10.8133							
0.1%120Suc	3				16.5267						
0.1%15Suc	3				17.0867						
0.1%30Suc	3					20.5600					
0.3%15Suc	3					20.8400					
0.3%30Suc	3						24.8200				
0.3%120Suc	3						24.9300				
0.1%60Suc	3						25.5467				
0.5%120Suc	3							28.0133			
0.5%15Suc	3							29.5767	29.5767		
0.1%60Suc	3								30.9233		
0.3%60Suc	3									34.3967	
0.5%60Suc	3										44.4833
Sig.		1.000	1.000	1.000	.533	.755	.447	.088	.140	1.000	1.000

Antioxidant H₂O₂ of Succinylation

		Subset for alpha = .05									
treatment	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.1% SPI	3	2.9033									
0.3% SPI	3	5.1333	5.1333								
0.5% SPI	3		7.0033								
0.1%15Suc	3			11.9600							
0.1%120Suc	3			12.5400							
0.3%120Suc	3				19.1900						
0.3%15Suc	3				19.3667						
0.1%30Suc	3					27.0400					
0.5%120Suc	3						30.5667				
0.1%15Suc	3						31.8600				
0.1%60Suc	3						32.3033				
0.3%30Suc	3							37.3967			
0.5%30Suc	3								50.2467		
0.3%60Suc	3									53.5500	
0.5%60Suc	3										62.2933
Sig.		.078	.137	.639	.886	1.000	.190	1.000	1.000	1.000	1.000

Antioxidant FTC of Succinylation

treatment	N		Subset for alpha = .05									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0.1% SPI	31.2900											
0.3% SPI	3	2.6533										
0.5% SPI	3		4.2167									
0.1%120Suc	3			14.7833								
0.1%15Suc	3			15.6567								
0.3%120Suc	3				19.9100							
0.3%15Suc	3					22.0700						
0.1%30Suc	3					22.2800						
0.5%120Suc	3						24.3733					
0.5%15Suc	3							28.1733				
0.5%30Suc	3							28.2767				
0.3%30Suc	3							28.3800				
0.1%60Suc	3								34.7300			
0.3%60Suc	3									36.0167		
0.5%60Suc	3										42.6100	
Sig.	1.000	1.000	1.000	.132	1.000	.712	1.000	.733	1.000	1.000	1.000	1.000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์
วัน เดือน ปี เกิด	12 กรกฎาคม 2526
สถานที่เกิด	จ.ตรัง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	104/1 ถ.พัทลุง ต.ทับเที่ยง อ.เมืองตรัง จ.ตรัง 92000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมแปรรูปอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง