บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ถั่วเขียว (Mungbean ,Green gram) หรือถั่วทอง (Golden gram) พืชใบเลี้ยงคู่ ประเภทพืชล้มลุก อยู่ในตระกูล Leguminosae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna radiata* (L) *Wilezek* เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และแหล่งปลูก วุฒิชัย นาครักษา (2526) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวที่ปลูกในประเทศไทย พบว่ามีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนร้อยละ 24.24 ความชื้นร้อยละ 8.10 ไขมันร้อยละ 1.12 เถ้าร้อยละ 3.92 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62.84 โดยน้ำหนัก ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากถั่วเขียวในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นการนำแป้งที่สกัดได้จากถั่วเขียวมาผลิตเป็นวุ้นเส้น,แป้งซ่าหริ่ม และได้โปรตีนถั่วเขียวเป็นผลพลอยได้ ซึ่งขายเป็นวัตถุดิบในการทำอาหารสัตว์

<u>โปรตีนในถั่วเขียว</u>

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวพบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต (สตาร์ช) รองลงมาคือ โปรตีน ซึ่งมีปริมาณประมาณ 20-26% (AVRDC,1975) ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ได้มีผู้ทดลองสกัดโปรตีนถั่วเขียว ศึกษาชนิดและลักษณะรวมถึงสมบัติด้านการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเขียวไว้ดังนี้

Satterlee, Members และ Kendrick (1975) ได้ทดลองเกี่ยวกับการเกิดฟองของโปรตีนที่สกัดจากถั่วเขียวสายพันธุ์ Great Northern Bean พบว่า โปรตีนเข้มข้นและอัลบูมินให้ปริมาตรฟองมากที่สุดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนโกลบูลินให้ปริมาตรฟองมากที่สุดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟองขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและความเป็นกรด-ด่างของสารละลายด้วย เช่น อัลบูมิน จะมีปริมาตรฟองมากที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แต่โกลบูลินจะมีปริมาตรของฟองเพิ่มมากที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6

Coffmann และ Garcia (1977) ได้ทำการสกัดโปรตีนถั่วเขียวโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.001 นอร์มัล อัตราส่วนแป้งถั่วเขียวต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:20

โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เวลาในการสกัดนาน 1 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกส่วนที่ไม่ละลาย ที่ 700 g นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 4.4 - 4.5 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.5 นอร์มัล แยกตะกอนโปรตีนโดยเหวี่ยงแยกที่ 700g นาน 30 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายกรดที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 จำนวน 3 ครั้ง และนำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 นอร์มัล ทำแห้งตะกอนโปรตีนด้วยวิธีแช่เยือกแข็งจะได้โปรตีนไอโซเลท (Protein isolate) และได้นำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของความสามารถในการเกิดฟอง (Foamability) ที่อุณหภูมิห้อง pH 7.0 และความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 8% โดยการวัดปริมาตรที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการตีให้นานขึ้น และเพิ่มความเร็วในการตีให้มากขึ้น พบว่าเมื่อใช้เวลาในการตี 10 นาที แต่ใช้ความเร็วที่เลข 3 และเลข 10 ปริมาตรเพิ่มขึ้น คือ 439 และ 729 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ความเร็วในการตีที่เลข 10 เท่ากัน แต่เวลาในการตีเป็น 5 และ 10 นาที ตามลำดับปริมาตรที่เพิ่มขึ้น คือ 625และ 729 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และได้สรุปว่าโปรตีนถั่วเขียวแสดงคุณสมบัติการให้ฟองที่ดี แต่ด้อยกว่าโปรตีนไข่ขาว เพราะโปรตีนไข่ขาวจะให้ฟองที่คงตัวมากกว่า

Thompson (1977) ได้ทำการสกัดโปรตีนจากถั่วเขียว โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล ที่ pH 9 ใช้อัตราส่วนแป้งถั่วเขียวต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 ^{0} C นาน 20 นาที จากนั้นแยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยเหวี่ยงแยกที่ 1000g เวลานาน 20 นาที และตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.0 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มัล ล้างตะกอนโปรตีนด้วยน้ำกลั่น 1 รอบ สุดท้ายปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางและทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้โปรตีนไอโซเลท (Protein isolate) ที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 83.8 (ร้อยละ 91.7 dry basis) ความชื้นร้อยละ 8.6 เถ้าร้อยละ 4.0 มีปริมาณ Lysine สูง แต่มี Methionine และ Cystine ต่ำมีสีครีมละลายได้ที่ pH สูงและต่ำกว่า Isoelectric point

Narang, Bain และ Bhatia (1981) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากแป้งถั่วเขียว ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ นำสารละลายที่ได้ไปปรับความเป็นกรดด่าง แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีเหวี่ยงแยก ได้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 62,500 รูปร่าง (Conformation) ของโปรตีนมีความคงทนที่อุณหภูมิ 35-85 °C วุฒิชัย (2526) ได้ศึกษารูปร่างของโปรตีนถั่วเขียวสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์โบเนตด้วยกล้อง SEM (Scanning Electron Microscope) ปรากฏว่าโปรตีนจากถั่วเขียวมีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอนโดยพบทั้งรูปร่างที่เป็นร่างแหเดี่ยวหรือเรียงเป็นชั้น อาจเกาะกันเป็นก้อนมีรูปร่างแน่นอน หรือเป็นสายโปรตีนที่เกาะกันแน่น

Sathe และ Salunkhe (1981) ได้ทำการศึกษาโปรตีนถั่วเขียวสายพันธุ์ Great northern bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) ซึ่งประกอบด้วยปริมาณโปรตีน 26.10% (dry weight basis) มีค่า Isoelectric point (pI) 4.4 โดยมีองค์ประกอบหลักเป็น Albumins และ Globulins ในปริมาณ 21.18 และ 73.40% ตามลำดับ ของโปรตีนในถั่วเขียวทั้งหมด จากนั้นได้ศึกษาคุณสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนชนิดต่างๆ (Albumin, Globulin, Protein concentrates, Protein isolates) จาก Great northern bean โดยทำการเปรียบเทียบกับ Egg albumin พบว่า Albumin ที่สกัดได้จาก Great northern bean จะมีความสามารถในการเกิดฟองสูงที่สุด รองลงมาคือ Protein concentrates ซึ่งสูงกว่า Egg albumin ส่วน Globulin มีความสามารถในการเกิดฟองเท่ากับ Egg albumin ขณะที่ Protein isolates มีความสามารถในการเกิดฟองต่ำสุด อย่างไรก็ตามไม่มีโปรตีนชนิดใดที่มีความคงตัวของฟองเทียบเท่ากับ Egg albumin แต่อยู่ในเกณฑ์พอใช้ โดยความคงตัวของฟองจะสูงสุดที่ pH 4 ซึ่งเป็นจุดที่โปรตีนในถั่วเขียวละลายน้ำได้น้อยที่สุด และตกตะกอน นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเขียว จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาสมบัติทางด้านกายภาพของฟองที่ได้จากโปรตีนถั่วเขียวชนิดต่างๆ พบว่ามีลักษณะเป็นสีครีมไม่ขาวเหมือนฟองจาก Egg albumin และพบว่าการให้ความร้อนแก่โปรตีนจากถั่วเขียวจะช่วยให้ฟองมีความคงตัวมากขึ้น

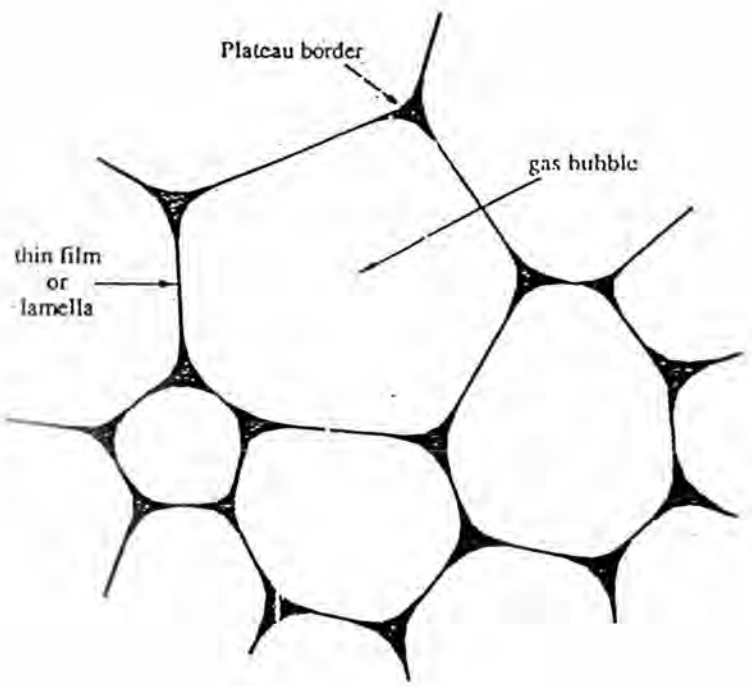
<u>คุณสมบัติทั่วไปของโบรมีเลน</u>

โบรมีเลน (Bromelain) (E.C.3.4.4.24) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชในตระกูล Bromeliaceae พืชในตระกูลนี้ที่รู้จักกันดีคือสับปะรด(*Ananas comosus* (L.) *Merr*) สามารถตรวจพบแอคติวิตีของโบรมีเลนในส่วนต่างๆ ของต้นสับปะรด เช่น ผล เปลือก แกน เนื้อ ใบ และลำต้น โบรมีเลนจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (-SH;sulfhydryl) ในบริเวณเร่ง (active site) เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน (papain) จากมะละกอและเอนไซม์ฟิซิน (ficin) จากมะเดื่อ โดยโบรมีเลน 1 โมเลกุลจะมี disulfide bridge 5 ตำแหน่งและมีหมู่ซัลไฟดริล 1 กลุ่ม ทั้งหมดนี้ล้วนอยู่ในกลุ่มที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของบริเวณเร่งในการเร่งปฏิกิริยาของโบรมีเลน (Murachi and Yasui, 1965) โบรมีเลนสามารถย่อยพันธะเพปไทด์ (peptide) เอไมด์ (amide) และเอสเทอร์ (ester) ของกรดอะมิโนและเพปไทด์ชนิดอื่นได้ดี ตัวอย่างเช่น benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) และ benzoyl-L-arginine amide (BAA) (Yamamoto, 1975) โบรมีเลนสามารถย่อยสับสเตรทจำพวกโพลีเปปไทด์ได้ดีคล้ายกันกับปาเปนและฟิซิน ต่างกันที่โบรมีเลนจะมีความจำเพาะในการย่อยพันธะที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโน

อาร์จีนีน-อะลานีน (Arg-Alg) และ อะลานีน-กรดกลูตามิค (Alg-Glu) แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่เชื่อมระหว่างอาร์จีนีน-อาร์จีนีน (Arg-Arg) และ ไลซีน-ไทโรซีน (Lys-Tys) (Murachi and Neurath, 1960)

ฟองในอาหาร (Food foams)

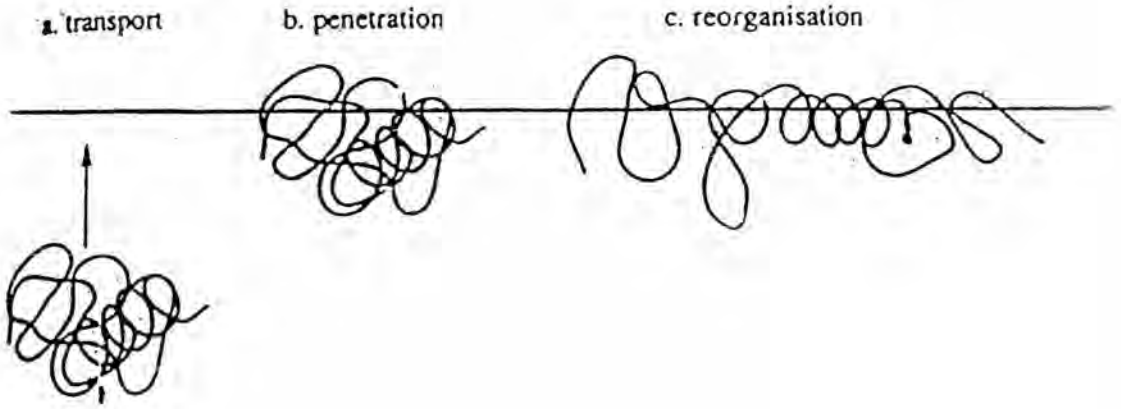
สมบัติในการสร้างฟองที่คงตัวของโปรตีนมีความสำคัญในการผลิตอาหารหลากหลายชนิดฟองเป็นระบบคอลลอยด์ 2 เฟส คือ เฟสของเหลว (Liquid phase) และเฟสของอากาศ (Air phase) โดยมีลักษณะของเซลล์อากาศ แยกออกจากกันโดยเยื่อเหลวบาง ที่เรียกว่าฟิล์มบาง (Thin film) หรือลาเมลลาร์ (Lamellar) ต่อเนื่องกันเป็นโคร่งร่างตาข่ายของ Plateau borders ดังรูปที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงโครงสร้างของฟอง (Foam bubbles)
ที่มา : Wilde, P.J. and Clark, D.C.,1996

