

การสกัดและการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนจากโอคารา
ISOLATION AND STUDY ON CHARACTERIZATION OF OKARA PROTEIN

นัชชา สุพิชฌายากร
NASHA SUPITCHAYANGKON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-324-113-2

การสกัดและการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนจากโอคารา

ISOLATION AND STUDY ON CHARACTERIZATION OF OKARA PROTEIN

นัชชา สุพิชญางกูร

NASHA SUPITCHAYANGKOON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน **45642**
วัน, เดือน, ปี **12 ก.พ. 2546**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-324-113-2

ISOLATION AND STUDY ON CHARACTERIZATION OF OKARA PROTEIN

NASHA SUPITCHAYANGKON

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 LANDKRABANG

2002

ISBN 974-324-113-2

COPYRIGHT 2002

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนจากโอคารา
นักศึกษา	ณัชชา สุพิชญางกูร
รหัสประจำตัว	43066013
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2545

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร.ยุพร พิษกมฺพร

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นในโอคาราที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (4, 8 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราสด) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (1 และ 2 ชั่วโมง ที่ 80 องศาเซลเซียส) ต่อปริมาณโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ พบว่า โอคาราแห้งที่ได้จากการอบโอคาราสดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้น 4 หรือ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาสกัดโปรตีนพบว่า มีผลผลิตไม่แตกต่างจากโอคาราสด การเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 1 เป็น 2 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ แต่การใช้เวลาในการสกัดหรือการทำแห้งวัตถุดิบให้มีความชื้นตามต้องการ ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ให้ความร้อนกับโปรตีน การศึกษาพบว่า ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อค่า Surface hydrophobicity (S_0) โดยการอบแห้งโอคาราจากโอคาราสด เป็นโอคาราแห้ง และการเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 เป็น 2 ชั่วโมง ทำให้ค่า S_0 สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับความร้อนในกระบวนการอบแห้งและการสกัด ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว ส่วน hydrophobic ที่อยู่ภายในจึงออกมาอยู่ที่ผิวมากขึ้น ความสามารถในการละลายของโอคาราโปรตีนที่ได้จากโอคาราสดเมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า S_0 ต่ำสุด จะมีความสามารถในการละลายสูงสุด ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดมีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการอุ้มน้ำของโอคาราโปรตีน โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้งดูดซับน้ำได้น้อยกว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสด และโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถดูดซับน้ำได้น้อยกว่าตัวอย่างที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามคุณสมบัติด้านการดูดซับน้ำมัน พบว่า โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำมันได้มากกว่าโอคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ ความคงตัวของฟองเมื่อใช้โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราแห้งจะมากกว่าตัวอย่างที่ใช้โอคาราโปรตีนที่เตรียมจากโอคาราสด เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่

ของโศคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่างๆกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และคุณสมบัติด้านความสามารถในการเกิดฟองและความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีนดีกว่าของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า

ผลการวิเคราะห์ subunit ด้วย SDS -PAGE พบว่า subunit ของโปรตีนที่สกัดจากโศคาราไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า นอกจากนี้ subunit ของโศคาราโปรตีนที่สกัดเมื่อใช้โศคาราแห้งหรือโศคาราสด ทั้งที่ระยะเวลาการสกัด 1 และ 2 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโศคาราโปรตีนพบว่ามีโปรตีน 56 - 60 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรต 38 - 40 เปอร์เซ็นต์ และมีเถ้า 3 - 4 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่า คาร์โบไฮเดรตคงจะอยู่ในรูปที่จับกับโปรตีน (Protein - polysaccharide conjugated) ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนของโศคาราโปรตีนพบว่า โศคาราโปรตีนมีชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็นเช่นเดียวกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า โศคาราโปรตีนมีปริมาณ Cystenine และ Threonine สูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่า กรดอะมิโนในส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น Cystenine , Methionine และ Tyrosine ซึ่งมีอยู่ในปริมาณต่ำโดยธรรมชาติของโปรตีนถั่วเหลือง

Thesis Title	Isolation and Study on Characterization of Okara Protein
Student	Ms. Nasha Supitchayangkoon
Student ID	43066013
Degree	Master Of Science
Programme	Food Science
Year	2002
Thesis Advisor	Dr.Yuporn Puechkamut

ABSTRACT

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

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

Functional properties of okara protein and conventional soy protein isolate (SPI) were compared. The result showed that there was no different in funtional properties of

okara protein and SPI. However, Foaming activity and FBC of okara protein were better than those of SPI.

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

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก ดร.ยุพร พิชกมุทร ที่ได้ให้เกียรติเป็น อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น แนวทางการแก้ปัญหาและให้ความช่วยเหลือในทุกด้านแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ระติพร หาเรือนกิจ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม และ รศ.ดร.วรรณาดังเจริญชัย คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่อง เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ตลอดจนให้ข้อคิด มุมมอง และแนวทางอันก่อประโยชน์แก่ข้าพเจ้าในการศึกษาค้นคว้า จัดทำวิทยานิพนธ์จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ ดร.ปาริฉัตร หงสประภาส คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ปัญหาแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ บริษัท แลคตาซอล จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์หากถั่วเหลืองในการวิจัย มาโดยตลอด เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำหนังสือและเอกสารต่างๆ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมืออุปกรณ์ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นที่เคารพรักยิ่ง รวมทั้งน้องๆ ที่ได้ให้ความรัก ให้กำลังใจ และสนับสนุน ช่วยเหลือในทุกด้าน ตลอดจน เพื่อนๆ รุ่นพี่ รุ่นน้อง ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ณัชชา สุพิชญางกูร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3. ขอบเขตของการศึกษา.....	2
1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1. การผลิตน้ำมันถั่วเหลือง.....	4
2.2. การผลิต Soy protein isolate.....	4
2.3. ไอคารา (Okara).....	7
2.4. การเก็บรักษาไอคารา.....	9
2.5. การผลิต Okara protein isolate.....	10
2.6. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
3.1. วัตถุประสงค์.....	41
3.2. อุปกรณ์ในการผลิตโปรตีนสกัด.....	42
3.3. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์.....	43
3.4. สถานที่ทดลอง.....	45
3.5. วิธีการดำเนินงาน.....	45

บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	48
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง.....	62
	ข้อเสนอแนะ.....	64
	บรรณานุกรม.....	66
	ภาคผนวก.....	71
	ภาคผนวก ก ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีน.....	72
	ภาคผนวก ข แผนภูมิแสดงวิธีวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่.....	75
	ภาคผนวก ค ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) ในกรณี วิเคราะห์ interaction.....	83
	ภาคผนวก ง ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ CRD ของแต่ละ ปัจจัย.....	87
	ภาคผนวก จ การวิเคราะห์องค์ประกอบของไอคาราโปรตีน.....	91
	ประวัติผู้เขียน.....	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน โยอาหารและคาร์โบไฮเดรต ต่อน้ำหนักแห้งของ โศคารา.....	7
ตารางที่ 2 องค์ประกอบ กลีโอะแรว และวิตามินที่พบในโศคาราที่เตรียมจากถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์.....	8
ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้และส่วนผลพลอยได้.....	11
ตารางที่ 4 กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (g/16 g.N) และความสามารถของร่างกาย ในการย่อยโปรตีนจากโศคาราโปรตีนไอโซเลต.....	12
ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราที่สภาวะการสกัดต่างๆ (เปอร์เซ็นต์ ต่อ 100 กรัมของแข็งในตัวอย่าง).....	48
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ค่า Surface Hydrophobicity ของโปรตีน.....	50
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการละลายของโปรตีน.....	50
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน.....	51
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันจากโปรตีน.....	52
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน.....	53
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความคงตัวของฟอง.....	53
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน.....	54
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความสามารถในดูดซับน้ำมันของโปรตีน.....	54
ตารางที่ 14 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในโศคารา.....	58
ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนสกัดจากโศคาราและโปรตีนสกัดทางการ ค้าต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง.....	59
ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดทางการค้า	61

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ pH ต่างๆ.....	11
ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ความสามารถในการขุ่นน้ำด้วยวิธี microcentrifuge.....	22
ภาพที่ 3 ภาพแสดงชั้นต่างๆในการสูญเสียความคงตัวของอิมัลชัน	27
ภาพที่ 4 ภาพแสดงความคงตัวของอิมัลชันที่เกิดจากแรง electrostatic.....	28
ภาพที่ 5 แสดงส่วนของโมเลกุลโปรตีนในส่วนของ Disperse และ Aqueous phase.....	29
ภาพที่ 6 แสดง steric effect ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนที่อยู่ผิวสัมผัสของเม็ดไขมัน.....	29
ภาพที่ 7 ภาพแสดงโครงสร้างการเกิดฟองของโปรตีน.....	34
ภาพที่ 8 ภาพแสดงวิธีการวัดความคงตัวของฟอง.....	35
ภาพที่ 9 Nibem Technique การวัดความคงตัวของฟองด้วย conducting needle.....	35
ภาพที่ 10 การวัดความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองด้วย electrode ...	36
ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากโอคารา.....	46
ภาพที่ 12 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์).....	56
ภาพที่ 13 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์).....	57
ภาพที่ 14 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีน (โอคาราสด).....	58
ภาพที่ 15 HR 73 Halogen Moisture Analyzer	73
ภาพที่ 16 Hammer Mill.....	73
ภาพที่ 17 Homogenizer	73
ภาพที่ 18 Homogenizer Probe S25N 10 G.....	73
ภาพที่ 19 Ultrasonic VC 750	73
ภาพที่ 20 Eppendorf Centrifuge.....	73
ภาพที่ 21 Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis system	74
ภาพที่ 22 Electrophoresis Power Supply EPS 301	74
ภาพที่ 23 Matched glass plates for Hoefer miniVE electrophoresis systems , Spacer , Comb.....	74
ภาพที่ 24 Easy Breeze Drying Frame	74
ภาพที่ 25 Easy Breeze Gel Dryer	74
ภาพที่ 26 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน.....	76
ภาพที่ 27 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน.....	77

ภาพที่ 28	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีน.....	78
ภาพที่ 29	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน.....	79
ภาพที่ 30	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน.....	80
ภาพที่ 31	ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีน.....	81
ภาพที่ 32	ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน.....	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่เป็นที่นิยมบริโภคและนำไปใช้ประโยชน์ในประเทศแถบเอเชีย เนื่องจากถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีราคาต่ำกว่าเนื้อสัตว์ อีกทั้งยังสามารถย่อยได้ง่ายกว่าเนื้อสัตว์ มีการนำถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น น้านมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าฮวย ผลิตเป็นโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soy protein concentrate, SPC) โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate, SPI) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และนำไปเป็นอาหารสัตว์

ในกระบวนการผลิตน้านมถั่วเหลือง เมื่อทำการสกัดแยกส่วนของแข็งที่ละลายน้ำได้แล้ว เหลือส่วนที่เป็นกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต โดยมากจะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่กากถั่วเหลืองหรือโอคารา (okara) ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้านมถั่วเหลืองนั้น ยังคงมีโปรตีนและสารอาหารอื่นๆอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยทั่วไปในการผลิตถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคาราสดประมาณ 1.1 ปอนด์ มีโปรตีนประมาณ 25 – 28 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 11 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันมีการใช้โอคาราเป็นอาหารสัตว์ ใช้เลี้ยงไหม ใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงในผลิตภัณฑ์เซรามิก ใช้ทำอาหารหมัก เช่น นัตโต โคจิ เทมเป หรือเติมในผลิตภัณฑ์อาหารอบ ผลิตบิสกิต snack bar การแยกโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้เพื่อนำมาผลิตเป็นสาร emulsifier นอกจากนี้ยังมีการผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปของสารที่ได้จากการหมักเพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อรา มีผลในการต้านโรคในพืช การผลิตสารลดแรงตึงผิว การผลิตกรดซิตริก

soy protein isolate เป็น food ingredient ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท และในหลายคุณลักษณะตามแต่คุณสมบัติของ soy protein isolate นั้นๆที่ผลิตขึ้นในทางการค้าซึ่งมีการปรับปรุงคุณลักษณะต่างๆให้เหมาะสมกับคุณสมบัติที่ผลิตภัณฑ์นั้นต้องการ เช่น ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ ไล้กรอก เพื่อเพิ่มคุณสมบัติในเรื่องการอุ้มน้ำหรือใช้เป็น emulsifier หรือใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรส เพื่อเพิ่มรสเนื้อสัตว์ และมีการใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นๆอีกมาก การผลิต soy protein isolate จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ดจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง การผลิตจากกากที่ได้จากกากบีบ น้ามันหรือสกัดน้ามันออกแล้วโปรตีนจะได้รับผลกระทบจากกระบวนการให้ความร้อนในการผลิตน้ามันซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติ ทำให้คุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไป การใช้โอคาราซึ่งเป็น by product จากการผลิต น้านมถั่วเหลืองจะเป็นการลดต้นทุน

การผลิตและกระบวนการในการให้ความร้อนไม่รุนแรงเหมือนการสกัดน้ำมันออกจากถั่วเหลือง และยังเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีอีกด้วย O'Toole (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ค่า Protein Efficiency Ratio (PER) พบว่า โอคารามีค่า PER สูงถึง 2.71 ซึ่งสูงกว่าถั่วเหลืองเล็กน้อย (PER 2.51) อย่างไรก็ตาม แรงกลและความร้อนมีผลต่อคุณลักษณะและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน การใช้โอคาราเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาจทำให้คุณสมบัติของ protein isolate ที่ได้แตกต่างจากที่ผลิตจากถั่วเมล็ดหรือกากน้ำมัน จึงควรที่จะทำการศึกษาถึงคุณสมบัติทั้งทางเคมีกายภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ okara protein isolate ที่ผลิตได้ นอกจากนี้โอคาราสดมีความชื้นสูงมาก (80%) ซึ่งเป็นปัญหาต่อการเก็บรักษาโอคารา การศึกษาผลของการอบแห้งโอคาราต่อผลผลิตและคุณลักษณะของโปรตีนที่สกัดได้จึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจ

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของปริมาณความชื้นของโอคาราที่มีผลต่อการสกัดโปรตีนจากโอคารา
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ okara protein isolate ที่สกัดจากโอคาราที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

1.3. ขอบเขตของการศึกษา

ขอบเขตของการวิจัยนี้จะครอบคลุมเนื้อหาของกระบวนการผลิต okara protein isolate รวมถึงการศึกษาวิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ประกอบด้วย

1. ทดลองหาวิธีการในการผลิต okara protein isolate ตามวิธีของ Ma และคณะ (1997) โดยใช้โอคาราจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง และทำการปรับปรุงวิธีการผลิตให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่ใช้ เพื่อให้การสกัดโปรตีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด
2. ศึกษาถึงผลของปริมาณความชื้นของโอคาราที่มีต่อการสกัดโปรตีน โดยทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณความชื้นของโอคาราและเวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีนที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้
3. ศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดที่ผลิตได้จากโอคาราเทียบกับโปรตีนสกัดทางการค้า โดยทำการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญ

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือจากกระบวนการการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง
2. ทราบถึงกระบวนการผลิตที่เหมาะสมในการผลิต okara protein isolate
3. ทราบถึงวิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน
4. เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์โปรตีนที่ผลิตได้จากโอคารา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. การผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

การผลิตน้ำมันถั่วเหลืองตามวิธีพื้นบ้าน จะทำการแช่ถั่ว บดและกรองเอาน้ำมันถั่วเหลืองออกมา แล้วจึงนำไปต้ม ซึ่งน้ำมันถั่วเหลืองที่ได้จะมีกลิ่นแรง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ lipooxygenase ซึ่งภายหลังได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโดยใช้อุณหภูมิสูงในการบดเพื่อทำลายเอนไซม์ lipooxygenase ทำให้กลิ่นลดลง การผลิตในระดับอุตสาหกรรม จะทำการบดถั่วเหลืองโดยใช้อุณหภูมิสูงเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipooxygenase และทำการจำกัดอากาศเพื่อไม่ให้เกิดการหืนของน้ำมันในถั่วเหลือง มีการเติม Sodium bicarbonate เพื่อปรับปรุงกลิ่นรส ถั่วบดที่ได้จะนำมาทำการแยกส่วนของน้ำมันโดยใช้ decanter centrifuge เพื่อแยกส่วน okara ออก และจะนำมามันกับน้ำเพื่อทำการสกัดอีกครั้ง น้ำมันที่แยกได้จะนำมาให้ความร้อนเพื่อทำการยับยั้งการทำงานของ trypsin inhibitor จากนั้นจะนำมาทำให้เย็นใน vacuum chamber โดยจะทำการกำจัดกลิ่นและอากาศออก จากนั้นจะทำการผสมส่วนประกอบอื่นแล้วทำการบรรจุ (Liu, 1997)

2.2. การผลิต Soy Protein Isolate

โดยทั่วไปการผลิต soy protein isolate สามารถผลิตได้จากถั่วเหลืองทั้งเมล็ด โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีส่วนของไขมันรวมอยู่ด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมจะทำการผลิตจากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิต Protein isolate มีหลายวิธี ดังนี้

2.2.1. กรรมวิธีการผลิตที่ใช้ในทางการค้า

การผลิตโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองจะผลิตจากกากที่ได้จากการสกัดน้ำมัน โดยใช้สารละลายต่าง (pH 7 – 10) ในการสกัดโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำสามารถแยกออกโดยการเหวี่ยงเพื่อให้ส่วนคาร์โบไฮเดรตนั้นตกตะกอนออกมา จากนั้นจะนำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาทำการตกตะกอนโปรตีนที่ isoelectric point (pH 4.5) และทำการแยกส่วนโปรตีนที่ตกตะกอนโดยใช้ mechanical decanting จากนั้นจะทำการล้างตะกอนและทำการ neutralized ให้มี pH ประมาณ 6.8 – 7.0 และทำการ spray – dried โดยผลิตภัณฑ์ที่

ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงและมีกลิ่นฉุนน้อยมาก และหากทำการผลิตโปรตีนโดยภายหลังการตกตะกอนโปรตีนและล้างโปรตีนแล้วไม่ทำการ neutralized จะได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูป isoelectric form

2.2.2. การแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในถั่วเหลืองเป็น globulin ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำเกลือ โปรตีนส่วนที่เหลือประกอบด้วย เอนไซม์, hemagglutinins, trypsin inhibitors และ lipoproteins การแยกโปรตีนอาจใช้วิธีการ Ultracentrifugation และ Sucrose density gradient centrifugation ส่วนองค์ประกอบหลักที่แยกได้จะแยกตามน้ำหนักโมเลกุลในหน่วย kDa ตามความสามารถในการตกตะกอน ดังนี้

2S fraction (8 – 22 kDa)	22 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด
7S fraction (180 – 210 kDa)	37 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด
11S fraction (ประมาณ 350 kDa)	31 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด
15S fraction (ประมาณ 600 kDa)	11 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด

ส่วนของ 7S (β - conglycinin) และ 11S (glycinin) เป็นส่วนขององค์ประกอบหลักในโปรตีนถั่วเหลือง และจากความแตกต่างของคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ globulin เหล่านี้ เช่น ความสามารถในการละลายและ isoelectric point จึงมีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อทำการเตรียมโปรตีนที่ประกอบด้วย 7S และ 11S สูงได้ (Kinsella, 1979)

2.2.3. การใช้ membrane ในการผลิตโปรตีนสกัด

Hensley และ Lawhon (1979) ใช้วิธีการ Ultrafiltration และ Diafiltration หลังจากกระบวนการสกัดตามปกติ เพื่อทำการแยกส่วนของโปรตีนออกจากสารละลายที่สกัดได้ อีกวิธีหนึ่งคือ Ultrafiltration – reverse osmosis และ Diafiltration ซึ่งอาจใช้ในการผลิตโปรตีนสกัดจาก Defatted soy flake (Lawhon et al, 1977) Ultrafiltration ใช้หลักการในการแยกโปรตีนด้วยขนาดโมเลกุล ส่วนกระบวนการ reverse osmosis ส่วนใหญ่จะใช้ในการทำให้ส่วนที่กรองได้มีความเข้มข้นมากขึ้น วิธีการ Diafiltration ใช้ร่วมกับการแยกโดยการใช้ membrane เพื่อทำให้เกิดสิ่งสกปรกที่ผิวหน้า membrane น้อยที่สุดในระหว่างการกรอง

โปรตีนที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีนี้จะละลายได้ดี เนื่องจากไม่ผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยกรดและการ neutralized ซึ่งเป็นกระบวนการที่ส่งผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง

2.2.3. Aqueous Extraction

Lawhon และคณะ (1981) ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้น้ำเพื่อทำการผลิต soy protein concentrate และ soy protein isolate ในกระบวนการจะนำถั่วเหลืองที่แห้งมาทำการบดเพื่อลดขนาดและทำการสกัดโปรตีนโดยใช้น้ำที่มี hydrogen peroxide (เพื่อทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase) ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9 จากนั้นจะนำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ใส่ใน three phase centrifuge เพื่อแยกส่วนของสารละลายโปรตีน อิมัลชันของไขมันและส่วนของใยอาหารที่เป็นกากออกจากกัน ส่วนของอิมัลชันจะนำไปทำให้แยกตัวออกเพื่อแยกส่วนของน้ำมัน และส่วนของสารละลายที่ได้จะนำไปทำการผลิตโปรตีน โดยการตกตะกอนด้วยกรด ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจาก spray – dried จะมีส่วนของไขมันอยู่ประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์

2.2.5. Salt Extraction

กระบวนการการผลิตโปรตีนโดยใช้เกลือในการสกัด ใช้ในการผลิต soy protein isolate โดยใช้เกลือที่มีความแรงของประจุ 0.3 – 0.6 M pH 5.0 – 6.0 ส่วนที่สกัดได้จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ ultrafiltration และทำการเจือจางให้มีความแรงของประจุน้อยกว่า 0.2 M เพื่อให้เกิดชั้นของโปรตีน (Protein micella) ซึ่งสามารถแยกส่วนของโปรตีนออกมาได้และนำไปทำแห้ง

2.2.6. Separation of Intact Protein Bodies

ส่วนของโปรตีนสะสมของถั่วเหลืองคือส่วนของโปรตีนใน Cotyledons ส่วนของโปรตีนที่สามารถแยกออกจากองค์ประกอบของเซลล์ได้โดยการบดและทำการแยกโดยใช้ density floatation แยกโปรตีนตามความหนาแน่นโดยใช้สาร Polyhydric alcohols, sodium chloride, sucrose และ alkali metal salts ของ organic acid เพื่อทำให้มีความหนาแน่น 1.2 – 1.5 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยโปรตีนที่แยกได้จะนำมาทำการล้างด้วยแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองได้รับผลกระทบจากปัจจัยหลายตัว เช่น การให้ความร้อนกับกากถั่วเหลือง กระบวนการในการสกัดไขมัน ขนาดของอนุภาค อุณหภูมิ อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อกาก ในการเตรียมกาก

มีการใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัดโปรตีนจากกากที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว โดยตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำ น้ำผสมสารละลายต่างเจือจาง (pH 7 – 9) หรือสาร

ละลายของเกลือ (0.5 – 2 M) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนและเนื่อง จากตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลายเจือจาง โปรตีนที่ได้จึงไม่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ

อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อกากถั่วเหลือง โดยมากจะใช้อัตราส่วนกากถั่วเหลือง 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 10 ส่วน หรือ 1 ต่อ 40 ส่วน ซึ่งในอัตราส่วน 1 ต่อ 40 อาจทำให้ได้ผลผลิตสูง แต่ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายที่ได้จะต่ำ ซึ่งจะพบปัญหาในการแยกส่วนของโปรตีน ส่วนอุดมหมู่ในการสกัดโปรตีน โดยมากจะทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังมีการทำการ สกัดโปรตีนที่อุณหภูมิตู้เย็น ซึ่งประโยชน์ที่ได้คือสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ใน กระบวนการ cryoprecipitation ของ crude 11S protein การสกัดที่อุณหภูมิห้อง (25 องศา เซลเซียส) จะได้ส่วนของ 11S มาก แต่ถ้าทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนของ 11S ส่วนใหญ่จะสูญเสียไป (Wolf, 1978)

2.3. โอคารา (Okara)

โอคาราหรือกากถั่วเหลือง เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่ได้จากกระบวนการกรองแยกนํ้านม ถั่วเหลือง เป็น by product ของกระบวนการผลิตนํ้านมถั่วเหลืองและเต้าหู้ จากการรายงานของ O'Toole (1999) ในโอคาราแห้งจะประกอบด้วยโปรตีน 25.4 – 28.4 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 9.3 – 10.9 เปอร์เซ็นต์ โยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ 40.2 – 43.6 เปอร์เซ็นต์ โยอาหารที่ละลายน้ำ 12.6 – 14.6 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ 5.3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในรายงานของ Hackler และคณะ (O'Toole, 1999) รายงานว่า ในการผลิตนํ้านมถั่วเหลือง 1 ปอนด์ จะได้โอคาราประมาณ 1.1 ปอนด์ มีความชื้น 76 – 80 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 3.5 – 4.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเป็นของแห้งจะ ประกอบด้วยโปรตีน 23.6 – 24.0 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 8.1 – 15.2 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลเปรียบเทียบองค์ประกอบโดยประมาณที่มีผู้ทำการทดลองไว้ดังตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน โยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต ต่อนํ้าหนักแห้งของโอคารา¹

โปรตีน	ไขมัน	โยอาหาร	คาร์โบไฮเดรต	อ้างอิง
24.0 (18.2 – 32.2)	15.2 (6.9 – 22.2)	14.5 (9.1 – 18.6)	-	Broune et al. (1976)
25.4 – 28.4	9.3 – 10.9	52.8 – 58.1	3.8 – 5.3	Van der Reit et al. (1989)
26.8 ± 1.0	22.3 ± 1.5	-	-	Guermani et al. (1992)
26.8	12.3	-	52.9	Ma et al. (1996)

¹O,Toole (1999)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบ กลีโอะแร่ และวิตามิน ที่พบในโอคาราที่เตรียมจากถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ (ต่อน้ำหนักแห้ง)

Proximate Composition, g/100g							
Cultivar	Protein ^a	Oil	CHO	Phytic Acid	Insoluble Fiber	Soluble Fiber	Total Fiber
Edgar	28.4	9.6	5.3	0.5	42.0	14.6	56.6
Hutton	25.4	10.9	3.8	1.2	43.6	14.5	58.1
Prima	26.2	9.3	4.6	0.9	40.2	12.6	52.8

^aKjeldahl nitrogen × 5.71

Minerals and Vitamins, mg/100g							
Cultivar	Ash	Ca	Mg	Fe	Na	K	Cu
Edgar	3200	260	163	6.2	16.2	1046	1.1
Hutton	3700	428	158	7.2	19.1	1094	1.1
Prima	3000	286	165	8.2	18.4	1233	1.2

	Zn	Mn	P	Thiamin	Riboflavin	Nicotinic Acid
Edgar	3.8	2.5	396	0.59	0.04	1.01
Hutton	3.5	3.1	444	0.49 ^b	0.03	0.82
Prima	6.4	2.3	407	0.48	0.03	1.04

^bO'Toole (1999)

นอกจากโอคาราจะอุดมไปด้วยโยอาหารแล้ว ยังประกอบด้วยโปรตีนคุณภาพดีอีกด้วย O'Toole, 1999 ได้รายงานถึงการวิเคราะห์ค่า protein efficiency ration (PER) พบว่าโอคารามีค่า PER สูงถึง 2.71 ในขณะที่ถั่วเหลืองมีค่า PER 2.51 เต้าหู้ 2.20 และนํ้านมถั่วเหลือง 2.11 จะเห็นได้ว่าในโอคารามีอัตราส่วนของโปรตีนที่มีคุณภาพอยู่สูง (Liu, 1997)

นอกเหนือประโยชน์จากโปรตีนในโอคาราแล้ว Maeda และคณะ (1998) ได้ทำการแยก hemicellulose ซึ่งเป็น คาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ โดยคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้เมื่อใช้ในการเพิ่มความหนืดในสารละลายจะให้ความหนืดของสารละลายต่ำ ซึ่งมีการนำ hemicellulose ที่แยกได้นี้มาใช้ในการเพิ่มความคงตัวของโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรด เช่นในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว

ทางด้านผลิตภัณฑ์หมัก มีการใช้โอคาราในการผลิตอาหารเช่น natto และ tempe ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับการผลิตจากถั่วเหลืองเมล็ด นอกจากการผลิตเป็นอาหารแล้ว ในการหมักโอคาราด้วยจุลินทรีย์บางชนิดยังได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น สารที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant Iturin A ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราจากโรคพืชได้ okaramine A และ B ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าแมลง surfactin ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว การผลิตกรดซิตริก

มีการใช้โอคาราในการลดต้นทุนในอาหารสัตว์ โดยใช้ในการเลี้ยงหนอนไหม ทำให้ตัวอ่อนเจริญดีและไม่มีโรค นอกจากนี้ในญี่ปุ่นยังมีการใช้โอคาราในการเพิ่มความคงทนในผลิตภัณฑ์เซรามิกด้วย (O'Toole, 1999)

นอกเหนือจากประโยชน์ทางด้านต่างๆนี้ ยังพบปัญหาในการเก็บรักษาโอคาราสด เนื่องจากโอคาราสดมีปริมาณความชื้นสูง รวมทั้งมีปริมาณโปรตีนสูง ทำให้เน่าเสียอย่างรวดเร็ว Kato และคณะ (1986) พบว่าสามารถป้องกันการเสื่อมเสียของโอคาราจากจุลินทรีย์ได้โดยใช้ lactic acid bacteria โดยทำการเติม dried lactic acid bacteria 10^6 /กรัม ลงในโอคาราที่มีกลูโคส 1% และทำการเก็บในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เกิดการหมักเกิดกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ของโอคาราลดลงต่ำกว่า 4.2 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้ 4 วันหรือนานกว่านั้น นอกจากนี้ยังมีการเก็บในรูปของโอคาราแห้งที่ผ่านการอบโดยใช้ลมร้อน ทำให้สามารถเก็บโอคาราได้นานยิ่งขึ้น

2.4. การเก็บรักษาโอคารา

การทำน้ำนมถั่วเหลืองจะทำการแยกส่วนที่เป็นของเหลว โอคาราที่เหลืออยู่จะมีความชื้นสูง ซึ่งปริมาณน้ำจะขึ้นอยู่กับการดึงน้ำออกจากกาก โอคาราจะเน่าเสียอย่างรวดเร็วเพราะมี water activity สูง Kato และคณะ (1986) จึงพยายามที่จะหาวิธีป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์โดยใช้ lactic acid bacteria การเติมโยเกิร์ตและ dried acid bacteria ลงในโอคารา โดยอาจเติมหรือไม่เติม 1% glucose โดยทำการทดสอบเก็บในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (facultatively anaerobic) ในสภาวะที่มีอากาศ โอคาราจะเกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็ว ถ้าเก็บโอคาราในถุง polyethylene หรือขวด screw-cap ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเกิดการหมักกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ของโอคาราลดลงต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้ 4 วัน หรือนานกว่านั้น การใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น dried lactic acid bacteria โดยเฉพาะการใช้ *Lactobacillus plantarum* จะดีกว่าการใช้โยเกิร์ต และพบว่า การที่จะป้องกันการเสื่อมเสียด้วยวิธีนี้จะป้องกันได้ดีเมื่อใช้ dried lactic acid bacteria 10^6 / g ลงในโอคาราที่มี glucose 1% และบ่มที่ 30 – 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย

กระบวนการอื่นในการป้องกันการเสื่อมเสียของโอคาราคือ การทำแห้งโอคาราทันทีภายหลังที่ได้จากการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง Muramatsu และคณะ (1995a-c) ได้ทำการศึกษาถึง dehydration และ cohesion properties ของโอคารา โดยเติม water absorbing synthetic polymer ในรูปแบบต่างๆ Hirotaka และคณะ (1987) จาก Fuji Oil Co., Ltd. ได้ทำการจดสิทธิบัตรกระบวนการทำแห้งโอคาราโดยยังคงมีปริมาณน้ำที่อยู่ภายในและมีสีขาวตามที่ต้องการ โดย

นำโอคาราสดที่มี water activity 65 – 75 % wt ป้อนใส่สายพานที่ผ่านโพรงอากาศที่อยู่เหนือเครื่องบด เมื่อโอคาราผ่านการทำให้แห้งจะตกลงสู่เครื่องบดด้วยแรงโน้มถ่วง ทำการบดโอคาราเพื่อลดขนาดอนุภาคให้เหลือ 1.5 – 13 มิลลิเมตร การใช้วัสดุที่เป็น nonstick เช่น poly (tetrafluorethylene) หรือ ceramic เคลือบด้านในของเครื่องบด จะสามารถป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและการเกิด caking

Fuchigami และคณะ (1980) แสดงให้เห็นว่าโอคาราที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 1.4 มิลลิเมตร และมีความชื้น $0.4 \text{ kg H}_2\text{O kg}^{-1}$ (dry basis) bed depth 40 มิลลิเมตร จะสามารถทำแห้งได้ตามที่ต้องการ โดยใช้ pneumatic drying system ในการทำแห้งโอคารา โดยโอคาราที่ใส่เข้าระบบในตอนแรกจะมีความชื้น 84.5% ทำแห้งโดยใช้ลมร้อน ($208 - 254^\circ\text{C}$) ลมร้อนที่ใช้จะมีความเร็วลมต่ำ (3.20 m s^{-1}) โดยความชื้นของโอคาราที่ได้จะหลากหลาย rehydration properties และ shelf life ของ โอคาราแห้งที่ประกอบด้วยความชื้น 25.3% จะมีคุณภาพดี แต่จะเก็บได้นานนัก คือสามารถเก็บได้นานครึ่งเดือนที่อุณหภูมิ 5°C ส่วนโอคาราที่มีความชื้น 7.4% คุณภาพไม่ดีนัก แต่จะสามารถเก็บได้นาน 8 เดือนที่อุณหภูมิ 5°C ค่า water activity ของโอคาราขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลาย ซึ่งในนมถั่วเหลืองจะมีต่ำ Chung และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษาวิธีการเก็บรักษาโอคาราในรูปเม็ดแห้ง โดยเม็ดโอคาราจะมีขนาด 3 มิลลิเมตร ถึง 10 มิลลิเมตร ขึ้นรูปจากโอคาราที่มีความชื้น 38% ทำให้แห้งภายใน 95 นาที ที่ 120°C ความเร็วลม 160 ft min^{-1} จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีในกระบวนการผลิตนี้

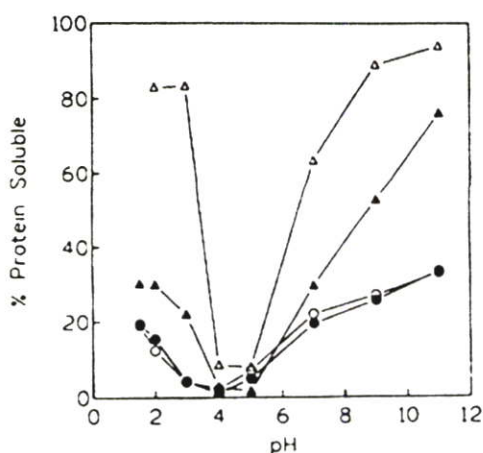
2.5. การผลิต Okara protein isolate

Ma และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาระบวนการในการเตรียม protein isolate จากโอคาราโดยการตกตะกอนที่ Isoelectric point แล้วจึงนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ protein isolate ทำการวัดค่าต่างๆ เพื่อทำการวิเคราะห์หาความเป็นไปได้ในการใช้โอคาราเป็นส่วนประกอบในอาหารต่างๆ จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ได้จากกระบวนการสกัดที่ 25 องศาเซลเซียส และที่ 80 องศาเซลเซียส พบว่าการทำการสกัดโปรตีนที่ 80 องศาเซลเซียส เฟอร์เซ็นต์โปรตีนที่ได้มากถึง 53.4 เฟอร์เซ็นต์ ส่วนการสกัดที่ 25 องศาเซลเซียส ได้โปรตีนเพียง 14.1 เฟอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH 9.0 โปรตีนสามารถละลายออกจากโอคาราได้มากที่สุด ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้และส่วนผลพลอยได้

Product	Weight (%)	Protein in solid (% N × 6.25)	Protein recovery (%)
Protein isolate (80°C)	24.3	58.8	53.4
Residue	67.8	16.5	41.8
Supernatant	7.6	13.9	3.9
Total	99.7		99.1
Protein isolate (25°C)	6.8	55.3	14.1
Residue	84.6	24.5	77.6
Supernatant	6.9	13.6	3.5
Total	98.3		95.2

Ma และคณะ (1997)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ค่า pH ต่างๆ

Δ: defatted soybean flour; ▲: Supro 610; ○: Okara protein isolate prepared at 25°C; ●: Okara protein isolate prepared at 80°C. (Ma และคณะ 1997)

ภาพที่ 1 แสดงกราฟความสามารถในการละลายของ defatted soybean flour, Supro 610 และ Okara protein isolate ทั้งที่ผลิตที่อุณหภูมิ 25 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าทุกตัวอย่างมีการละลายต่ำที่สุดที่ pH 4 – 5 ซึ่งเป็นช่วง isoelectric point ของถั่วเหลือง โปรตีนจะตกตะกอนทำให้เกิดการละลายต่ำ และจากกราฟแสดงว่า soy flour ละลายได้ดีกว่า soy protein isolate ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีนตามธรรมชาติมีความสามารถในการละลายดีกว่า protein isolate ซึ่งโปรตีนเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติในระหว่างกระบวนการผลิต

ตารางที่ 4 กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (g/16g N) และความสามารถของร่างกายในการย่อยโปรตีนจากโอคาราโปรตีนไอโซเลต^a

	PI 80°C ^a	Supro 610	FAO scoring pattern ^b
Amino acid			
Threonine	3.8	3.8	4.0
Valine	4.7	5.0	5.0
Cysteine	0.9	1.3	3.5
Methionine	1.0	1.3	3.5
Isoleucine	4.4	4.9	4.0
Leucine	8.0	8.2	7.0
Tyrosine	3.6	3.8	6.0
Phenylalanine	5.2	5.2	6.0
Lysine	6.0	6.3	5.5
Total	37.5	39.8	35.0
In vitro digestibility (%)	94.9	92.4	

^aPI 80°C : okara protein isolate prepared at 80°C

^b Values taken from FAO/WHO Joint Ad Hoc Committee (1973)

^c Ma และคณะ (1997)

จากตารางที่ 4 กรดอะมิโนที่จำเป็นที่พบใน Okara protein isolate ทั้งที่ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส พบเช่นเดียวกับใน Supro 610 ซึ่งเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ แต่ปริมาณ Cysteine และ Methionine ของ okara protein isolate ที่ทำการสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส จะต่ำกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส และใน Supro 610 แต่เมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นโดยส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ มาตรฐานยกเว้น Methionine, Cysteine และ Tyrosine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งมีอยู่ในปริมาณต่ำโดยธรรมชาติของถั่วเหลืองอยู่แล้ว ส่วน Lysine จะมีมากกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้

ส่วน เปอร์เซ็นต์ *in vitro* digestibility คือ ความสามารถที่ร่างกายจะย่อยและดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้พบว่า okara protein isolate มีค่าไม่ต่างจาก Supro 610 คือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากโปรตีน ซึ่งผลิตได้จากผลพลอยได้ซึ่งมีมูลค่าต่ำที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและเต้าหู้ Okara protein isolate มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนและร่างกายสามารถย่อยและดูดซึมโปรตีนนี้ได้ดี ถึงแม้ว่า okara protein isolate จะมีความสามารถในการละลายต่ำ แต่คุณสมบัติอื่นๆ เช่น คุณสมบัติในการเกิดอิมัลชัน การเกิดฟองและการเกาะเกี่ยวต่างๆ เทียบได้กับ soy isolate ที่มีขาย

โดยทั่วไป และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำ okara protein isolate ไปใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆได้

2.6. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบของอาหาร ทั้งในระหว่างกระบวนการเตรียม กระบวนการแปรรูป การเก็บรักษาและองค์ประกอบ รวมถึงคุณภาพและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหารด้วย คุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนในองค์ประกอบของอาหาร แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน (solubility), ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity), ความสามารถในการเกิดฟอง (foam formation) และความสามารถในการเกิดเจล 2) คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับส่วนที่ชอบไขมัน (hydrophobic) ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการดูดซับไขมัน (fat binding capacity) 3) คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไขมัน (hydrophilic – hydrophobic) เช่น คุณสมบัติในการเกิดอิมัลชัน (emulsifying properties) และความสามารถในการเกิดฟอง

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของโปรตีนและความสามารถในการเกิดปฏิกริยาร่วม (interaction) กับองค์ประกอบอื่นๆของอาหาร คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่มีต่อองค์ประกอบของอาหารเป็นผลมาจาก น้ำหนักโมเลกุล รูปร่างโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างกันของโครงสร้างของโปรตีน การกระจายตัวของประจุบนโมเลกุลของโปรตีน จำนวนและการจัดเรียงของกรดอะมิโนบนสายโซ่โพลีเปปไทด์ของโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน

นอกจากนี้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนยังขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนเอง การเกิดปฏิกริยาร่วมกับไขมัน คาร์โบไฮเดรต น้ำ ไอออน และสารให้กลิ่นรสต่างๆ

การที่โปรตีนประกอบด้วย apolar amino acid (2.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลต่อการจัดเรียงตัว (conformation) ของโปรตีน คุณสมบัติในการดูดซับน้ำ คุณสมบัติในการละลายและการเกิดเจล การที่โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุจะเพิ่ม electrostatic interaction ซึ่งจะช่วยให้โปรตีนมีความเสถียร และส่งผลต่อการดูดซับน้ำของโปรตีน นอกจากประจุของโปรตีนและความแน่นของโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนและขอบเขตที่สามารถเกิดปฏิกริยาร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆในอาหารก็มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเช่นเดียวกัน

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเป็นคุณสมบัติที่เกิดจากปฏิกิริยาหลายรูปแบบร่วมกัน โดยเน้นที่การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนที่แตกต่างกัน และระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่น และเพื่อที่จะใช้ประโยชน์จากโปรตีนจากวัตถุดิบทุกชนิดได้อย่างสมบูรณ์และเหมาะสม จึงมีความจำเป็นในการปรับปรุงโครงสร้างของโปรตีน การดัดแปรโปรตีนจะทำให้โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่เหมาะสมที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่างๆ

นอกเหนือจากความแตกต่างของโครงสร้างของโปรตีนที่ส่งผลทำให้โปรตีนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่แตกต่างกันแล้วแหล่งของโปรตีน (พืช, สัตว์) กระบวนการผลิตโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาจากปัจจัยแวดล้อม ก็ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเช่นกัน โดยปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนได้แก่ ความเป็นกรด - ด่าง, อุณหภูมิ, ความแรงของประจุ, ปริมาณความชื้น, ระดับการเกิด oxidation/reduction, แรงเฉือน (shear stress) และปัจจัยอื่นๆ

อุณหภูมิในกระบวนการผลิตส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denature) ซึ่งอาจทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการดีขึ้นหรืออาจทำให้สูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการไป ปัจจัยในการผลิตที่ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากพืช ได้แก่ สภาพแวดล้อมในการผลิต วิธีการกำจัดไขมันชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดและการทำแห้งโปรตีน การกำหนดคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ต้องการสามารถทำได้โดยการเลือกกระบวนการผลิตโปรตีนที่เหมาะสม นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในการผลิตโปรตีนได้แก่ ความร้อน การทำแห้ง การแช่แข็ง การทำ ultrafiltration การลดขนาด (comminution) การ homogenize

การทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนทำเพื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดในอาหารชนิดต่างๆ มีการใช้วิธีการต่างๆมากมายในการศึกษาถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน วิธีโดยทั่วไปที่ใช้ในการทดสอบจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง สภาพความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิ ความแรงของประจุ การได้รับแรงกลและความร้อนของโปรตีน และการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่นทั้งที่เป็นโปรตีนและไม่ใช่โปรตีน โดยในการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนวิธีที่ใช้ควรจะสามารถทำได้ง่าย (good repeatability) และสะดวกในการทดสอบ และวิธีการทดสอบจะต้องสัมพันธ์กับระบบอาหารที่ต้องการจะใช้โปรตีนนั้นๆด้วย

ในกระบวนการแปรรูปอาหาร การที่สามารถบอกถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนได้จะทำให้สามารถที่จะปรับปรุงคุณภาพของอาหารและสามารถลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้แต่อย่างไรก็ตาม การที่จะสามารถบอกถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ไม่เพียงจะต้องมีข้อมูลใน

ส่วนของโครงสร้าง ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ประจุ ความยืดหยุ่นของตัวโปรตีนเองเท่านั้นยังต้องใช้ข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมด้วย (Zayas, 1997)

พารามิเตอร์ด้านเคมีกายภาพที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากถั่วเหลืองมีดังนี้

- Purity, homogeneity and subunit composition by SDS – PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
- Amino acid composition and sequence of subunit
- Subunit, isomer and polymer molecular weights as a function of pH, ionic composition and temperature
- Association – dissociation of subunit and polymers
- Total and available SH and SS groups
- Isoelectric points of subunits and polymers
- Thermal transition points and their reversibility by DSC (Differential scanning calorimetry)
- Solubility as a function of pH, ionic composition and temperature
- Surface properties
- Optical rotation and dispersion properties
- Polarization of fluorescence properties
- Visible and UV spectroscopy properties

(Morr, 1990)

2.5.1. ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน

โปรตีนมีคุณสมบัติที่สำคัญสองประการที่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆคือ ความสามารถในการละลายและคุณสมบัติด้าน hydrodynamic ความสามารถในการละลายเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีผลต่อคุณสมบัติด้าน surface active ของโปรตีน ได้แก่ การเกิดฟอง การเกิดอิมัลชัน คุณสมบัติของโปรตีนในการจับกับไขมันและกลีโกลิน ส่วนคุณสมบัติด้าน hydrodynamic ส่งผลต่อความหนืดและการเกิดเจล คุณสมบัติด้าน surface active จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ (ชนิด), การกระจายตัว, ความยืดหยุ่นของโมเลกุลและขนาดของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้นๆ ในทางตรงข้ามปัจจัยที่ส่งผลต่อ hydrodynamic properties คือ ขนาดและรูปร่างของโปรตีน และยังขึ้นอยู่กับชนิดและการกระจายตัวของกรดอะมิโนด้วย ความสามารถในการ

ละลายของโปรตีนขึ้นอยู่กับ Surface Hydrophobicity (Protein – Protein) และ Hydrophilic group ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับน้ำ ความสามารถในการละลายของโปรตีนสามารถปรับปรุงให้มากขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนของ hydrophilic group (Vojdani, 1996)

ความสามารถในการละลายของโปรตีน เป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่อันดับแรกที่จะทำการทดสอบเมื่อมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทโปรตีนชนิดใหม่ ซึ่งความสามารถในการละลายนี้ จะมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเชิงหน้าที่ประการอื่นด้วย คุณสมบัติในการละลายได้ของโปรตีนเป็นประโยชน์ในการเลือกนำโปรตีนนั้นไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นของเหลวและผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องดื่ม

ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณสมบัติในการละลายได้ของโปรตีนได้แก่ องค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลและการจัดเรียงตัวรวมทั้งจำนวนกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโปรตีนนั้นๆ ส่วนปัจจัยภายนอกที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายได้แก่ ความแรงของประจุ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ระดับความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและสภาวะในกระบวนการผลิตโปรตีนนั้น (Zayas, 1997)

ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับค่า surface hydrophobic (protein – protein) และ hydrophilic (protein – solvent) ที่เกิดปฏิกิริยาร่วมกับน้ำ ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีนสามารถที่จะปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดยการทำให้ deamidation การเพิ่มกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็น hydrophilic, glyco- หรือ phosphate group

การกระจายตัวและอัตราส่วนของส่วนผิวที่เป็น hydrophobic และ hydrophilic เป็นปัจจัยสำคัญที่จะบ่งบอกถึงระดับของความสามารถในการละลายได้มากกว่าปริมาณ hydrophobicity โดยรวมและประจุของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Vojdani, 1996)

การรายงานถึงคุณสมบัติในการละลายของโปรตีนสามารถใช้ได้หลายค่า เช่น water-soluble protein (WSP), water dispersible protein (WDP), protein dispersibility index (PDI), nitrogen solubility index (NSI) ซึ่งโดยมากจะใช้ค่า PDI และ NSI ในการรายงานค่าความสามารถในการละลายของโปรตีน (Kinsella, 1976)

ความสามารถในการละลายของโปรตีน (Vojdani, 1996)

1. ค่า PDI (protein dispersibility index) คือความสามารถในการกระจายตัวของโปรตีนในระบบของอาหารภายในสภาวะที่ทำการทดสอบ ทำโดยการนำโปรตีน 20 กรัม ทำการผสมกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเกิดเป็น slurry จากนั้นนำมาใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการ centrifuge 10 นาที ที่ 27,000 rpm

อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส แล้วทำการแยกส่วน supernatant และ slurry อย่างละ 15 มิลลิลิตร นำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC Method)

$$\text{PDI (\%)} = \frac{\% \text{ water dispersible protein}}{\% \text{ total protein}} \times 100$$

- ค่า WDP (Water dispersible protein) เป็นค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่สามารถกระจายตัวในน้ำได้ ทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้โปรตีน 10 กรัม คนในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร

$$\% \text{ WDP} = \frac{\text{Weight of Dispersed Protein}}{\text{Weight of Sample}} \times 100$$

- Nitrogen Solubility index (NSI)

นำโปรตีนผงมาบดโดยทำการร่อนผ่านตะแกรง 100 mesh ซึ่งตัวอย่างต้องผ่านตะแกรงไม่น้อยกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่เป็น full fat sample จะทำการบดตัวอย่างให้สามารถร่อนผ่านตะแกรง 80 mesh ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่าง 5 กรัม นำมาคนในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คนเป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำของผสม 40 มิลลิลิตร มาทำการแยกตะกอนโดยทำการ centrifuge ที่ 1500 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำส่วน supernatant 25 มิลลิลิตร มาทำการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl จากนั้นทำการคำนวณหาค่า % WSN (% water soluble nitrogen) ก่อนจึงทำการคำนวณหาค่า NSI

$$\% \text{ WSN} = \frac{\text{Weight of Soluble Nitrogen}}{\text{Weight of Sample}} \times 100$$

$$\text{NSI} = \frac{\% \text{ water soluble nitrogen (WSN)}}{\% \text{ Total nitrogen}} \times 100$$

- Solubility index (SI)

ค่า Solubility Index หาจากค่าปริมาตรของ sediment (ส่วนที่ตกตะกอน) ในหน่วย มิลลิลิตรที่กั้นหลอด centrifuge ส่วนใหญ่ใช้ในการแยกเกรดของนมผง โดยนมผงที่มีค่า SI ต่ำจะมีคุณภาพดี

5. Water Soluble protein (WSP)

$$\text{WSP} = \frac{\text{Water soluble Protein}}{\text{Total sample protein}} \times 100$$

6. Percent protein solubility (%PS) หรือ % Nitrogen solubility (%NS)

$$\% \text{ PS (\%NC; PSI)} = \frac{\text{Amount of soluble protein}}{\text{Total amount of protein}} \times 100$$

7. Degree of Turbidity ทำการวัดความขุ่นของสารละลายโปรตีนที่ 500 – 540 นาโนเมตร ถ้าสารละลายโปรตีนมีความขุ่นมากแสดงว่าละลายได้น้อย

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน

● ความเป็นกรดต่าง

หากสภาวะแวดล้อมของโปรตีนส่งผลให้โปรตีนมีประจุโดยรวมเป็นศูนย์ pH จะเท่ากับ pI ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ละลายได้น้อยที่สุด แต่เมื่อ pH ของระบบสูงกว่า pI จะทำให้ประจุโดยรวมเป็นลบ หรือเมื่อ pH ของระบบต่ำกว่า pI ประจุโดยรวมจะเป็นบวก ซึ่งทั้งสองสภาวะจะส่งผลให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น เมื่อเขียนกราฟความสามารถในการละลายของโปรตีนจะออกมาในรูปแบบตัว U โดยจุดต่ำที่สุดจะเป็นจุดที่ pH เท่ากับ pI แต่เมื่อระบบเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปอาจส่งผลทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ โปรตีนเกิดการคลายตัวเนื่องจากการลดลงของ electrostatic bond ทำให้ปริมาณส่วนที่ชอบไขมัน (Hydrophobic group) เพิ่มขึ้น การละลายได้ของโปรตีนจะลดต่ำลง

● ความแรงของประจุ

กลไกของผลจากความแรงของประจุที่มีต่อความสามารถในการละลายได้ของโปรตีนไม่สามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ กลไกอาจรวมไปถึงการเกิดปฏิกิริยาของ electrostatic การเกิด salting in และ salting out ด้วย ไอออนของเกลือที่มีความเข้มข้น 0.1 – 1M อาจจะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยไอออนของเกลือจะเกิดปฏิกิริยาจับกับหมู่ที่มีประจุตรงข้ามในโปรตีน ทำให้เกิดเป็น double layer ของหมู่ ionic ซึ่งจะทำให้ electrostatic interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลง ทำให้โปรตีนสามารถละลายได้มากขึ้น (Zayas, 1997)

แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 1 M ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลง (salting out) เนื่องจาก hydrophobic interaction และการเกิด aggregation เพิ่มขึ้น และ

เกิดการขัดขวางการจับตัวของโปรตีนกับน้ำ ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ที่ความเข้มข้นของไอออนของเกลือสูง โมเลกุลของน้ำส่วนใหญ่จะจับกับไอออนของเกลือมากกว่าจับกับโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งทำให้เกิด interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน มากกว่า โมเลกุลของโปรตีนกับน้ำ ทำให้เกิดการตกตะกอน (Vojdani, 1996)

- อุณหภูมิ

โดยทั่วไปโปรตีนจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง 40-50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิของสารละลายเพิ่มสูงกว่านี้ โปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลต่อพันธะที่เป็น non-covalent ซึ่งเป็นพันธะที่ยึดโมเลกุลของโปรตีนในการเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ เช่น พันธะ hydrogen, hydrophobic และ electrostatic เมื่อโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิเกิดการคลายตัว ส่วนที่ชอบไขมัน (hydrophobic) จะเพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อยลง และเกิดการจับตัวกับระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมากขึ้นและเกิดการตกตะกอนของโปรตีน

ที่อุณหภูมิต่ำบางครั้งก็ทำให้โปรตีนไม่คงตัว โปรตีนมี hydrophobic bond เป็นพันธะที่ทำให้เกิดความคงตัวของโครงสร้างตติยภูมิ ที่อุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้ hydrophobic bond มีความแรงลดลง โปรตีนเช่น 11S globulin, gliadin และโปรตีนจากไข่และนมบางชนิดจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ทำให้โปรตีนเกิดการจับตัวกันและตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิแช่แข็ง แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนโดยมากจะมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ และที่อุณหภูมิต่ำการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยที่อุณหภูมิต่ำสามารถที่จะทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ protease ลดลงได้ (Vojdani, 1996)

สำหรับโปรตีนจากถั่วเหลือง ในกระบวนการผลิตจะมีการใช้ความร้อนทั้งความร้อนเปียกและความร้อนแห้ง ซึ่งความร้อนจะลดการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase และ trypsin inhibitor แต่การให้ความร้อนก็ส่งผลให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติและทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง นอกจากกระบวนการให้ความร้อนแล้ว ในส่วนของการสกัดด้วยตัวทำละลายและการกำจัดตัวทำละลายก็ส่งผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากถั่วเหลืองลดลงด้วย

นอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว Boatright และ Hettiarachchy (1995) ทำการทดลองพบว่า การกำจัดไขมันออกจากโปรตีนสกัด จะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากอัตราส่วนของส่วนที่มีไขมันในโปรตีนเพิ่มขึ้น

2.5.2. ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน

ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนเป็นคุณสมบัติทางกายภาพ ซึ่งบอกถึงความสามารถของโครงสร้างของอาหารนั้นในการเก็บกักน้ำไว้โดยใช้โครงสร้างสามมิติของโปรตีน ความสามารถในการอุ้มน้ำเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญในการสร้างเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้ออบและ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ การดูดซับน้ำของโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกับเนื้อสัมผัส สี และลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโมเลกุลของน้ำกับ hydrophilic group ของโปรตีนเกิดจากพันธะ hydrogen ดังนั้นความสามารถของโปรตีนในการจับกับโมเลกุลของน้ำขึ้นอยู่กับ polar hydrophilic group เช่น imino, amino, carboxyl, hydroxyl, carbonyl และ sulfhydryl group ซึ่งความสามารถในการอุ้มน้ำขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของหมู่ที่มีขั้วเหล่านี้ในสายโซ่ของโปรตีน โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีประจุมากจะสามารถดูดซับน้ำได้มาก

กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเช่น alanine และ valine สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้เพียง 1 โมเลกุล ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีขั้วสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ 2 - 3 โมเลกุล และ ionic side chain (ใน aspartic และ glutamic และ lysine) สามารถจับกับน้ำได้ 4 - 7 โมเลกุลต่อ 1 โมเลกุลของโปรตีน กรดอะมิโนแบ่งตามความสามารถในการจับกับน้ำได้ดังนี้ 1) กรดอะมิโนที่มีขั้วจะสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากที่สุด 2) กรดอะมิโนที่เป็น non - ionize สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ปานกลาง และ 3) hydrophobic group จะจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อยหรือไม่จับเลย (Zayas, 1997)

โดยทั่วไป เมื่อโครงสร้างของโปรตีนอุ้มน้ำไว้โครงสร้างจะสามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นน้ำที่จับอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน (bound water) ส่วนกลุ่มที่สองคือน้ำที่อยู่ใน protein matrix (free water) ซึ่งน้ำในส่วนนี้จะสามารถแยกออกจากโปรตีนได้

ในผลิตภัณฑ์ที่เกิดเจลเมื่อได้รับความร้อน เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และ textured soy protein mixture ต้องการความสามารถในการอุ้มน้ำในผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความชุ่มชื้น Aljawad และ Bowers (1988) ทำการทดลองพบว่า การเติมเกลือในส่วนผสมจะทำให้เจลของผลิตภัณฑ์ที่ได้แข็งมากขึ้น และมีปริมาณ bound water มากขึ้น ส่วนปริมาณ free water ลดลง ส่วนการเพิ่มปริมาณน้ำในส่วนผสมทำให้ระยะเวลาในการผลิตหรือทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดเจลนานขึ้น ทำให้น้ำที่ไหลออกจากผลิตภัณฑ์ และปริมาณ free และ bound water เพิ่มขึ้น รวมทั้งปริมาณ freezable water และปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นด้วย

วิธีวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน

1. Press method

ทำการบีบตัวอย่างที่อยู่ระหว่าง plate ที่ขนานกัน โดยใช้อุปกรณ์เช่น hydraulic press หรือ universal testing machine น้ำจากการบีบตัวอย่างจะขับด้วยกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ปริมาณของเหลวที่ออกจากตัวอย่างจะแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างหรือเป็น ปริมาณน้ำที่ออกจากตัวอย่างก็ได้ วิธีนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของตัวอย่าง เช่น โปรตีนนมเข้มข้น โปรตีนถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์เนื้อ

การคำนวณปริมาณน้ำอิสระที่ออกจากผลิตภัณฑ์ คำนวณโดย

$$\frac{\text{พื้นที่ที่เปียกของกระดาษกรอง} - \text{พื้นที่ที่ตัวอย่างถูกกดบนกระดาษ}}$$

$$\text{ปริมาณน้ำเริ่มต้นในตัวอย่าง} \times 2 \times \text{water filter paper absorbs unit area}$$

ในการทำการทดลองจะต้องใช้สภาวะในการทดสอบเดิมทุกครั้งเพื่อการเปรียบเทียบค่าที่ถูกต้อง เพราะเมื่อใช้แรงในการกดตัวอย่างที่ต่างกัน ปริมาณน้ำที่ออกจากตัวอย่างก็จะต่างกัน รวมทั้งต้องควบคุมปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาณน้ำที่เติมก่อนทำการกดตัวอย่างด้วย

2. High speed centrifugation

วิธีนี้นิยมใช้ในการวัดความสามารถในการอุ้มน้ำของ ผลิตภัณฑ์นม เช่น whey , casein, นมผง, โปรตีนถั่วเหลือง, โปรตีนไข่ขาวผง และโปรตีนจากข้าวสาลี สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างด้วย ปริมาณตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีตั้งแต่ 1.5 จน ถึง 20 กรัม แรงที่ใช้ตั้งแต่ 1,500 ถึง 190,000 g การคำนวณค่า ความสามารถในการอุ้มน้ำของ ตัวอย่างคำนวณด้วยสมการดังนี้

$$\frac{\text{สารละลายที่เติมในตัวอย่าง} - \text{สารละลายที่แยกออกมาภายหลังการหมุนเหวี่ยง}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง}} \times 100$$

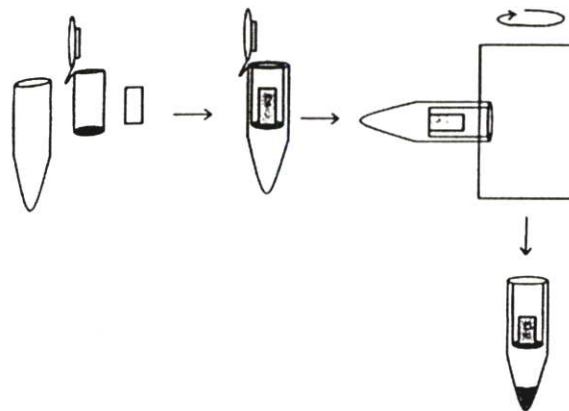
เมื่อใช้แรงในการเหวี่ยงสูงจะทำให้น้ำถูกกำจัดออกจากตัวอย่าง ในขณะที่การใช้แรงเหวี่ยงต่ำ น้ำจะยังคงถูกกักไว้ในตัวอย่าง จึงควรควบคุมแรงที่ใช้ในการเหวี่ยงให้เท่ากันทุกครั้ง ทุกตัวอย่างที่นำมาทำการเปรียบเทียบค่ากัน ความสามารถในการอุ้มน้ำของตัวอย่างจะมากขึ้นเมื่อ อุณหภูมิลดลงและเมื่อมีปริมาณเกลือในตัวอย่างเพิ่มขึ้น

3. Low speed centrifugation

วิธีการใช้แรงในการหมุนเหวี่ยงต่ำ (100 – 800 g) ใช้กับตัวอย่างโปรตีน โดยเฉพาะตัวอย่างที่เป็นเจล และทำการวัดปริมาณน้ำที่ออกจากตัวอย่างเช่นเดียวกัน วิธีนี้มีการใช้ในการ

ทดสอบตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อถั่วเหลือง และ blood plasma gel ประโยชน์จากวิธีการวิเคราะห์นี้คือ ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อย โครงสร้างของตัวอย่างไม่ถูกทำลาย ซึ่งจะตรงกันข้ามกับตัวอย่างที่ผ่านการบีบและการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ซึ่งจะเกิดการแตกของโครงสร้าง แต่การทดสอบด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำจะให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันหากปริมาณตัวอย่างมีน้อย (1 กรัม) จึงต้องใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างมาก

นอกจากนี้มีการใช้ microcentrifuge ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำ Kocher และ Foegeding (1993) ทำการวิเคราะห์โดย นำตัวอย่างเจลทรงกระบอกขนาดเล็กใส่ในเซลล์ชั้นในของ microfiltration unit จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วย horizontal rotor microcentrifuge จากนั้นนำมาทำการวัดปริมาณน้ำที่ออกจากตัวอย่าง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำด้วยวิธี microcentrifuge

4. Capillary suction methods

อุปกรณ์ที่ใช้มีหลักการคือ ยิปซัมที่มีรูพรุนจะดูดซับความชื้นจากตัวอย่างเนื้อที่ถูกกด โดยจะกดยิปซัมลงบนตัวอย่างเนื้อชิ้นเล็กๆ จากนั้นจะปล่อยช่องเหลวให้แทนที่อากาศใน overflow pipe ที่ต่อเข้ากับอุปกรณ์เฉพาะ ผลที่ได้แสดงเป็นปริมาณน้ำที่ออกมาต่อตารางเซนติเมตร หรือน้ำหนักของน้ำต่อน้ำหนักตัวอย่าง

5. Optical methods

วิธีนี้ไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยกเว้นในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ซึ่งใช้การสังเกตสีในการคัดเลือกเนื้อหมูว่า ชีด หรือนุ่ม หรือมีเลือดมากเกินไป โดยทั่วไปการเทียบสีจะทำการเทียบกับระบบสีของ International Commission on Illumination (CIE) นอกจากนี้ยังมีวิธีการใช้ Near Infra Red (NIR) ในการวัดการอุ้มน้ำของตัวอย่างเนื้อไก่วง ส่วนตัวอย่างที่เป็นเจลที่ค่อนข้างโปร่งใส อาจใช้หลักการการหักเหของแสงในการวิเคราะห์ได้

6. Microscopy

โครงสร้างของเจลสามารถที่จะวิเคราะห์ได้ด้วยการวัดการสะท้อนแสงหรือการดูดกลืนแสง และวิธีการสังเกตด้วยตาสามารถบอกได้ถึงลักษณะของการจับตัวกันของน้ำและโปรตีนรวมทั้งการกระจายตัวด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ จะทำให้ตัวอย่างโปรตีนสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น ตัวอย่างเช่น การเติมเกลือในส่วนผสมของเนื้อจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนสามารถอุ้มน้ำไว้ได้มากขึ้น

7. Special instrument(NMR, DSC, X – ray)

Nuclear magnetic resonance (NMR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นวิธีที่สามารถใช้วัดความสามารถในการอุ้มน้ำของอาหารได้ ซึ่งวิธี NMR จะสามารถให้รายละเอียดที่แม่นยำในเรื่องของโมเลกุลของน้ำได้ และ DSC สามารถวัดถึงระดับของการดูดน้ำและ/หรือ ปริมาณของน้ำที่สามารถกลายเป็นน้ำแข็ง (freezable water) ในโปรตีนได้ และอุปกรณ์เฉพาะเหล่านี้มีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้โดยทั่วไป และยังต้องการผู้ชำนาญและมีความรู้ในการใช้งาน

NMR spectroscopy ใช้ในการวัดน้ำที่ดูดซับอยู่โดยตรง โดยการ scan ผ่านตัวอย่างขนาดเล็กที่สม่ำเสมอ (โดยทั่วไปใช้ตัวอย่าง 1 – 5 กรัม ใส่ใน NMR tube) หลายร้อยครั้ง เพื่อทำให้ magnetic nuclei ของโมเลกุลของน้ำเปลี่ยนไปอยู่ในระดับพลังงานเดิม หลังจากที่ถูกกระตุ้นให้มีระดับพลังงานสูงขึ้น (โดยใช้คลื่นวิทยุที่มีความถี่สูงในสนามแม่เหล็ก) nuclei 3 ชนิดที่สามารถศึกษาได้ด้วย NMR ที่พบในน้ำคือ โปรตอน ดิวטרอนและ oxygen – 17

DSC ใช้ในการศึกษาการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) การละลายและการเกิดผลึกของไขมัน และการเกิดเจลของแป้งได้ รวมทั้งสามารถใช้วัด first – order transition (denaturing/melting) และ second – order transition (glass transition) ในอาหาร

X – ray diffraction ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างและคำนวณเปลี่ยนเป็นค่า ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนได้ มีการใช้ long – angle X-ray diffraction ในการวิเคราะห์ myofilament ที่แยกออกจากเนื้อหมูด้วย

นอกจากวิธีที่กล่าวไปแล้ว ยังมีการใช้ neutron scattering และ X-ray ในการวิเคราะห์ โมเลกุลของน้ำภายในโครงสร้างผลึกของโปรตีน สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้โปรตีนที่จะวิเคราะห์ จะต้องสามารถเกิดเป็นผลึกที่อยู่ในรูปของแห้งได้

ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน

- ความเข้มข้นของโปรตีน

ปริมาณของน้ำที่โปรตีนจะดูดซับไว้ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนนั้น โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีขั้ว นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับค่า surface hydrophobicity รวมถึงสภาวะในกระบวนการผลิตโปรตีนด้วย ซึ่งสภาวะในกระบวนการผลิตสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่น เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและน้ำได้ โปรตีนที่ได้จากสัตว์จะมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้มากกว่าโปรตีนที่ได้จากพืช อาจเนื่องมาจากการมีหมู่ amide nitrogen สูงกว่า

- ความเป็นกรด – ต่าง

ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนได้รับผลอย่างมากจากระดับความเป็นกรด – ต่าง โปรตีนจะสามารถดูดซับน้ำได้น้อยที่สุดที่ระดับ pH เท่ากับ pI เพราะประจุรวมของโปรตีนเป็นศูนย์ จะมีการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนมากที่สุด เกิดการจับตัวกับโมเลกุลของสารอื่นรวมทั้งโมเลกุลของน้ำได้น้อย การเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายโปรตีนจะทำให้ประจุบนโมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ทำให้เกิดการเปิดออกหรือปิดส่วนของโปรตีนที่จะสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้

- ความแรงของประจุ

การพองออกเมื่อดูดซับน้ำของโปรตีนขึ้นกับความแรงของประจุในระบบด้วย เมื่อมีการเติมเกลือในระบบจะส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนเพราะเกลือจะมีผลต่อ electrostatic interaction ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 2.0 M จะทำให้ bound water ลดลง และที่ความเข้มข้นของเกลือสูงมากๆ จะทำให้โปรตีนเกิดการ salting out ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนเช่นกัน

- การให้ความร้อน

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ความสามารถในการดูดซับน้ำจะลดลง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน เมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติจะทำให้โครงสร้างที่เป็นทรงกลมสามมิติของโปรตีนเกิดการคลายตัวเป็น random coil ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนจับกับน้ำได้น้อยลงกว่าเดิม

สำหรับโปรตีนจากถั่วเหลือง กระบวนการผลิตโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ในระหว่างกระบวนการสกัดและการทำแห้ง ซึ่งทำให้ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนเปลี่ยนไป การที่โปรตีนจากถั่วเหลืองมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้จึงมีการใช้โปรตีน

จากถั่วเหลืองในผลิตภัณฑ์นมมอบเพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้นในผลิตภัณฑ์ ซึ่งนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชุ่มชื้นมากขึ้นแล้วยังเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ด้วย นมบั้งที่มีการเติมโปรตีนจากถั่วเหลืองจะสามารถอุ้มน้ำได้มากกว่า นมบั้งที่ได้นุ่มกว่านมบั้งที่ไม่มีการเติมโปรตีนจากถั่วเหลือง

2.5.3. ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีน

ความสามารถในการดูดซับไขมันในอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก คุณสมบัตินี้ได้รับอิทธิพลจากโครงสร้างของโปรตีน (ขนาดของโปรตีนและช่องว่างในโครงสร้างที่สานเป็นร่างแห) รวมทั้งชนิดของน้ำมันและการกระจายตัวของน้ำมัน (ขนาดของเม็ดไขมัน, การใส่หรือไม่ใส่ emulsifying agent) การเกิดปฏิกริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนและไขมันเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อโครงสร้างของเจล รวมทั้งการกระจายตัวและ/หรือการเกิดอิมัลชันด้วย

ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีนมีความสำคัญเมื่อต้องการนำโปรตีนนั้นมาใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท fluid emulsion, powders, dairy food, ไข่กรอก, dough และนมบั้ง การจับกันระหว่างโปรตีนและไขมันเป็นคุณสมบัติที่ต้องการในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นอิมัลชัน รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเติมกลิ่นรสที่ละลายได้ในไขมัน ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน สภาวะในกระบวนการผลิตโปรตีน การเติมองค์ประกอบอื่น ขนาดอนุภาคของโปรตีน

ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีลักษณะเป็นผง การดูดซับไขมันของผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค ผงโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำและขนาดอนุภาคเล็กจะสามารถดูดซับและเก็บกักไขมันได้มากกว่าผงโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีนจากพืชจะขึ้นกับความเข้มข้นของโปรตีน จำนวนส่วนที่ไม่มีหัวโมเลกุล และความสามารถในการเกิดปฏิกริยาร่วมกันระหว่างโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต

โปรตีนที่ไม่ละลายหรือมี hydrophobic สูงจะมีความสามารถในการดูดซับไขมันได้สูง ซึ่งจะวิเคราะห์ได้จากค่า surface hydrophobicity ซึ่งจะบ่งถึงส่วนที่สามารถจับกับไขมันได้ในบริเวณผิวของโมเลกุลของโปรตีน ไขมันที่ดูดซับอยู่ที่ผิวของโปรตีนหรือส่วนที่เป็น hydrophobic จะยากในการแยกออกโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ปริมาณของไขมันที่โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถดูดซับได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น กระบวนการในการผลิตโปรตีน ความเข้มข้นของโปรตีน ขนาดอนุภาคของโปรตีน คุณสมบัติของส่วน hydrophobic โดยความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีนจากถั่วเหลืองจะเพิ่มขึ้นเมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้เกิดการเปิดออกของโครงสร้างโปรตีนส่วนที่เป็นส่วนไม่มีหัวซึ่งสามารถจับกับไขมันได้เพิ่มมากขึ้น มีการใช้ protein – liquid

complex ของโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็น emulsifier ในส่วนผสมของเค้ก นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนและไขมันในน้ำมันถั่วเหลืองจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟองเต้าหู้ (yuba)

แต่อย่างไรก็ตามการเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีนมากเกินไป อาจทำให้ความสามารถในการดูดซับไขมันลดลง เนื่องจากส่วน hydrophobic ของโปรตีนถูกทำลายไป (Zayas, 1997)

นอกจากวิธีโดยทั่วไปในการวัดน้ำหนักของน้ำมันหรือปริมาณน้ำมันที่โปรตีนตัวอย่างสามารถดูดซับไว้ได้แล้ว ยังมีการพัฒนาวิธีการในการวิเคราะห์อื่นอีกเช่น Tsutsui และคณะ (1986) ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับไขมันโดยการวิเคราะห์หาสารที่ไม่มีขั้วโดยใช้สาร Diphenylhexatriene (DPH) ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำมันข้าวโพด จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำมันในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างผสมกับน้ำมันและ DPH รวมทั้งสารที่เรืองแสง เช่น 8 - Anilino - 1 - Naphthalene Sulphonic Acid (ANS) หรือ *cis* - parinaric acid (CPA) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ด้านบนของหลอดคือส่วนของน้ำมันที่ไม่ถูกดูดซับ ส่วนด้านล่างจะเป็นตัวอย่างกับน้ำมัน และทำการวัดค่า Fluorescence intensity (FI) ของชั้นตัวอย่างด้านล่าง การวัดการเรืองแสงโดยใช้สาร ANS จะให้ค่าที่ถูกต้องมากกว่าการใช้สาร CPA

2.5.4. ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนขึ้นอยู่กับความสามารถของโปรตีนในการรวมตัวกับส่วนของสารละลายและส่วนของน้ำมันในการเกิดเป็นอิมัลชัน คุณสมบัติเชิงหน้าที่ประการนี้เป็นประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภท dairy food และสารทดแทนน้ำมัน รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันของเนื้อสัตว์เช่นไส้กรอก ซึ่งต้องการความสามารถในการเกิดอิมัลชันของผลิตภัณฑ์และความรู้สึกในปากที่ดีด้วย การเกิดอิมัลชันสารที่เป็น emulsifier หรือโปรตีนนั้นจะต้องสามารถเกิดเป็นฟิล์มรอบเม็ดไขมันและทำให้แรงตึงผิวระหว่างเม็ดไขมันและส่วนที่เป็นน้ำมีค่าน้อยที่สุด (Zayas, 1997)

อิมัลชันคือการกระจายตัวหรือการแขวนลอยของของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ละลายรวมกัน อิมัลชันมี 2 ชนิดคือ water in oil emulsion (W/O) เป็นอิมัลชันที่มีน้ำกระจายตัวในไขมัน เช่น มายองเนส และเนยเหลว อิมัลชันอีกชนิดหนึ่งคือ oil in water emulsion (O/W) เป็นอิมัลชันที่มีไขมันกระจายตัวอยู่ในน้ำ เช่น นม ซึ่งเม็ดไขมันที่กระจายอยู่อาจมีขนาดตั้งแต่ 1 ไมครอนในผลิตภัณฑ์นม จนถึงมีขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอนในผลิตภัณฑ์เนื้อ (Hill, 1996)

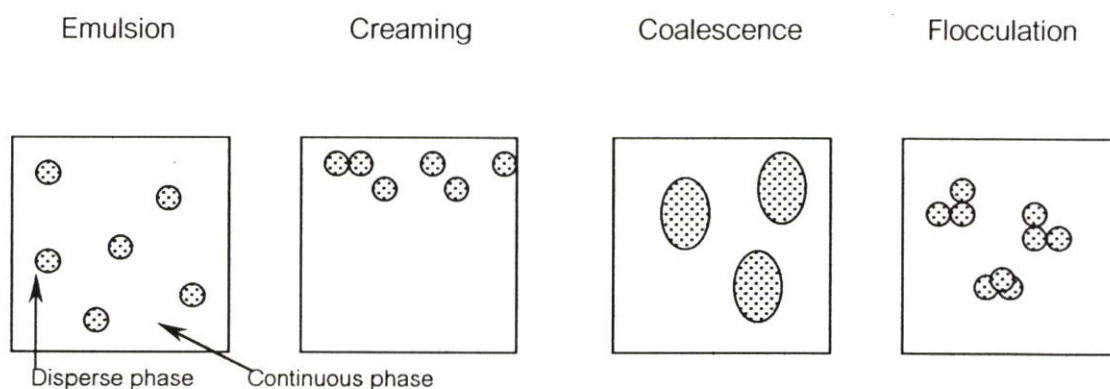
ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่า surface hydrophobicity และแรงตึงผิวมีค่าสัมพันธ์กัน โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วมากจะมีคุณสมบัติที่เกี่ยวกับค่า

surface ดี (emulsion , foaming) แต่จะเกิดเจลได้ไม่ดี hydrophobicity ของโปรตีนส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนในน้ำและส่งผลทางอ้อมกับความสามารถในการเกิดอิมัลชัน แต่ค่า surface hydrophobicity ไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่จะบอกถึงความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