แต่โดยปกติฟองในระบบอาหารจะเป็นระบบผสมของ ก๊าซ ของเหลว ของแข็ง และสารลดแรงตึงผิว (Surfactants) ขนาดของฟองอากาศที่กระจายอยู่ในระบบมีอิทธิพลต่อลักษณะปรากฏและสมบัติด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร ถ้าเป็นฟองอากาศขนาดใหญ่ ผลิตภัณฑ์อาหารจะมีลักษณะเนื้อสัมผัสเบาและมีรูพรุน แต่ถ้าเป็นฟองอากาศขนาดเล็กลักษณะเนื้อสัมผัสที่ได้จะเบาและเรียบกว่า โดยปกติสามารถทำให้เกิดฟองได้หลายวิธี เช่นการตีให้ขึ้นฟู การเขย่า การอัดอากาศ ซึ่งแต่ละวิธีส่งผลถึงสมบัติของฟองที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจาก 2 ค่า คือ กำลังการเกิดเกิดฟอง (Foaming capacity) วัดจากปริมาตรของฟองที่เกิดขึ้นและแสดงเป็นค่าของเปอร์เซ็นต์ Overrun ส่วนอีกค่าหนึ่งคือ ความคงตัวของฟอง (Foam stability) วัดเวลาที่ใช้สำหรับการสลายตัว (Collapse) ของฟอง เป็นที่ทราบดีว่าโปรตีนมีความสามารถในการสร้างฟองที่ดี โดยเฉพาะโปรตีนจากไข่ขาว ที่มักนำมาผลิตเป็นสารให้ฟอง เนื่องจากไข่ขาวมีโปรตีนหลายชนิดอยู่รวมกัน นอกจากนี้ยังมีการใช้โปรตีนจากแหล่งอื่น เช่น เจลาติน เคซีน โปรตีนถั่วเหลือง และกลูเตน

<u>กลไกการเกิดฟอง</u> (The Mechanism of foam formation)



<u>ภาพที่ 2.2</u> กระบวนการดูดซับ (Adsorption) ที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ ของโปรตีน
ที่มา : Wilde, P.J. and Clark, D.C.,1996

ประกอบด้วยสามขั้นตอน อันดับแรกโปรตีนที่สามารถละลายได้จะเกิดการแพร่กระจาย (Diffusion) ไปยังผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ (Air – water interface) มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แรงตึงผิวลดลง อันดับต่อมา โปรตีนจะเกิดการคลายตัว (Unfolding) ที่ผิวหน้าเมีการเปลี่ยนรูปร่าง (Conformation change) และจัดเรียงตัวให้หมู่ไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic groups) ชี้ไปยัง Aqueous phase และหมู่ไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic groups) ชี้เข้าหา Air phase สุดท้าย จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโฟลีเปปไทด์เพื่อสร้างเป็นฟิล์ม ซึ่งโปรตีนอาจมีการเสียสภาพบางส่วน (Partial denaturation) และรวมตัวกันตกตะกอน (Coagulation) จะช่วยสนับสนุนการสร้างฟอง

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนพืชด้วยเอนไซม์</u>

เนื่องจากโปรตีนสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ มีผลในการเพิ่มคุณสมบัติด้านการละลาย (Solubility) แต่ทั้งนี้ถ้าต้องการปรับปรุงสมบัติติดกันหน้าที่ของโปรตีน (Functional properties) ในอาหาร ดังเช่น สมบัติด้านการเกิดฟอง (Foaming properties) จำเป็นต้องจำกัดการย่อยสลายโปรตีน (Limited hydrolysis) วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก ในการจำกัดการย่อยสลายโปรตีน คือ การควบคุมระดับการย่อย (Degree of hydrolysis ; DH ซึ่งวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทั้งหมด) โดย การหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่ต้องการ วิธีนี้จะทำให้ได้โพลีเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ขนาดเท่าโปรตีนเริ่มต้นจนถึงเปปไทด์ขนาดเล็กที่สุดที่เป็นไปได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรท และอัตราการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (Vojdani and Whitaker,1994)

วิธีการทางเอนไซม์ที่ใช้ในการปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนพืช มักนิยมใช้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส (Proteases) เช่น Bromelain, Pepsin, Papain, Ficin, Trypsin และ Bacterial proteases ย่อยสลายโปรตีนอย่างจำกัด (Limited proteolysis หรือ Limited hydrolysis) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า โปรตีนดัดแปลง (Modified – proteins) โดยสมบัติการเกิดฟองขึ้นอยู่กับปัจจัยเหล่านี้

1. กระบวนการย่อยสลาย (Process treatment)

ชนิดของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีน ที่ระดับการย่อยสลายเท่ากันแตกต่างกันด้วย (Bernadi et al.,1991)

ระดับการย่อยสลาย

ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis,DH) เป็นการวัดระดับของการตัด Peptide linkages ซึ่งโปรตีนโดยทั่วไปจะมีค่า DH เท่ากับ 0 % และโปรตีนที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์แล้วจะมี DH เท่ากับ 100 % การวัดระดับการย่อยสลายอาจทำได้โดย 1. วัดการเพิ่มขึ้นของการละลายใน Trichloroacetic acid 2. เฝ้าติดตามปริมาณเบสที่เติมลงไปเพื่อควบคุม pH ให้คงที่ขณะการย่อยสลาย (pH stat method) 3.การลดลงของจุดเยือกแข็ง (Osmometry) โดยอาศัยความสัมพันธ์โดยตรง ระหว่างความเข้มข้นทั้งหมดของโมเลกุลในสารละลาย และจุดเยือกแข็งของมัน ซึ่งระดับการย่อยสลายขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อสับสเตรท อุณหภูมิ เวลา และ pH ซึ่งการกำหนดระดับการย่อยสลายโดยการควบคุมสภาวะดังกล่าว ส่งผลให้ได้เปปไทด์ขนาดต่างๆ (Panyam and Kilara,1996.)

2. ปัจจัยภายใน (Intrinsic factor)

การปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนพืชด้วยวิธีการทางเอนไซม์นั้น นอกจากต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายดังกล่าวแล้ว ปัจจัยภายในอื่นๆที่นับได้ว่าเป็นสิ่งสำคัญที่มีส่วนช่วยในการประเมินผล ต่อสมบัติการเกิดฟองของ Enzyme-modified Plant protein ได้ ประกอบด้วยปัจจัยต่างๆ ดังต่อไป

ขนาดของโมเลกุลโปรตีน (Molecular size)

ขนาดของโมเลกุลมีอิทธิพล Rigidity และ Flexibility ของสายเปปไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างฟองของโมเลกุลโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนที่มี Flexibility สูง สามารถเกิดการคลายตัวของโมเลกุล ที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ เพื่อสร้างฟองได้ง่าย ส่งผลให้ค่ากำลังการเกิดฟองเพิ่มขึ้น

การละลาย (Solubility)

การละลาย เป็นสมบัติทางโมเลกุลของโปรตีนซึ่งสัมพันธ์กับสมบัติการสร้างฟองของโปรตีนเนื่องจากโมเลกุลโปรตีน (Protein molecules) ที่สามารถละลายได้ใน Aqueous phase จะสามารถแพร่กระจาย (Diffusion) ไปยังผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ (Air – water interface) ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นสมบัติที่ต้องการในการสร้างฟอง วิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการเพิ่มสมบัติด้านการละลายของโปรตีน คือการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ เพื่อกำจัดพันธะข้ามเชื่อมของโปรตีน (Protein crosslinkages) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการละลาย นอกจากนี้เป็นการลดน้ำหนักโมเลกุลและเพิ่ม Ionizable groups เพราะการย่อยสลายทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้น ๆ ส่งผลทำให้โปรตีนละลายได้เพิ่มขึ้น (Panyam and Kilara,1996.)

ความหนืด (Viscosity)

โดยปกติเมื่อสารละลายโปรตีนมีความหนืดเพิ่มขึ้น จะช่วยเพิ่มความคงตัวของฟอง แต่เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ ซึ่งทำให้การละลายของโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้นนั้น พบว่าจะส่งผลทำให้ความหนืดของสารละลายโปรตีนลดลง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีค่ากำลังการเกิดฟองเพิ่มขึ้น แต่ความคงตัวของฟองลดลง (Puski ,1975) เนื่องจากความหนืดของ Surface film และ Bulk liquid เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความคงตัวของฟอง ฟิลม์ที่มีความหนืดที่ผิวสูงจะสามารถสร้างฟองที่แข็งแรง ซึ่งเป็นผลของ Cohesive forces ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Zayas, 1997)

แรงตึงผิว (Surface tension)

เนื่องจากโมเลกุลของของเหลวมีแรงดึงดูดซึ่งกันและกัน การเคลื่อนที่ของแต่ละโมเลกุลจึงอยู่ภายใต้อิทธิพลของโมเลกุลอื่นที่อยู่ใกล้เคียง โมเลกุลที่อยู่ตรงกลางได้รับแรงดึงดูดจากโมเลกุลอื่นที่อยู่ล้อมรอบเท่ากันทุกทิศทุกทาง ส่วนโมเลกุลที่ผิวหน้าจะได้รับแรงดึงดูดจากโมเลกุลที่อยู่ด้านล่างและด้านข้างเท่านั้น ดังนั้นโมเลกุลที่ผิวหน้าจึงถูกดึงเข้าภายในของเหลว ทำให้พื้นที่ผิวของของเหลวลดลงเหลือน้อยที่สุด แต่ในการสร้างฟองนั้นจำเป็นต้องเพิ่มพื้นที่ผิว โดยโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ด้านในของของเหลวจะเคลื่อนมายังพื้นผิว ในกรณีนี้จึงต้องการเอาชนะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยการพยายามลดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล ด้วยการทำให้แรงตึงผิวลดลง ดังนั้นการลดลงของแรงตึงผิว จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟองของโปรตีน เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการดูดซับได้อย่างรวดเร็วที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำของโมเลกุลโปรตีน ทั้งยังมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น โดยสามารถลดลง เมื่อความเข้มข้นที่ผิวหน้าเพิ่มขึ้น (Kitabatake and Doi,1988)

ความเข้มข้น (Concentration)

ความเข้มข้นของโปรตีนมีอิทธิพลต่อปริมาตรและความคงตัวของฟอง การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน เป็นผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น เพิ่มความคงตัวของฟอง เพราะฟิล์มโปรตีนที่ห่อหุ้มอากาศมีความหนาของ lamella เพิ่มขึ้น และในขณะผสมสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงจะได้ปริมาตรฟองเพิ่มขึ้นเนื่องจากโปรตีนสามารถดูดซับที่ผิวหน้าได้อย่างรวดเร็ว ประกอบกับมีความเข้มข้นเพียงพอเพื่อสร้างฟิล์มห่อหุ้มอากาศไว้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (Zayas, 1997)

หมู่ไฮโดรโฟบิกที่ผิว (Surface hydrophobicity)

โปรตีนมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถสร้างฟิล์มที่คงตัวของฟองได้ เป็นผลมาจาก การเปลี่ยนรูปร่างโมเลกุลของโปรตีน (Molecular configuration) , พันธะระหว่างโมเลกุล (Intermolecular bond) จำนวนและตำแหน่งของ Hydrophobic residue การเปลี่ยนรูปร่าง (Conformational change) ของโปรตีนที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ (Air - water interface) เกิดขึ้นโดยการคลายตัว (Unfolding) ทำให้ Hydrophobic regions เปิดออก ปรากฏการณ์เช่นนี้ทำให้ Polypeptides สามารถจัดตัวที่ผิวหน้าได้ง่ายและเพิ่มขึ้น โดยจัดตัวให้ Hydrophobic

groups ชี้ไปยัง Air phase และ Hydrophilic groups ชี้ไปยัง Aqueous phase เกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มรอบ ๆ ฟองอากาศไว้ได้ (Zayas,1997)