Hydrophilic – Lipophilic Balance (HLB) ที่เหมาะสม บอกได้ถึงความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนด้วย ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดอิมัลชันเช่นกัน เมื่อโปรตีนละลายได้มากโปรตีนจะสามารถเกิดอิมัลชันได้มากและอิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น โปรตีนที่ไม่ละลายจะเป็น stabilizer ที่ไม่ดี เนื่องจากโปรตีนจะต้องสามารถละลายและไปจับตัวที่ผิวของเม็ดไขมันจึงจะเกิดอิมัลชันที่ดีได้ (Zayas, 1997)

โดยธรรมชาติอิมัลชันจะไม่คงตัว เมื่อเวลาผ่านไปเม็ดไขมันที่กระจายตัวอยู่จะมาชนกันและรวมตัวกันและเกิดการแยกชั้นของไขมันและน้ำ การทำให้อิมัลชัน W/O คงตัวทำได้โดยการกำหนดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคที่เป็นของแข็ง เช่นในเนย จะกำหนดขนาดของ fat crystal ส่วนใน O/W อิมัลชันการที่อิมัลชันไม่คงตัวเกิดจากการเกิด flocculation , coalescence, creaming และ oiling off ซึ่งอาจเกิดเพียงกรณีเดียวหรือเกิดหลายกรณีร่วมกัน

Flocculation คือการที่เม็ดไขมันเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ไม่แยกเป็นเม็ดไขมันเดี่ยวเมื่อผิวของเม็ดไขมันที่รวมกันอยู่แตกออก จะทำให้เกิดเป็นเม็ดไขมันขนาดใหญ่ซึ่งเรียกว่าการเกิด coalescence แต่หากส่วนที่กระจายตัวอยู่มีความหนาแน่นต่ำกว่าส่วน continuous phase จะทำให้เกิด creaming ขึ้นแทน จะไม่ใช่การเกิด coalescence (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ภาพแสดงขั้นต่างๆในการสูญเสียความคงตัวของอิมัลชัน (Hill , 1996)

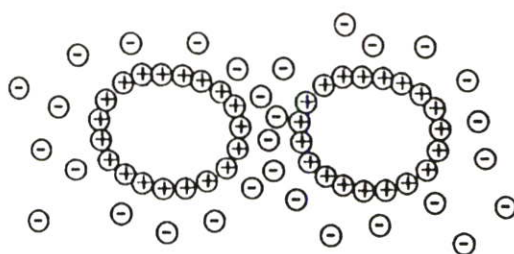
แรงที่เกี่ยวข้องในการเกิดอิมัลชัน

1. Attractive force

เม็ดไขมันที่กระจายตัวอยู่จะดึงดูดเข้าหากันด้วยแรง van der Waals การที่เม็ดไขมันดึงดูดเข้าหากันจะทำให้ฟิล์มของเหลวรอบเม็ดไขมันมันรวมตัวกัน อัตราเร็วในการที่เม็ดไขมันจะดึงดูดเข้าหากันจะขึ้นกับความหนืดของของเหลวนั้น เมื่อเม็ดไขมันเคลื่อนที่เข้าใกล้กัน จะเกิดแรงอีกแรงหนึ่งคือแรงผลักร (repulsive born force) ถ้าแรงดึงดูดที่ผิวด้านที่ใกล้กันไม่สมดุลกันกับแรงผลักรจะทำให้เม็ดไขมันรวมตัวกันและเกิด coalescence

2. Repulsive force

เพื่อให้อิมัลชันมีความคงตัว แรงที่ดึงดูดระหว่างเม็ดไขมันจะต้องสมดุลกับแรงผลักร ตามทฤษฎี DVLO (Derjaquin – Landau – Verwey – Overbeek Theory) ในเรื่องความคงตัวของอิมัลชัน แรงดึงดูดระหว่างเม็ดไขมันซึ่งเป็นแรง van der Waals จะต้องสมดุลกับแรงผลักรซึ่งเป็นแรง electrostatic ที่สามารถสร้างประจุบนเม็ดไขมันในอิมัลชันได้โดยการทำ ionization, adsorption หรือ fractional contact ในระบบอิมัลชันที่ไม่มีการใส่สารช่วยความคงตัวของอิมัลชัน (emulsifier) การใช้วิธี fractional contact ก็สามารถสร้างประจุบนเม็ดไขมันได้ แต่ถ้าในอิมัลชันมี ionic emulsifier เช่นโปรตีนดูดซับอยู่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างของเหลว จะเกิด counter ion (ประจุตรงข้าม) ในส่วน continuous phase ซึ่งจะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น ซึ่ง counter ion นี้จะล้อมรอบเม็ดไขมันและทำให้เกิด electrical double layers ซึ่งจะทำให้เม็ดไขมันไม่เคลื่อนเข้าหากันและไม่รวมตัวกัน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ภาพแสดงความคงตัวของอิมัลชันที่เกิดจากแรง electrostatic

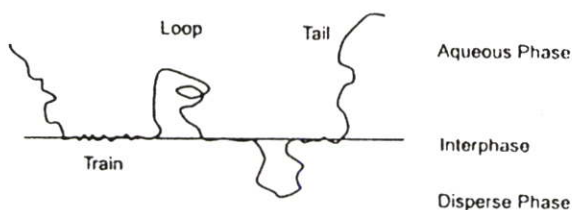
ความหนาของ electrical double layer เป็นปัจจัยสำคัญที่จะบอกถึงปริมาณของแรงผลักรที่จะเกิดขึ้น แรงนี้จะลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะห่างระหว่างเม็ดไขมัน ความหนาของ double layer ขึ้นอยู่กับ square root ของความเข้มข้นของ electrolyte ใน continuous phase ในผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่จะมีความแรงของประจุต่ำ ซึ่งอาจจะไม่เป็นประโยชน์เท่ากับการที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งช่วยทำให้กลิ่นรสเพิ่มขึ้นและสามารถควบคุมระดับ

ความเป็นกรดต่างหรือควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ได้ดีกว่า แรงผลักรวมไม่ได้เป็นผลมาจากความแรงของประจุใน continuous phase ที่ต่ำเท่านั้น แต่ pH ของระบบจะต้องห่างจาก pI ด้วย

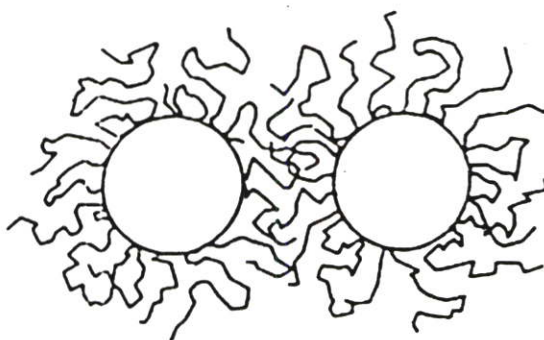
3. Steric forces

โปรตีนจะจัดเรียงตัวที่ผิวสัมผัสของ OW อิมัลชัน โดยจะหันส่วนที่เป็น hydrophobic เข้าในส่วนของไขมัน ในขณะที่ส่วน hydrophilic จะอยู่ในส่วน aqueous phase ดังแสดงในภาพที่ 5 โปรตีนที่ผิวจะยื่นออกมาจากผิวสัมผัส เมื่อเม็ดไขมันเคลื่อนเข้าหากัน ส่วนของ loops และ tails ของโปรตีนจะเกิด interaction ร่วมกันและจะเกิด steric effect ดังภาพที่ 6

แรง steric repulsive จะขึ้นอยู่กับความยาวของส่วนของโปรตีนใน continuous phase ซึ่งจะต้องยาวกว่าระยะที่แรง van der Waals ดึงดูดเม็ดไขมันเข้าหากัน ส่วนการช่วยในความคงตัวของอิมัลชัน แรงนี้จะไม่ได้รับผลจากความเข้มข้นของเกลือ



ภาพที่ 5 แสดงส่วนของโมเลกุลโปรตีนในส่วนของ Disperse และ Aqueous phase



ภาพที่ 6 แสดง steric effect ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนที่อยู่ผิวสัมผัสของเม็ดไขมัน

4. Depletion force

แรงนี้เป็น long range force ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้งแรงดึงดูดหรือแรงผลักระหว่างเม็ดไขมัน การกระจายตัวของเม็ดไขมันได้รับผลกระทบจากโพลิเมอร์ที่ไม่ได้กระจายอยู่ที่ผิวสัมผัส

ซึ่งกรณีนี้จะพบมากในอิมัลชันของอาหารที่มีความเข้มข้นของโพลิเมอร์สูง เช่นอิมัลชันที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ โพลิเมอร์ในสารละลายสามารถไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของอนุภาคอื่นทำให้เกิดผลตามมาก็คือ ทำให้แรงผลักดันมีมากขึ้น ถ้าแรงนี้อ่อนลงและโพลิเมอร์ที่ผิวสัมผัสเกิดการเคลื่อนที่ออกจากผิวสัมผัสระหว่างเม็ดไขมัน เมื่อพลังงานอิสระเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่เพียงพอสำหรับตัวทำละลายระหว่างเม็ดไขมันแล้ว และเม็ดไขมันเคลื่อนเข้ามาใกล้กัน ตัวทำละลายที่อยู่ระหว่างเม็ดไขมันจะเคลื่อนที่ออกไปผสมกับส่วนของโพลิเมอร์ เม็ดไขมันจะเคลื่อนที่เข้าใกล้กันมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้แรงระหว่างเม็ดไขมันเปลี่ยนเป็นแรงดึงดูด (attractive force)

วิธีการวัดคุณสมบัติในการเกิดอิมัลชัน

โดยมากวิธีการวิเคราะห์จะใช้สำหรับ O/W อิมัลชัน ปัจจัยที่ต้องควบคุมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ชนิดของอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตอิมัลชัน พลังงานที่ใช้ในระบบ ปริมาณโปรตีน ปริมาณของส่วนผสม ความแรงของประจุ ความเป็นกรดต่าง และชนิดของน้ำมันที่ใช้

1. การวัดขนาดเม็ดไขมัน

การวัดขนาดเม็ดไขมัน ใช้ microscopy ในการวัดการเปลี่ยนแปลงของขนาดของเม็ดไขมันกับเวลา จนกระทั่งอิมัลชันเกิด coalescence เป็นการวัดความคงตัวของอิมัลชัน วิธีการวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะทำการเจือจางอิมัลชันที่สามารถเกิดเจลได้ ทำให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆบนแผ่นสไลด์ ทำการวัดขนาดของเม็ดไขมันโดยใช้ Haemocytometer แต่วิธีนี้ทำได้ยากและผลที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงมีการพัฒนาโดยใช้ Fluorescence microscopy และ Coulter counter ในการวัดขนาดซึ่งให้ผลการทดลองที่ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามขนาดของเม็ดไขมันที่จะวัดด้วยวิธีดังกล่าวจะต้องใหญ่กว่า 10 ไมครอน หากเม็ดไขมันมีขนาดเล็กกว่า 0.1 ไมครอนจะต้องใช้วิธีอื่น เช่น dynamic light scattering ซึ่งจะไม่สามารถวัดเม็ดไขมันที่มีขนาดใหญ่ได้ วิธีที่นิยมใช้ในการวัดขนาดของเม็ดไขมันที่กระจายอยู่ใน O/W อิมัลชันคือการใช้วิธี spectroturbidity

2. Emulsifying activity (EA)

วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันทำได้หลายวิธีคือ วิเคราะห์จากขนาดของเม็ดไขมัน ที่กระจายตัวอยู่ใน disperse phase หรือแสดงเป็นค่า Emulsifying activity index (EAI) แสดงค่าเป็นพื้นที่ผิวสัมผัสต่อปริมาณโปรตีน โดยวัดจากความขุ่นของอิมัลชันที่มีความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นอกจากนี้อาจใช้ การวัดขนาดของเม็ดไขมันด้วย laser diffraction แล้วทำการคำนวณเป็นค่า EAI วิธีอื่นๆในการวัด Emulsion activity คือ การ

วัดความแตกต่างของความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลายโปรตีนและค่าการนำไฟฟ้าต่ำที่สุดของอิมัลชันในระหว่างการ homogenize 1 นาที

3. Emulsion capacity (EC)

เมื่อทำการคนสารละลายโปรตีนอย่างแรงในขณะที่เติมน้ำมัน จะทำให้เกิดอิมัลชันขึ้น จะทำการเติมน้ำมันจนกระทั่งอิมัลชันเกิดการแยกตัวออก บันทึกปริมาณน้ำมันมากที่สุดที่เติมได้ สิ่งบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของอิมัลชันเมื่อเกิดการแยกตัวได้แก่ สิ่งที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาคือเห็นน้ำมันแยกออกมา หรืออิมัลชันมีความหนืดลดลง หรือเกิดการเพิ่มขึ้นของ electrostatic resistance โดยทั่วไปจะใช้วิธีสังเกตจุดยุติโดยสังเกตความหนืดของอิมัลชันที่ลดลงเนื่องจากเม็ดไขมันเกิดการรวมตัวกัน แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะต้องมีประสบการณ์และฝึกฝนในการสังเกตจุดยุติ และวิธีนี้ใช้ไม่ได้กับอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ หากทำการวิเคราะห์โดยการสังเกตน้ำมันที่แยกออกจากอิมัลชันควรเติมสารที่เกิดสีกับส่วนของน้ำมันเพื่อให้สังเกตจุดยุติได้ง่ายขึ้น

4. Emulsion stability (ES)

มีวิธีการวิเคราะห์หลายวิธี แต่โดยทั่วไปจะทำการวัดปริมาณน้ำมัน และ/หรือ ครีมที่แยกจากอิมัลชันระหว่างระยะเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิคงที่ หรือทำการวิเคราะห์โดยทำการวัดความคงตัวโดยวัดการเกิด coalescence หรือเกิด creaming ในระบบที่เป็นสารละลายเจือจางจะเกิด layer ขึ้น ซึ่งจะทำให้การผสมและเจือจางจากนั้นทำการวัดความขุ่น นอกจากนี้การเกิด creaming สามารถวัดได้ด้วยการใช้ ultrasound ซึ่งวิธีนี้สามารถที่จะวัดการเกิด creaming ได้ก่อนที่จะสังเกตได้ด้วยตา

ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน

- ความเข้มข้นของโปรตีน

ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ ฟิล์มที่เกิดขึ้นรอบเม็ดไขมันจะบางและไม่แข็งแรงทำให้อิมัลชันเกิดได้ยากและอิมัลชันที่เกิดจะไม่คงตัว เม็ดไขมันจะเกิดการเคลื่อนที่มารวมตัวกันได้ง่ายที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูง โปรตีนจะเกิดเป็น multilayer รอบเม็ดไขมัน

นอกจากความเข้มข้นของโปรตีนแล้วความคงตัวของอิมัลชันยังขึ้นอยู่กับขนาดของเม็ดไขมัน ถ้าเม็ดไขมันมีขนาดใหญ่จะเกิดการรวมตัวกันได้ง่ายกว่าเม็ดไขมันขนาดเล็ก การเพิ่มอัตราการ homogenize จะทำให้ขนาดโดยเฉลี่ยของเม็ดไขมันมีขนาดเล็ก ทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น

Crenwelge และคณะ (1974) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนจะทำให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยช่วงความเข้มข้นของโปรตีนที่ให้อยู่ระหว่าง 0.2

– 1.7 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีความเข้มข้นที่เหมาะสมแตกต่างกัน โปรตีนจากถั่วเหลืองจะมีความเข้มข้นที่เหมาะสมประมาณ 0.98 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

- ความเป็นกรด – ต่าง

โปรตีนบางชนิดสามารถเกิดอิมัลชันได้ดีที่ pH เท่ากับ pi เช่นไข่ขาวและเจลาติน แต่โปรตีนส่วนใหญ่จะสามารถเกิดอิมัลชันได้ดีที่ระดับ pH ที่ไม่ใช่ pi โดยระดับ pH จะส่งผลกระทบต่ออิมัลชัน โดยจะเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายของโปรตีน โครงสร้างและค่า surface ที่ระดับ pH นั้นๆ ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากถั่วเหลืองได้รับผลกระทบจากระดับ pH และความแรงของประจุในส่วนของสารละลายในอิมัลชัน

ในอิมัลชันที่มีความข้นหนืด ที่ระดับ pH เท่ากับ pi จะทำให้แรงผลักระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีน้อย ทำให้ฟิล์มที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรง ทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น แต่ในอิมัลชันที่เจือจาง ที่ระดับ pH เท่ากับ pi จะทำให้แรงผลักระหว่างเม็ดไขมันลดลงทำให้เม็ดไขมันเกิดการรวมตัวกัน อิมัลชันจึงมีความคงตัวต่ำ

- ความแรงของประจุ

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากถั่วเหลืองจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม NaCl โดยเมื่อเติม 0.1M NaCl ลงในระบบอิมัลชันที่ใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็น emulsifier จะทำให้ฟิล์มโปรตีนรอบเม็ดไขมันมีความแข็งแรงมากขึ้น การเติมเกลือสามารถทำให้ electrostatic interaction ลดลงและมีผลกับการกระจายตัวของโปรตีนและการคลายตัวของโมเลกุลของโปรตีนที่ผิวสัมผัสของเม็ดไขมันด้วย ซึ่งผลจากการเติมเกลือจะส่งผลต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันด้วย

- การให้ความร้อน

คุณสมบัติในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนสามารถปรับปรุงได้โดยการทำโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติโดยการใช้ความร้อน ซึ่งการเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ surface hydrophobicity ของโปรตีนด้วย

การให้ความร้อนจะทำให้โปรตีนบางชนิดมีความหนืดเพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้โปรตีนสามารถเกิดอิมัลชันได้ดีขึ้น เมื่อโปรตีนคลายตัวหมู่ที่ชอบไขมันจะเพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนสามารถจะจับกับไขมันได้มากขึ้น การเกิดอิมัลชันมีมากขึ้น

การใช้โปรตีนถั่วเหลืองในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เป็นอิมัลชันจะช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดอิมัลชันและทำให้อิมัลชันที่ได้มีความคงตัวมากขึ้น โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ใช้ในส่วนผสมของการผลิต ไส้กรอกจะช่วยอิมัลชันเกิดได้ดีขึ้น เกิดเป็นเจลที่ข้นหนืดและผลิตภัณฑ์มีการอุ้มน้ำดีขึ้น

Nir และคณะ (1994) ทำการทดลองโดยให้ความร้อนหรือใช้สารเคมี เช่น urea, guanidine.HCl กับโปรตีนถั่วเหลือง เมื่อโปรตีนได้รับความร้อนหรือเกิดการทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่เติมลงในกระบวนการผลิต จะส่งผลให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ พบว่าโปรตีนสามารถเกิดอิมัลชันได้มากขึ้น และอิมัลชันที่ได้มีความคงตัวมากขึ้น

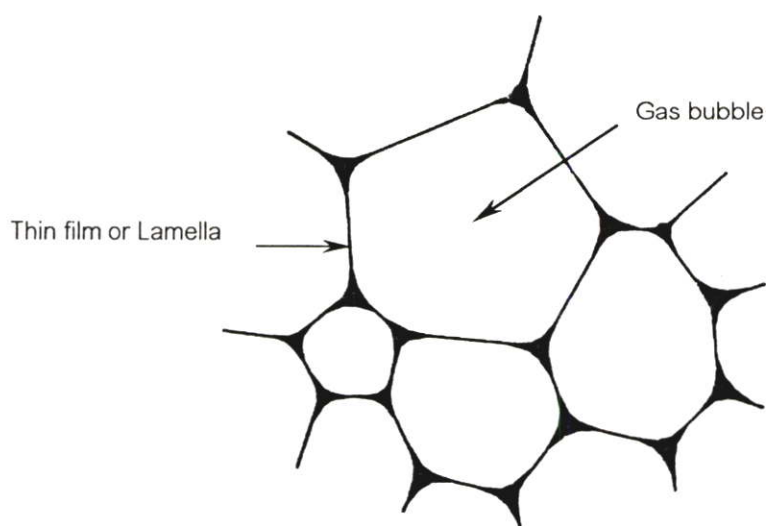
2.5.5. ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน

การเกิดฟองเป็นระบบที่ประกอบด้วยสองส่วนคือส่วนของเม็ดอากาศซึ่งจะถูกล้อมรอบด้วยส่วนของชั้นของเหลวบางๆที่เรียกว่า lamellar phase ขนาดของฟองอากาศในการเกิดโฟมจะส่งผลต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์และลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ด้วย เช่นถ้าฟองอากาศมีขนาดเล็กและกระจายตัวอย่างทั่วถึงจะทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีความนุ่มนวลและทำให้ผลิตภัณฑ์ดูมีเนื้อมากขึ้น

ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนขึ้นอยู่กับ ชนิดของโปรตีน วิธีการและความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตโปรตีน รวมถึงระดับ pH ที่เป็น isoelectric point ของโปรตีน อุณหภูมิ และความเข้มข้นของโปรตีนในการผสมส่วนผสมของผลิตภัณฑ์และวิธีการในการตีฟองด้วย

การเกิดฟองจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือ ขั้นแรกโปรตีนจะเกิดการละลายกระจายตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสของเม็ดอากาศและสารละลาย ทำให้ที่ผิวมีปริมาณโปรตีนมากขึ้นและแรงตึงผิวลดลง จากนั้นโปรตีนจะเกิดการเคลือบผิวที่บริเวณผิวสัมผัส และหันส่วนที่มีขั้วเข้าจับกับส่วนของน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วจะหันเข้าสู่เม็ดอากาศ ขั้นสุดท้าย สายโซ่ของโปรตีนจะเกิดการจับเป็นฟิล์มและจับอยู่ในส่วนผิวสัมผัสอย่างรวดเร็ว และเกิดฟิล์มที่คงตัวอุ้มอากาศไว้ภายใน (ภาพที่ 7)

หน้าที่พื้นฐานของโปรตีนในการเกิดฟองคือ เป็นตัวลดแรงตึงผิว เพิ่มความหนืดและความยืดหยุ่นของส่วนผสมสารละลายและเกิดเป็นฟิล์มที่แข็งแรง ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความสามารถของโปรตีนในการลดแรงตึงผิวที่ air – liquid interface ซึ่งแรงตึงผิวส่วนนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิของระบบสูงขึ้น แรงตึงผิวจะลดลงเนื่องจากโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Zayas, 1997)



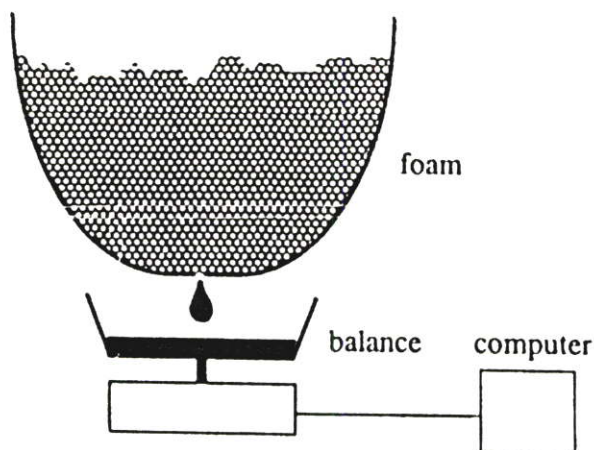
ภาพที่ 7 ภาพแสดงโครงสร้างการเกิดฟองของโปรตีน

Methods of Protein foam measurement (Wilde & Clark, 1996)

การวัดการเกิดฟองของโปรตีนทำได้ยาก โดยทั่วไปการวัดจะทำการวัดปริมาตรของฟอง ขนาดของฟองอากาศ การกระจายตัวของฟอง และช่วงเวลาความคงตัวของฟอง การวัดการกระจายตัวของฟองทำได้ 3 วิธี

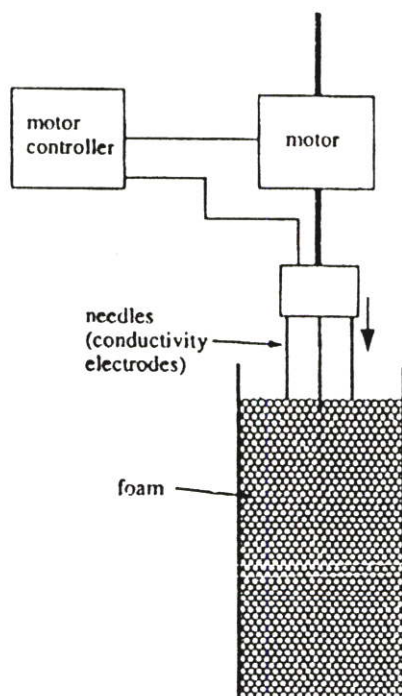
1. ทำการวัดปริมาตรของฟองที่เกิดหรือของเหลวที่ไหลออกมา (drainage) โดยกระบวนการทำให้เกิดฟองจะต้องควบคุมให้เหมือนกันเช่น เวลาในการตีฟอง ปริมาณของก๊าซที่ใส่ในตัว อย่าง โดยต้องเลือกค่าต่างๆให้เหมาะสม เพราะในระบบที่มีประสิทธิภาพสูงอาจทำให้ฟองที่เกิดล้นออกนอกภาชนะที่ใช้ทำให้วัดปริมาตรไม่ได้ หรืออาจจะเกิดฟองจนถึงระดับสูงสุดที่ภาชนะจะรับได้ก่อนที่จะครบเวลาที่กำหนดในการทำให้เกิดฟอง วิธีวัดนี้สามารถทำได้ง่ายด้วยสายตา โดยนำฟองที่ได้ใส่ในภาชนะทำการอ่านปริมาตรฟองที่เกิดขึ้น

สำหรับความคงตัวของฟอง Phillips et al 1990 ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน โดยการนำตัวอย่างมาทำการตีในเวลาที่กำหนด จากนั้นทำการวัดน้ำหนักของของเหลวที่เกิดจากการรวมตัวของฟองที่ไหลออกจากช่องที่กั้นภาชนะดังภาพที่ 8 จะทำการวัดน้ำหนักของของเหลวที่เกิดต่อเนื่องกันจนถึงน้ำหนักครึ่งหนึ่งของทั้งหมด จะใช้เป็นค่าความคงตัวของฟอง



ภาพที่ 8 ภาพแสดงวิธีการวัดความคงตัวของฟอง

นอกจากนี้ยังมีวิธีการใหม่ในการวัดปริมาตรของฟองหรือปริมาตรของของเหลวที่เกิดจากการรวมตัวของฟองคือวิธี Nibem ดังภาพที่ 9 จะทำการวัดที่ส่วนบนของฟอง โดยใช้ conducting needle ซึ่ง probe จะเคลื่อนตัวลงไปจนแตะกับผิวของฟอง เมื่อสัมผัสมอเตอร์ที่ควบคุมจะหยุด probe ในแนวตั้งฉาก เมื่อเกิดการยุบตัวของฟอง probe ก็จะมีผลลดลงไปที่ผิวของฟองที่ลดลงอีก การรายงานผลรายงานเป็นความสูงของฟองต่อเวลา แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจไม่แม่นยำ เนื่องจากการวัดพื้นผิวของฟองไม่ค่อยเรียบ