Hayakaya และ Nakai (1985)กล่าวว่า Hydrophobicity ของโปรตีนมีทั้ง Aliphatic และ Aromatic hydrophobicity โดยที่ Aliphatic hydrophobibity มาจาก Aliphatic amino acid residues และ Aromatic hydrophobicity มาจาก Aromatic acid residues ความสมดุลที่เหมาะสมระหว่าง Hydrophobic groups, Hydrophilic groups และการละลายของโปรตีนเป็นตัวกำหนดสมบัติการเกิดฟอง (Foaming properties) ของโปรตีน เราสามารถวัด Total hydrophobicity ของโปรตีนได้จากกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ส่วนความหนืด (Viscosity) ของสารละลายโปรตีนเป็นตัวกำหนดความคงตัวของฟอง

Kitabatake และ Doi (1982) รายงานว่า โปรตีนที่มีอัตราส่วนของ Polar ต่อ Non-polar ต่ำ จะมีการคลายตัวอย่างสมบูรณ์ที่ Gas- liquid interface และโปรตีนที่มี Hydrophobic groups บนผิวมาก จะเกิดการคลายตัวอย่างรวดเร็วที่ระหว่างผิว Townsend และ Nakai (1983) รายงายว่า Foaming capacity มีความสัมพันธ์กับ Total hydrophobicity มากกว่า Surface hydrophobicity (ในกรณีที่ไม่มีการ Unfolding) แต่พบว่า Surface hydrophobicity มีความสำคัญต่อ Emulsifying capacity ของโปรตีนมากกว่า Zayas,1997(Kato, et al.,1981) รายงานว่าสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการให้ความร้อนปานกลางและการเสียสภาพด้วยความร้อน เป็นผลให้เกิดการคลายตัวบางส่วนและการเปิดออกของ Hydrophobic groups เกิดการเพิ่มขึ้นของ Surface hydrophobicity และ ลดลงของ Surface tension อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนมากเกินไป จะทำให้โปรตีนเสียสภาพแบบไม่ผันกลับ เกิดการจัดตัวกันและตกตะกอนได้ เป็นผลให้ฟองถูกทำลาย

กล่าวโดยสรุป พบว่าการดูดซับ (Absorption) ของโมเลกุลโปรตีนที่เสียสภาพบางส่วนที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ จะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่มีการลดลงของ Surface tension ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในการจัดเรียงตัวของโมเลกุล นอกจากนี้พบว่า Foaming capacity ที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เสียสภาพแต่ยังคงละลายได้ อาจเกิดจากการลดต่ำลงอย่างรวดเร็วของ Surface tension ด้วยการดูดซับของโมเลกุลที่คลายตัวและมีเสถียรภาพโดย Solid particles

ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามในการเพิ่ม Surface hydrophobicity เพื่อปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนพืช ด้วยวิธีการที่นอกเหนือจากการให้ความร้อนซึ่งเป็นวิธีการทางกายภาพซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า วิธีการทางเคมี และเอนไซม์

3. ปัจจัยภายนอก (Extrinsic Factor) เช่น ความเป็นกรดด่างของอาหาร ปริมาณเกลือ น้ำตาล ไขมัน เป็นต้น

ผลของ pH

pH ของสารละลายมีอิทธิพลต่อสมบัติของฟองอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลต่อประจุสุทธิของโปรตีน ซึ่งส่งผลต่อการสร้างฟิล์มและสมบัติของฟิล์ม ทั้งนี้เนื่องจากอัตราและระดับการพัฒนาของ Surface pressure , โครงสร้างของโปรตีน , ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Protein – protein interactions , ความหนาของฟิล์ม และ Viscoelastic properties ล้วนแล้วแต่เป็นผลมาจากประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนทั้งสิ้น โดยทั่วไป การสร้างฟิล์มอย่างรวดเร็ว และได้ฟิล์มที่มีความแข็งแรง จะเกิดขึ้นที่ Isoelectric pH ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ เพราะฉะนั้นการเตรียมฟองใกล้ ๆ กับ Isoelectric pH พบว่าจะได้ฟองที่มีความคงตัวดี ถ้าโปรตีนยังคงสามารถกระจาย (Dispersible) ได้ที่ pH นั้น ๆ เพราะ Electrostatic attractions ระหว่าโมเลกุลโปรตีนมีค่าสูงสุดที่ pI เป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ Protein – protein interaction แรงตึงผิวลดลง ได้ฟิล์มที่หนามากที่สุด มีความหนืดสูงและมีความยืดหยุ่น (Elasticity) เพราะเกิด Electrostatic Bonding สูงในระหว่างโมเลกุล แต่ที่ pH เหนือและต่ำกว่า pI โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็น Negative และ Positive charge ตามลำดับ เป็นผลให้มี Electrostatic repulsion (แรงผลัก) สูงบดบังการสร้างฟิล์มและฟอง เนื่องจากโปรตีนเกิดปฏิกิริยากับน้ำได้สูง (German and Phillips,1994)

ผลของน้ำตาล

ผลของน้ำตาลต่อกำลังการเกิดฟองของโปรตีนพบว่าสัมพันธ์กับการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนด้วยความร้อน โดยพบว่าน้ำตาลที่ระดับ 20% มีผลเป็นสารป้องกันการเสียสภาพสำหรับโปรตีนไข่ขาวในระหว่างการฆ่าเชื้อและทำแห้ง Kinsella ,1976 กล่าวว่าน้ำตาลมีอิทธิพลต่อการลดลงของค่ากำลังการเกิดฟองของโปรตีน เนื่องจากยับยั้งการรวมตัว (Incorporation) ของฟองอากาศในสารละลาย แต่พบว่าน้ำตาลมีผลในการเพิ่มความคงตัวของฟองเนื่องจากไปเพิ่ม bulk viscosity และ Surface tension โดยที่อิทธิพลของน้ำตาลต่อความคงตัวของฟองขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาล นอกจากนี้น้ำตาลยังมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติด้านผิวหน้า (Surface properties) ของฟิลม์โปรตีนอีกด้วย โดยโปรตีนสามารถดูดซับที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีน้ำตาล (Zayas,1997)