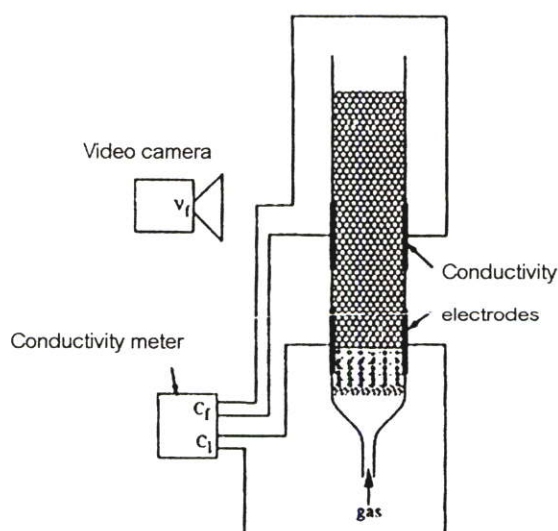
ภาพที่ 9 Nibem Technique การวัดความคงตัวของฟองด้วย conducting needle

อีกวิธีหนึ่งคือ การวัดการเปลี่ยนแปลงความดันของฟองในระบบปิดเมื่อเกิดการยุบตัวของฟองและเกิดการปล่อยความดันออกมา การเปลี่ยนแปลงของความดันของระบบจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิวของฟอง เมื่อสิ้นสุดการวัดจะทำการเติมสารที่ด้านการเกิดฟองเพื่อให้ฟองเกิดการยุบตัวทั้งหมดและวัดความดันสุดท้ายที่พื้นที่ผิวเป็นศูนย์ การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ผิวสามารถบอกถึงความคงตัวของฟองได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ NMR ในการวิเคราะห์ภาพตัดขวางของฟองและยังสามารถให้ภาพของโครงสร้างและสภาพแวดล้อมของโปรตีนในฟองได้ด้วย

- การวิเคราะห์คุณสมบัติ physico – mechanical ของฟอง คุณสมบัติทางกายภาพของฟองสามารถอธิบายได้ถึง ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง การวัดความหนาแน่นเป็นวิธีพื้นฐานในการวัดส่วนของก๊าซต่อของเหลวในฟอง ทำได้โดยนำฟองที่ได้ใส่ภาชนะที่ทราบน้ำหนักและปริมาตร จากนั้นนำไปชั่งและคำนวณเป็นค่าความหนาแน่นของฟอง

ความสามารถในการนำไฟฟ้า (conductivity) ของฟองเป็นส่วนโดยตรงกับปริมาณของเหลวในฟอง นิยมใช้ในการหาความหนาแน่นของฟอง โดยการตีฟองในหลอดที่ผนังหลอดมี electrode ติดอยู่ ทำการวัดการนำไฟฟ้าต่อเวลา โดย electrode จะ sensitive กับการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของฟองเพียงเล็กน้อย

ต่อมาภายหลังมีการพัฒนามาใช้ electrode แยกเป็น 2 คู่ เพื่อทำการการนำไฟฟ้าทั้งในส่วนของฟองและของเหลวที่เกิดจากการรวมตัวของฟอง ความหนืดของฟองจะวัดโดยใช้ standard rotational หรือ torsion wive viscometer นอกจากนี้อาจทำการวัดความแข็งแรงของฟองซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความหนืดของฟอง โดยคุณสมบัติทั้งสองนี้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของชั้นของโปรตีนที่ผิวของฟอง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การวัดความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองด้วย electrode 2 คู่

3. ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของฟองอากาศ ซึ่งสามารถอธิบายถึงการทำงานของโปรตีนในการทำให้ฟองคงตัว วิธีการวัดที่นิยมคือ การวัดขนาดของฟองอากาศเช่น การใช้ scanning electron microscopy วัดขนาดของฟองอากาศที่ผ่านการ freeze dried หรือการใช้ fiber optic probe เคลื่อนที่ผ่านฟองอากาศด้วยอัตราเร็วคงที่ ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของการสะท้อนเมื่อ probe ผ่านฟิล์มบางๆของฟอง ทำการวัดระยะทางระหว่างผิวทั้งสองด้านของฟองอากาศ นำมาคำนวณเป็นขนาดของฟองอากาศ ซึ่งวิธีนี้ probe จะต้องผ่านที่จุดกึ่งกลางของฟองอากาศแต่ละฟองซึ่งมีขนาดเล็ก ทำให้ทำการวิเคราะห์ได้ง่าย

ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน

- ความเป็นกรด – ด่าง

ถ้าสามารถที่จะควบคุมระดับ pH ของอาหารได้จะสามารถที่จะปรับปรุงคุณสมบัติในการเกิดฟองได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนจะมากที่สุดที่ระดับ pH เท่ากับ pi โปรตีนจะไปดูดซับอยู่ที่ผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับสารละลายมาก แรงดึงผิวลดลงมาก ซึ่งจะทำให้ฟิล์มที่เกิดขึ้นรอบฟองอากาศมีความหนา และมีความยืดหยุ่นดี จะได้ฟองที่มีความคงตัวมากที่สุด

- ความเข้มข้นของโปรตีน

ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนสูงโพนี่ได้จะมีความหนาแน่นมากและมีความคงตัวสูงกว่าโพนี่ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ เพราะฟิล์มที่อยู่ผิวสัมผัสมีความหนามากกว่า และฟิล์มที่เกิดขึ้นอาจจะสามารถลดการเสียน้ำออกจากโครงสร้าง lamellar ได้ทำให้ฟองมีความคงตัว

ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนจากถั่วเหลือง ขึ้นอยู่กับระดับของการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน ความยืดหยุ่นของโมเลกุล ความสามารถในการเกิดฟองจะมากขึ้นเมื่อลดองค์ประกอบที่เป็น disulfide bond ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถปรับปรุงได้โดยการใช้ความร้อนที่ 70 – 80 องศาเซลเซียส หรือทำการย่อยโปรตีนบางส่วน

2.5.6. Surface hydrophobicity

โมเลกุลของโปรตีนจะมีส่วนที่ไม่มีขั้วหรือ hydrophobic group อยู่ภายในโมเลกุลที่ทับเป็นโครงสร้างสามมิติอยู่ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของโปรตีนที่ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวหรือเปลี่ยนรูปร่างไป hydrophobic group ที่อยู่ภายในจะถูกเปิดออกทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีส่วน hydrophobic มากขึ้นซึ่งจะส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ประการ

อื่น การศึกษาถึงปริมาณ hydrophobic group ที่ผิวของโมเลกุลโปรตีนหรือการหาค่า surface hydrophobicity จึงสามารถบ่งถึงแนวโน้มของคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่นของโปรตีนได้ด้วย

การวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนโดยทั่วไปจะใช้วิธี fluorescent probe ค่าของการเรืองแสงที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับความมีขั้วของโปรตีน (Alizadeh – Pasdar and Li - Chan, 2000)

ค่า Hydrophobicity ของโปรตีนสามารถใช้อธิบายได้ถึงคุณสมบัติต่างๆของโปรตีน โดยเฉพาะ Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกริยาร่วมกันของโมเลกุลโปรตีนกับองค์ประกอบอื่นในอาหาร รวมถึง น้ำ, macromolecules (เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน) และ small molecules (เช่น เกลือ น้ำตาลและกลีเซอรอล) โดยปฏิกริยาที่เกิดขึ้นอาจเกิดในระบบโดยรวมหรืออาจเกิดที่ผิวหรือผิวสัมผัสก็ได้ (Nakai และคณะ, 1996)

Nakai & Li – Chan (1993) ทำการศึกษาโปรตีนด้วย QSAR พบว่า คุณสมบัติในการเกิดอิมัลชัน มีความสัมพันธ์กับค่า surface hydrophobicity ส่วนคุณสมบัติในการเกิดฟองของโปรตีนต้องการส่วน hydrophobic และปัจจัยที่ช่วยให้โปรตีนสามารถจับที่ผิวสัมผัสเพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางรอบฟองอากาศได้

Nir และคณะ (1994) ทำการวัดค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านความร้อนหรือการทำปฏิกริยากับสารเคมี เช่น urea พบว่าค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนที่เติม 4 M urea มีค่ามากกว่าโปรตีนตามปกติถึง 8 เท่า และโปรตีนที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่ามากกว่าถึง 6 เท่า

วิธีการวัดค่า Surface Hydrophobicity (Nakai และคณะ ,1996)

1. Hydrophobicity scales for proteins

โปรตีนที่พบในธรรมชาติประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด มีการแบ่ง scale หลายวิธีในการประเมินค่า relative hydrophobicity ของกรดอะมิโน scale แบ่งได้ตามหลักการคือ แบ่งโดยยึดหลักความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน และแบ่งตามการคำนวณโดยใช้ crystallographic หรือ ใช้ข้อมูลของตำแหน่งของอะมิโนในโครงสร้างโมเลกุล โดยสันนิษฐานว่า hydrophobic residue จะอยู่ด้านในโมเลกุล

ข้อเสียของการวิเคราะห์ด้วย hydrophobicity scales ของกรดอะมิโนในการคำนวณค่า hydrophobicity ของโปรตีนคือ ขาดการคำนึงถึงผลของโครงสร้างสามมิติของโปรตีนแต่ละชนิดที่เกิดการคลายตัวในแต่ละสภาวะได้แตกต่างกัน การคำนวณจึงผิดพลาดได้จากผลของกระบวนการผลิตที่ให้กับโปรตีนส่งผลต่อโปรตีนแตกต่างกัน

2. Binding Methods

มีหลายวิธีในการวิเคราะห์ปริมาณของส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วน hydrophobic ของโปรตีนในการวัดค่า Surface hydrophobicity สารที่ใช้ในการจับกับส่วน hydrophobic ของโปรตีนมีตั้งแต่ aliphatic และ aromatic hydrocarbon , sodium dodecyl sulfate, simple triglycerides จนถึง น้ำมันข้าวโพด โดยทั่วไปของผสมของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง กับสารที่ทำปฏิกิริยาจับกับส่วน hydrophobic จะผสมแล้วบ่มไว้ในเวลาที่กำหนด เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาร่วมกันขึ้น จากนั้นจะกำจัดสารส่วนที่เกินออกโดยใช้วิธี dialysis, การสกัด หรือ microfiltration ส่วนโปรตีนที่มีสารจับอยู่จะนำมาวัดปริมาณด้วย GC, radioactive count analysis, spectrophotometry หรือ fluorescence probe ขั้นตอนที่ต้องใช้เวลาคือ การจับของสารกับโปรตีนซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์ในการทำงานเพื่อกำหนดเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยากับสารอย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์การจับตัวของโปรตีนกับสารนี้สามารถที่จะวิเคราะห์ถึง interaction ของโปรตีนกับองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วอื่นๆในอาหาร เช่น กลีเซอรอล วิตามิน กรดไขมัน หรือ triglyceride ได้

3. Intrinsic Fluorescence

ทำการวัด fluorescence spectrum ที่มีอยู่ในโปรตีน เช่น การวัดส่วนที่เป็นกรดอะมิโนที่เป็น aromatic ของ Tryptophan, Tyrosine และ Phenylalanine ในทางปฏิบัติโดยมากจะวัด tryptophan fluorescence เนื่องจาก phenylalanine มีปริมาณน้อยและ tyrosine fluorescence เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อเกิด ionization หรือ เกิดปฏิกิริยาร่วมกับกรดอะมิโน, carbonyl หรือ tryptophan ได้ การวัดค่า fluorescence ของ tryptophan และ tyrosine จะได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมเช่น magnitude ของ fluorescence intensity โดยความยาวคลื่น emission ที่ใช้ในการวิเคราะห์สำหรับ tryptophan 3 กลุ่มที่พบในโปรตีน คือ 330 – 332 นาโนเมตร, 350 – 353 นาโนเมตร และ 340 – 342 นาโนเมตร

4. Probe spectrofluorometry

โดยมากนิยมทำการวิเคราะห์โดยใช้ anionic probes ของ aromatic sulfonic acid เช่น amphiphilic 1 – anilino naphthalene – 8 – sulfonate (ANS) หรือใช้ dimeric form bis – ANS นอกจากนี้มีการสารในกลุ่มอื่นได้แก่ cis – parinaric acid (CPA) และ trans – parinaric acid ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนและเนื้อเยื่อ ข้อจำกัดในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือ การเปลี่ยนแปลงของค่า relative fluorescence intensity ซึ่งบอกถึงค่า surface hydrophobicity นั้น มีปัจจัยที่ส่งผลคือ ระดับความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ หรือการเติมสารที่ส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติไป โดยการวิเคราะห์โดยใช้สาร ANS ช่วงความเป็นกรดต่างที่ไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

คือ 2 – 8 ส่วนการใช้สาร CPA ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจะต้องมีระดับความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5 เป็นข้อจำกัดของตัวอย่างที่ไม่สามารถละลายได้ที่ระดับความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 5

การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดย นำโปรตีนตัวอย่างมาทำการเจือจางใน 0.01 M phosphate buffer (pH 5.5 – 7.4) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.005 – 0.03 เปอร์เซ็นต์ นำโปรตีนแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร ทำการเติมสารละลาย ANS (8.0 mM ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7) หรือ CPA (3.6 m ใน absolute ethanol ที่มีส่วนผสมของ equimolar butylated hydroxytoluene) จำนวน 10 ไมโครลิตร ทำการวัดค่า Relative fluorescence intensity (RFI) ที่ความยาวคลื่น emission และ excitation ที่เหมาะสม ค่า RFI ที่วัดได้จะนำมาทำการเขียนกราฟ กับค่าความเข้มข้นของโปรตีน ค่าความชันของกราฟที่ได้คือ ค่า protein hydrophobicity

2.5.7. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีการในการศึกษาองค์ประกอบในตัวอย่างโดยทำการแยกตามขนาดโมเลกุล โดยมากจะใช้ในการศึกษาองค์ประกอบในโปรตีน SDS – PAGE เป็น denaturing gel electrophoresis เพราะ SDS เป็น denaturing agent จะไปทำลาย non – covalent bond เมื่อใส่ในตัวอย่างโปรตีนจะทำให้โครงสร้างที่เป็น globular ของโปรตีนเกิดการคลายตัวออก เมื่อทำการแยกจะเห็นเป็นแถบอยู่ภายในเจล

SDS เป็น detergent ที่มีประจุเป็นลบ (strong anion) เมื่อเกาะกับโมเลกุลของโปรตีนจะทำให้ประจุรวมเป็นลบ โปรตีนมีรูปร่างเป็น rod shape ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โปรตีนจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวกของเจล

ถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชที่มีโปรตีนสูง ประกอบด้วยส่วนของโปรตีนหลักคือ glycinin (11S) และ β - conglycinin (7S) ส่วนที่เป็น glycinin มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350,000 ซึ่งประกอบด้วย subunit อย่างน้อย 6 ชนิด ซึ่งแต่ละ subunit จะประกอบด้วย acidic polypeptide เชื่อมต่อกับ basic polypeptide ด้วยพันธะ disulfide น้ำหนักโมเลกุลของ acidic subunit อยู่ในช่วง 34,000 – 44,000 และ basic subunit น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 17,000 – 20,000 ส่วน β - conglycinin น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180,000 ประกอบด้วย subunit อย่างน้อย 4 ชนิด (α , α , β และ γ) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 42,000 – 57,000 (Sathe et al., 1987)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. วัสดุดิบ

3.1.1. กากถั่วเหลืองจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง (Okara) ของโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

3.1.2. โปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (conventional soy protein isolate) Supro EX33

3.1.3. สารเคมี

Acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$)	Sigma ^a
8 – Anilino – 1 – Naphthalene Sulphonic Acid Ammonium salt (ANS)	Sigma ^a
Ammonium Persulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma ^a
Boric Acid (H_3BO_3)	Merck ^b
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck ^b
Bromophenol Blue ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)	Merck ^b
Coom Assie Brilliant Blue R – 250	Fluka ^c
Copper (II) Sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck ^b
Disodium Hydrogen Phosphate Anhydrous (Na_2HPO_4)	Carlo ^d
Folin and Coacutheu's Phenol Reagent	Carlo ^d
Glacial Acetic acid (CH_3COOH)	Carlo ^d
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Carlo ^d
Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Sigma ^a
Hexane	Mallinckrodt ^e
2 – Mercaptoethanol (2ME)	Sigma ^a
Methanol (CH_3OH)	Lad acan ^f
N,N – Methylene – bis – Acrylamide ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)	Sigma ^a
N,N,N,N – Tetramethyl Ethylenediamine (TEMED) ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	Sigma ^a
Potassium Sulfate (K_2SO_4)	Carlo ^d
Sodium Carbonate (Na_2CO_3)	Merck ^b
Sodium Dihydrogen Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck ^b

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma ^a
Sodium Hydroxide (NaOH)	Carlo ^d
Soybean Oil	Thip ^g
Sulfuric Acid (H ₂ SO ₄)	Merck ^b
Tri – Sodium Citrate (Na ₂ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	Merck ^b
Tris (hydroxymethyl) Aminomethane (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck ^b

^a Sigma Chemical Company , USA

^b Merck, Germany

^c Fluka Chemika, Switzerland

^d Carlo ERBA Reagenti

^e Mallinckrodt, USA

^f Lab scan Analytical sciences, Thailand

^g น้ำมันพืชทิพ

3.2. อุปกรณ์ในการผลิตโปรตีนสกัด

1. บีเกอร์ 1000 มิลลิลิตร
2. Suction flask
3. Buchner funnel
4. กระดาษกรอง Whatman No. 4
5. Hot plate stirrer Thermolyne Nuova Stir Plate, USA
6. Ceramag Midi IKA[®] Works
7. pH meter MP 220 Mettler Toledo , Switzerland
8. Centrifuge Centrifon T – 42 K Kontron Instruments
9. Vacuum pump
10. หลอด centrifuge
11. ตู้อบลมร้อน
12. ตู้แช่แข็ง
13. Freeze Dryer Unitop 220SL, Virtis, USA
14. Halogen (ภาพที่ 14) HR 73 Halogen Moisture Analyzer, Mettler Toledo
15. Hammer Mill (ภาพที่ 15) Polymix PX – MFC, Klnematica AG, Switzerland
16. เครื่องชั่งชนิดละเอียด BP 221s, Sartorius
17. เครื่องชั่งชนิดหยาบ BP 3100s , Sartorius
18. Soxlet Equipment
19. Kjeldahl Equipment

3.3.5. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำ

- Eppendorf Centrifuge Universal 16, Hettich Zentrifugen
- Eppendorf tube
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด BP 221s, Sartorius

3.3.6. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity

- Magnetic stirrer Ceramag Midi IKA Works
- Homogenizer Ultra – Turrax, Janke & Kunkel, IKA Work
- Homogenizer probe S25N 10 G IKA – Dispersing Tool
- Spectrofluorometer Modle FP – 6200, JASCO, USA
- Rectangular quartz cell
- Vortex mixer VM – 300 Gemmy industrial Corp.
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด BP 221s, Sartorius
- เครื่องแก้ว

3.3.7. อุปกรณ์ในการศึกษาเปรียบเทียบ subunit ของโปรตีน โดยใช้ SDS-PAGE

- Hoefer miniVE Vertical electrophoresis system (ภาพที่ 20)
Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Electrophoresis Power Supply EPS 301 (ภาพที่ 21)
Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Matched glass plates 10 X 10.5 cm. + spacer +comb (ภาพที่ 22)
Amersham pharmacia biotech, Sweden
- Easy Breeze Drying Frame (ภาพที่ 23)
Hoefer Scientific Instruments
- Easy Breeze Gel Dryer (ภาพที่ 24)
Hoefer Scientific Instruments
- Syringe Microliter # 701 Hamilton Co., USA
- Micropipette P1000 Pipetman Gilson Medical Electronics
- Micropipette P5000 Pipetman Gilson Medical Electronics
- Micropipette Transferpette TYP Digital 20 – 100 µl Merck, Germany
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด BP 221s, Sartorius
- เครื่องแก้ว

3.4. สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการโครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5. วิธีการดำเนินงาน

3.5.1. การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสกัดจากโอคารา

จะเตรียมตัวอย่าง 3 ส่วนคือ

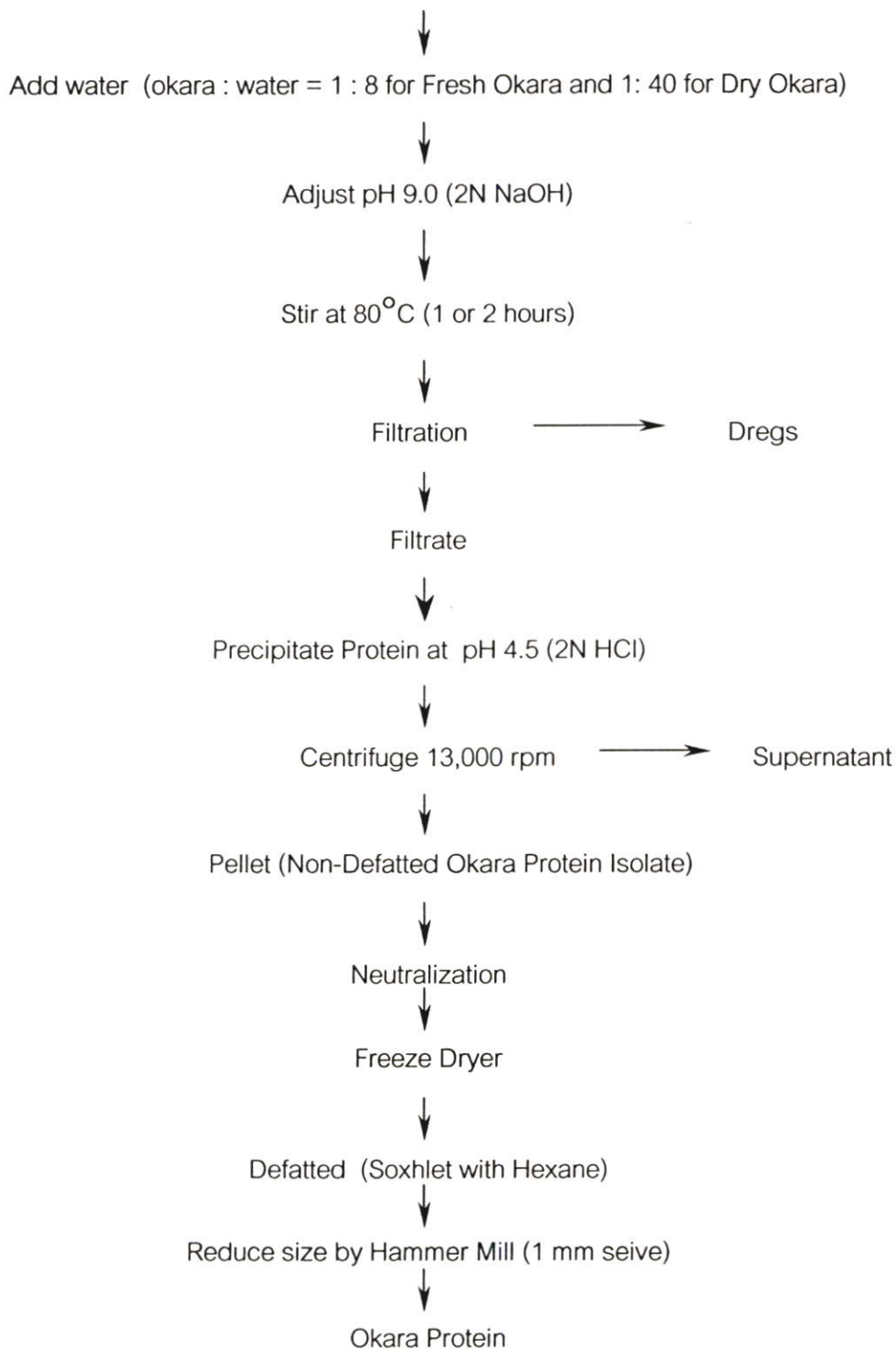
1. ตัวอย่างสด จะนำกากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานมาทำการบิบน้ำออกในรอบแรกเพื่อลดปริมาณน้ำในวัตถุดิบ จากนั้นจะทำการแบ่งเป็นส่วนส่วนละ 100 กรัม เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนต่อหนึ่งครั้งในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส
2. ตัวอย่างแห้ง จะนำกากถั่วเหลืองจากโรงงานมาทำการบิบน้ำออกเช่นเดียวกับตัวอย่างสด และแบ่งเป็นถุงเล็กๆ จากนั้นนำไปแช่แข็งเพื่อคงคุณภาพให้สม่ำเสมอ (เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่ได้รับจากโรงงานมีปริมาณมากเกินกว่าที่จะอบได้ในหนึ่งครั้ง) เมื่อทำการอบจะนำกากถั่วมาทำการละลายและนำมาบิบน้ำออกอีกครั้งเพื่อลดปริมาณน้ำ ทำให้ใช้เวลาในการอบน้อยลง จากนั้นจะนำกากถั่วเหลืองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 – 60 นาที เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณความชื้น 8 – 10 เปอร์เซ็นต์ และอบเป็นเวลา 75 – 80 นาทีเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณความชื้น 4 - 5 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างแห้งที่ได้จะทำการแบ่งบรรจุลงละ 20 กรัมเพื่อทำการสกัดโปรตีนต่อหนึ่งครั้งในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดผนึกถุงด้วยระบบสูญญากาศ

3.5.2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อผลผลิตโอคาราโปรตีนที่สกัดได้

โอคาราที่มีปริมาณความชื้น 3 ระดับ คือ โอคาราสดความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และโอคาราอบแห้งที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการสกัดโปรตีนตามวิธีการของ Ma และคณะ (1997) ดังภาพที่ 11 โดยโอคาราสดจะใช้อัตราส่วนของโอคาราสดต่อน้ำเป็น 1:8 ส่วนโอคาราแห้งจะใช้อัตราส่วนของโอคาราแห้งต่อน้ำเป็น 1:40 วางแผนการทดลองแบบ CRD และจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (3×2) ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคือ 1 และ 2 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง

ปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อผลผลิตโอคาราโปรตีนที่สกัดได้(% dry basis)โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 9.01

Raw Material (Dry Okara 4%, 8% Moisture content and Fresh Okara)



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากโอคารา

3.5.3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้

นำตัวอย่างโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 3.5.2 มาทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ และเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่กับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33)

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคารา และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีน โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 9.01

3.5.3.1. การทดสอบความสามารถละลายได้ของโอคาราโปรตีน

หาค่า Solubility index ของโอคาราโปรตีนทำได้จากวิธีการของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ 26 (ภาคผนวก ข) และนำค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่หาได้มาทำการวิเคราะห์ค่า % solubility index ดังสมการที่ 1

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

3.5.3.2. การทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน ทำการวิเคราะห์ค่า Emulsion Activity และ Emulsion Stability โดยค่า Emulsion Activity จะทำการวัดค่า Emulsion Turbidity ของอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hill (1996) ดังภาพที่ 27 (ภาคผนวก ค) และวัดความคงตัวของอิมัลชัน ดังภาพที่ 28 (ภาคผนวก ข)

3.5.3.3. การทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการเกิดฟอง (foaming) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีของ Phillips (1987) ดังภาพที่ 29 (ภาคผนวก ข)

3.5.3.4. การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีของ Quinn และ Paton (1979) ดังภาพที่ 30 (ภาคผนวก ข)

3.5.3.5. การทดสอบความสามารถในการดูดซับไขมันของโอคาราโปรตีน

ทดสอบความสามารถในการดูดซับไขมัน (fat adsorption) ของโอคาราโปรตีน โดยวิธีการของ Lin และคณะ (1974) ดังภาพที่ 31 (ภาคผนวก ข)

3.5.3.6. การทดสอบหาค่า surface hydrophobicity ของโศคาราโปรตีน

หาค่า Surface hydrophobicity ของโศคาราโปรตีน โดยวิธีการของ Voutsinas และคณะ (1983) ดังภาพที่ 32 (ภาคผนวก ข) และทำการวิเคราะห์ค่า Surface Hydrophobicity ของโปรตีนหาได้โดยการหาค่าความเข้มของกราฟระหว่าง ค่า Fluorescence Intensity กับความเข้มข้นของโปรตีนไอโซเลต (%)

3.5.4. การศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโศคารา (ภาคผนวก จ)

3.5.4.1. ศึกษา subunit ของโศคาราโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการแยก subunit ของโปรตีนโดยใช้ SDS - PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก จ) โดยใช้ 12% acylamide gel ในการแยก subunit และเติม 2 - ME (mercaptoethanol) 2% ทำการแยก subunit ของโศคาราโปรตีน เทียบกับ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และใช้ Low Molecular Weight Standard Marker เป็น ตัวอย่างในการเทียบน้ำหนักโมเลกุลของ subunit แต่ละตัว

3.5.4.2. การศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโศคาราโปรตีน

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

3.5.4.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโศคาราโปรตีน (AOAC ,1995)

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน
- วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโศคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

โศคาราที่มีปริมาณความชื้น 3 ระดับ คือ โศคาราสดความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และโศคาราอบแห้งที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการสกัดโปรตีน โดยโศคาราสดจะใช้อัตราส่วนของโศคาราสดต่อน้ำเป็น 1:8 ส่วนโศคาราแห้งจะใช้อัตราส่วนของโศคาราแห้งต่อน้ำเป็น 1:40 การที่ปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เนื่องจากในกรณีของโศคาราแห้ง ถ้าปริมาณน้ำที่เติมลงในน้อย ผงโศคาราจะดูดซับน้ำนั้นไว้มัน เกิดเป็นลักษณะของ paste เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ไม่สามารถแยกน้ำออกได้ จึงต้องเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อให้ผงโศคาราที่แห้งดูดซับน้ำได้อิ่มตัว อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำลงไปปริมาณมาก เมื่อปรับอัตราส่วนของน้ำและโศคาราให้เท่ากับในกรณีที่ใช้เป็นโศคาราสด จะให้ผลผลิตของโปรตีนที่สกัดได้ต่อครั้งต่ำมาก ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการทดลองในหัวข้อต่อไป เนื่องจากมีข้อจำกัดของอุปกรณ์ในการทดลองที่ไม่สามารถผลิต Batch ใหญ่ได้ ประกอบกับเมื่อพิจารณาในด้านประสิทธิภาพการสกัดจริงๆ การใช้น้ำปริมาณมาก พลังงานที่ใช้ในการแยกน้ำและของแข็งจะเพิ่มมากขึ้นด้วย

ปริมาณโศคาราโปรตีนที่สกัดได้เมื่อใช้โศคาราสด โศคาราที่มีความชื้น 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มาทำการสกัดโดยใช้เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณโศคาราโปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราที่สภาวะการสกัดต่างๆ (เปอร์เซ็นต์ต่อ 100 กรัมของโศคาราแห้ง)

	โศคาราความชื้น 4 %	โศคาราความชื้น 8 %	โศคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	11.59 ^a	11.53 ^a	11.98 ^a
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	12.30 ^b	12.48 ^b	12.85 ^b

ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยศึกษาความสัมพันธ์แบบแฟคทอเรียลของปริมาณความชื้นของโศคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (ภาคผนวก ค) พบว่า ไม่พบอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัยต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากโศคารา เมื่อพิจารณาถึงปริมาณ

ความชื้นของโอคาราต่อปริมาณโปรตีน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ง) พบว่าปริมาณความชื้นของโอคาราในสภาวะการสกัดที่ใช้ในการทดลอง ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในขั้นตอนการอบตัวอย่างใช้ระดับความร้อนเพียง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งระดับความร้อนนี้อาจไม่ส่งผลต่อการสกัดโปรตีน ในการทดลอง Pre - test เมื่อใช้โอคาราแห้งจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งโอคาราของโรงงานสูงมากกว่า 100 องศาเซลเซียส เป็นผลให้ในการสกัดโปรตีนออกจากโอคาราต้องใช้เวลามากกว่า 5 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ถ้าต้องการอบโอคาราสดเพื่อเก็บรักษาไว้ และยังทำการสกัดโปรตีนจากโอคาราแห้งได้ดี ควรอบโอคาราสดที่อุณหภูมิต่ำ (~ 60 องศาเซลเซียส)

เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการสกัดโปรตีนพบว่า ระยะเวลาในการสกัดโปรตีนเป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่อปริมาณโปรตีน โดยเมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมงจะได้ปริมาณโปรตีนมากกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากผลผลิตที่สกัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนที่มีในโอคาราแห้ง (24 - 25 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นว่ายังมีสัดส่วนที่สูญเสียไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Ma และคณะ (1997) การที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อให้ได้โอคารา มีการใช้ความร้อนสูง รวมถึงแรงกลที่อัดบดเมล็ดถั่วเหลือง เพื่อสกัดน้ำมันออกมา ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียหาย คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของโปรตีนในโอคาราเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เป็นผลให้ความสามารถในการละลายที่เคยมีอยู่ลดลง (Zayas, 1997) ในการทดลองเลือกใช้หลักการละลายของโปรตีนที่ pH เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด ได้ผลดีมากในกรณีของ soy protein isolate (Vojdani, 1996) และเป็นวิธีการที่ไม่ทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ไม่มีผลต่อการย่อยโปรตีนของร่างกาย (protein digestibility) ถ้าต้องการเพิ่มปริมาณผลผลิตของโปรตีนสกัดจากโอคารา อาจเลือกใช้วิธีการสกัดแบบอื่น เช่น การใช้เอนไซม์หรือสารเคมีที่เข้าไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้าน ionic ของโปรตีน เพื่อทำให้คุณสมบัติการละลายสูงขึ้น

4.2. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดจากโอคารา

โปรตีนนอกจากจะเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายแล้ว ในอุตสาหกรรมอาหาร คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และอื่นๆ ทำให้โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ผู้ผลิตสามารถเลือกใช้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ ดังนั้นในการทดลองจึงทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆ

4.2.1. ผลของการวิเคราะห์หาค่า surface hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่า Surface Hydrophobicity ของโอคาราโปรตีน

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

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$)

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

จากการวิเคราะห์หาค่า surface hydrophobicity พบว่า ปริมาณความชื้นของตัวอย่างมีผลต่อค่า surface hydrophobicity โดยโปรตีนที่สกัดจากโอคาราแห้งจะมีค่า surface hydrophobicity สูงกว่าโปรตีนที่สกัดจากโอคาราสด ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนในระหว่างการอบแห้งมีผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวออก ค่า surface hydrophobicity ที่วัดได้จึงสูงกว่าโปรตีนจากโอคาราสดซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อนในกระบวนการทำแห้ง ส่วนระยะเวลาในการสกัดโปรตีนก็ส่งผลต่อค่า surface hydrophobicity เช่นกัน โดยเมื่อทำการสกัดที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ค่า surface hydrophobicity จะสูงกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง เนื่องจากในกระบวนการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาการสกัด ซึ่งส่งผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวออกเช่นเดียวกัน แต่เมื่อทำการพิจารณาถึงอิทธิพลของปริมาณความชื้นและระยะเวลาในการสกัดร่วมกันต่อค่า surface hydrophobicity จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อค่า surface hydrophobicity (ภาคผนวก ค)

4.2.2. ผลของการทดสอบความสามารถละลายได้ของโอคาราโปรตีน

ตารางที่ 7 แสดงค่า Solubility Index ของโอคาราโปรตีน

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

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบ ความสามารถในการละลายในรูปของ Solubility Index ของโปรตีนสกัดจากโอคาราแสดงในตารางที่ 7 จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความเข้มข้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน (ภาคผนวก ค) พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณความเข้มข้นของโอคารา ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ง) พบว่า โปรตีนที่ได้จากโอคาราสดมีค่า Solubility index สูงกว่าตัวอย่างที่ได้จากโอคาราแห้ง (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับค่า Surface hydrophobicity การที่ค่า surface hydrophobicity สูง แสดงว่ามีส่วน hydrophobic ที่ไม่ชอบน้ำอยู่ที่ผิวของโมเลกุลมาก เป็นเหตุให้การจับตัวกับน้ำได้น้อยลง เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาในการสกัดต่อค่า Solubility index พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อใช้เวลาในการสกัด 1 หรือ 2 ชั่วโมง

4.2.3.ผลของการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีนที่สกัดได้ (Emulsion Activity) ซึ่งวัดอยู่ในรูปของค่า Turbidity (Absorbance) แสดงดังตารางที่ 8 ถ้าค่า Absorbance สูง แสดงว่าค่า Emulsion Activity สูง

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน

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

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวตั้งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความเข้มข้นของโอคารา และระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน (ภาคผนวก ค) พบว่า ทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบโอคาราสดกับโอคาราแห้ง โดยเฉพาะโอคาราที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่ว่าระยะเวลาการสกัดจะเป็น 1 หรือ 2 ชั่วโมง ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโอคาราที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของค่า surface hydrophobicity เมื่อโมเลกุลของโปรตีนได้รับความร้อนในกระบวนการอบแห้ง โมเลกุลเกิดการคลายตัวทำให้ส่วน hydrophobic ที่อยู่ด้านในจะออกมาที่ผิว สามารถจับกับโมเลกุลของไขมัน ทำให้ค่า Emulsion Activity สูงขึ้น

ความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion Stability) เป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญอีกอย่างหนึ่งของโปรตีน อิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่างๆ นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปทดสอบค่า Emulsion Turbidity ถ้าค่า Emulsion Turbidity สูง แสดงว่าอิมัลชันมีความคงตัวดี ผลของค่า Emulsion Stability ซึ่งแสดงในรูปของค่า Emulsion Turbidity ของอิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่างๆ แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า Emulsion Stability ของอิมัลชันที่เตรียมจากโอคาราโปรตีน

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

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

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ค) เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความคงตัวของอิมัลชัน พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความคงตัวของอิมัลชัน แสดงว่าโอคาราโปรตีนที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถให้อิมัลชันที่มีความคงตัวใกล้เคียงกัน ความคงตัวของอิมัลชันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง นอกจากโปรตีนแล้วยังขึ้นกับขนาดของเม็ดไขมัน ความเป็นกรดต่าง ค่า ionic (Pearce & Kinsella, 1978)

4.2.4. ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน (Foaming Activity)

ความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน วัดอยู่ในรูปของความสูงของฟองที่เกิดขึ้น (เซนติเมตร) ถ้าความสูงของฟองที่วัดได้มีค่าสูง แสดงว่าความสามารถในการเกิดฟองดี ผลของความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีนที่สกัดในสภาวะต่างๆ แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเกิดฟองของโอคาราโปรตีน

	โอคาราความชื้น 4 % ^{NS}	โอคาราความชื้น 8 % ^{NS}	โอคาราสด ^{NS}
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	7.33	7.50	7.45
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	7.50	7.40	7.60

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

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ค) เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของไอคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการเกิดฟอง พบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการเกิดฟอง ถึงแม้ว่าค่า surface hydrophobicity ของไอคาราโปรตีนที่ได้จากไอคาราแห้งจะสูงกว่าไอคาราสดก็ตาม ความสามารถในการเกิดฟองก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ โมเลกุลมีลักษณะกลมพับม้วนงอแน่น โครงสร้างภายในประกอบด้วย subunit ที่จับกันด้วยพันธะที่แข็งแรง เช่น พันธะ disulfide การผ่านความร้อนในระหว่างการผลิตไอคารา ในขั้นตอนของการอบแห้งไอคารารวมถึงการสกัดทำให้โครงสร้างเพียงบางส่วนมีการคลายตัวออก ถ้าต้องการปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดฟองของไอคาราโปรตีน อาจต้องทำการดัดแปร (modify) ด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้เอนไซม์ กรด ต่าง ทำให้โครงสร้างคลายตัวออกมากทำให้เกิดการสวนตัวเป็นฟิล์มบางๆ ล้อมรอบ air cell ได้ง่ายขึ้น

เมื่อนำฟองที่เกิดจากไอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่างๆ มาทำการตรวจสอบความคงตัวของฟอง โดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดความสูง (เซนติเมตร) ของฟองที่เวลาต่างๆ ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของฟองของไอคาราโปรตีน

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

OPI 4*1 โปรตีนสกัดจากไอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI 4*2 โปรตีนสกัดจากไอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

OPI 8*1 โปรตีนสกัดจากไอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI 8*2 โปรตีนสกัดจากไอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

OPI F*1 โปรตีนสกัดจากไอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI F*2 โปรตีนสกัดจากไอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากผลการวิเคราะห์ความคงตัวของฟอง พบว่า ความคงตัวของฟองที่ได้จากไอคาราโปรตีนที่เตรียมจากไอคาราสดจะน้อยกว่าของตัวอย่างที่ได้จากไอคาราโปรตีนที่เตรียมจากไอคารา

แห้ง ส่วนที่ไม่มีขี้ผึ้ง (hydrophobic group) ที่ผิวที่เพิ่มขึ้นของโศคาราโปรตีนที่เตรียมจากโศคาราแห้ง ทำให้สามารถจับกับอากาศได้มาก ทำให้ฟองที่เกิดมีความคงตัวมากขึ้น

4.2.5. ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโศคาราโปรตีน

ความสามารถในการดูดซับน้ำของโศคาราโปรตีน คำนวณจากค่า กรัมของน้ำที่โศคาราโปรตีน 1 กรัม ดูดซับ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของโศคาราโปรตีน

	โศคาราความชื้น 4 %	โศคาราความชื้น 8 %	โศคาราสด
ทำการสกัด 1 ชั่วโมง	5.63 ^c	5.97 ^d	6.01 ^d
ทำการสกัด 2 ชั่วโมง	4.12 ^a	4.82 ^b	5.02 ^b

ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ค) เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโศคาราและระยะเวลาในการสกัดที่มีต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโศคาราโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน โดยโศคาราโปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราแห้งจะดูดซับน้ำได้น้อยกว่าโปรตีนที่สกัดจากโศคาราสด และโศคาราโปรตีนที่สกัดที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงจะดูดซับน้ำได้น้อยกว่าการสกัดที่ 1 ชั่วโมง

4.2.6. ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโปรตีนสกัดจากโศคารา

ความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีน คำนวณจากค่า กรัมของน้ำมันที่โศคาราโปรตีน 1 กรัมดูดซับไว้ ผลจากการทดสอบแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีน

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

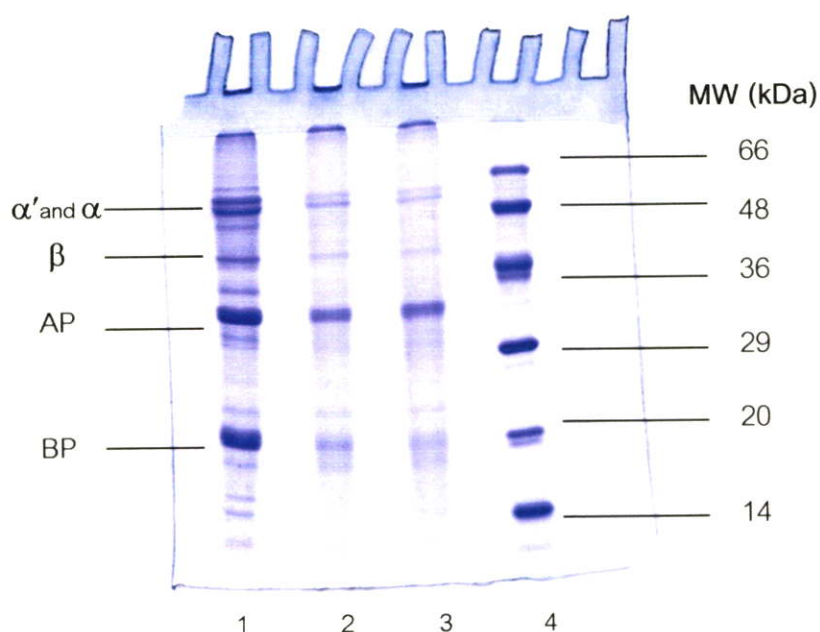
ตัวอักษรกำกับต่างกันทั้งในแนวดิ่งและแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ค) เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปริมาณความชื้นของโศคาราและระยะเวลาในการสกัด ที่มีต่อความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีน พบว่า ทั้งสองปัจจัยไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของระยะเวลาในการสกัด (ภาคผนวก ง) พบว่า เมื่อระยะเวลาใน

การสกัด 2 ชั่วโมง ความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโศคาราโปรตีนสูงขึ้น การที่โศคาราโปรตีนที่ได้จากโศคาราแห้ง มีความสามารถในการดูดซับน้ำมันไม่แตกต่างจากโศคาราโปรตีนที่จะได้จากโศคาราสด ทั้งๆที่มีค่า surface hydrophobicity สูงกว่า อาจเกิดจาก site ที่ตำแหน่งของ hydrophobic group ที่ผิวยังไม่ยืดหยุ่น (flexible) ยังมีโมเลกุลของกลุ่มอื่นบัง ทำให้ site ที่จะจับกับน้ำมันไม่สะดวก

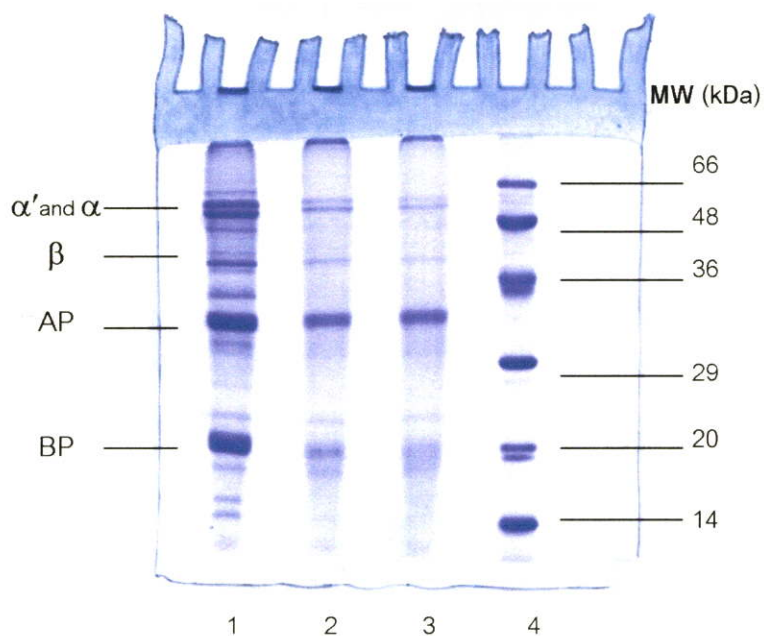
4.3. ผลการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโศคารา

4.3.1. ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบย่อยในโปรตีนด้วย SDS - PAGE



ภาพที่ 12 SDS - PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโศคาราความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์

- 1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (SuproEX33)
 - 2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราแห้งความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 1 ชั่วโมง
 - 3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราแห้งความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 2 ชั่วโมง
 - 4 : Low Molecular Weight Marker
- α' , α และ β คือ α' , α และ β - subunit ของ β - conglycinin
 AP : Acidic polypeptide และ BP: Basic polypeptide



ภาพที่ 13 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโศคาราความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์

1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (SuproEX33)

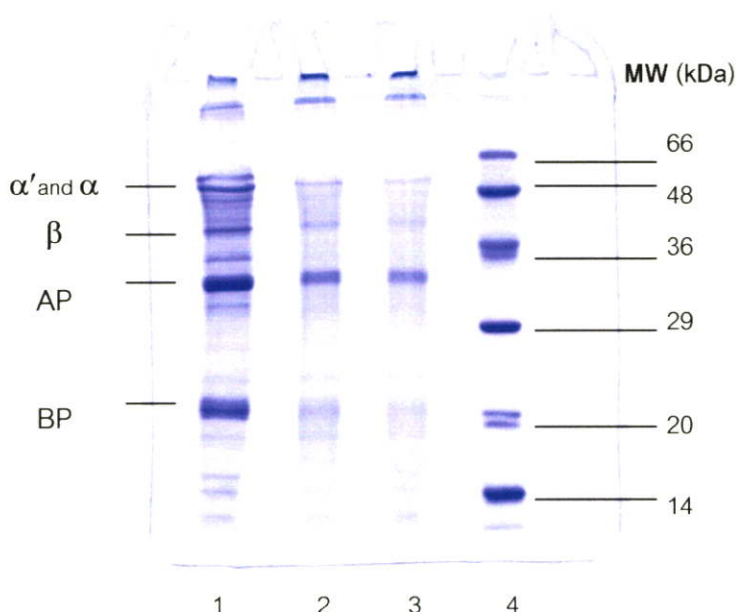
2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราแห้งความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 1 ชั่วโมง

3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราแห้งความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัด 2 ชั่วโมง

4 : Low Molecular Weight Marker

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

AP : Acidic polypeptide และ BP: Basic polypeptide



ภาพที่ 14 SDS – PAGE Patterns ของโปรตีนที่สกัดจากโศคาราสด

- 1 : โปรตีนสกัดทางการค้า (SuproEX33)
- 2 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราสด ทำการสกัด 1 ชั่วโมง
- 3 : โปรตีนที่สกัดได้จากโศคาราสด ทำการสกัด 2 ชั่วโมง
- 4 : Low Molecular Weight Marker

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

AP : Acidic polypeptide และ BP: Basic polypeptide

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบย่อยของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีการใช้ SDS – PAGE ในสภาวะที่มี Denaturing agent (2-ME) ในกรณีที่ใช้โศคาราความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โศคาราความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และโศคาราสด แสดงดังภาพที่ 10 ,11 และ 12 ตามลำดับ โดยเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33) ผลการวิเคราะห์พบว่า มี subunit ที่เป็นองค์ประกอบหลักในโปรตีนถั่วเหลืองอยู่ในโปรตีนที่สกัดจากโศคารา และมี subunit ไม่แตกต่างจากของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า อย่างไรก็ตามในการเตรียมตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในช่องแต่ละเจลเท่ากัน การที่ Band (แถบ) ของโศคาราโปรตีนมีสีจางกว่ามาก แสดงว่าปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโศคาราโปรตีนที่สกัดได้ต่ำกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และจะเห็นว่าไม่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถผ่านสู่เจลได้ ซึ่งอาจเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนกับโมเลกุลอื่น ซึ่งจะอธิบายในลำดับต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบย่อยของโปรตีนที่สกัดจากสภาวะต่างๆ จะเห็นว่าไม่มีความแตกต่างกัน การผ่านความร้อนในระหว่างการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง การอบแห้งโอคารา ความร้อนที่ใช้ในการสกัด รวมถึงบดเพื่อนำน้ำมันออกจากเมล็ดถั่วเหลือง ทำให้โครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองเปลี่ยนไปก็ตาม แต่ subunit ซึ่งเป็นองค์ประกอบย่อยของโปรตีนยังคงอยู่ ดังนั้นโปรตีนที่สกัดได้จากโอคาราจึงยังคงมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ และคุณค่าทางโภชนาการที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

4.3.2. การศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นจากโอคาราโปรตีน

ตารางที่ 14 แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นที่พบในโอคารา (g/ 16g N)

Amino acid	โปรตีนสกัดจากโอคารา ^a	Soy protein isolate ^b	FAO score ^c
Essential			
Cyst(e)ine	2.03	1.19	3.5
Isoleucine	3.58	4.72	4.0
Leucine	6.42	8.51	7.0
Lysine	4.98	6.34	5.5
Methionine	1.09	1.24	3.5
Phenylalanine	3.90	5.62	6.0
Threonine	5.30	3.84	4.0
Tyrosine	2.82	4.04	6.0
Valine	3.70	4.91	5.0
Histidine	2.60	2.54	
Nonessential			
Alanine	3.74	4.37	
Arginine	4.18	7.87	
Aspartic acid	10.42	11.80	
Glutamic acid	17.26	20.70	
Glycine	4.42	4.22	
Proline	4.67	5.42	
Serine	4.05	5.30	

^a โปรตีนสกัดจากโอคาราสดที่ทำการสกัด 1 ชั่วโมง

^b Sarwar และคณะ (1983) ; ^c FAO/WHO Joint Ad Hoc Committee (Ma และคณะ, 1997)

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

4.3.3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีนและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (ต่อปริมาณน้ำหนักแห้ง)

ตัวอย่าง	โปรตีน (%)	เถ้า (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)
OPI 4*1	57.69	4.27	38.04
OPI 4*2	58.28	3.87	37.85
OPI 8*1	57.99	3.46	38.55
OPI 8*2	59.20	3.55	37.25
OPI F*1	56.01	3.58	40.41
OPI F*2	56.90	3.99	39.11
Supro EX33	84.31	3.82	11.87

OPI 4*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI 4*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

OPI 8*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI 8*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราแห้ง ความชื้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

OPI F*1 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

OPI F*2 โปรตีนสกัดจากโอคาราสด ทำการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Supro EX33 โปรตีนสกัดทางการค้า

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีนที่สกัดที่สภาวะต่างๆ แสดงดังตารางที่ 15 พบว่าปริมาณโปรตีนที่พบในโอคาราโปรตีนที่สกัดได้มีค่าประมาณ 56 – 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้ามีมากถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ SDS – PAGE (ภาพที่ 11 – 13) ที่พบ band ของโอคาราโปรตีนจางกว่า

band ของโปรตีนตัวเหลืองสกัดทางการค้า ในทางตรงข้ามปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในโอคาราโปรตีนมีค่าสูงถึง 38 – 39 เปอร์เซ็นต์ การที่พบปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงในโอคาราโปรตีนสันนิษฐานว่าเกิดจากความร้อน แรงบด ที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพตามธรรมชาติ ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับหมู่ของคาร์โบไฮเดรต (Protein – Polysaccharide conjugate) กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

Dickinson และ McClements (1996) กล่าวว่า การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะเกิดในรูป biopolymer โดยอาจเกิดจากโมเลกุลที่มีประจุเดียวกันหรือประจุตรงข้ามก็ได้ โดยมากสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจาก globular โปรตีนที่สามารถละลายได้กับโพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุลบจะมีประจุโดยรวมเป็นลบ โพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยหมู่ carboxyl จะไม่เกิดเป็นสารประกอบกับ globular protein ที่ระดับ pH มากกว่า pI แต่โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุของ sulfate สูง เช่น dextran sulfate สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถละลายได้กับโปรตีนได้ที่ระดับ pH มากกว่า pI สายโซ่ของโปรตีนที่มีประจุบวก เช่น ϵ - amino, α - amino, guanidium และ imidazole จะมีส่วนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้มากขึ้นเมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ

มีการสันนิษฐานถึงการเกิดการจับตัวกันของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตไว้ 2 แบบคือ แบบแรกโปรตีนได้รับความร้อนและเกิดการจับตัวกับคาร์โบไฮเดรตจำนวนเล็กน้อยด้วยพันธะ covalent และอีกแบบหนึ่งคือ โปรตีนเกิดการจับตัวเป็น monomer เมื่อได้รับความร้อน การจัดเรียงตัวไม่เป็นเส้นตรง แต่มีโครงสร้างที่มีช่องว่างภายในทำให้เกิดการกักส่วนของคาร์โบไฮเดรตจำนวนมากไว้ในโครงสร้าง (Marchall & Chrastil)

Matsudomi และคณะ (1995) ศึกษาพบว่า โปรตีนในพลาสมาสามารถที่จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับ galactomannan ได้ ด้วยกระบวนการ Maillard ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นส่งผลให้โปรตีนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ดีขึ้นและอิมัลชันที่ได้มีความคงตัวมากขึ้น โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนนี้เกิดจากกระบวนการให้ความร้อน

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

4.4. ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไอคาราโปรตีนกับโปรตีนสกัดทางการค้า

ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Supro EX33)

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

เพื่อจะหาข้อสรุปในการนำไปใช้งานของไอคาราโปรตีน จึงควรทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไอคาราโปรตีนกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า Supro EX33 เป็นโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาสูง นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์บดลดขนาด ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของ Supro EX33 แสดงดังตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบพบว่า คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไอคาราโปรตีนในหลายด้านไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้าเลย และมีบางด้านเช่น ความสามารถในการเกิดฟอง ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน ไอคาราโปรตีนทำได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า การที่เป็นเช่นนี้ สามารถอธิบายได้ว่า โดยปกติโปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนขนาดใหญ่มีโครงสร้างกลมอัดกันแน่น (globular structure) การที่จะคลายตัวเพื่อสร้างเป็นฟิล์มบางๆล้อมรอบ air cell ทำได้ยากกว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็กมีโครงสร้างยืดหยุ่นกว่า เช่น ovalbumin และ Bovine Serum Albumin (Meste และคณะ,1990) แต่เมื่อโปรตีนจากถั่วเหลืองผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่นในกรณีของไอคาราโปรตีน ซึ่งผ่านความร้อนในช่วงต่างๆ ตั้งแต่การสกัดเอาน้ำนมถั่วเหลืองออก การอบแห้ง ซึ่งทำให้โครงสร้างเกิดการเสียสภาพตามธรรมชาติมีการคลายตัวออก ไม่อัดแน่นเหมือนเดิมนอกจากนั้นการที่โครงสร้างคลายตัวออกทำให้หมู่ hydrophobic ออกมาที่ผิวสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำมันได้มากขึ้น ความสามารถในการดูดซับน้ำมันสูงขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ไอศคาราแห้งที่ได้จากการอบไอศคาราสดที่ 60 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้น 4 เปอร์เซ็นต์ หรือ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาสกัดโปรตีน พบว่ามีผลผลิตไม่แตกต่างจากไอศคาราสด การเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 ชั่วโมงเป็น 2 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตที่สกัดได้
2. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่
 - 2.1. การอบแห้งไอศคาราจากไอศคาราสดเป็นไอศคาราแห้ง หรือการเพิ่มเวลาการสกัดจาก 1 ชั่วโมงเป็น 2 ชั่วโมง ทำให้ค่า Surface Hydrophobicity สูงขึ้น
 - 2.2. ความสามารถในการละลายของไอศคาราโปรตีนที่ได้จากไอศคาราสด เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าสูงสุด
 - 2.3. ปริมาณความชื้นของไอศคาราและระยะเวลาในการสกัดมีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันของไอศคาราโปรตีน อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งสองไม่มีอิทธิพลร่วมต่อค่าความคงตัวของอิมัลชัน
 - 2.4. ปริมาณความชื้นของไอศคาราและระยะเวลาในการสกัด ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อความสามารถในการเกิดฟองของไอศคาราโปรตีน อย่างไรก็ตามความคงตัวของฟองเมื่อใช้ไอศคาราโปรตีนที่เตรียมจากไอศคาราแห้ง มีมากกว่าตัวอย่างที่ใช้ไอศคาราที่เตรียมจากไอศคาราสด
 - 2.5. คุณสมบัติในการดูดซับน้ำ พบว่าไอศคาราโปรตีนที่เตรียมจากไอศคาราแห้งดูดซับน้ำได้น้อยกว่าไอศคาราโปรตีนที่เตรียมจากไอศคาราสด และไอศคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัด 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำได้น้อยกว่าตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 1 ชั่วโมง
 - 2.6. คุณสมบัติในการดูดซับน้ำมัน พบว่าไอศคาราโปรตีนที่เตรียมจากการสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดซับน้ำมันได้มากกว่า ตัวอย่างไอศคาราโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่ใช้เวลา 1 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่สกัดได้จากโอคารา
 - 3.1. ผลของ SDS – PAGE แสดงให้เห็นว่ามี subunit ที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน ถั่วเหลืองอยู่ในโปรตีนสกัดจากโอคารา และมี subunit ไม่แตกต่างจากของโปรตีน ถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และ Subunit ของโอคาราโปรตีนที่สกัด เมื่อใช้ปริมาณ ความชื้นของโอคาราและระยะเวลาในการสกัดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน
 - 3.2. ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นของโอคาราโปรตีน พบชนิดของกรดอะมิโนในโอคาราโปรตีน พบเช่นเดียวกับในโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และในโอคาราโปรตีนมีปริมาณ Cys และ Thr สูงกว่า และเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ FAO พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น Cys, Met และ Tyr มีปริมาณต่ำกว่า ส่วน Thr มีสูงกว่ามาตรฐาน
 - 3.3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโอคาราโปรตีน พบว่า มีโปรตีน 56 – 60 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรต 38 – 40 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 3 – 4 เปอร์เซ็นต์ สันนิษฐานว่าคาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปที่จับกับโปรตีน (Protein – polysaccharide conjugate)
4. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโอคาราโปรตีนในหลายด้าน ไม่แตกต่างจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า และคุณสมบัติในการเกิดฟอง และความสามารถในการดูดซับน้ำมันของโอคาราโปรตีน ทำได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า

ข้อเสนอแนะ

1. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างและปฏิกริยาร่วมกับสารอื่น หากต้องการให้โปรตีนมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ สามารถทำได้โดยการปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยวิธีการดัดแปรโปรตีนทางกายภาพ เคมีหรือการใช้เอนไซม์
2. ควรหาวิธีในการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากโศคารา โดยอาจทำการใช้เอนไซม์ หรือสารเคมี เพื่อทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนในในการสกัดเพิ่มขึ้น หรือเพิ่มกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยผ่าน chromatography, gel filtration หรืออาจเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนกับวิธีการสกัดอื่น
3. ลักษณะตัวอย่างที่ได้จากการ freeze dried ซึ่งใช้อุณหภูมิต่ำในการทำแห้งไม่เหมือนกับการ spray dried ซึ่งใช้ความร้อนสูงในการทำแห้ง ลักษณะโปรตีนที่ได้เป็นผงมากกว่า (Supro EX33) จึงอาจทำการศึกษาเปรียบเทียบถึงกระบวนการทำแห้งที่ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

บรรณานุกรม

- Alizadeh – Pasder, N. and Li – Chan, E. 2000. “ Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values using Three Different Fluorecent Probes.” *J. Agric. Food Chem.* 48 : 328 – 334.
- Alijawad, L.S. and Bowers, J.A. 1988. “ Water-Binding Capacity of Ground Lamb – Soy Mixture with Different Levels of Water and Salt and Internal End – Points Temperarutes.” *J. Food Sci.* 53(2) : 376 – 382.
- AOAC. 1998. “ Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.” 16th ed. Gaithersburg, Maryland.
- Boatright, W.L. and Hettiarachchy, N.S. 1995. “ Effect of Lipids on Soy Protein Isolate Solubility.” *J Am. Oil Chem. Soc.* 72(12) : 1439 – 1444.
- Chung, S.S., Chang, H.N., and Park, M.Y. 1978. “ Dehydration of Soybean Residue by Hot – air in Conjunction with Filter Pressing.” *Food Sci. Technol. Abstr.* 79-01-G0072.
- Cohen, S.A. and Michaud, D.P. 1993. “ Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6 – Aminoquinol – N – Hydroxysuccinimidyl carbomate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High – Performance Liquid Chromatography.” *Analytical Biochemistry.* 221 : 279 – 289.
- Crenwelge, D.D., Dill, C.W., Tybor, P.T. and Landmann, W.A. 1974. “ A Comparison of the Emulsification Capacities of Some Protein Concentrates.” *J. Food Sci.* 39 : 175 – 177.
- Dickinson, E. and McClements, D.J. 1996. “ Protein – Polysaccharide Interaction.” *In Advances in Food Colloids.* Blackie Academic & Professional. UK.

- Fuchigami, A., Suzuki, K., Kubota, K., and Hosaka, H. 1980. " Thermal Efficiency of Vacuum – Drying in a Vibro – Fluidized Bed." *Food Sci. Technol. Abstr.* 81-09-A0543.
- Hensley, D.W. and Lawhon, J.T. 1979. " Economic Evaluation of Soy Isolate Production by a Membrane Isolation Process." *Food Technol.* 33 : 46.
- Hill, S.E. 1996. " Emulsion." *In* G.M. Hall (ed.) *Methods of Testing Protein Functionality*, Chapman & Hall. UK.
- Hirotsuka, M., Harada, T., Ohtsubo, N., Kawade, H., Hayakawa, Y., Taniguchi, H. 1987. " Method for Drying Water Retentive Substance." *US Patent* 4,702,927
- Kato, T., Shiga, I. And Terasawa, K. 1986. " Preservation of Okara (Soybean Residue from Soy Mash) by Lactic Acid Fermentation." *Food Sci. Technol. Abstr.* 88 – 09 – J0140.
- Kinsella, J.E. 1976. " Functional Properties of Proteins in Foods: A survey." *CRC. Rev. Food Sci. Nutr.* 7 : 219 – 280.
- Kinsella, J.E. 1979. " Functional Properties of Soy Proteins." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56 : 242.
- Kocker, P.N. and Foegeding, E.A. 1993. " Microcentrifuge – Based Method for Measuring Water – Holding of Protein Gels." *J. Food Sci.* 58(5) : 1040 –1046.
- Laemmli, U.K. 1970. " Cleavage of Stuctural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄." *Nature.* 227 : 680 – 685.
- Lawhon, J.T., Muslow, D., Cater, C.M. and Mattil, K.F. 1977. " Production of Protein Isolate from Oil Seed Extracts using Industrial Ultrafiltration and Reverse Osmosis System." *J. Food Sci.* 42 : 389.

- Lawhon, J.T., Rhee, K.C. and Lusas, E.W. 1981. " Soy Protein Ingredients Prepared by New Processes Aqueous Processing and Industrial Membrane Isolate." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58 : 397.
- Lin, M.J., Humbert, E.S. and Sosulski, F.W. 1974. " Certain Functional Properties of Sunflower Meal Products." *J. Food Sci.* 39 : 368 – 370.
- Liu, K.S. 1997. " Non Fermented Oriental Soy Foods." *In Soybeans, Chemistry, Technology and Utilization*, Chapman & Hall, New York.
- Ma, C.-Y., Liu, W.-S., Kwok, K.C. and Kwok, F. 1997. " Isolation and Characterization of Proteins from Soy Milk Residue (Okara)." *Food Res. Int.* 29(8) : 799 – 805.
- Maeda, H., Furuta, H., Yoshida, R., Takahashi, T., Sato, Y., Hisakawa, M. and Teranishi, S. 1998. " Preparation of Water – Soluble Polysaccharide from Plants and a Demethoxylation Process. *U.S. Patent* 5,710,270.
- Marshall, W.E. and Chrastil, J. " Interaction of Food Proteins with Starch." *In* B.J F. Hudson (ed.) *Biochemistry of Food Proteins*. Elsevier Applied Science. New York.
- Matsudomi, N., Inoue, Y., Nakashima, H., Kato, A. and Kobayashi, K. 1995. " Emulsion Stabilization by Maillard – type Covalent Complex of Plasma Protein with Galactomannan." *J. Food Sci.* 60(2) : 265-268, 283.
- Morr, C.V. 1990. " Functionality of Oil Seed and Legume Protein." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(5) : 265 – 271.
- Muramatsu, N., Karasawa, H., Kaneko, S., Ohhinata, H. and Ohike, T. 1995a. " Effects of Addition of Water – Absorbing Synthetic Polymers to Okara on Dehydration and Cohesion." *Food Sci. Technol. Abstr.* 96-06-J0165.

- Muramatsu, N., Karasawa, H., Kaneko, S., Ohhinata, H.m Ohike, T. 1995b. " Effects of Use of Water Absorbing Synthetic Polymer Sheets on Dehydration from Okara." **Food Sci Technol. Abstr.** 96-06-J0166.
- Muramatsu, N., Karasawa, H., Kaneko, S., Ohhinata, H.m Ohike, T. 1995c. " Drying test of Water Absorbing Synthetic Polymers and Okara." **Food Sci. Technol. Abstr.** 96-06-J0167.
- Nakai, S. and Li – Chan, E. 1993. " Recent Advances in Structure and Function of Food Proteins : QSAR approach." **CRC. Rev. Food Sci. Nutr.** 33 : 477 – 499.
- Nakai, S., Li – Chan, E. and Arteaga, G.E. 1996. " Mesurement of Surface Hydrophobicity." *In* G.M. Hall (ed.) **Methods of Testing Protein Functionality**, Chapman & Hall. UK.
- Nir, I., Feldman, Y., Aserin, A. and Garti, N. 1994. " Surface Properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy Proteins." **J. Food Sci.** 59(3) : 606 – 608.
- O'Toole, D.K. 1999. " Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production – A Review." **J. Agric. Food Chem.** 47 : 363 – 371.
- Phillips, L.G., German, J.B., O'Neill, T.E., Foegeding, E.A., Harwalkar, V.R., Kilara, A., Lewis, B.A., Mangino, M.E., Morr, C.V., Regenstein, J.M., Smith, D.M. and Kinsella, J.E. 1990. " Standardized Procrdure for Measuring Foaming Properties of Three Proteins, A Collaborative study." **J. Food Sci.** 55(5) : 1441 – 1444.
- Phillips, L.G., Haque, Z. and Kinsella, J.E. 1987. " A Method for the Measurement of Foam Formation and Stability." **J. Food Sci.** 52 (4) : 1074 – 1077.
- Quinn, J.R. and Paton, D. 1979. " A Practical Mesurement of Water Hydration Capacity of Protein Materials." **Cereal Chem.** 56 (1) : 38 – 40.

- Sarwar, G., Christensen, D.A., Finlayson, A.J., Friedman, M., Hackler, L.R., Mackenzie, S.L., Pellett, P.L. and Tkachuk, R. 1983. " Inter – and Intra – Laboratory Variation in Amino Acid Analysis of Food Proteins." **J. Food Sci.** 48 : 526 - 531.
- Sathe, S.K., Lilley, G.G., Mason, A.C. and Weaver, C.M. 1987. " High – Resolution Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Soybean (*Glycine max L.*) Seed Proteins." **Cereal Chem.** 64 (6) : 380 – 384.
- Tsutsui, T., Li – Chan, E. and Nakai, S. 1986. " A Simple Fluorometric Method for Fat – Binding Capacity as an Index of Hydrophobicity of Proteins." **J. Food Sci.** 51 (5) : 1268 – 1272.
- Vojdani, F. 1996. "Solubility." *In* G.M. Hall (ed.) **Methods of Testing Protein Functionality**, Chapman & Hall. UK.
- Voutsinas, L.P., Cheung, E. and Nakai, S. 1983. " Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatural Proteins." **J. Food Sci.** 48 : 26 – 32.
- Wilde, P.J. and Clark, D.C. 1996. " Foam Formation and Stability." *In* G.M. Hall (ed.) **Methods of Testing Protein Functionality**, Chapman & Hall. UK.
- Wolf, W.J. 1978. " Purification and Properties of the Proteins." *In* Smith, A.K. and Circk, S.J. (ed.) **Soybeans : Chemistry and Technology**. AVI Publishing Company.
- Zayas, J.F. 1997. **Functionality of Proteins in Food**. Springer – Verlag , Berlin, Heidelberg, Germany.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก	ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน	
ภาคผนวก ข	แผนภูมิแสดงวิธีวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่	
ภาคผนวก ค	ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) ในกรณีวิเคราะห์ interaction	
ภาคผนวก ง	ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของแต่ละปัจจัย	CRD
ภาคผนวก จ	การวิเคราะห์องค์ประกอบของไอคาราโปรตีน	

ภาคผนวก ก

ภาพอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน



ภาพที่ 15 HR 73 Halogen Moisture Analyzer



ภาพที่ 16 Hammer Mill



ภาพที่ 17 Homogenizer



ภาพที่ 18 Homogenizer Probe S25N 10 G



ภาพที่ 19 Ultrasonic VC 750



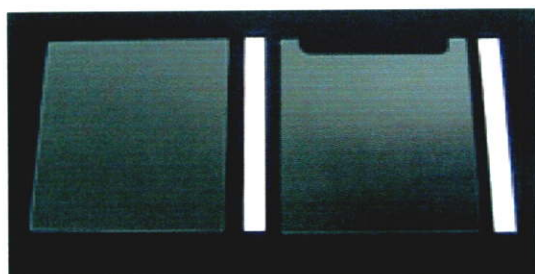
ภาพที่ 20 Eppendorf Centrifuge



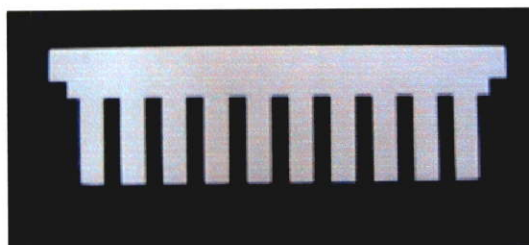
ภาพที่ 21 Hoefer miniVE Vertical
Electrophoresis system



ภาพที่ 22 Electrophoresis Power Supply
EPS 301



ภาพที่ 23 Matched glass plates for Hoefer miniVE electrophoresis systems, Spacer, Comb



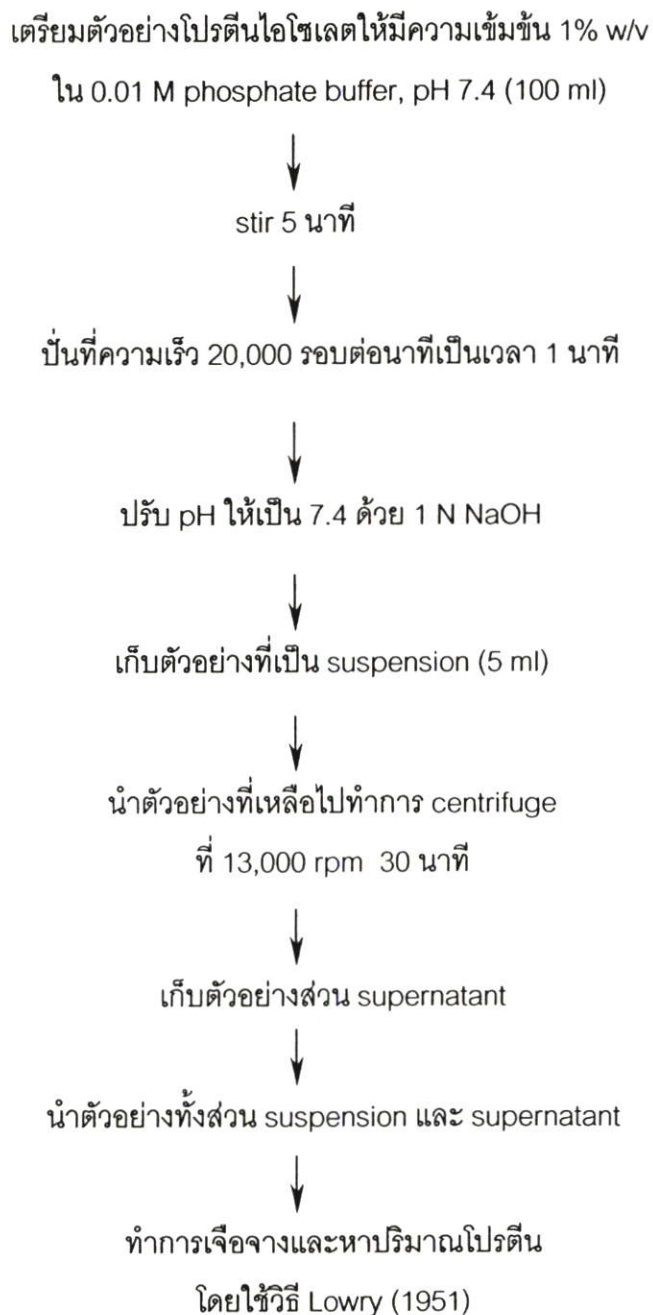
ภาพที่ 24 Easy Breeze Drying Frame



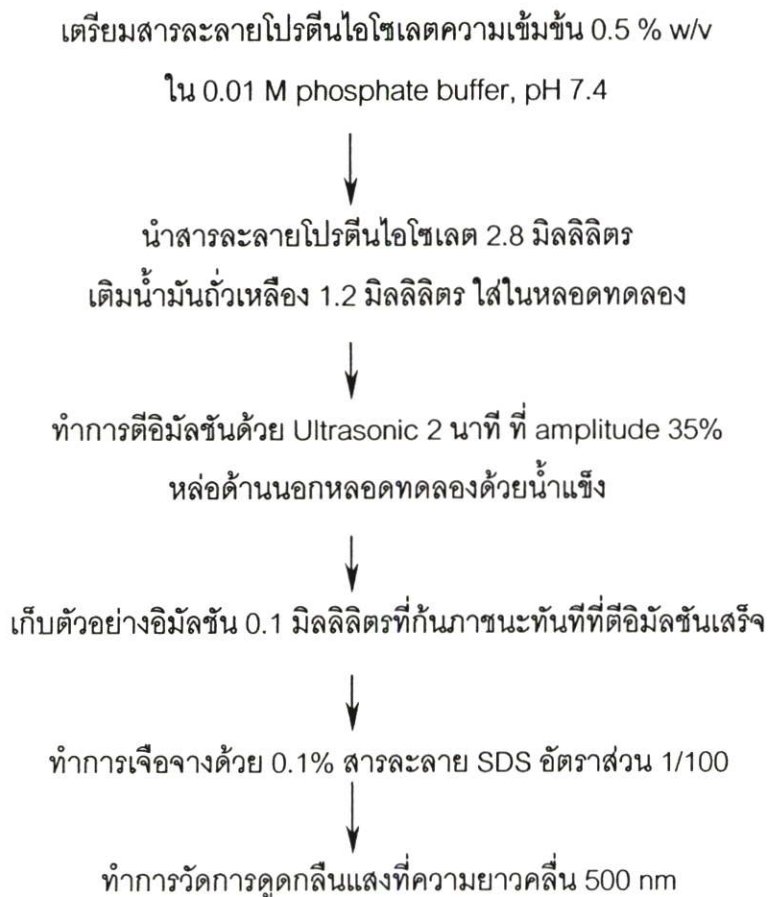
ภาพที่ 25 Easy Breeze Gel Dryer

ภาคผนวก ข

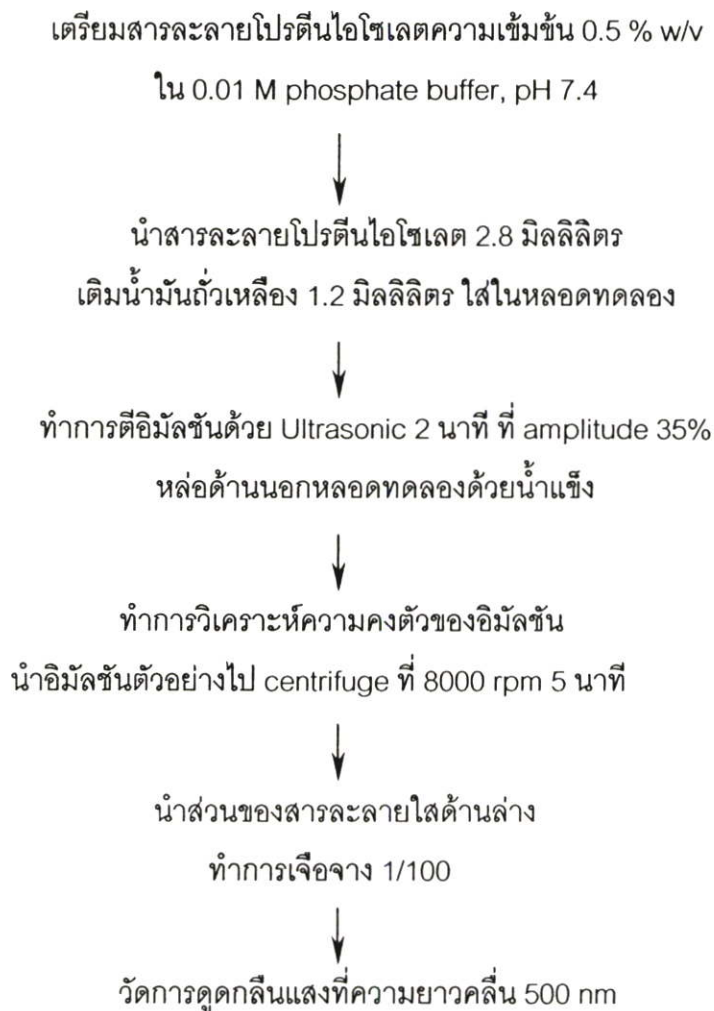
แผนภูมิแสดงวิถีวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่