ผลของเกลือ

พบว่าการเติมเกลือมีอิทธิพลต่อค่ากำลังการเกิดฟองของโปรตีนเพราะเกลือมีอิทธิพลต่อ ความสามารถในการละลาย ความหนืด การคลายตัวและการรวมตัวของโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่าเกลือมีผลในการเพิ่มกำลังการเกิดฟอง และลดความคงตัวของฟอง Kinsella, 1976 ได้รายงานว่าการเติมเกลือลงในสารละลายโปรตีนถั่วเหลือง ส่งผลให้ค่ากำลังการเกิดฟองเพิ่มขึ้นแต่ความคงตัวของฟองลดลง โดยอธิบายว่าการเพิ่มขึ้นของค่ากำลังการเกิดฟองนั้นเนื่องจากความสามารถในการละลายสูงขึ้นที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ อย่างไรก็ตามเกลือจะไปขัดขวางการเสียสภาพบางส่วนของโพลีเปปไทด์ของโปรตีน ที่จำเป็นสำหรับ protein-protein interaction และความคงตัวของฟอง(Zayas,1997)

ผลของไขมัน

เนื่องจากฟองสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่ไม่สามารถละลายได้ ซึ่งเป็นสาเหตุการแตกของฟองอากาศ ซึ่งสารดังกล่าวได้รวมถึงไขมันที่มี Surface activity สูงด้วย โดยไขมันจะเข้ารบกวนการจัดเรียงตัวของฟิลม์โปรตีนที่ถูกดูดซับที่ระหว่างผิวหน้า โดยทำลายตำแหน่งที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ นอกจากนี้สามารถทำให้พันธะระหว่าง protein-protein interactions อ่อนลง โดยการรบกวนที่ Hydrophobic surface การที่ไขมันสามารถทำลาย protein-protein interactions ที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ และยับยั้งการสร้างฟองได้นั้น เนื่องจากไขมันสามารถเข้าแทนที่โปรตีนที่ระหว่างผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำได้นั่นเอง (Zayas ,1997)

สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

Puski (1975) ทดลองย่อยสลาย Soy protein isolate เข้มข้น 15 % ด้วยปริมาตร 1 ลิตร Neutral protease จาก *Aspergillus oryzae* จำนวน 0.030 , 0.075 , 0.15 และ 0.30 g ที่อุณหภูมิ 50 °C pH 7.0 นาน 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนอุณหภูมิ 70 °C นาน 10 นาที แล้วจึง freeze drying พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มี ค่าการละลายที่ pH 4.5 เพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ค่าการขยายตัวของฟอง (Foaming expansion)สูงขึ้นตามไปด้วย ส่วนความหนืดของสารละลาย กลับพบว่ามีค่าลดลง ตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความคงตัวของฟองลดลง

Horiuchi และ Fukushima (1978) ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง Foam stability ของ Hydrolyzed protein 5 ชนิด คือ Gelatin, Egg albumin, Wheat gluten, และ Soybean protein กับสมบัติด้านโครงสร้างของโมเลกุล พบว่าความคงตัวของฟอง (Foam stability) มีความสัมพันธ์กับระดับของไฮโดรโฟบิกบนผิวของโมเลกุลโปรตีนที่ย่อยสลายอย่างจำกัดด้วยเอนไซม์ โดยเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของไฮโดรโฟบิกบนผิวเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของไฮโดรโฟบิกเป็นผลให้โมเลกุลโปรตีน เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และจัดตัวได้ง่ายที่ผิวหน้า และมีแนวโน้มที่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโพลีเปปไทด์ได้สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดฟิลม์ที่แข็งแรง ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

Sekul, Vinnett และ Ory (1978) ได้ศึกษาผลของการย่อยโปรตีนใน Peanut flour อย่างจำกัดด้วย Papain โดย ละลาย Peanut flour กับน้ำ (1:10 w / v)เติม Papain 0.5 % (Total volume)ทำให้เย็นและทำแห้ง (Freeze drying) ศึกษาคุณสมบัติด้านการละลาย (Solubility) ในช่วง pH 1-9 พบว่าการย่อยโปรตีนถั่วลิสงอย่างจำกัด มีผลในการเพิ่มทั้ง Foaming capacity และ Foam volume อย่างมีนัยสำคัญ และที่สำคัญคือการปรับ pH เป็น 2 ขั้นตอน (Two – Step process) ก่อนทำให้เกิดฟอง พบว่าค่ากำลังการเกิดฟอง (Foam capacity) และความคงตัวของฟอง (Foam stability) เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) นอกจากนี้ความคงตัวของฟองที่ pH เป็นกรดเล็กน้อย (6.3) มีค่าต่ำ ความคงตัวของฟองจะสูงขึ้นที่ pH 8.2 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้นี้มีศักยภาพที่ไม่ดีในอาหารประเภทกรด (Acid food)

Gunther (1979) ได้ศึกษากระบวนการผลิตสารให้ฟองโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย Soy protein isolate และ Oil-Free soybean flakes โดยควบคุมสภาวะในการผลิต เช่น ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ pH และเวลา ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลอง โดย Soy protein isolate ถูกสกัดจาก Oil – Free soybean flakes ด้วยสารละลายด่างและตกตะกอนด้วยกรดใน Curding tank ได้เป็น Purified cured isolate ถูกนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้น Hydrolysate ถูกแยกออกจากโปรตีนที่ไม่ถูกย่อย (Unreacted protein) โดยการเหวี่ยงแยก (Centrifugation) แล้วทำให้เข้มข้น ตามด้วยการปรับ pH แล้วทำให้แห้งโดย Spray drying ส่วนกระบวนการผลิต Modified whipping proteins แบบ Direct method เริ่มจากทำความสะอาด Oil-Free soybean flakes ด้วยน้ำผสมกรด เพื่อกำจัดเกลือ, และสารให้สี (Pigments) โดย เหวี่ยงแยกออกไป จากนั้นย่อยสลาย Insoluble protein และ Fiber residue โดยตรงด้วยเอนไซม์ ใน Reaction tank ด้วยสภาวะที่เหมาะสม จาก

นั้น เหวี่ยงแยกเอาเฉพาะ Soluble hydrolyzed fraction มาทำให้เข้มข้นใน Evaporator ตามด้วยการปรับ pH และทำแห้งด้วยวิธี Spray drying พบว่าสารให้ฟองที่ได้มีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกัน คือ มีรสจืด เป็นผงสีคล้ายครีม ละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็นเมื่อนำมาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างกัน 2 ระบบ คือ ระบบที่ประกอบด้วยน้ำตาลหรือไขมัน พบว่าผลิตภัณฑ์ขึ้นฟูอย่างรวดเร็ว และดีกว่า Egg albumen แต่ไม่จับตัวเป็นก้อนด้วยความร้อน

Bobalik และ Taranto (1980) ทดลองย่อยสลายโปรตีนใน Defatted soya flour ด้วยเอนไซม์ Papain ที่เวลา 0,5,10,15 และ 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิเป็น 50 °C pH 7.0 และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 82 ° C นาน 10 นาที ก่อนนำไปทำแห้ง (Freeze Drying) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความแตกต่างของ Foaming capacity และ Foam stability ไปตามเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย พบว่าตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ด้วยเวลาต่างๆ (5,10,15 และ 30 นาที) ให้ค่ากำลังการเกิดฟองสูงกว่า ตัวอย่างควบคุม (เวลา 0 นาที) โดยตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยเวลา 30 นาที ให้ค่ากำลังการเกิดฟองสูงสุด ส่วนความคงตัวของฟองนั้น เป็นการวัดปริมาตรของ Fluid leakage (ml) หลังจากตั้ง Whipping hydrolyzed ไว้ที่เวลาต่างๆ ซึ่งพบว่า Fluid leakage เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น พิจารณาความคงตัวของฟอง หลังจากการสร้างฟอง 30 นาที พบว่า Enzyme hydrolyzed soy flour มีความคงตัวของฟองต่ำกว่า Control ที่ทุกระดับการย่อยสลาย แต่ที่ระดับการย่อยสลาย 30 นาที ให้ค่าความคงตัวของฟองสูงกว่าที่ระดับการย่อยสลายอื่นๆ

Rahma และ Narasinga Rao (1983) ศึกษา Foaming capacity และ Foam stability ของ Cottonseed flour ที่ถูกย่อยด้วย Solid protease (*Aspergillus oryzae*)ปริมาณ 30, 70 และ 100 mg of enzyme ในสภาวะที่ควบคุม pH 7.0 อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 70 °C นาน 10 นาที ก่อนนำไปทำแห้งโดยวิธี Freeze drying และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช พบว่า Foaming capacity ของ Cottonseed flour เพิ่มขึ้นด้วยการย่อยสลาย โดยพบว่า Foam volume เพิ่มขึ้นเกือบถึง 80% ที่ระดับเอนไซม์ 30 และ 70 mg แต่ที่การใช้เอนไซม์ 100 mg มีการลดลงของ Foam volume เล็กน้อย แต่ก็ยังคงสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ทรีทด้วยเอนไซม์ ส่วน Foam stability นั้นพบว่าตัวอย่างที่ทรีทด้วยเอนไซม์ ให้ความคงตัวของฟองดีกว่า แต่โดยรวมแล้ว Foam stability ไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาตรของฟองลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 30 นาที

Bernardi และ คณะ (1991) ทดลองย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrates) ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 6% โดยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Fungal protease และ Bacterial protease ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ควบคุมอุณหภูมิเป็น 50 ° C และ pH 6.75 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ระดับการย่อยสลายต่าง ๆ โดยแปรอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรทเป็น 0.1/100-1/100 สำหรับ Fungal protease และ 0.07/100-1/100 สำหรับ Bacterial protease จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการย่อยโดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 75 °C นาน 10 นาที ก่อนนำไปทำแห้งโดย Freeze drying พบว่า การย่อยสลาย Soy Protein Concentrate (SPC) ด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ให้ค่าการละลายเป็นกรัมต่อ 100 กรัมของ Soy protein concentrates hydrolyzed ที่ neutral pH 7.0 เพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น โดยการละลายมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่ DH 10 % แต่อย่างไรก็ตาม Bacterial protease สามารถย่อยโปรตีนและให้การละลายเพิ่มขึ้นมากกว่า Fungal protease ที่ระดับการย่อยสลายเท่ากัน และพบว่าให้กำลังการเกิดฟองสูงสุดที่ DH 10 –12% โดย Soy protein hydrolyzed ที่ได้จากการใช้ Bacterial protease ให้ค่ากำลังการเกิดฟองดีกว่าการใช้ Fungal protease ในทุก ๆ DH ส่วนความคงตัวของฟองใน SPC ที่ย่อยสลายด้วย Fungal protease พบว่าเพิ่มขึ้นตาม DH ที่เพิ่มขึ้น แต่ SPC ที่ย่อยสลายด้วย Bacterial protease มีค่าความคงตัวของฟองสูงสุดที่ DH 10% และลดลงเมื่อ DH เพิ่มขึ้น ดังนี้เราจึงสามารถปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนจากพืช (Soy protein concentrate) ได้โดยการย่อยสลายอย่างจำกัด (Limited hydrolysis) โดยใช้ Fungal หรือ Bacterial protease แต่ประสิทธิภาพในการเพิ่มสมบัติการเกิดฟองของเอนไซม์ทั้งสองแตกต่างกันเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน ในกรณีนี้ Bacterial protease (*Bacillus subtilis*) เป็น mixture ของ Metallo protease และ Serine protease มีความจำเพาะกว้างย่อยสลายพันธะเปปไทด์ ให้ Hydrophobic- COOH amino acid ส่วน Fungal protease จาก *Aspergillus Oryzae* เป็น mixture ของ Aspartic, Metallo, Serine protease และ Carboxypeptidase จึงมีความจำเพาะกว้างมาก

Mannheim และ Cheryan (1992) ได้ทดลองใช้ Membrane filtration ร่วมกับการย่อยสลาย Corn Gluten Meal (CGM) ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Alkali- Protease ดังเช่น Alcalase, Chymotrypsin ที่อุณหภูมิ 50 °C โดยควบคุม pH ด้วย 4 N NaOH และหยุดปฏิกิริยาที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ ด้วย การปรับ pHเป็น 4.2 ด้วย 4 N HCl หรือความร้อน 100 °C นาน 10 นาที ก่อนที่จะถูกปั๊มไปยัง Membrane ตัวที่ 1 ที่มี MW. Cut Off 30,000 Da ในขั้นตอนนี้เปปไทด์ที่มี MW.เท่ากับหรือต่ำกว่า 30,000 Da จะผ่านลงสู่ Balance tank ส่วนที่มี MW. สูงกว่าจะกลับเข้าสู่

Reaction vessel จาก Balance tank สารละลายตัวอย่างจะถูกปั๊มต่อไปยัง Membrane ตัวที่ 2 ที่มี MW. Cut Off 10,000 Da เช่นเดียวกัน เปปไทด์ที่มี MW. เท่ากับหรือต่ำกว่า 10,000 Da จะผ่านไปได้ ส่วนที่มีขนาดใหญ่กว่า จะกลับเข้าสู่ Balance tank

ศึกษาสัมบัติด้านการละลายของไนโตรเจน (% Nitrogen solubility) และสมบัติด้านการเกิดฟอง (Foaming properties) ของ Corn gluten meal hydrolyzed กับ Membrane pore size ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ พบว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน (No UF) มีค่าการละลายของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น แต่ตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน ค่าการละลายของไนโตรเจนไม่ขึ้นกับระดับการย่อยสลาย โดยที่ ตัวอย่างที่กรองผ่าน Membrane pore size 10 (MW.Cut Off 10,000 Da) มีการละลายของไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ 100 % ที่ทุกระดับการย่อยสลายร้อยละ ส่วนตัวอย่างที่กรองผ่าน Membrane pore size 30 (MW.Cut Off 30,000 Da) มีค่าการละลายของไนโตรเจนเริ่มที่ร้อยละ 80 และเพิ่มเป็น 100% เมื่อระดับการย่อยสลายถึง 10%

และจากการศึกษาการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight distribution) ของตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน (No UF)พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-15,000 Da ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนที่มี MW.Cut Off 10,000 Da (UFP 10) พบว่ามีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลที่แคบว่า คือ 2,500-10,000 Da แสดงให้เห็นว่าค่ากำลังการเกิดฟอง (Initial foam volume, ml) ของตัวอย่างทั้งสามมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดที่ระดับการย่อยสลาย 10 % แต่ตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนทั้งสองขนาดให้ค่ากำลังการเกิดฟองสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน แต่ผู้ทดลองได้รายงานว่าฟองที่ได้จากตัวอย่างที่ผ่านการกรอง ด้วยเมมเบรนมีความคงตัวต่ำกว่า ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรอง จึงได้เสนอว่าการย่อยสลายให้ได้เปปไทด์ขนาดต่างๆ กันจะช่วยสนับสนุนสมบัติการเกิดฟองได้ดีกว่าเปปไทด์ขนาดเท่าๆ กัน เนื่องจากเราต้องการสารให้ฟองที่ให้ค่ากำลังการเกิดฟองสูง และได้ฟองที่คงตัวด้วย จึงจะถือว่าเป็นสารให้ฟองที่มีประสิทธิภาพ

Were, Hettiarachchy และ Kalapathy (1997) ได้ทดลองปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของ Soy protein isolate โดยการดัดแปลงด้วยสารละลายด่าง pH 10 นาน 30 นาที ก่อนย่อยสลายอย่างจำกัดด้วย papain เพื่อศึกษาอิทธิพลของ Surface hydrophobicity ต่อสมบัติการเกิดฟองและผลของ pH ต่อสมบัติการเกิดฟองพบว่า Enzyme – modified soy protein ที่ได้มีความสามารถในการละลายและ Surface hydrophobicity เพิ่มขึ้นอย่างมาก เนื่องจากการทรีทด้วยสารละลายด่าง ทำให้เกิดการคลายตัว (Unfold) ของโมเลกุลโปรตีนเป็นผลให้เกิดการเปิด

ออกของ Hydrophobic groups ระดับหนึ่งและเมื่อตามด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain ทำให้มีการเพิ่มขึ้นอย่างสูงของ Surface hydrophobicity ซึ่งอาจเกิดจาก Flexibility ที่เพิ่มขึ้น ทำให้การคลายตัวของโมเลกุลเกิดขึ้นได้ง่าย ส่งผลให้ค่ากำลังการเกิดฟองเพิ่มขึ้นเทียบเท่ากับไข่ขาว ที่ pH 7.0 และความคงตัวของฟองสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่ต่ำกว่าไข่ขาว เนื่องจากการเปิดออกของ Hydrophobic groups นี้จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Protein – protein interactions ที่ผิวหน้าระหว่างอากาศกับน้ำ

ส่วนผลของ pH ต่อสมบัติการเกิดฟอง พบว่าตัวอย่างแสดงการเพิ่มขึ้นของ Foaming properties ที่ pH 7.0 สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ pH 6.0 และ 8.0 เราอาจอธิบายการลดลงของ Foaming properties ที่ pH 8.0 ได้ว่าเกิดจากอิทธิพลของ Electrostatic repulsion ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของประจุสุทธิบนโมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลในการขัดขวางการสร้างฟิล์มของโปรตีนส่วนการลดลงของ Foaming preperties ที่ pH 6.0 นั้นนอกจากอิทธิพลของ Electrostatic interactions แล้วยังอาจเป็นผลมาจาก Solubility ที่ต่ำกว่า pH 7.0 ด้วย

Linares, Larre, Lemeste และ Popineau (2000) ศึกษาการย่อยสลายกลูเตนอย่างจำกัดด้วยโปรติเอส ที่ระดับการย่อยสลายต่างๆ โดยแปรอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรทเป็น 1/500,1/100,1/50 และเวลาในการย่อย 2 และ 6 ชม. ควบคุมอุณหภูมิ 50 °C pH เริ่มต้นของสารละลายโปรตีน 4.3 หยุดปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟอุณหภูมิ 90-100 °C วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วย Reversed-phase HPLC พบว่าความสามารถในการละลาย Hydrophilic groups และ Hydrohobic groups ของ Gluten hydrolysates เพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น แต่สัดส่วนของ Hydrophobic ต่อ Hydrophilic ลดลงเมื่อเพิ่มระดับการย่อยสลายดังกล่าว จากนั้นศึกษาสมบัติด้านการเกิดฟองของ Hydrolysate dispersions และ Soluble fractions hydrolysate พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยสลาย ส่งผลให้กำลังการเกิดฟองของ Hydrolysate dispersions เพิ่มขึ้น ส่วนความคงตัวของฟองลดลง นอกจากนี้ สมบัติด้านกำลังการเกิดฟอง และความคงตัวของฟองของ Soluble fractions hydrolysate กลับพบว่าเพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้น สุดท้ายพบว่า NaCl มีสมบัติในการปรับปรุงค่ากำลังการเกิดฟองและความคงตัวของฟองทั้งใน Hydrolysate dispersions และ Soluble fractions