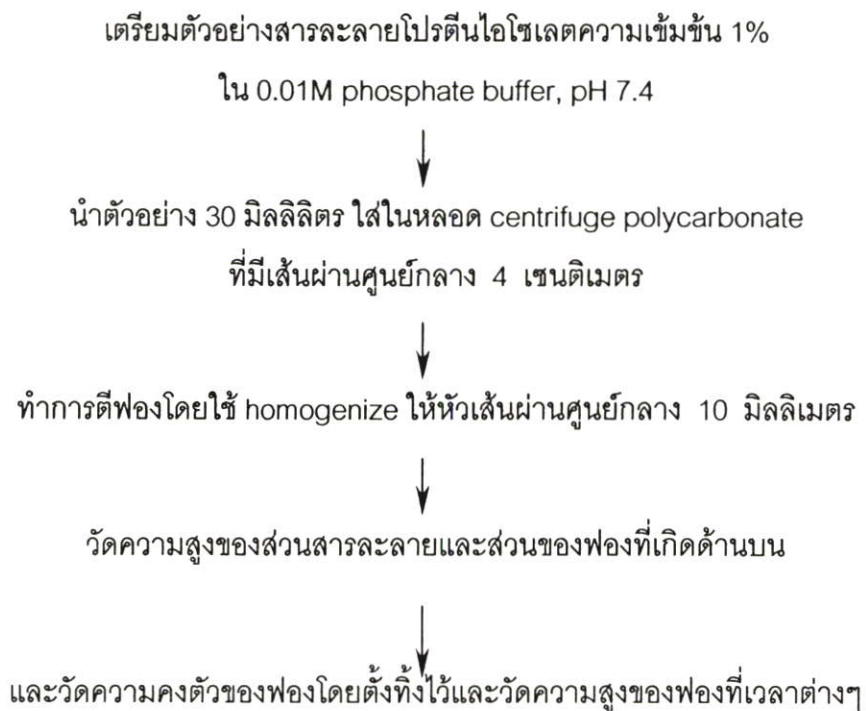
ภาพที่ 26 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีน



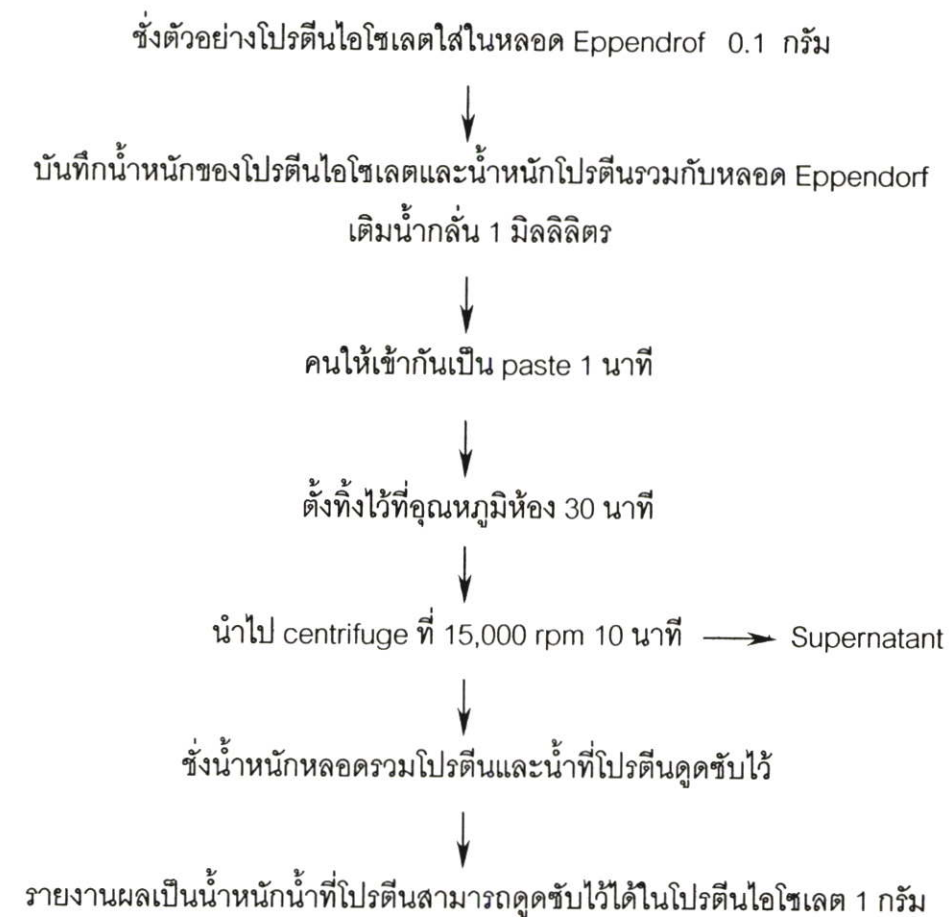
ภาพที่ 27 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีน
(Emulsion Activity)



ภาพที่ 28 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีน
(Emulsion Stability)



ภาพที่ 29 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีน



ภาพที่ 30 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีน

ชั่งตัวอย่างโปรตีนไอโซเลตใส่ในหลอด Eppendorf 0.1 กรัม
 บันทึกน้ำหนักของโปรตีนไอโซเลตและน้ำหนักโปรตีนรวมกับหลอด Eppendorf

↓
 เติมน้ำมันถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร

↓
 คนใส่เข้ากันเป็น paste 1 นาที

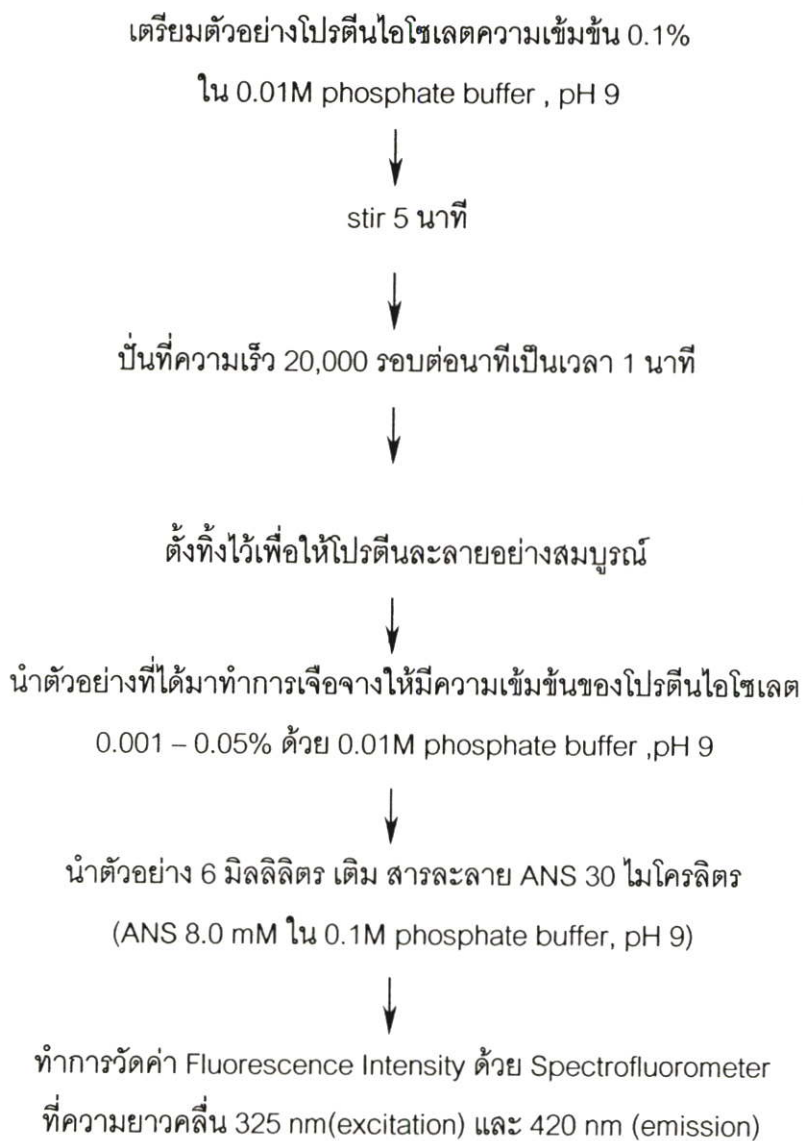
↓
 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

↓
 นำไป centrifuge ที่ 15,000 rpm 10 นาที → น้ำมันที่แยกชั้น

↓
 รินน้ำมันออกแล้วชั่งน้ำหนักหลอดรวมโปรตีนและน้ำมันที่โปรตีนดูดซับไว้

↓
 รายงานผลเป็นน้ำหนักน้ำมันที่โปรตีนสามารถดูดซับไว้ได้ในโปรตีนไอโซเลต 1 กรัม

ภาพที่ 31 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับไขมันของโปรตีน



ภาพที่ 32 ขั้นตอนการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน

ภาคผนวก ค

ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA)
ในกรณีวิเคราะห์ Interaction

Tests of Between – Subjects Effects (Interaction)

Extraction Yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.681	5	.536	1.564	.299
Intercept	1762.886	1	1762.886	5140.994	.000
Moisture Content	.519	2	.260	.757	.509
Extraction Time	2.133	1	2.133	6.220	.047
Interaction	2.851E-02	2	1425E-02	.042	.960
Error	2.057	6	.343		
Total	1767.624	12			
Corrected Total	4.738	11			

Surface Hydrophobicity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4595.100	5	919.020	13.282	.003
Intercept	1534397.800	1	153437.800	22175.130	.000
Moisture Content	2656.202	2	1328.101	19.194	.002
Extraction Time	1829.569	1	1829.569	26.441	.002
Interaction	109.329	2	54.665	.790	.496
Error	415.167	6	69.195		
Total	1539408.100	12			
Corrected Total	5010.267	11			

Solubility Index

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	234.414	5	46.883	2.606	.138
Intercept	91028.994	1	91028.994	5059.830	.000
Moisture Content	193.019	2	96.510	5.364	.046
Extraction Time	16.542	1	16.542	.920	.375
Interaction	24.852	2	12.426	.691	.537
Error	107.943	6	17.991		
Total	91371.351	12			
Corrected Total	342.357	11			

Foaming Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.937E-02	5	1.787E-02	1.619	.286
Intercept	668.267	1	668.267	60522.283	.000
Moisture Content	2.625E-02	2	1.312E-02	1.189	.367
Extraction Time	1.688E-02	1	1.688E-02	1.528	.263
Interaction	4.625E-02	2	2.313E-02	2.094	.204
Error	6.625E-02	6	1.104E-02		
Total	668.422	12			
Corrected Total	.156	11			

Fat Binding Capacity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.591	5	.118	6.993	.017
Intercept	134.125	1	134.125	7933.406	.000
Moisture Content	.135	2	6.743E-02	3.989	.079
Extraction Time	.452	1	.452	26.709	.002
Interaction	4.742E-03	2	2.371E-03	.140	.872
Error	.101	6	1.691E-02		
Total	134.818	12			
Corrected Total	.693	11			

Water Holding Capacity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.500	5	1.100	119.586	.000
Intercept	332.254	1	332.254	36123.562	.000
Moisture Content	.918	2	.459	49.884	.000
Extraction Time	4.437	1	4.437	482.383	.000
Interaction	.145	2	7256E-02	7.889	.021
Error	5.519E-02	6	9.198E-03		
Total	337.809	12			
Corrected Total	5.555	11			

Emulsion Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.151E-03	5	1.830E-03	14.601	.003
Intercept	91.153	1	91.153	727218.240	.000
Moisture Content	5.295E-03	2	2.647E-03	21.120	.002
Extraction Time	4.619E-04	1	4.619E-04	3.685	.103
Interaction	3.394E-03	2	1.697E-03	13.540	.006
Error	7.521E-04	6	1.253E-04		
Total	91.163	12			
Corrected Total	9.903E-03	11			

Emulsion Stability

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.956E-02	5	3.913E-03	1.161	.423
Intercept	.429	1	.429	127.220	.000
Moisture Content	1.340E-02	2	6.702E-03	1.988	.218
Extraction Time	2.159E-03	1	2.159E-03	.640	.454
Interaction	4.001E-03	2	2.000E-03	.593	.582
Error	2.022E-02	6	3.371E-03		
Total	.469	12			
Corrected Total	3.979E-02	11			

ภาคผนวก ง

ตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ CRD ของแต่ละปัจจัย

Oneway ANOVA (Duncan)

Extraction Yield

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
8% MC 1 hr	2	11.529050
4% MC 1 hr	2	11.590100
Fresh 1 hr	2	11.977600
4% MC 2 hr	2	12.302600
8% MC 2 hr	2	12.475550
Fresh 2 hr	2	12.848250
Sig.		.078

Surface Hydrophobicity

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Fresh 1 hr	2	320.73575			
Fresh 2 hr	2		352.43265		
4% MC 1 hr	2		356.50055	356.50055	
8% MC 1 hr	2		358.47350	358.47350	
8% MC 2 hr	2			357.43740	375.43740
4% MC 2 hr	2				381.92555
Sig.		1.000	.508	.070	.465

Solubility Index

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4% MC 2 hr	2	81.085750	
4% MC 1 hr	2	81.764400	
Fresh 2 hr	2	86.810950	86.810950
8% MC 1 hr	2	89.837700	89.837700
8% MC 2 hr	2	89.869600	89.869600
Fresh 1 hr	2		93.208850
Sig.		.098	.200

Foaming Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4% MC 1 hr	2	7.3250	
8% MC 2 hr	2	7.4000	7.4000
Fresh 1 hr	2	7.4500	7.4500
4% MC 2 hr	2	7.5000	7.5000
8% MC 1 hr	2	7.5000	7.5000
Fresh 2 hr	2		7.6000
Sig.		.165	.122

Fat Binding Capacity

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
4% MC 1 hr	2	3.054150			
Fresh 1 hr	2	3.108650	3.108650		
8% MC 1 hr	2	3.284900	3.284900	3.284900	
4% MC 2 hr	2		3.391600	3.391600	3.391600
Fresh 2 hr	2			3.543250	3.543250
8% MC 2 hr	2				3.676750
Sig.		.137	.080	.103	.079

Water Holding Capacity

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
4% MC 2 hr	2	4.121850			
8% MC 2 hr	2		4.816200		
Fresh 2 hr	2		5.023550		
4% MC 1 hr	2			5.632250	
8% MC 1 hr	2				5.972400
Fresh 1 hr	2				6.005300
Sig.		1.000	.074	1.000	.743

Emulsion Activity

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Fresh 2 hr	2	2.723200			
Fresh 1 hr	2	2.730200			
8% MC 1 hr	2	2.744600	2.744600		
4% MC 2 hr	2		2.759400	2.759400	
4% MC 1 hr	2			2.774900	
8% MC 2 hr	2				2.804325
Sig.		.114	.234	.216	1.000

Emulsion Stability

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
Fresh 1 hr	2	.125100
4% MC 2 hr	2	.171550
Fresh 2 hr	2	.176575
4% MC 1 hr	2	.196350
8% MC 1 hr	2	.204325
8% MC 2 hr	2	.259225
Sig.		.073

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไอคาราโปรตีน

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Laemmli, 1970)

Electrophoresis เป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า พอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้จากคุณสมบัติดังกล่าว เทคนิค Electrophoresis จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆของ macromolecule เช่น มวลโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างของโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิและรูปร่าง รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่ต่างกันด้วย

ตัวกลางที่ใช้ในการแยกมีหลายชนิด เช่น แป้ง , Polyacrylamide , Agarose และ Agarose – Acrylamide เจลเหล่านี้จะนำไปเคลือบเป็นแผ่นบางบนพลาสติกหรือแผ่นกระจก การใช้ตัวกลางที่เป็นเจลนี้จะให้ผลในการแยกสารดีขึ้นโดยเฉพาะเมื่อใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) เป็นเทคนิค Electrophoresis ที่มีตัวกลางเป็น Polyacrylamide gel ซึ่งเจือยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก Polyacrylamide gel เป็นเจลที่เกิดจากปฏิกิริยา Polymerization ระหว่าง Acrylamide Monomer ซึ่งเป็นสายโซ่ยาว และมี monomer คือ N,N' – methylene – bisacrylamide ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างสายโซ่ให้เกิดเป็นร่างแห ความเข้มข้นของ acrylamide เป็นตัวกำหนดความยาวของสายโซ่ ในขณะที่ความเข้มข้นของ Bis เป็นตัวกำหนดขนาดของ รูพรุน หากความเข้มข้นของ Bis มาก รูพรุนของเจลจะมีขนาดเล็ก

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เป็น anionic detergent สามารถจับกับสายโซ่โพลีเปปไทด์ด้วยอัตราส่วนคงที่ คือ SDS 1.4 กรัม / สายโซ่โพลีเปปไทด์ 1 กรัม เมื่อ SDS จับกับสายโซ่ของโปรตีนจะทำให้ประจุสุทธิเป็นลบ การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลทั้งหมดจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกทั้งหมด โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS – PAGE

A – Solution		
Acrylamide (CH ₂ CHCONH ₂)	29.2 g.	(A – 27)
N,N – Methylene – bis (acrylamide)	0.8 g.	(M – 11)
With H ₂ O	100	ml

B – Solution		
1.5 M Tris – HCl (pH 8.8)	18.17 g.	
0.4 % SDS	0.4 g.	
With H ₂ O	100	ml

C – Solution		
0.5 M Tris – HCl (pH 6.8)	6.06 g.	
0.4 % SDS	0.4 g.	
With H ₂ O	100	ml

D – Solution		
10 % Ammonium persulfate	0.5 g.	
With H ₂ O	5	ml

E – Solution		
Electrophoresis buffer		
0.025 M Tris – HCl	3 g.	
0.192 M glycine	14.4 g.	
0.1 % SDS	1 g.	
With H ₂ O	1000	ml

Gel Preparation

Seperating Gel (12.5 %)	
A – Solution	7.5 ml
B – Solution	4.5 ml
Distilled H ₂ O	6.0 ml
D – Solution	0.07 ml
TEMED	0.01 ml

Stacking Gel (4.4%)	
A – Solution	0.9 ml
C – Solution	1.5 ml
Distilled H ₂ O	3.6 ml
D – Solution	0.018 ml
TEMED	0.006 ml

Sample Preparation

BFB color	
Bromophenol Blue	1 mg.
Glycerol	100 μ
H ₂ O	900 μ

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

Staining and Destaining Solution

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

Destaining solution	
Methanol	200 ml
Acetic acid	70 ml
H ₂ O	730 ml

การเตรียม Slap Gel

1. เตรียมสารละลาย separating gel เทลงระหว่างแผ่นแก้วของชุด Electrophoresis ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศจากนั้นค่อยๆเติมน้ำกลั่นคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
2. เตรียมสารละลาย stacking gel
3. เทน้ำออกจากผิวหน้าเจลที่แข็งตัวแล้ว rinse ผิวหน้าเจลด้วย stacking gel 1 ครั้ง แล้วเทส่วน stacking gel จนเต็ม เสียบ comb พักไว้จนเจลแข็งตัว
4. ดึง comb ออก ล้างส่วน stacking gel ด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างด้วย electrode buffer

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างโปรตีนสกัดหรือ supro 0.05 กรัม
2. เติม sample buffer 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
3. เติม 2 – Mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร
4. เติม BFB color 0.1 มิลลิลิตร
5. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

การทำ Electrophoresis

1. ต่อชุด electrophoresis เข้าด้วยกัน เติม electrode buffer
2. ใช้ micro syring ดูดสารละลายตัวอย่าง 5 – 7 ไมโครลิตร เติมในช่องของ stacking gel
3. ต่อส่วนของ chamber เข้ากับส่วนจ่ายกระแสไฟ ทำการ run gel
4. ปิดส่วนจ่ายกระแสไฟเมื่อเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล
5. นำแผ่นเจลออกจากกระบอก ทำการย้อมสีแผ่นเจล

การย้อมสีแผ่นเจล

1. ค่อยๆนำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว ลงในภาชนะที่มี staining solution อยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 40 นาที
2. เมื่อครบเวลาเท staining solution ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ใน destaining solution จนแผ่นเจลใสเห็นแถบชัดเจน
3. เท destaining solution ทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วนำแผ่นเจลไปอบแห้ง

การอบเจล

1. แช่แผ่นเจลในสารละลายที่มี alcohol 30% และ glycerol 2% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นที่มีส่วนผสมของ glycerol 1% เป็นเวลา 1 – 2 นาที
3. การอบเจลใช้แผ่น cellophane 2 แผ่น แช่ในน้ำกลั่นที่แช่เย็นจนแผ่น cellophane อิมตัว นำแผ่น cellophane แผ่นแรกวางบนฐาน เติมน้ำกลั่น 5 – 10 มิลลิลิตร
4. นำเจลวางบนแผ่น cellophane ใส่น้ำกลั่น 5 – 10 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกให้หมด
5. นำแผ่น cellophane อีกแผ่นวางทับ ไล่อากาศออกให้หมด
6. นำกรอบสติงมาครอบ ล็อคกรอบให้เป็นมุมตั้งฉาก
7. ยกกรอบออกจากฐานพลิกด้านล่างขึ้นด้านบน แล้วนำเข้าเครื่องอบเจล โดยเปิดสวิทช์ไปที่ 0 เปิด speed ไปที่ low
8. อบเจลประมาณ 1 – 2 ชั่วโมงหรือจนเจลแห้งแล้วจึงนำออกจากกรอบ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นของโอคาราโดยใช้ Halogen Moisture analyzer
ตัวอย่างโอคาราสด ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วย Halogen ดังนี้
ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมในถาด halogen ใช้โปรแกรม step drying อุณหภูมิในการทำแห้ง 200 องศาเซลเซียส 7 นาที 150 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิสุดท้าย 105 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างโอคาราแห้ง ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วย Halogen ดังนี้
ชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม ในถาด halogen ใช้โปรแกรม rapid drying อุณหภูมิในการทำแห้ง 105 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

สารเคมี

1. conc. Sulfuric acid
2. 4% Boric acid
3. 0.1 N Hydrochloric acid
4. 32 % Sodium Hydroxide
5. Mixed catalyst ($K_2SO_4 : CuSO_4 \cdot 5H_2O = 8:1$)
6. Mixed indicator
เตรียม 0.1 % Bromocresol Green ใน 95% Alcohol และ
0.1% Methyl red ใน 95% Alcohol
ผสม 10 มิลลิลิตร Bromocresol Green กับ 2 มิลลิลิตร Methyl red

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask 250 ml
2. เติม mixed catalyst 7 กรัม เติม conc. Sulfuric acid 15 ml และ glass beads
3. นำ Kjeldahl flask วางในชุดย่อยโปรตีน ย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าใส ทิ้งให้เย็น ค่อยๆ เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
4. นำหลอด Kjeldahl เข้าเครื่องกลั่น เติม sodium hydroxide 60 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ทำการกลั่นประมาณ 4 นาที เก็บก๊าซแอมโมเนียที่เกิดด้วย สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ 60 มิลลิลิตร มี mixed indicator 2 – 3 หยด
5. นำกรดบอริกที่มีก๊าซอยู่ภายในมาทำการไทเทรตกับ 0.1 N HCl จนสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู จนปริมาณกรดที่ใช้

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(\text{ml. HCl ที่ไทเทรตตัวอย่าง} - \text{ml. HCl ที่ไทเทรต blank}) \times 14 \times 0.1 \times 100}{\text{mg. ของตัวอย่างแห้งที่ใช้}}$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Nitrogen} \times \text{Factor (5.71 for soybean)}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

1. อบปีกเกอร์ไขมันและ glass bead ที่ 120 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง ชั่งและบันทึกน้ำหนักของปีกเกอร์รวมทั้ง glass bead
2. ชั่งตัวอย่างแห้งประมาณ 1 กรัมในกระดาศกรอง ห่อตัวอย่าง ใส่ใน Thimble ใส่ในเครื่อง soxhlet
3. ทำการสกัดไขมันด้วย Hexane ใช้เวลาประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง หรือให้เกิดการหมุนเวียน Hexane 3 – 4 รอบ
4. ระบาย Hexane ออก แล้วนำปีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักปีกเกอร์รวมทั้ง glass bead และน้ำมันที่สกัดออกมาได้
5. คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำมันในตัวอย่างแห้ง

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

1. อบ crucible จนน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนัก crucible เปล่า
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัมใส่ใน crucible นำไปเผาบน hot plate จนตัวอย่างเป็นสีดำทั้งหมดและไม่มีควัน
3. นำ crucible เข้าเผาใน furnace อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีขาวทั้งหมด
4. ชั่งน้ำหนัก crucible รวมเถ้า คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เถ้าในตัวอย่าง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวณัชชา สุพิชญางกูร
วัน เดือน ปี เกิด	5 กุมภาพันธ์ 2522
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	80/934 ซอย 38 หมู่บ้านทิพวัล 1 ถนนเทพารักษ์ ตำบลบางเมืองใหม่ อำเภอเมือง สมุทรปราการ 10270
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2542 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร