

สมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียว *Vigna radiata* และถั่วอะชูกิ
Vigna angularis งอก

นางสาวฐสรพร แสงสุขเอี่ยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GERMINATED MUNG BEAN

***Vigna radiata* AND AZUKI BEAN *Vigna angularis* PROTEIN HYDROLYSATE**

Miss Thasanporn Sangsukiam

**A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology**

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

สมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีน

ไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว *Vigna radiata*

และถั่วอะชูกิ *Vigna angularis* งอก

โดย

นางสาวฐสรพร แสงสุขเอี่ยม

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นินนาท ชินประหัยฐ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีจันทร หงสประภาส)

ฐสรพร แสงสุขเอี่ยม : สมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จาก
ถั่วเขียว *Vigna radiata* และถั่วอะซูกิ *Vigna angularis* งอก (PROPERTIES AND
ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GERMINATED MUNG BEAN *Vigna radiata* AND
AZUKI BEAN *Vigna angularis* PROTEIN HYDROLYSATE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
: ผศ.ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์, 107 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะต่อองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลส จากถั่วอกแต่ละชนิด และผลของมอลโทเด็กซ์ทรินต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิในช่วงระยะเวลาเพาะ 0, 9, 18, 27 และ 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C พบว่า ระยะเวลาเพาะไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนหยาบในถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยการเพาะถั่วเขียว 36 ชั่วโมง ให้ TPC สูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปริมาณ TPC ในถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง ($p > 0.05$) ขณะที่ระยะเวลาเพาะถั่วอะซูกิมีผลให้ปริมาณโปรตีนหยาบ และ TPC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยถั่วอะซูกิเพาะ 36 ชั่วโมงมีปริมาณโปรตีนหยาบสูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนหยาบในถั่วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ($p > 0.05$) การย่อยโปรตีนจากถั่วเขียว และถั่วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 7% (w/w) ได้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและ TPC สูงสุด และแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น Flavourzyme® ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (ค่า FRAP) ที่สูงกว่าภาวะอื่น ๆ การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง ย่อยด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้น 7% (w/w) ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ TPC ค่า FRAP และค่า ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยการใช้ electron spin resonance พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินทำให้ร้อยละ DPPH scavenging activity ลดลง เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer อย่างไรก็ตามการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะซูกิก็ส่งผลให้ร้อยละผลผลิตและค่าปริมาณน้ำอิสระเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity และค่าการดูดน้ำของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะซูกิก็ผสมมอลโทเด็กซ์ทรินลดลง

ภาควิชา...เทคโนโลยีทางอาหาร... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา...เทคโนโลยีทางอาหาร... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2555.....

5272698523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORDS : GERMINATED LEGUMES / GERMINATED BEANS PROTEIN

HYDROLYSATE / ANTIOXIDANT ACTIVITY

THASANPORN SANGSUKIAM : PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GERMINATED MUNG BEAN *Vigna radiata* AND AZUKI BEAN *Vigna angilaris* PROTEIN

HYDROLYSATE ADVISOR : ASST. PROF. KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., 107 pp.

This research was aimed at studying the effect of germination period on the chemical composition of mung bean and azuki bean, the optimum concentration of Flavourzyme[®] for the production of protein hydrolysate from each germinated bean, and the effect of maltodextrin on antioxidant activity of freeze dried protein hydrolysate. The results showed that germination periods (0, 9, 18, 27 and 36 h), at 30 ±2°C, did not significantly affect an increase in crude protein content in mung bean ($p>0.05$). Total phenolic content (TPC) of the 36-h germinated mung bean was the highest but not significantly different from that of the 27-h germinated mung bean. For azuki bean, it was found that both crude protein and TPC significantly increased with an increase in the germination period ($p\leq0.05$). The 36 h-germinated azuki bean provided the highest content of crude protein but not significantly different compared to that of 27 h-germinated azuki bean ($p>0.05$). In the production of protein hydrolysate from the germinated beans using Flavourzyme[®], it was found that the highest amount of free amino acid group (FAAG) and TPC was obtained when using 7% (w/w) Flavourzyme[®] for both 27 h-germinated mung bean and azuki bean. An increase in FAAG and TPC relatively contributed to an increase in antioxidant activity measured using ferric reducing antioxidant power (FRAP). The addition of maltodextrin in the protein hydrolysate before freeze drying caused a significant decrease in TPC, FRAP and ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ($p\leq0.05$). The antioxidant activity determined using DPPH radical scavenging activity with electron spin resonance gave the similar result in accordance to that determined with spectrophotometry. However, the addition of maltodextrin resulted in an increase in water activity of the protein hydrolysate powder while surface hydrophobicity and hygroscopicity decreased.

Department...Food Technology.....

Student's Signature.....

Field of study... Food Technology...

Advisor's Signature.....

Academic year.....2012.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความรู้ แนวความคิด หลักการทำงาน คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือในทุกด้าน อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และการดำเนินชีวิตในอนาคต ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัยฐ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช และรองศาสตราจารย์ ดร. ปาริฉัตร หงสประภาส ที่กรุณาสละเวลามาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาชี้แนะแนวทางให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ ตลอดงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ปริญญาเอก เพื่อนปริญญาโท และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกคน รวมทั้งเพื่อนสมัยเรียนมัธยมและปริญญาตรีที่ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และญาติทุกคนสำหรับความช่วยเหลือ ความรัก และเป็นกำลังใจที่สำคัญอย่างยิ่ง รวมทั้งให้การสนับสนุนและส่งเสริมให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ถั่วเขียวและถั่วอะซูกิ.....	3
2.2 โพรตีนในเมล็ดถั่ว.....	3
2.3 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการงอก.....	5
2.3.1 งานวิจัยที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิระหว่างการงอก.....	5
2.4 โพรตีนไฮโดรไลเสด.....	8
2.4.1 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสดด้วยเอนไซม์.....	8
2.4.2 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH).....	11
2.4.3 สารต้านออกซิเดชัน.....	12
2.4.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสด.....	14
2.4.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก.....	18
2.5 ผลของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน.....	19
3 อุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 อุปกรณ์.....	21
3.1.1 วัตถุดิบ.....	21
3.1.2 เอนไซม์.....	21
3.1.3 สารเคมี.....	21

	หน้า
3.1.4 เครื่องมือ.....	23
3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในช่วงระยะเวลาการงอกที่ต่างกัน.....	24
3.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอก.....	27
3.2.3 ศึกษาผลของมอลโทเด็กซ์ทรินต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	30
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอกในช่วงระยะเวลาการงอกที่ต่างกัน.....	34
4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก.....	34
4.1.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก.....	38
4.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอก.....	40
4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอกด้วย Flavourzyme®	40
4.2.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก.....	45
4.2.3 การเกิดสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก	50
4.2.4 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก.....	52
4.3 ผลของมอลโทเด็กซ์ทริน ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	56
4.3.1 ผลของมอลโทเด็กซ์ทรินต่อองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	58
4.3.2 ผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในงอก.....	61

4.3.3 ผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อสมบัติทางกายภาพของโปรตีน ไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก	68
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	73
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	73
5.2 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย.....	74
รายการอ้างอิง.....	75
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก.....	85
ภาคผนวก ข.....	87
ภาคผนวก ค.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติของเลกูมินและวิชิติน.....	4
4.1 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะต่อองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิ ระยะงอก.....	37
4.2 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวและถั่วอะชูกิต่อชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ทั้งหมด.....	39
4.3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวงอกที่ผ่านการย่อย เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	40
4.4 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิที่ผ่านการย่อย เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	42
4.5 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิที่ผ่านการย่อย เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	43
4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่ว อะชูกิที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	45
4.7 ผลของปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® ต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg mL ⁻¹) ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวเพาะที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	48
4.8 ผลของปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® ต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg mL ⁻¹) ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิเพาะที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	49
4.9 ร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิที่ผ่าน การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	58
4.10 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดร- ไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	59
4.11 ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ที่ได้จากความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดร- ไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิ.....	62
4.12 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity และ FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและ ถั่วอะชูกิที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	64

ตารางที่	หน้า
4.13 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยใช้ DPPH ที่วิเคราะห์ด้วย spectrophotometer และเครื่อง ESR ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	68
4.14 ค่า surface hydrophobicity ของ BSA และ โปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	70
4.15 ปริมาณน้ำอิสระและค่าการควบแน่นของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	72
ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณความชื้น	97
ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด.....	97
ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณโปรตีนไนโตรเจน.....	97
ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณ Non-protein nitrogen.....	97
ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณโปรตีนหยาบ	98
ค.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด.....	98
ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	98
ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณความชื้น	98
ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด.....	99
ค.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณโปรตีนไนโตรเจน.....	99
ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณ Non-protein nitrogen.....	99
ค.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณโปรตีนหยาบ.....	99
ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะชูกิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	100

ตารางที่	หน้า
ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	100
ค.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอก	100
ค.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	100
ค.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme® 0 % (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	101
ค.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme® 3 % (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	101
ค.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme® 5 % (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	101
ค.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme® 7 % (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	101
ค.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้น Flavourzyme® ที่ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมงต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก	102
ค.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้น Flavourzyme® ที่ระยะเวลาเพาะ 27 ชั่วโมงต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	102
ค.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอก.....	102
ค.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะซูกิอก.....	103
ค.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอก.....	103

ตารางที่	หน้า
ค.26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme [®] ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสต จาก ถั่วอะชูกิงอก.....	103
ค.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อร้อยละผลผลิต ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	104
ค.28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อร้อยละผลผลิต ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	104
ค.29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อปริมาณหมู่อะมิโน อิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	104
ค.30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อปริมาณหมู่อะมิโน อิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	104
ค.31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	105
ค.32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	105
ค.33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า EC ₅₀ ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	105
ค.34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า EC ₅₀ ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	105
ค.35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า AEAC ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	106
ค.36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า AEAC ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	106
ค.37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า FRAP ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวอก.....	106
ค.38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อค่า FRAP ของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก.....	106

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของใบเลี้ยงแบบตัดขวางของถั่ว.....	4
2.2 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก.....	18
4.1 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อการเกิดสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	52
4.2 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	54
4.3 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย DPPH radical scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	55
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	89
ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	90
ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox® ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป FRAP.....	93
ข.4 โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดอะมิโน.....	94
ข.5 สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH (control)	95
ข. 6 สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน.....	95
ข. 7 สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน.....	96

บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเป็นพืชสกุล *Vigna* อยู่ในตระกูล Leguminosae ตระกูลย่อย Papilionoideae กระจายพันธุ์ในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน และเขตอบอุ่น พืชสกุล *Vigna* ที่พบในประเทศไทยมีจำนวน 11 ชนิด เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.)) ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek var. *radiata*) และ ถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis* (Wild.) Ohwi & H. Ohashi) เป็นต้น (รัมภ์รดา มีบุญญา และฉัตรชัย เงินแสงสรวย, 2553) ในถั่วเมล็ดแห้งมีโปรตีนประมาณร้อยละ 23 – 41 โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีนจากถั่วมีคุณภาพดีเนื่องจากเป็นแหล่งของกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ อาร์จินีน ไอโซลูซีน ลูซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน วาลีน กรดแอสพาร์ติก กรดกลูตามิกและซีรีน (USDA, 2010) แต่ยังมีกรดอะมิโนบางชนิดที่มีปริมาณต่ำ คือ เมไทโอนีน และซิสเทอีน (Mubarak, 2005) นอกจากนี้ถั่วเมล็ดแห้งยังมีสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ที่มีสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณของสารดังกล่าวมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของถั่วแต่ละสายพันธุ์ ถั่วเขียวมีปริมาณ โปรตีนค่อนข้างสูงประมาณร้อยละ 27 โดยน้ำหนักแห้ง (Mubarak, 2005) และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 3.55 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อถั่วหนัก 1 กรัม (Amarowicz and Pegg, 2008) ถั่วอะซูกิมีปริมาณ โปรตีนประมาณร้อยละ 24 โดยน้ำหนักแห้ง (Balk, Klmaczynska, and Czuchajowska, 1998) และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 89.7 มิลลิกรัมสมมูลย์คาเทชินต่อถั่วหนัก 1 กรัม (Amarowicz and Pegg, 2008) อย่างไรก็ตามในเมล็ดถั่วยังมีสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ เช่น สารต้านทริปซินและแทนนินรวมอยู่ด้วย สารต้านคุณค่าทางโภชนาการดังกล่าวสามารถถูกกำจัดหรือทำให้ลดลงไปได้เมื่อเมล็ดถั่วผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ การงอกเป็นกระบวนการหนึ่งซึ่งช่วยลดสารต้านคุณค่าทางโภชนาการซึ่งทำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่าย (Kuo *et al.*, 2004) นอกจากนี้การงอกยังส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารต้านออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ ของถั่วงอก

การย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์เป็นการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้มีสมบัติตามต้องการวิธีหนึ่ง การย่อยทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้นซึ่งมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการที่เพิ่มขึ้น ถั่วที่ผ่านกระบวนการงอกจะมีปริมาณ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) และปริมาณสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่มีในถั่วดิบจะลดลงระหว่างการงอกด้วย

ดังนั้นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วพาะงอก จึงน่าจะให้ผลดีทั้งคุณค่าทางโภชนาการ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นวิธีการทำแห้งที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษา และการใส่สารเติมแต่งอาหารบางประเภท เช่น มอลโทเด็กซ์ทริน ก่อนการทำแห้งอาจช่วยเพิ่มอายุการเก็บ และปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตได้

ปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และถั่วอะชูกิ (*Vigna angularis*) งอกต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต ด้วยเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิในช่วงระยะเวลางอกที่ต่างกัน ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิพาะงอก และศึกษาผลของมอลโทเด็กซ์ทรินต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิพาะงอก ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ถั่วเขียวและถั่วอะซูกิ

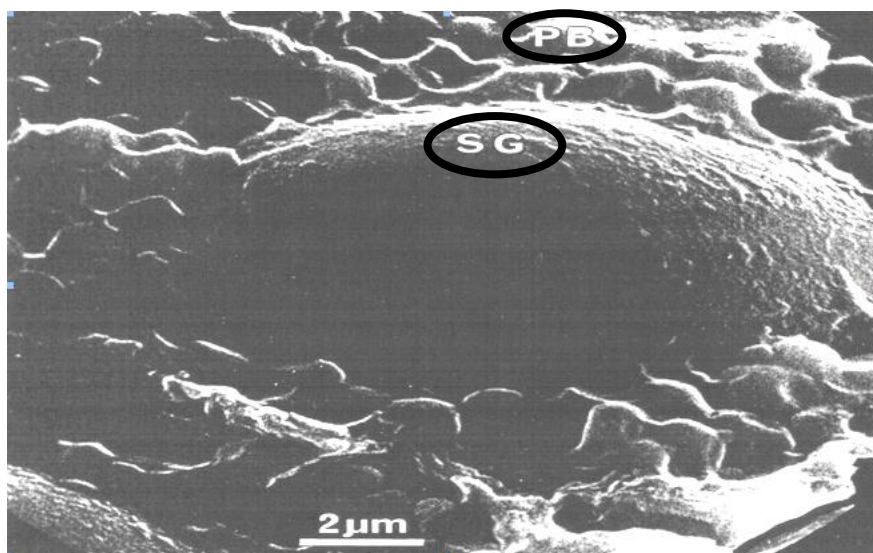
ถั่วที่ใช้รับประทานเป็นอาหารได้จากพืชซึ่งจัดอยู่ในตระกูล Leguminosae และอยู่ในตระกูลย่อย Papilionoideae (Faboideae) ซึ่งจัดเป็นพืชตระกูลถั่วแท้ ในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึง ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) ที่เป็นพืชตระกูลถั่วแท้ ในอดีต ถั่วเขียวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phaseolus aureus* Roxb. ต่อมาได้มีการเปลี่ยนชื่อใหม่โดย Wilczek R. และ Hepper ที่ทำการศึกษาสายพันธุ์ของถั่วเขียว และพบว่าถั่วเขียวมีวิวัฒนาการมาจากถั่วสายพันธุ์ป่าที่พบในประเทศอินเดีย (Rachie and Roberts, 1974) ซึ่งการค้นพบครั้งนี้ทำให้ถั่วเขียวมีชื่อวิทยาศาสตร์ใหม่ว่า *Vigna radiata* (L.) Wilczek มีชื่อสามัญคือ mung bean และ green gram ในประเทศไทย ได้พัฒนาสายพันธุ์ของถั่วเขียวเพื่อใช้ในการเกษตร 2 สายพันธุ์หลัก คือ ถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

ถั่วอะซูกิ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna angularis* (Wild) Ohwi and Ohashi ชื่อสามัญคือ adzuki bean, azuki bean, small red bean, small bean และ atsuki (พิบูล ชุนพุ่ม, 2550) ถั่วอะซูกิพันธุ์ปางคะที่ปลูกในประเทศไทยได้รับการพัฒนาจากถั่วอะซูกิพันธุ์ Erimo ซึ่งเป็นถั่วอะซูกิพันธุ์ดีที่นำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2539 โดยมูลนิธิโครงการหลวง เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรบนที่สูงปลูกเพื่อการค้า (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร, 2555)

2.2 โปรตีนในเมล็ดถั่ว

โปรตีนในเมล็ดถั่วถูกเก็บสะสมระหว่างการเจริญของเมล็ด โดยอยู่ในรูปของโปรตีนบอดี (protein bodies) อยู่ติดกับสตาร์ชเกรนูล (starch granules) แสดงดังรูปที่ 1 (Pernollet and Mossé, 1983) ปริมาณโปรตีนในโปรตีนบอดีมีประมาณร้อยละ 80±10 โปรตีนที่พบมีทั้งโปรตีนกลุ่มอัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเทลิน แต่โปรตีนส่วนใหญ่ในโปรตีนบอดีเป็นโปรตีนกลุ่มโกลบูลิน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ เลกูมิน (legumin) หรือ 11S และ วิซิลิน (vicilin) หรือ 7S ลักษณะของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.1 (Pernollet and Mossé, 1983)

นอกจากนี้ยังพบ โปรตีนชนิดอื่น ในเมล็ดถั่ว เช่น เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการงอกของเมล็ด



รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของใบเลี้ยงแบบตัดขวางของถั่ว

โดย PB คือ โปรตีนบอดี SG คือ สตาร์ชเกรนูล ภาพกำลังขยาย 5,400 เท่า

ที่มา : Pernollet และ Mossé (1983)

ตารางที่ 2.1 สมบัติของเลกูมิน และวิซิลิน

สมบัติ	เลกูมิน 11S	วิซิลิน 7S
ขนาดโปรตีน	300 – 400 kDa	200 ± 50 kDa
การละลายในสารละลายเกลือ	ละลายได้น้อย	ละลายได้มากกว่า
อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน	ที่อุณหภูมิสูงกว่า มีเสถียรภาพดีกว่า	ที่อุณหภูมิต่ำกว่า มีเสถียรภาพด้อยกว่า
ปริมาณไนโตรเจน และซัลเฟอร์	สูงกว่า	ต่ำกว่า

ที่มา : Pernollet และ Mossé (1983)

2.3 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการงอก

การงอกของเมล็ดเป็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ชีวภาพ ชีวเคมี และคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ด (Kuo *et al.*, 2004) ดังนั้นการงอกจึงมีผลต่อกระบวนการหายใจของเมล็ดที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากกระบวนการหายใจเป็นกระบวนการสลายสารอาหารที่สะสมภายในเมล็ดเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน นอกจากนี้การงอกยังส่งผลต่อการสร้างหรือสังเคราะห์สารอาหารต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเป็นลำต้น และสืบพันธุ์ต่อไป การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเมล็ดได้อยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ปริมาณออกซิเจนที่พอเหมาะสำหรับใช้ในกระบวนการหายใจ ปริมาณน้ำ และความชื้นเหมาะสมที่จะทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนตัว และเอมบริโอที่อยู่ภายในเมล็ดเริ่มดูดซึมน้ำ (Sangronis and Machado, 2007)

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่สังเกตได้ของถั่วเริ่มจากการดูดน้ำของเมล็ดทำให้น้ำของเมล็ดนี้เพิ่มขึ้น มีการงอกของรากอ่อน (radical) จากเปลือกหุ้มเมล็ด หลังจากนั้นประมาณ 3 ถึง 4 วัน ใบเลี้ยงของถั่วเขียวจะชูขึ้นเหนือดิน (โสภิตา คำหาญ, 2546)

สารทุติยภูมิ (secondary constituents) เป็นสารเคมีที่พืชสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการงอก สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มแรกคือ terpenoids เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ isopentenyl และ dimethylallyl pyrophosphates กลุ่มที่สองคือ alkaloids และสารทุติยภูมิที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยพืชสามารถสร้างสารประกอบที่มีไนโตรเจนจากอะมิโนของโปรตีน กลุ่มที่สามคือ สารทุติยภูมิประเภทฟีนอลิก สารในกลุ่มนี้เริ่มต้นจากฟีนิลอะลานินที่เกิดจากกระบวนการ Shikimate จากนั้นฟีนิลอะลานินจึงเปลี่ยนเป็น *p*-hydroxycinnamic acid เพื่อสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนินต่อไป (Harborne, 1999)

2.3.1 งานวิจัยที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารทุติยภูมิระหว่างการงอก

Sattar และคณะ (1989) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเขียวที่ผ่านการแช่น้ำ โดยแปรเวลาแช่น้ำ (0, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการแช่ (22-25 และ 55 องศาเซลเซียส) พบว่า การแช่ถั่วเขียวเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิของน้ำ 55 องศาเซลเซียสทำให้ปริมาณ โปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนของถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการแช่น้ำ นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเขียวที่ผ่านการงอกเป็นเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง อุณหภูมิเพาะระหว่าง 20 – 35 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ

รายงานว่ ปริมาณโปรตีน วิตามินซี วิตามินบี1 และวิตามินบี2 เพิ่มขึ้นหลังการเพาะเมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะทั้งสองระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะ

Mubarak (2005) พบว่าการเพาะถั่วเขียวสายพันธุ์ Giza-1 ในที่มีดเป็นเวลา 3 วัน มีผลต่อปริมาณความชื้นและปริมาณโปรตีนหยาบที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการเพาะ

การศึกษาเวลาในการเพาะของ Lin และ Lai (2006) ที่มีต่อการเพาะถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) ถั่วเหลืองผิวดำ และถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 และ 4 วัน พบว่า ปริมาณฟีนอลิกของถั่วทั้งสามชนิดที่เพาะเป็นเวลา 4 วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่าถั่วที่เพาะเป็นเวลา 1 วัน เช่นเดียวกับปริมาณฟลาโวนอยด์ของถั่วเหลือง และถั่วเหลืองผิวดำที่เพิ่มขึ้น แต่ถั่วอะซูกิที่เพาะเป็นเวลา 1 วันจะมีปริมาณของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นมากกว่าการเพาะเป็นเวลา 4 วัน

Ghavidel และ Prakash (2007) พบว่า การเพาะถั่วเขียว cowpea (*Vigna catjang*) lentil (*Lens culinaris*) และ chickpea (*Cicer arietinum*) เป็นเวลา 1 วัน มีผลต่อปริมาณโปรตีน และวิตามินบี 1 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ

Sangronis และ Machado (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) 2 สายพันธุ์ คือ ถั่วแขกสีขาว และถั่วแขกสีดำ และถั่วพิจจิน (*Cajanus cajan* L. Millsp) โดยนำไปเพาะเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณของวิตามินซี และวิตามินบี 1 ของถั่วทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ

Fernandez-Orozco และคณะ (2008) ศึกษาการเพาะถั่วเขียวในที่มีดเป็นเวลา 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน ถั่วเหลือง (*Glycine max* cv. jutro) เพาะในที่มีดเป็นเวลา 2, 3 และ 4 วัน ถั่วเหลือง (*Glycine max* cv. merit) เพาะในที่มีดเป็นเวลา 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน พบว่า มีปริมาณของวิตามินอี และสารประกอบฟีนอลิกของถั่วทั้งสามชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการงอก

Martínez-Villaluenga และคณะ (2008) พบว่า การเพาะ pea (*Pisum sativum* L.) สามสายพันธุ์จากประเทศโปแลนด์ เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มีด จะส่งผลต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และโปรตีนหยาบให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ

Rodríguez และคณะ (2008) ทำการเพาะ pea สายพันธุ์ Esla ถั่วเขียวสายพันธุ์ La Granja และ lentils สายพันธุ์ Castellana เป็นเวลา 2, 4 และ 6 วันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทั้งในภาวะที่มีแสง และไม่มีแสง พบว่า ที่ภาวะทั้งสองภาวะระยะเวลาการเพาะถั่วทั้งสามชนิดมีผลต่อ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีนหยาบ non-protein nitrogen และกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ ไลซีน ฮิสทีดีน และไทโรซีน ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาการงอกเพิ่มขึ้น

Maneemegalai and Nandakumar (2011) ทำการเพาะถั่วเขียว ถั่วเขียวฝิวดำ (*Vigna mungo*) และถั่ว *Pennisetum typhoides* เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในที่มืด พบว่า ถั่วทั้งสามชนิด มีปริมาณโปรตีน และวิตามินซีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ

การงอกของเมล็ดนอกจากมีส่วนช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการทางอาหารแล้ว ยังมีส่วนช่วยลดสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่มีในถั่วเมล็ดแห้ง งานวิจัยของ Sattar และคณะ (1989) ที่ศึกษาอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการแช่เมล็ดถั่วเขียว พบว่า อุณหภูมิ และเวลาการแช่เมล็ดถั่ว ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณ ไฟเตท และสารต้านทริปซินที่ลดลงเมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่แช่น้ำ และ ปริมาณของสารดังกล่าวจะลดลงมากขึ้นเมื่อเมล็ดถั่วถูกแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง เมื่อเพาะถั่วเขียว เป็นเวลา 0-120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 – 35 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะมีผลต่อปริมาณไฟเตท และสารต้านการทำงานของเอนไซม์ทริปซินลดลงอย่างมากหลังเพาะ

Mubarak (2005) พบว่า การงอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งพบได้จากการที่ปริมาณของสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ แรฟฟิโนส สตาลิไอส ไฟเตท และแทนนินของถั่วเขียวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการเพาะ Sangronis และ Machado (2007) รายงานว่า ปริมาณของสารต้านทริปซิน กรดไฟติก และแทนนินของถั่วแขก และถั่วพิจเงินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาเพาะเพิ่มขึ้น

จากงานวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเมล็ดถั่วที่ผ่านการเพาะงอกจะส่งผลให้

- 1).คุณค่าทางโภชนาการบางประการ ได้แก่ โปรตีน และวิตามินเพิ่มขึ้น 2).การลดลงของสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ แรฟฟิโนส สตาลิไอส สารต้านทริปซิน แทนนิน และไฟเตท
- 3).การเพิ่มขึ้นของสารทุติยภูมิ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินดี วิตามินอี และสารประกอบฟีนอลิก

2.4 โปรตีนไฮโดรไลสเสต

โปรตีนไฮโดรไลสเสต เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบโดยใช้สารเคมี หรือใช้เอนไซม์ การย่อยด้วยสารละลายกรดสามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็ว และให้กลิ่นรสที่ดี แต่ทำให้ทริปโทเฟนซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย การย่อยด้วยสารละลายด่าง เช่น การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนบางชนิดจาก L-form เป็น D-form ซึ่งเป็นโครงสร้างของกรดอะมิโนที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสที่ไม่ดี ในขณะที่การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีนให้เกิดเป็นเพปไทด์ที่มีสายสั้นลง และกรดอะมิโน การย่อยด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และภาวะที่ใช้ในการย่อยไม่รุนแรงจึงไม่ทำลายโครงสร้างของกรดอะมิโน แต่อาจมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสขม อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสเสตด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่ได้กล่าวข้างต้น จะทำให้สายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนถูกตัดให้เป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการและสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีน (Kristinsson and Rosco, 2000)

2.4.1 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสเสตด้วยเอนไซม์

กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสเสตด้วยเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่เริ่มจากการบดวัตถุดิบให้ละเอียด จากนั้นจึงเติมตัวทำละลายแล้วนำไปย่อยด้วยโปรติเอสภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เมื่อครบระยะเวลาการย่อยจะทำการยับยั้งการทำงานของโปรติเอส และแยกส่วนของเหลวซึ่งเป็นโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ประกอบด้วยเพปไทด์ สายสั้น และกรดอะมิโน

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งทำหน้าที่เร่ง การตัดพันธะเพปไทด์ของโปรตีน ลักษณะการตัดพันธะเพปไทด์ของโปรติเอสแบ่งได้สองประเภท คือ 1).เอกโซเพปติเดส (exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ด้านปลายของสายพอลิเพปไทด์ โดยอาจตัดพันธะทางด้านปลายกลุ่มอะมิโน เรียกว่า aminopeptidase และการตัดพันธะด้านปลายกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า carboxypeptidase 2).เอนโดเพปติเดส (endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในสายพอลิเพปไทด์ การย่อยลักษณะนี้จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสูง เนื่องจากการย่อยมีความจำเพาะต่อสับเสตรท ที่เป็นเพปไทด์

โมเลกุลใหญ่ การย่อยจึงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Alcalase® และ Neutrase® เป็นต้น (ฉันทพร จันท์แสนโรจน์, 2550)

เอนไซม์โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพสำหรับการเกิดปฏิกิริยาในภาวะที่แตกต่างกันได้แก่ 1).ระดับความเป็นกรดต่าง โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานที่แตกต่างกัน 2).อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย เนื่องจากเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นอุณหภูมิในการย่อยจึงเป็นสิ่งสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ เพราะหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา 3).ระยะเวลาในการย่อยโปรตีน ช่วงแรกของการย่อยโปรตีน เอนไซม์จะเข้าไปตัดพันธะเพปไทด์ของโปรตีนอย่างรวดเร็วจนเกิดเพปไทด์มีสายสั้นหรือกรดอะมิโน แต่เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยมากขึ้นอัตราเร็วในการเข้าตัดพันธะเพปไทด์ของเอนไซม์จะเริ่มคงที่ (Alder-Nissen, 1986)

การย่อยโปรตีนด้วยโปรติเอสต่างชนิด จะส่งผลต่อปริมาณ และคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากโปรติเอสแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยพันธะเพปไทด์ที่แตกต่างกัน

Shahidi, Han และ Synowiecki (1995) เปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์คือ Alcalase®, Neutrase®, papain และการย่อยโปรตีนด้วยปฏิกิริยา autolysis ของ endogeneous enzymes ที่ได้จากเครื่องในปลาต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตของปลา capelin (*Mallotus villosus*) จากนั้นทำการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด และใช้ระยะเวลาในการย่อย 120 นาที พบว่า การย่อยโปรตีนด้วย Alcalase®, Neutrase® และ papain จะได้ร้อยละ protein recovery สูงกว่าการย่อยด้วยปฏิกิริยา autolysis และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละ protein recovery ของการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทางการค้า พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® จะมีร้อยละ protein recovery สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ papain และ Neutrase® โดยมีค่าร้อยละ 70.60 ± 1.5 , 57.1 ± 2.13 และ 51.60 ± 1.92 ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ Alcalase® ในการย่อยโปรตีนจากปลา capelin เป็นเวลา 120 นาที จะมีระดับการย่อยสูงกว่าการย่อยด้วย Neutrase® โดยมีระดับการย่อยประมาณร้อยละ 20 และ 10 ตามลำดับ

Kammerdpetch และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยโปรตีนจากเนื้อมันฝรั่งบดโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง endoprotease (Alcalase® และ Novo Pro-D®) และ exopeptidase (Flavourzyme® และ Corolase®) ใช้อัตราส่วนระหว่าง endoprotease และ exopeptidase เท่ากับ

2:5 และ 3:4 ตามลำดับ ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 ชั่วโมง พบว่า การใช้ เอนไซม์ Alcalase[®] และ Flavourzyme[®] ในอัตราส่วน 2:5 จะให้ระดับการย่อยสูงสุด คือร้อยละ 44 เมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ Novo Pro-D[®] และ Corolase[®] ในอัตราส่วน 3:4 ซึ่งให้ระดับ การย่อยร้อยละ 17

Chen และคณะ (2012) นำโปรตีนไอโซเลทของ walnut (*Juglans regia* L.) มาย่อย ด้วย Neutrase[®], Alcalase[®] และ pepsin ตามภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด และแปรเวลา ในการย่อย 0.5 – 4 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH scavenging activity พบว่า การใช้ pepsin จะให้ค่าร้อยละ DRSA (The DPPH radical scavenging ability) คงที่ตลอดระยะเวลาการย่อยตั้งแต่ 0.5 – 4 ชั่วโมง แตกต่างกับโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วย Neutrase[®] และ Alcalase[®] ที่มีค่าร้อยละ DRSA ลดลงเมื่อระยะเวลา การย่อยเพิ่มขึ้น

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการย่อยโปรตีนจะมีผลต่ออัตราเร็วในการย่อยโปรตีน การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากจะส่งผลต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตให้เพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วในช่วงแรก อย่างไรก็ตามระดับการย่อยของโปรตีนจะคงที่ เมื่อเวลาในการย่อย ผ่านไปนานขึ้น

Benjakul และ Morrissey (1997) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน ไฮโดรไลเสตจาก Pacific whiting solid wastes (PWSW) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase[®] และ Neutrase[®] พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ Alcalase[®] คือ pH 9.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ Neutrase[®] คือ pH 7.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ (0–120 AU/kg) ต่อระดับการย่อยโปรตีน จากภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง ใช้ระยะเวลาในการย่อย 30 นาที พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ เอนไซม์จะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น และระดับการย่อยโปรตีนจะเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มปริมาณ เอนไซม์ถึง 57 AU/kg โดยเอนไซม์ Alcalase[®] และ Neutrase[®] มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดร้อยละ 60 และ ร้อยละ 30 ตามลำดับ

Alvise และคณะ (2000) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต จาก alfalfa ด้วยเอนไซม์ Delvolase[®] ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.8, 7.6, 76, 152 และ 184 ยูนิตต่อโปรตีน alfalfa เข้มข้น 1 กรัม แล้วนำมาย่อยที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และติดตามระดับการย่อยด้วยวิธี pH-stat พบว่า ปริมาณสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการรักษาระดับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 9.5 ตามวิธี pH-stat จะมีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 152 และ 184 ยูนิตต่อโปรตีน alfalfa เข้มข้น 1 กรัม จะมีการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มากกว่า ที่ความเข้มข้น 0.8, 7.6 และ 76 ยูนิตต่อโปรตีน alfalfa เข้มข้น 1 กรัม (ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25, 40 และ 45 มิลลิโมล ตามลำดับ)

Guerard, Guimas และ Binet (2002) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาทูน่าที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตปลาทูน่ากระป๋องด้วยเอนไซม์ Umamizyme[®] โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนในช่วงร้อยละ 0.1-1.5 (w/w) ย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า เมื่ออัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนเพิ่มขึ้นจะทำให้ระดับการย่อยสูงขึ้น และระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือร้อยละ 22.5 เมื่อใช้อัตราส่วนโปรตีนต่อเอนไซม์ร้อยละ 1.5 (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไนโตรเจนของโปรตีนไฮโดรไลสที่เพิ่มขึ้น

2.4.2 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยโปรตีน เป็นดัชนีที่ใช้อธิบายระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การวิเคราะห์ระดับการย่อยสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสม และระดับความละเอียดที่ตรงที่ต้องการ การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือ 1).การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนของโปรตีนไฮโดรไลสที่ตกตะกอนด้วย trichloroacetic acid (TCA) โดยใช้เทคนิค Kjeldahl การวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง UV ของเปปไทด์ที่มีหมู่วงแหวนเบนซีนในโครงสร้าง และการวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง 400-700 นาโนเมตรของสารประกอบเชิงซ้อน ที่มีสี เช่น ปฏิกิริยา Biuret 2).การวิเคราะห์หมู่อะมิโนอิสระด้วยวิธี formal titration หรือใช้สารที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่อะมิโน ได้แก่ ninhydrin, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), fluorescamine, polychroniadou และ orthophthaldehyde (OPA) เป็นต้น 3).การวิเคราะห์ปริมาณโปรตอนที่ถูกลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสด้วยเทคนิค pH-stat (ธัญพร จันท์แสนโรจน์, 2550)

ธัญพร จันท์แสนโรจน์ (2550) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากหอยเป้าชื่อ (*Halotis asinina*) ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] และ Alcalase[®] ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8 ตามลำดับ และแปรปริมาณ Flavourzyme[®] เป็นร้อยละ 0-1.5 ของน้ำหนักตัวอย่าง และแปรปริมาณ Alcalase[®] เป็นร้อยละ 0-0.20 ของน้ำหนักตัวอย่าง ใช้ระยะเวลาในการย่อย 0-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดและโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Kjeldahl เพื่อคำนวณระดับการย่อยโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

พบว่า ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยและปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ภาวะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่มีระดับการย่อยสูงที่สุด คือ Flavourzyme[®] ร้อยละ 1.00 ระยะเวลาย่อย 4 ชั่วโมง มีร้อยละระดับการย่อย 47.75 และภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase[®] ร้อยละ 0.10 ระยะเวลาย่อย 3 ชั่วโมง มีร้อยละระดับการย่อย 73.99

ศุภกิจจิตต์ เอี่ยมมนเรพร (2551) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบด้วย Flavourzyme[®] ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6.5 โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์เป็นร้อยละ 0, 1, 2, 5 และ 7.5 (w/w) และแปรเวลาในการย่อยเป็น 0-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Dumas Combustion และปริมาณโปรตีนหลังการย่อยด้วยวิธี Modified Lowry และนำมาคำนวณระดับการย่อย พบว่า Flavourzyme[®] ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 7.5 (w/w) ใช้เวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีร้อยละระดับการย่อย คือ 35.78 และ 35.25 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่โปรตีนไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นของ Flavourzyme[®] ร้อยละ 5 และ 7.5 (w/w) มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือ การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/w) จะให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด 277.25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ขณะที่ใช้เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (w/w) ให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 414.13 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

2.4.3 สารต้านออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ เป็นองค์ประกอบ ทำให้อะตอม โมเลกุล หรือไอออนนั้นขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเป็นอนุภาคที่ไม่เสถียร และมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาอย่างมาก เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลปกติโดยการดึงอิเล็กตรอนมาหนึ่งตัว ทำให้โมเลกุลปกติขาดอิเล็กตรอน และเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระแทน ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาการแย่งอิเล็กตรอนจาก โมเลกุลปกติ โมเลกุลอื่นต่อไปอีก (วัชรวิ หาดูยั้ง, 2549) การกำจัดอนุมูลอิสระอาจทำได้โดยการเติมสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสารที่สามารถป้องกัน หรือชะลอปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนระหว่างสารตั้งต้น และสารออกซิไดซิงเอเจนต์ที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารในกลุ่มนี้จึงมีหน้าที่จับอนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น (วัชรวิ หาดูยั้ง, 2549) สารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่แตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน อุณหภูมิ ชนิดของสารตั้งต้น รวมถึงชนิด และโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชันในร่างกาย ได้แก่ สารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส แคแทเลส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เป็นต้น และสารต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินซี วิตามินเอ คาโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ กลูตาไทโอน และกรดไลโปอิก เป็นต้น (วัชรีย์ หาญยิ่ง, 2549)

บิวทิลไฮดรอกซีอะนิโซล (butylated hydroxyanisole; BHA) บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene; BHT) และเทอเทียรีบิวทิลไฮโดรควิโนน (tertiary butyl hydroquinone; TBHQ) เป็นสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ที่ถูกสร้างให้มีโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996)

กลไกการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งออกได้ ดังนี้ 1).กลไกการต้านออกซิเดชันโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ หรือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้สารประกอบที่มีความเสถียร สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น วิตามินอี บีตาแคโรทีน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น 2).กลไก preventive inhibitors สามารถแบ่งกลุ่มของสารต้านออกซิเดชันได้เป็นสามกลุ่มย่อย คือ สารต้านออกซิเดชันกลุ่มแรก เป็นสารที่สามารถรีดิวซ์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น กรดอะมิโน และกรดฟอสฟอริก สารกลุ่มที่สองเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถกำจัดซิงเกิลออกซิเจน (1O_2) ซึ่งก่อให้เกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) โดยสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้มีหน้าที่รับพลังงานจากซิงเกิลออกซิเจน ทำให้ซิงเกิลออกซิเจนเปลี่ยนเป็นทริปเลตออกซิเจน (3O_2) ซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาค่ำ สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น แคโรทีนอยด์ สารกลุ่มที่สาม เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถจับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารต้านออกซิเดชันกับโลหะ โดยสารประกอบที่เกิดขึ้นจะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อีก สารต้านออกซิเดชันกลุ่มนี้ เช่น สารประกอบฟีนอลิก และกรดฟอสฟอริก เป็นต้น 3).กลไกทำงานร่วมกันในการเสริมฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชัน เช่น วิตามินซี เป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถรีดิวซ์อนุมูลของวิตามินอีให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996)

การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีกลไกวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างต่างกัน การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ได้รับความนิยมได้แก่ 1).Radical-scavenging method เช่น 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้อนุมูลอิสระสังเคราะห์ (DPPH) ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน

โดยสารต้านออกซิเดชันที่มีสมบัติในการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระสังเคราะห์จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของ DPPH ซึ่งมีสีม่วงให้เป็นสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง DPPH กับสารต้านออกซิเดชัน (DPPH-H) ซึ่งมีสีเหลือง และตรวจติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Gordon, 2001) 2). ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) วิธีวิเคราะห์นี้จะอาศัยสมบัติของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ของสารต้านออกซิเดชัน โดยสารต้านออกซิเดชันจะสามารถรีดิวซ์ Fe(III)-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ซึ่งเป็นสารประกอบไม่มีสีให้เปลี่ยนเป็น Fe(II)-TPTZ ซึ่งเป็นสารประกอบสีน้ำเงินในภาวะที่เป็นกรด และตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Benzie and Strain, 1996)

2.4.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสตประกอบด้วยเพปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโน ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันจะทำหน้าที่ 1). กำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมของไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ 2). การกำจัดออกซิเจนอิสระ หรือไฮออกซิเจนของโลหะจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Gordon, 2001)

Wu, Chen และ Shiao (2003) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาแมคเคอเรล (*Scomber austriasicus*) ด้วย Protease[®] N (EC.3.4.21.66) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และแปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 0, 5, 10, 15 และ 25 ชั่วโมง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตของปลาแมคเคอเรลมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นเทียบกับการย่อย 0 ชั่วโมง (เพิ่มขึ้นจาก 144.6 ± 33.2 เป็น 3133.5 ± 720.5 mg per 100 mL) ปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี inhibition of linoleic acid autoxidant, DPPH radical scavenging และ reducing power ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยเป็นเวลา 0 ชั่วโมง และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมงจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวสูงที่สุด

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) โดยศึกษาชนิดของเอนไซม์ คือ Alcalase[®] 2.4 L และ Flavourzyme[®] 500 L และผลของระดับการย่อยที่ร้อยละ 5, 15 และ 25 ต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และ FRAP พบว่า การย่อยปลา yellow stripe trevally โดยใช้ Alcalase[®] 2.4 L จนมีระดับการย่อย

ร้อยละ 5 จะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตในภาวะอื่น ๆ การย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme[®] 500 L ที่มีระดับการย่อยร้อยละ 25 จะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี reducing power สูงที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตในภาวะอื่น ๆ

จากงานวิจัยข้างต้น สรุปได้ว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากปลาแมคเคอเรลและปลา yellow stripe trevally ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ผลของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น น่าจะเป็นผลมาจากขนาดเพปไทด์และปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยขนาดของเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นเป็นผลจากความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

Tang, Chen และ Ma (2009) นำโปรตีนเข้มข้นของ buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) มาย่อยด้วย Alcalase[®] 2.4 L ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 8 ศึกษาอัตราการย่อย (5, 10, 15, 20 และ 25) ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซต พบว่าระดับการย่อยร้อยละ 15 มีค่า IC₅₀ สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระดับการย่อยอื่น ๆ และที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 มีค่า reducing power สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระดับการย่อยอื่น ๆ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่แตกต่างกัน เกิดจากระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ต่างกัน ส่งผลต่อองค์ประกอบของเพปไทด์ กรดอะมิโน และสารประกอบฟีนอลิกในโปรตีนไฮโดรไลเซตแต่ละภาวะให้แตกต่างกัน

Pownall, Udenigwe และ Aluko (2010) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนไอโซเลทจากถั่ว pea (*Pisum sativum* L.) โดยย่อยด้วย Thermolysin[®] อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa ส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และ metal chelating activities ให้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 3 kDa

Ajibola และคณะ (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากโปรตีนไอโซเลทของ African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) แล้วย่อยด้วย Alcalase[®] ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 9 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical-

scavenging activity, superoxide radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity และ FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ โปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการย่อย

Wongekalak และคณะ (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากโปรตีนเข้มข้นของถั่วเขียวที่ได้จากการย่อยด้วย trypsin ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 8 เวลาการย่อย 1 ชั่วโมง พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ oxygen radical adsorbing capacity-fluorescein (ORAC_{FL}) ของโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนเข้มข้นของถั่วเขียวที่ไม่ได้ผ่านการย่อย

โปรตีนเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ ขึ้นกับโครงสร้างของเปปไทด์ ชนิดของกรดอะมิโน และตำแหน่งของกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์นั้น (Korhonen and Pihlanto, 2006; Ngo *et al.*, 2012) นอกจากนี้ Chen และคณะ (2012) ได้รายงานว่ โปรตีนไฮโดรไลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa จะส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลสมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 3 kDa Korhonen และ Pihlanto (2006) รายงานว่า เปปไทด์ที่มีความสามารถให้ฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีควรมีกรดอะมิโนอยู่ในสายเปปไทด์ประมาณ 2 – 20 ตัว

Rajapakse และคณะ (2005) ทำการหมัก mussel (*Mytilus edulis*) ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 25 (w/w) เป็นเวลา 6 เดือน จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตต (pH 4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำเฉพาะส่วนสารละลายใสที่ได้ไปแยกเปปไทด์ด้วยคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 และใช้โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 1 (v/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตต (pH 4) เป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ linear gradient ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำเปปไทด์ที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Zorbax SB C₁₈ ใช้ acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 4.6 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ linear gradient อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้เวลาในการแยก 30 นาที พบว่า การวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย ESI mass spectroscopy ของเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจาก mussel ที่ทำให้บริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 962 ดาลตัน และสายเปปไทด์มีลำดับการต่อของกรดอะมิโน คือ His-Phe-Gly-Asp-Pro-Phe-His เมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ด้วยวิธี superoxide, hydroxyl, carbon-centered และ DPPH

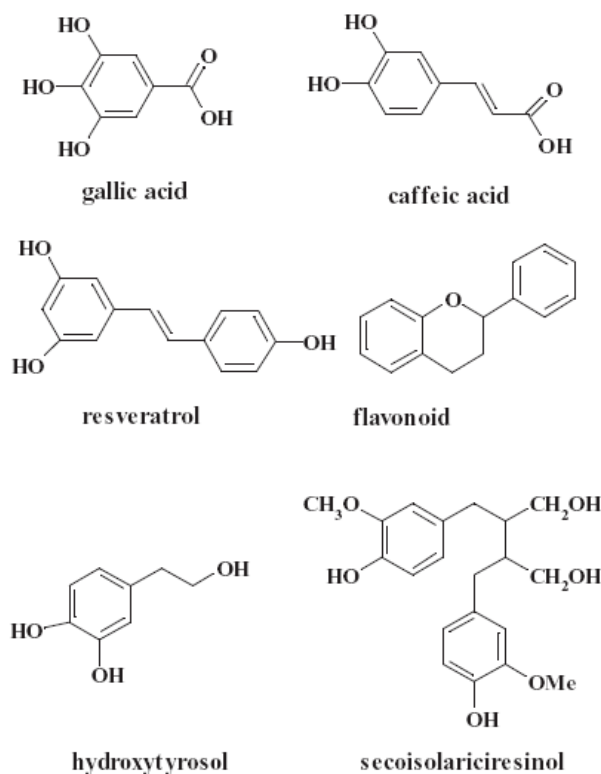
radical scavenging activity พบว่า เพปไทด์บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ จะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูง เนื่องจากสายเพปไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น aromatic ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี

Zhang และคณะ (2011) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่ว chickpea ด้วย Alcalase[®] 2.4 L FG จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ C18 RP-HPLC และใช้ acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 5 – 40 ที่ผสม trifluoroacetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ linear gradient และอัตราการเคลื่อนที่ 1 mL/min เก็บตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์ในช่วงเวลา 16.5 นาที พบว่า เพปไทด์ในช่วงเวลาดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 717.37 ดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิด คือ Asn-Arg-Tyr-His-Glu น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของกรดอะมิโนที่มีในโปรตีนไฮโดรไลสมีความสอดคล้องกับขนาดของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสด้วยวิธี Metal ion chelating activity พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสในช่วงเวลาดังกล่าวให้ค่าร้อยละ chelating activity เท่ากับ 76.92 เมื่อใช้ Cu^{2+} ในการทำปฏิกิริยาและให้ค่าร้อยละ chelating activity เท่ากับ 63.08 เมื่อใช้ Fe^{2+} ในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลสในช่วงเวลาดังกล่าวมีความสามารถในการจับ Cu^{2+} ได้ดีกว่า Fe^{2+} ความสามารถในการจับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลสเป็นผลมาจากกรดอะมิโนที่มี imidazole ring ที่มีความสำคัญในการจับโลหะ

Chen และคณะ (2012) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากโปรตีนไอโซเลทของ walnut (*Juglans regia* L.) แล้วนำโปรตีนไฮโดรไลสผ่าน ultrafiltration membrane โดยใช้ molecular weight cutoff 3000 Da เมื่อได้โปรตีนไฮโดรไลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3000 ดาลตัน นำไปแยกออกเป็น 4 ส่วนด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-25 และมีน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที นำโปรตีนไฮโดรไลสทั้ง 4 ส่วนที่แยกได้ในขั้นตอนี้ไปวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสในส่วนที่ 3 (มวลโมเลกุลเท่ากับ 423.23 Da) มีร้อยละ DRSA สูงที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสส่วนอื่น ๆ

2.4.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านออกซิเดชันประเภทหนึ่งที่พบมากในพืช นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังเป็นสารทุติยภูมิซึ่งเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ของพืชระหว่างการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกอย่างน้อยหนึ่งวงแหวนในโครงสร้าง และมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่แทนที่ จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีได้หลากหลายอนุพันธ์ (รูปที่ 2.2) เช่น กรดแกลลิก กรดคาเฟอิก และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Xiao and Kai, 2012) โดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกเกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น การหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ การเป็นตัวคีเลต (chelating agent) และการเป็นสารเสริมฤทธิ์สารต้านออกซิเดชัน ซึ่งประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับตำแหน่ง และจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะอยู่กับโครงสร้างหลัก



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา : Xiao and Kai (2012)

Benavente-Garcia และคณะ (1997) พบว่า การต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์ จะมีประสิทธิภาพสูงหรือต่ำ ขึ้นกับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ เช่น การมีหมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่งออร์โท และตำแหน่งพาราบนวงแหวนเบนซีน จะทำให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์ สูงกว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ trolox 4 เท่า

Kim และคณะ (2012) รายงานว่า การสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ด้วยเมทานอลจากถั่วเขียวที่เพาะเป็นเวลา 5 วัน พบสารประกอบฟีนอลิก 191.7 ± 2.20 มิลลิกรัม สมมูลย์กรดเฟรูลิกต่อถั่วหนัก 1 กิโลกรัมโดยน้ำหนักแห้ง และพบฟลาโวนอยด์ 69.20 ± 1.70 มิลลิกรัมสมมูลย์ลูทีนต่อถั่วหนัก 1 กิโลกรัม เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จากถั่วเขียวเพาะ พบว่า ถั่วเขียวที่ผ่านการเพาะมีค่าร้อยละ DPPH radical scavenging activity และ ร้อยละ alcohol dehydrogenase activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของถั่วเขียวเพาะเป็นผลจากสารประกอบ ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่

Amarowicz และคณะ (2008) สกัดสารประกอบฟีนอลิกและแทนนินจากถั่วอะชูกิ ด้วยอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 80 (v/v) ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที พบว่า สารประกอบฟีนอลิกของถั่วอะชูกิที่สกัดได้มีค่า total antioxidant activity ที่วิเคราะห์ด้วย Randox kit[®] คิดเป็น $1.40 \pm 0.04 \mu\text{mol trolox}^{\text{®}} \text{mg}^{-1}$ และแทนนินให้ค่า total antioxidant activity คิดเป็น $4.17 \pm 0.13 \mu\text{mol trolox}^{\text{®}} \text{mg}^{-1}$

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสัตว์และพืช ด้วยวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสัตว์ น่าจะเกิดจากองค์ประกอบสองชนิด คือ เพปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโน ส่วนฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากพืช อาจเกิดจากองค์ประกอบหลักสามชนิด คือ เพปไทด์สายสั้น กรดอะมิโน และสารประกอบฟีนอลิก

2.5 ผลของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นการกำจัดน้ำออกจากอาหาร โดยการใช้อุณหภูมิต่ำร่วมกับการลดความดันบรรยากาศให้ต่ำลงในระดับที่น้ำแข็งสามารถระเหิดเป็นไอได้ การทำแห้งด้วยวิธีนี้ จึงช่วยรักษารสชาติของอาหารที่สามารถสลายตัว หรือเสียโครงสร้างได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน และการทำแห้งแบบนี้ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

น้อยกว่าการทำแห้งด้วยวิธีอื่นที่ต้องใช้ความร้อนสูง (ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล, 2555; Chen, Chi and Xu, 2012) ในกระบวนการทำแห้งอาจมีการเติมสารบางชนิดลงไป เช่น มอลโทเด็กซ์ทริน มอลโทเด็กซ์ทรินเป็นผลผลิตของการใช้ความร้อน กรด หรือเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลของสตาร์ช ให้เป็นน้ำตาลสายสั้น มอลโทเด็กซ์ทรินถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหาร

Chen, Chi และ Xu (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่ขาวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ papain เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 แล้วผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และ reducing power ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่ขาวไม่ต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่ขาวที่ไม่ผ่านการทำแห้ง ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งใช้อุณหภูมิต่ำจึงชะลอการเสถียรภาพของโปรตีนส่งผลให้ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสไม่เกิดเปลี่ยนแปลงมากนัก

Silva และคณะ (2012) ศึกษาผลของมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 และ 30 ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากเนื้อหอยแมงภู่ที่ย่อยด้วย Protamex[®] ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส pH 6.85 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 และ 30 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ TEAC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ผสมมอลโทเด็กซ์ทริน โดยผู้วิจัยรายงานว่า การลดลงของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทริน อาจเป็นผลมาจาก ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างลดลง เนื่องจากการเติมมอลโทเด็กซ์ทริน แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจะขึ้นอยู่กับกรดอะมิโน และเพปไทด์สายสั้นของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วย วัสดุดิบ เอนไซม์ สารเคมีและเครื่องมือ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 วัสดุดิบ

ถั่วเขียว จากบริษัท อุตสาหกรรมอาหารไทย (1964) จำกัด และถั่วอะซูกิ จากมูลนิธิโครงการหลวง ซื่อในช่วงเดือนเมษายน 2554 ถึงเดือนพฤษภาคม 2555

3.1.2 เอนไซม์

α -amylase (BAN[®] 480L) food grade (Brenntag, Mülheim) รายละเอียดในภาคผนวก ก.1

Flavourzyme 500 MG[®] food grade (Brenntag, Mülheim) รายละเอียดในภาคผนวก ก.2

3.1.3 สารเคมี

Acetic acid	A.R. grade	(Quality Reagent Chemical, New Zealand)
Ammonium molybdate	A.R. grade	(Univar, Australia)
Boric acid	A.R. grade	(Carlo Erba, France)
Bromocresol green	A.R. grade	(Carlo Erba, France)
Calcium chloride	A.R. grade	(Univar, Australia)
Copper (II) sulfate pentahydrate	A.R. grade	(Merck, Germany)
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	A.R. grade	(Sigma, Germany)
Ferric chloride	A.R. grade	(Quality Reagent Chemical, New Zealand)
Folin-Ciocalteu phenol reagent	A.R. grade	(Sigma, Germany)
Gallic acid	A.R. grade	(Fluka Chemika, Switzerland)

D-Glucose	A.R. grade	(Univar, Australia)
Hydrochloric acid	A.R. grade	(Fisher Scientific, England)
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox [®])	A.R. grade	(Sigma, Germany)
Methanol	A.R. grade	(Quality Reagent Chemical, New Zealand)
Methyl red	A.R. grade	(Merck, Germany)
Potassium hydrogen phthalate	A.R. grade	(Ajax Finechem, New Zealand)
Selenium reagent mixture	A.R. grade	(Merck, Germany)
Sodium acetate	A.R. grade	(Univar, Australia)
Sodium carbonate	A.R. grade	(Quality Reagent Chemical, New Zealand)
Sodium hydroxide	A.R. grade	(Carlo Erba, France)
di-sodium hydrogen arsenate heptahydrate	A.R. grade	(Fluka Chemika, Switzerland)
Sodium hydrogen carbonate	A.R. grade	(Merck, Germany)
Sodium dihydrogen orthophosphate	A.R. grade	(Univar, Australia)
di-sodium hydrogen orthophosphate	A.R. grade	(Univar, Australia)
Sodium sulphate	A.R. grade	(Carlo Erba, France)
Sulphuric acid 98%	A.R. grade	(Quality Reagent Chemical, New Zealand)
Trichloroacetic acid	A.R. grade	(Carlo Erba, France)
2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid	A.R. grade	(Sigma, Germany)
2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	A.R. grade	(Sigma, Germany)
สารเคมีที่มีใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน		
AccQ• Tag [™] Eluent A concentrate (for hydrolysate amino acid analysis)	(Waters, MA)	
Acetonitrile for HPLC grade	(RCI Labscan Limited, Poland)	
AccQ.fluor [™] reagent kit	(Waters, MA) ประกอบไปด้วย	

Water AccQ. fluor™ borate buffer

Water AccQ. fluor™ reagent powder

Water AccQ. fluor™ reagent diluents flammable

Amino acid hydrolysate standard (Thermo scientific, USA)

3.1.4 เครื่องมือ

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดหยาบ (Sartorius รุ่น BP 310s, Bradford, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น ED 224s, Bradford, Germany)

เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (Horiba รุ่น F-21, Kyoto, Japan)

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Thermo Scientific รุ่น Supermodulyo-230, USA)

เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Aqua lab รุ่น 3 TE, Decagon Derices, Inc., WA)

ตู้อบลมร้อน (Mettler รุ่น 600, Schwabach, Germany)

ตู้แช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Sanyo รุ่น SF-C95, Japan)

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Buchi , Switzerland) ประกอบด้วย

- ชุดย่อย (Buchi รุ่น K-424 , Switzerland)
- เครื่องดักจับไอกรด (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)
- ชุดกลั่น (Buchi รุ่น B-324 , Switzerland)

เครื่อง Centrifuge (Hettich รุ่น Mikro 22 R , Tuttlingen, Germany)

เครื่อง Electron spin resonance spectrometer (JEOL Ltd., รุ่น JES-TE300 ESR spectrometry, Tokto, Japan)

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters, MA)

ประกอบด้วย

- ระบบฉีดตัวอย่าง (Waters 717 plus Autosample)
- คอลัมน์ Waters AccQ – Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 4 ไมครอน
- เครื่องตรวจวัด (Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector: 254 นาโนเมตร)
- ปั๊ม (Waters 515 HPLC pump)
- Empower™ system เป็นโปรแกรมสำหรับคำนวณผล
- เครื่อง Rotary Evaporator (Eyela รุ่น SB-651, Tokyo, Japan)
- เครื่อง Shaking Water Bath (Gesells chaft für รุ่น GEL 1092, Burgwedel, Germany)

เครื่อง Spectrofluorometer (JASCO รุ่น FP-6200, Japan)

เครื่อง Spectrophotometer (PerkinElmer รุ่น Lambda 25 UV/VIS system, MA)

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิในช่วงระยะเวลาการงอกที่ต่างกัน

แช่ถั่วเขียวและถั่วอะซูกิในน้ำอุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะโดยใช้ผ้าขาวบางปูพื้นภาชนะ และคลุมถั่วให้มิดชิด เพาะที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0, 9, 18, 27 และ 36 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำถั่วมาล้างเป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างการงอก ทิ้งตัวอย่างถั่วงอกให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำตัวอย่างไปปั่นใน Waring blender ด้วยความเร็วสูงสุดนาน 3 นาที นำถั่วที่ผ่านการปั่นละเอียดมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.2.1.1 ปริมาณความชื้นตามวิธีข้อ 925.40 ของ A.O.A.C (2006) รายละเอียดในภาคผนวก ข.1

3.2.1.2 ปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl โดยใช้ conversion factor = 6.25 ตามวิธีข้อ 955.04 ของ A.O.A.C (2006) รายละเอียดตามภาคผนวก ข.2

3.2.1.3 ปริมาณ non-protein nitrogen

การวิเคราะห์หาปริมาณ non-protein nitrogen ดัดแปลงตามวิธีของ Hagan และ Villota (1987) โดยชั่งถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่ผ่านการปั่นละเอียด 30 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 180 มิลลิลิตร กวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส และตะกอนออกจากกัน เก็บสารละลายส่วนใสไว้ในบีกเกอร์ และนำตะกอนผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 90 มิลลิลิตรทำการสกัดซ้ำเช่นเดียวกับการสกัดครั้งแรก นำสารละลายใสที่ได้เทรวมกับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงครั้งแรก แล้วจึงเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 72 ลงในสารละลายส่วนใส จนสารละลายมีความเข้มข้นของ TCA ร้อยละ 10 กวนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนมาล้างด้วย diethyl ether 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสจนตะกอนแห้ง

หาปริมาณโปรตีนไนโตรเจนในตะกอนตามภาคผนวก ข.2 และคำนวณปริมาณ non-protein nitrogen โดยการหักลบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ข้อ 3.2.1.2) กับโปรตีนไนโตรเจน

3.2.1.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ชั่งถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่ผ่านการตีป่น 20 กรัมใส่ขวดรูปชมพู่ เติมเมทานอล 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเขย่าแบบ orbital ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปประเหยเพื่อเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse (2005) เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างที่ระเหยเมทานอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนตัวอย่างมีปริมาตรเท่าเดิม นำมาทำการทดลองโดยปิเปตสารสกัด 200 ไมโครลิตรลงในขวดกำหนดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu เข้มข้น 2 นอร์มัล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (ภาคผนวก ข. 3) แสดงผลในหน่วยไมโครกรัม กรดแกลลิกต่อกรัมถั่วเขียวหรือถั่วอะซูกิ (น้ำหนักแห้ง)

3.2.1.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่งถั่วเขียว และถั่วอะซูกิที่ผ่านการตีป่น 20 กรัมใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเขย่าแบบ orbital ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Fournier (2005) เตรียมตัวอย่าง โดยการเจือจางสารสกัดเข้มข้นให้สารสกัดมีความเข้มข้นลดลง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น ทำการทดลอง โดยปิเปตสารสกัด 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลาย low-alkalinity copper 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็น เติมสารละลาย arsenomolybdate 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณ

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข.4) แสดงผลในหน่วยไมโครกรัมน้ำตาลกลูโคสต่อกรัมถั่วเขียวหรือถั่วอะชูกิงอก (น้ำหนักแห้ง)

3.2.1.6 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

นำถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก 0 และ 27 ชั่วโมง ที่ผ่านการตีบ้นแล้ว (จากข้อ 3.2.1) มาย่อยด้วยสารละลายกรดตามวิธีการในภาคผนวก ข.5 จากนั้นนำสารที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วย HPLC ตามวิธี AccQ. Taq (Waters, MA., USA) โดยใช้คอลัมน์ Waters AccQ–Taq amino acid analysis ขนาด 3.9x150 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ใช้แบบ gradient elution ซึ่งเป็นการผสมระหว่าง 60% acetonitrile และ AccQ. Taq Eluent A โดยมีอัตราส่วนผสมดังนี้

เวลา (นาที)	อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (มิลลิเมตรต่อนาที)	ร้อยละของ Eluent A	ร้อยละของ 60% acetonitrile
0.00	1.0	100	0
0.50	1.0	98	2
15.00	1.0	93	7
19.00	1.0	90	10
28.00	1.0	81	19
34.00	1.0	80	20
36.00	1.0	68	32
40.00	1.0	60	40
45.00	1.0	0	100
50.00	1.0	100	0

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

ปริมาณตัวอย่าง	10	ไมโครลิตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	1.0	มิลลิเมตรต่อนาที
อุณหภูมิในการวิเคราะห์	37	องศาเซลเซียส
เวลาในการวิเคราะห์	50	นาทีต่อตัวอย่าง

ข้อ 3.2.1.1 ถึงข้อ 3.2.1.5 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

ข้อ 3.2.1.6 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอก

คัดเลือกถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะจากข้อ 3.2.1 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนหยาบสูงสุดเพื่อศึกษาในข้อ 3.2.2 โดยเพาะถั่วเขียวและถั่วอะชูกิตามวิธีในข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 27 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6 (มีแคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่ 0.5 กรัมต่อลิตร การเติมแคลเซียมคลอไรด์เพื่อให้ภาวะของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เหมาะกับการทำงานของ α -amylase) ด้วยเครื่อง Waring blender เมื่อตัวอย่างละเอียดเติมเอนไซม์ α -amylase 1% (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก แล้วย่อยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 20 นาที และลดอุณหภูมิลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 3, 5 และ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายส่วนใส (โปรตีนไฮโดรไลเสต) นำไปวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.2.2.1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วย Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)

วิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระตามวิธีของ Alder-Nissen (1979) ปิเปตโปรตีนไฮโดรไลเสตของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิ 0.125 มิลลิลิตร ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.2 2 มิลลิลิตร ปิเปต 0.05% TNBS 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (blank ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสต) กำหนดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครโมลต่อกรัมโปรตีน)} = \frac{\text{Absorbance}_{420} \times \text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมด (L)}}{\epsilon \times l \text{ เซนติเมตร} \times \text{น้ำหนักโปรตีนในตัวอย่าง (g)}} \times 10^6 \quad \dots\dots 3.1$$

โดย ϵ คือ molar extinction coefficient ($20300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 ปริมาตรสารละลายทั้งหมด คือ ปริมาตรโปรตีนไฮโดรไลสที่ใส่ + ปริมาตรสารละลาย
 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ + ปริมาตร TNBS + ปริมาตรสารละลายไฮโดรคลอริก = 0.008125 L

3.2.2.2 ระดับการย่อยด้วย TNBS

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 และคำนวณระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากสมการ 3.2

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{L_{\max} - L_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots 3.2$$

โดย DH คือ ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลส
 L_0 คือ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเริ่มต้น
 L_t คือ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยใช้เวลาย่อย 6 ชั่วโมง
 L_{\max} คือ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ (acid hydrolysis)

3.2.2.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลสจากขั้นตอน 3.2.2 ตามวิธีในข้อ 3.2.1.4 และแสดงผลของสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรของโปรตีนไฮโดรไลส

3.2.2.4 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

นำโปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยจากขั้นตอน 3.2.2 ไปสร้างอนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับ Waters AccQ. Reagent ตามภาคผนวก ข.5 และใช้ภาวะในการทดลองเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.1.6 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วย HPLC

3.2.2.5 การเกิดสีน้ำตาล

นำโปรตีนไฮโดรไลสจากขั้นตอน 3.2.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพื่อศึกษาค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงของโปรตีนไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme[®] ต่างกัน

3.2.2.6 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

นำโปรตีนไฮโดรไลสจากขั้นตอน 3.2.2 วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1996) เตรียมสารละลาย FRAP ตามภาคผนวก ข.6 จากนั้นจึงเปิดสารละลาย FRAP 1900 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลอง แล้วจึงนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงเปิดโปรตีนไฮโดรไลสของถั่วเขียว หรือถั่วอะชูกิออก 100 ไมโครลิตรตามลงไป ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากันแล้วเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (blank ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 แทนโปรตีนไฮโดรไลส) คำนวณค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลส โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox® (ภาคผนวก ข.6)

2) วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Park และคณะ (2008) ผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6) กับโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิออกในอัตราส่วน 0.7 : 0.3 (v/v)

เปิดโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียม(ตามภาคผนวก ข.7) 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณ DPPH radical scavenging activity (%) จากสมการ 3.3

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots 3.3$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ข้อ 3.2.2.1 ถึงข้อ 3.2.2.3 วางแผนการทดลองแบบ 2×4 Factorial in CRD โดยกลุ่มตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากภาวะการย่อย 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

ข้อ 3.2.2.4 ถึงข้อ 3.2.2.6 วางแผนการทดลองแบบ 2×4 Factorial in CRD โดยกลุ่มตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากภาวะการย่อย 3 ซ้ำ

3.2.3 ศึกษาผลของมอลโทเด็กซ์ทรินต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพาะงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ทำการเพาะถั่วเขียวและถั่วอะซูกิ ตามวิธีในข้อ 3.2.1 เป็นเวลา 0 และ 27 ชั่วโมง แล้วนำมาย่อยด้วย Flavourzyme® โดยใช้ปริมาณ Flavourzyme® ที่คัดเลือกจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิก (ความเข้มข้นร้อยละ 7 (w/w))

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดำเนินการดังนี้ 1). โปรตีนไฮโดรไลเสตส่วนแรกผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 2). โปรตีนไฮโดรไลเสตส่วนที่สองผสมกับมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 5 (w/w) แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของโปรตีนไฮโดรไลเสตใช้โปรแกรมการทำแห้งแบบอัตโนมัติ โดยตั้งอุณหภูมิที่ -60 องศาเซลเซียส ความดัน 10^{-4} มิลลิบาร์ ใช้เวลาการทำแห้ง 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

ก่อนการวิเคราะห์ในข้อ 3.2.3.2 ถึง 3.2.3.5 นำผงโปรตีนไฮโดรไลเสตละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 โดยสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3.1 ร้อยละผลผลิต

คำนวณร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตในทุกภาวะ จากสมการ 3.4

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิต}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100 \quad \dots\dots\dots 3.4$$

3.2.3.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วย TNBS

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.2.1 และแสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในหน่วยไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

3.2.3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.1.4 และแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

3.2.3.4 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมงที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน และเติมมอลโทเด็กซ์ทริน (5% w/w)

1) วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity
ด้วย spectrophotometer

เตรียมสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางให้มีความเข้มข้น 6 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูปของ DPPH radical scavenging activity (ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 ในข้อ 2)) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging activity กับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย % scavenging activity คำนวณได้จากสมการ 3.3 จากนั้นหาสมการเส้นตรงของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายเจือจาง แล้วแทนค่า y เป็น 50 ในกราฟความสัมพันธ์ที่ได้ เพื่อคำนวณหาค่า EC_{50} ของตัวอย่าง แล้วจึงนำค่า EC_{50} ของตัวอย่างมาแทนในสมการ 3.5 เพื่อแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมวิตามินซีต่อกรัมตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

$$AEAC \text{ (มิลลิกรัมวิตามินซีต่อกรัม)} = \frac{EC_{50} \text{ ของวิตามินซี}}{EC_{50} \text{ ของตัวอย่าง}} \times 100 \quad \dots\dots 3.5$$

โดยค่า EC_{50} ของวิตามินซีที่ใช้ในการคำนวณมีค่าเท่ากับ 0.00387 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chan *et al.*, 2007)

2) วิธี Ferric reducing antioxidant power

ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.2.2.6 ในข้อ 1) และแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัม Trolox[®] ต่อกรัมตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

3) วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity
ด้วยเครื่อง electron spin resonance

ดัดแปลงการวิเคราะห์จาก Giri และคณะ (2011) โดยปีเปตสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้หลอด Pyrex NMR capillary ขนาด 20 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่เตรียมไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง JES-TE300 electron spin resonance (ESR) โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ microwave power 1.2 mW, microwave frequency 9149.3 MHz, magnetic field 325.5 ± 25 mT และ sweep time 30 s จากนั้นคำนวณค่า DPPH radical scavenging activity (%) ตามสมการ 3.6

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(H_0 - H)}{H_0} \times 100 \dots\dots\dots 3.6$$

โดย H_0 คือ ความสูงของพีคที่ได้จากการวัดสารละลาย DPPH

H คือ ความสูงของพีคที่ได้จากการวัดสารตัวอย่าง

3.2.3.5 surface hydrophobicity

ดัดแปลงจากวิธีของ Wagner และ Anon (1990) เตรียมสารละลายตัวอย่าง โปรตีนไฮโดรไลเสตให้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030 และ 0.035 (w/v) บีบตัวอย่าง 3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติม 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) ความเข้มข้น 8 mM 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่า fluorescence intensity (FI) ด้วยเครื่อง spectrofluorometer และตั้งค่า excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 390 และ 470 นาโนเมตร ตามลำดับ สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่า FI และปริมาณโปรตีน (%) เพื่อหาค่าความชัน (surface hydrophobicity) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารอ้างอิง

3.2.3.6 การวัดปริมาณน้ำอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ชั่งน้ำหนักผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผสมกับมอลโทเด็คซ์ทรินร้อยละ 5 (w/w) 1 กรัมใส่ภาชนะพลาสติกสำหรับวัดปริมาณน้ำอิสระ เกลี่ยผงโปรตีนไฮโดรไลเสตให้ทั่วกันภาชนะ แล้วปิดฝาภาชนะเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา 15 นาทีจึงเปิดฝาภาชนะออก วัดปริมาณน้ำอิสระของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.3.7 การดูดน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ทดสอบความสามารถในการดูดน้ำของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผสมกับมอลโทเด็คซ์ทรินร้อยละ 5 (w/w) ซึ่งดัดแปลงการวิเคราะห์จาก Sablani, Rahman และ Labuza (2001) โดยชั่งน้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเสต 1.0000 กรัม ใส่ภาชนะอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน จากนั้นใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์อิ่มตัวที่มีค่าความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Sablani, Rahman and Labuza, 2001) ภายในภาชนะใส่บีกเกอร์ที่มีหลอดอื่น เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างทุกวันจนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ (\pm ร้อยละ 0.05 ของน้ำหนักเริ่มต้น) แสดงปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นโดยใช้หน่วยเป็นน้ำหนักของน้ำ (กรัม) ต่อกรัมของตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง)

ข้อ 3.2.3.1 ถึงข้อ 3.2.3.4 ข้อ 2) วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการ
ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก 2 ซ้ำ วิเคราะห์
ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's
new multiple range test

ข้อ 3.2.3.4 ข้อ 3) ถึงข้อ 3.2.3.7 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการ
ทดลอง 2 ซ้ำ โดยสุ่มตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิในช่วงระยะเวลาการงอกที่ต่างกัน

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่งอก

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น ในโตรเจนทั้งหมด โปรตีน ในโตรเจน Non-protein nitrogen (NPN) โปรตีนหยาบ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และน้ำตาลรีดิวซ์) ของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพาะเป็นเวลา 0, 9, 18, 27 และ 36 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4.1 และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแสดงในตารางที่ ค.1 ถึง ค.14

ระยะเวลาการเพาะที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ปริมาณความชื้นของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเป็นต้นอ่อน (โศภิตา คำหาญ, 2546) จึงพบปริมาณความชื้นของเมล็ดที่เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการงอก ดังนั้นเมล็ดที่ใช้เวลาเพาะนานกว่า จะมีปริมาณความชื้นมากกว่าเมล็ดที่ใช้เวลาเพาะน้อย Mubarak (2005) รายงานว่า การเพาะถั่วเขียวสายพันธุ์ Giza-1 เป็นเวลา 3 วันในที่มืด ทำให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ Ghavidel และ Prakash (2007) พบว่า การเพาะถั่วเขียว cowpea, lentil และ chickpea ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีผลต่อปริมาณความชื้นของถั่วที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะ โดยปริมาณความชื้นของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่หาได้จะใช้คำนวณผลของปริมาณในโตรเจนทั้งหมด โปรตีนในโตรเจน NPN โปรตีนหยาบ TPC และน้ำตาลรีดิวซ์เป็นน้ำหนักแห้ง (db)

ระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวมีผลให้ปริมาณในโตรเจนทั้งหมด โปรตีนในโตรเจน และโปรตีนหยาบที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl เพิ่มขึ้น แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณ NPN ของถั่วเขียวมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเพาะเพิ่มขึ้นแต่ไม่ส่งผลให้ปริมาณ NPN ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในถั่วเขียวที่ผ่านการงอกเป็นไปในทำนองเดียวกับ อรอนงค์ นัยวิกุล และพัชรี โสธนาสมบุญ (2532) ที่รายงานว่าการเพาะถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน1 เป็นเวลา 3 วันทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 0.22 Alonso, Aguirre และ Marzo (2000) พบว่า การเพาะถั่วเขียวสายพันธุ์ Athropurplea เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก็ไม่ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนหยาบเพิ่มขึ้น ($p > 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเพาะเพิ่มขึ้น

ระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีนไนโตรเจน NPN และโปรตีนหยาบ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็นผลจากปริมาณโปรตีนไนโตรเจนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย TCA ร่วมกับปริมาณ NPN ซึ่งอาจมาจากกรดนิวคลีอิก กรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้น ทั้งนี้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และโปรตีนหยาบของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่เพิ่มขึ้น น่าจะเป็นผลจากการสังเคราะห์โปรตีน เพปไทด์สายสั้น กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิกในระหว่างการงอก (Harborne, 1999; Maneemegalai and Nandakumar, 2011) หรืออาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการงอกทำให้สารอาหารอื่น เช่น แป้งและไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Mubarak, 2005) เมื่อคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง ปริมาณของแป้งและไขมันที่ลดลงจึงทำให้ปริมาณโปรตีนมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบสารอาหารอื่น

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเพาะเพิ่มขึ้น (11.75 และ 12.90 ไมโครกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมถั่วแห้ง) การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอาจเป็นผลจากการสังเคราะห์สารฟลูโอยด์ระหว่างกระบวนการงอก (Randhir, Lin and Shetty, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ McCue และ Shetty (2002) ที่พบว่า การเพาะถั่วเขียวในที่มืดเป็นเวลา 2 และ 3 วัน มีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในถั่วเขียวเพิ่มขึ้นประมาณ 8 ไมโครกรัมฟีนอลิกต่อน้ำหนักถั่วสด Fernandez-Orozco และคณะ (2008) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วเขียวสายพันธุ์ emerald ที่เพาะเป็นเวลา 7 วันเพิ่มขึ้นจาก 1.09 เป็น 3.46 มิลลิกรัมสมมูลย์คาเทชินต่อถั่วแห้งหนัก 1 กรัม

นอกจากนี้พบว่า ระยะเวลาในการเพาะที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของถั่วทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) Rahman และคณะ (2007) รายงานถึงปริมาณเอนไซม์อะไมเลสของถั่วเขียวที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในถั่วทั้งสองชนิดน่าจะเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์อะไมเลสระหว่างการงอก ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสทำให้คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ถูกย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กได้มากขึ้น สอดคล้องกับ Venkateswaran และ Vijayalakshmi (2010) ที่รายงานว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ finger millet (*Eleusine coracana*) เพิ่มขึ้น 1.81 เท่า เมื่อระยะเวลาการเพาะเพิ่มขึ้น 24 ชั่วโมง

ในการเลือกระยะเวลาการเพาะที่เหมาะสม พิจารณาจากปริมาณโปรตีนหยาบสูงที่สุด พบว่า ระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวไม่ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนหยาบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังนั้นการคัดเลือกระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวจึงต้องใช้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกประกอบการตัดสินใจ พบว่า ถั่วเขียวเพาะเป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง สำหรับถั่วอะซูกิเพาะเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้ปริมาณโปรตีนหยาบสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับถั่วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำการคัดเลือกถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่เพาะเป็นเวลา 27 ชั่วโมงศึกษาในขั้นต่อไป

การเพาะถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเป็นเวลา 27 ชั่วโมงจะมีปริมาณโปรตีนหยาบสูงที่สุด โดยถั่วเขียวที่ระยะเวลาการเพาะ 27 ชั่วโมงจะมีการเพิ่มของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีนหยาบสูงที่สุด ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.04 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีนหยาบที่ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมง เช่นเดียวกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีนหยาบของถั่วอะซูกิที่เพิ่มขึ้น 1.15 เท่า เมื่อระยะเวลาเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 27 ชั่วโมง นอกจากนี้ระยะเวลาการเพาะ 27 ชั่วโมงทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิเพิ่มขึ้น 2.35 และ 2.53 เท่า ตามลำดับ

การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีนหยาบและสารประกอบฟีนอลิกของถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่แตกต่างกันอาจเป็นผลจากชนิดและสายพันธุ์ของถั่วที่แตกต่างกัน จึงมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน และการเปลี่ยนแปลงระหว่างการงอกของถั่วแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ก็มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันด้วย

ระยะเวลาเพาะ 27 ชั่วโมงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของถั่วอะซูกิเพิ่มขึ้น 2.55 เท่า ซึ่งน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของถั่วเขียวที่เพิ่มขึ้น 3.65 เท่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในถั่วทั้งสองชนิดที่แตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากลักษณะ โครงสร้างของเม็ดแป้ง (starch granula) ของถั่วที่แตกต่างกัน โดย Tang, Watanabe และ Mitsunaga (2002) ศึกษาลักษณะของ azuki starch รวมถึงสมบัติต่าง ๆ พบว่า โครงสร้างของเม็ดแป้งของถั่วอะซูกิมีขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายโครงสร้างเม็ดแป้งมันฝรั่ง โครงสร้างภายในของเม็ดแป้งถั่วอะซูกิมีผลึกมาก เมื่อนำเม็ดแป้งถั่วอะซูกิมาย่อยด้วยเอนไซม์ β -amylase และ isoamylase เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า เม็ดแป้งถั่วอะซูกิมีร้อยละของระดับการย่อยต่ำที่สุด (ร้อยละ 23) เมื่อเทียบกับเม็ดแป้งของข้าวบาร์เลย์ (ร้อยละ 68)

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะต่อองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิระยะงอก

	ระยะเวลา การเพาะ (ชั่วโมง)	ความชื้น (%)	ไนโตรเจน ทั้งหมด (% w/w db)	โปรตีน ไนโตรเจน (% w/w db)	Non-protein nitrogen (% w/w db)	โปรตีนหยาบ (%N x 6.25, % w/w db)	สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด (μg gallic acid / g db)	น้ำตาลรีดิวิซ (μg glucose / g db)
ถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i>)	0	50.43 ^a ± 4.45	3.73 ^{ns} ± 0.09	3.13 ^{ns} ± 0.04	0.60 ^{ns} ± 0.05	23.33 ^{ns} ± 0.55	4.55 ^a ± 0.60	0.62 ^a ± 0.04
	9	58.27 ^b ± 1.68	3.72 ^{ns} ± 0.22	3.25 ^{ns} ± 0.05	0.47 ^{ns} ± 0.17	23.23 ^{ns} ± 1.36	5.97 ^b ± 0.39	1.34 ^b ± 0.08
	18	61.52 ^b ± 2.28	3.60 ^{ns} ± 0.15	2.95 ^{ns} ± 0.59	0.65 ^{ns} ± 0.46	22.49 ^{ns} ± 0.96	7.01 ^b ± 0.83	1.65 ^b ± 0.13
	27	66.59 ^c ± 1.61	3.88 ^{ns} ± 0.15	3.35 ^{ns} ± 0.39	0.53 ^{ns} ± 0.24	24.26 ^{ns} ± 0.93	10.69 ^c ± 0.66	2.26 ^c ± 0.41
	36	68.05 ^c ± 1.36	3.75 ^{ns} ± 0.22	3.34 ^{ns} ± 0.38	0.40 ^{ns} ± 0.19	23.35 ^{ns} ± 1.35	11.70 ^c ± 0.64	2.65 ^c ± 0.20
ถั่วอะชูกิ (<i>Vigna angularis</i>)	0	51.36 ^a ± 0.93	4.06 ^a ± 0.47	3.20 ^a ± 0.44	0.86 ^b ± 0.10	25.39 ^a ± 2.89	4.64 ^a ± 0.07	0.42 ^a ± 0.30
	9	55.47 ^b ± 2.22	4.30 ^a ± 0.47	3.47 ^a ± 0.26	0.83 ^b ± 0.21	26.89 ^a ± 2.94	5.69 ^a ± 0.36	0.49 ^a ± 0.03
	18	62.59 ^c ± 0.71	4.69 ^{ab} ± 0.26	3.53 ^a ± 0.17	1.16 ^c ± 0.09	29.34 ^{ab} ± 1.64	7.30 ^b ± 0.16	0.89 ^b ± 0.13
	27	65.16 ^c ± 2.03	4.65 ^{ab} ± 0.24	4.39 ^b ± 0.29	0.26 ^a ± 0.12	29.09 ^{ab} ± 1.51	11.80 ^c ± 0.67	1.07 ^b ± 0.15
	36	70.94 ^d ± 2.35	5.25 ^b ± 0.23	4.84 ^b ± 0.02	0.41 ^a ± 0.21	32.80 ^b ± 1.41	17.54 ^d ± 1.53	1.54 ^c ± 0.24

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

ns ตัวเลขที่มีอักษรในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

ไนโตรเจนทั้งหมด - โปรตีนไนโตรเจน = Non-protein nitrogen

4.1.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

นำถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน โดยย่อยถั่วเขียวและถั่วอะชูกิด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ถั่วทั้งสองชนิดมีกรดอะมิโน 17 ชนิด (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด จะทำให้กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ แอสพาราจิน เปลี่ยนเป็นกรดแอสพาร์ติก กลูตามีนเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิก และทริปโทเฟนถูกทำลาย (Kristinsson and rosco, 2000)

จากตารางที่ 4.2 พบว่า ระยะเวลาการเพาะ 27 ชั่วโมงส่งผลต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งจำเป็นและไม่จำเป็นทั้งหมดของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกให้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับถั่วที่ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4.2 (โครมาโทแกรมแสดงในภาคผนวก ข.8)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง พบว่า ถั่วเขียวเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมงมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 2521.15 ± 399.01 และ 4192.41 ± 24.60 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมถั่วแห้ง ตามลำดับ โดยระยะเวลาการเพาะถั่วเขียว 27 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเพิ่มขึ้นประมาณ 1.66 เท่า ถั่วอะชูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 1713.43 ± 360.13 และ 4524.81 ± 516.38 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมถั่วแห้ง ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นจากระยะเวลาการเพาะ 0 ชั่วโมง ประมาณ 2.64 เท่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอาจเกิดจากการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ด (Harborne, 1999; Maneemegalai and Nandakumar, 2011)

ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้ในถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยชนิดของกรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุด ในถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ได้แก่ กรดกลูตามิก (808.83 ± 31.78 และ 882.43 ± 81.07 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมถั่วแห้ง ตามลำดับ) รองลงมาคือ กรดแอสพาร์ติก (703.91 ± 63.33 และ 668.02 ± 47.58 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมถั่วแห้ง ตามลำดับ) Mubarak (2005) ทำการเพาะถั่วเขียวเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ชนิดของกรดอะมิโนในถั่วเขียวงอกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ได้แก่ ไอโซลูซีน ลูซีน เนิลอะลานีน วาลีน และทรีโอนีน

เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 100 มิลลิกรัมของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก (ตารางที่ 4.2) พบว่า การเพาะถั่วเขียว 27 ชั่วโมงทำให้อัตราส่วนของกรดแอสพาร์ติก อาร์จินีน และเพนิลอะลานีนต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 100 มิลลิกรัมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น การเพาะถั่วอะชูกิเป็นเวลา 27 ชั่วโมงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของวาลีน กรดแอสพาร์ติก เมไทโอนีน และกรดกลูตามิกต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 100 มิลลิกรัมเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น

ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะถั้วเขียวและถั้วอะซูกิต่อชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

ชนิดของกรดอะมิโน	ระยะเวลาเพาะถั้วเขียว (ชั่วโมง)				ระยะเวลาเพาะถั้วอะซูกิ (ชั่วโมง)			
	0		27		0		27	
	ปริมาณ (mg/100 g db)	ร้อยละ*	ปริมาณ (mg/100 g db)	ร้อยละ*	ปริมาณ (mg/100 g db)	ร้อยละ*	ปริมาณ (mg/100 g db)	ร้อยละ*
Essential amino acid								
Arginine	116.74 ± 48.17	4.63	249.55 ± 14.32	5.95	95.81 ± 37.09	5.59	252.09 ± 76.23	5.57
Histidine	73.51 ± 17.61	2.92	122.36 ± 12.52	2.92	57.88 ± 13.13	3.38	145.28 ± 19.60	3.21
Isoleucine	108.65 ± 21.93	4.31	171.15 ± 8.01	4.08	70.18 ± 11.59	4.10	187.28 ± 16.89	4.14
Leucine	205.79 ± 37.33	8.16	331.10 ± 18.45	7.90	136.59 ± 23.69	7.97	58.56 ± 34.53	7.92
Lysine	168.63 ± 18.14	6.69	235.04 ± 23.01	5.61	109.99 ± 14.72	6.42	96.33 ± 28.44	6.55
Methionine	6.91 ± 6.62	1.07	42.85 ± 4.36	1.02	4.36 ± 8.07	0.25	49.84 ± 22.32	1.10
Phenylalanine	197.26 ± 49.92	7.82	350.58 ± 32.87	8.36	142.75 ± 35.09	8.33	354.57 ± 47.05	7.83
Threonine	160.55 ± 26.58	6.37	233.89 ± 10.96	5.58	120.58 ± 37.61	7.04	282.77 ± 33.83	6.25
Valine	132.29 ± 25.02	5.25	215.25 ± 14.16	5.13	43.94 ± 36.80	2.56	215.18 ± 68.24	4.75
TEAA[†]	1190.33 ± 181.03		1951.78 ± 80.37		782.09 ± 140.52		2139.71 ± 255.98	
Non-essential amino acid								
Alanine	5.83 ± 0.97	0.23	9.03 ± 1.77	0.22	3.28 ± 0.46	0.19	8.91 ± 0.80	0.20
Aspartic acid	363.08 ± 45.47	14.40	703.91 ± 63.33	16.79	231.66 ± 35.86	13.52	668.02 ± 47.58	14.76
Cysteine	14.39 ± 3.63	0.57	24.36 ± 2.53	0.58	50.23 ± 30.52	2.93	32.89 ± 46.71	0.73
Glutamic acid	496.92 ± 68.01	19.71	808.83 ± 31.78	19.29	320.38 ± 53.08	18.70	882.43 ± 81.07	19.49
Glycine	104.88 ± 22.82	4.16	149.63 ± 9.95	3.57	68.07 ± 12.03	3.97	170.29 ± 21.18	3.76
Proline	106.10 ± 18.94	4.21	168.05 ± 7.98	4.01	70.56 ± 13.31	4.12	182.64 ± 16.03	4.03
Serine	145.89 ± 28.48	5.78	232.70 ± 12.39	5.55	94.62 ± 17.66	5.52	249.34 ± 23.95	5.51
Tyrosine	93.71 ± 27.41	3.72	144.00 ± 11.40	3.43	92.53 ± 27.92	5.40	190.54 ± 49.91	4.21
TNEAA^{††}	1330.82 ± 217.99		2240.63 ± 55.77		31.34 ± 219.61		2385.10 ± 260.40	
Total amino acid	2521.15 ± 399.01	100	4192.41 ± 24.60	100	1713.43 ± 360.13	100	4524.81 ± 516.38	100

*ร้อยละของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเทียบปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

[†]TEAA คือ ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นทั้งหมด

^{††}TNEAA คือปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็นทั้งหมด

4.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Flavourzyme® ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิระยะงอก

4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนถั่วเขียวและถั่วอะชูกิอกด้วย Flavourzyme®

จากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ระดับการย่อยและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิอก ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6 ระยะเวลาย่อย 6 ชั่วโมง ได้ผลแสดงดังตาราง 4.3, 4.4, 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวเพาะ พบว่า ระยะเวลาการเพาะ ความเข้มข้น Flavourzyme® และอิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวเพาะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางภาคผนวก ค.15 โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® จะทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสของถั่วเขียวงอกสูงขึ้น จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวงอกในภาวะการเพาะ 27 ชั่วโมง และย่อยด้วย Flavourzyme® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูงที่สุด และแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือ $1049.00 \pm 66.88 \mu\text{mole g}^{-1} \text{ protein db}$ ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 7.1 เท่า เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง ในภาวะที่ไม่มี Flavourzyme®

ตารางที่ 4.3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น Flavourzyme® (%w/w)	หมู่อะมิโนอิสระ ($\mu\text{mole g}^{-1} \text{ protein db}$)	
	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง
0	$65.42^a \pm 0.40$	$147.66^b \pm 4.27$
3	$514.86^c \pm 8.58$	$805.11^c \pm 28.64$
5	$692.40^d \pm 9.95$	$921.25^f \pm 9.97$
7	$708.67^d \pm 17.21$	$1049.00^g \pm 66.88$

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

พิจารณาตารางที่ 4.4 และตารางภาคผนวก ค.16 พบว่า ระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิเพาะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่อิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ไม่ส่งผลต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิเพาะให้แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแยกปัจจัย (ตารางภาคผนวก ค. 17 ถึง ค. 22) เมื่อไม่มี Flavourzyme® พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิออก 0 ชั่วโมงจะมีปริมาณหมู่อะมิโนน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 3, 5 และ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วออก ถั่วเพาะ 27 ชั่วโมงมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับถั่วเพาะ 0 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิออกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ภาวะการย่อยโปรตีนจากถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วออก เป็นภาวะที่ทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูงที่สุด

การเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วทั้งสองชนิดเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Flavourzyme® ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดพันธะเพปไทด์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์มีขนาดสั้นลง ทำให้เกิดหมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วย trinitrobenzenesulfonic acid ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับ primary amines จึงให้ค่าหมู่อะมิโนอิสระสูงขึ้น (Alder-Nissen, 1979) Achouri, Zhang และ Shiyong (1998) รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเหลืองมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นจาก 0.247 เป็น 0.274 free NH_2 per 100 g protein เมื่อร้อยละของระดับการย่อยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4 เป็นร้อยละ 8

ตารางที่ 4.4 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น Flavourzyme® (%w/w)	หมู่อะมิโนอิสระ ($\mu\text{mole g}^{-1} \text{ protein}$)	
	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง
0	50.50 ^{aA} \pm 1.82	67.05 ^{bA} \pm 0.62
3	305.65 ^{aB} \pm 7.13	309.79 ^{aB} \pm 6.38
5	370.20 ^{aC} \pm 8.62	374.80 ^{aC} \pm 0.89
7	415.59 ^{aD} \pm 7.83	437.02 ^{aD} \pm 11.97

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

A,B,C... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.5 และตารางในภาคผนวก ค.23 และ ค.24 พบว่า ระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® รวมถึงอิทธิพลร่วมของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ทำให้ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การย่อยโปรตีนจากถั่วเขียวเพาะ 0 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 5 และ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก จะให้ระดับการย่อยสูงสุดซึ่งแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยที่ค่าระดับการย่อยจากทั้งสองภาวะไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ร้อยละประมาณ 68) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระดับการย่อยซึ่งติดตามจากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก พบว่า ตัวอย่างที่มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูงสุด (ถั่วเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก) ไม่ได้มีระดับการย่อยสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากระดับการย่อยของโปรตีน เป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ณ เวลาใด ๆ กับปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของตัวอย่าง แต่ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ จะมีผลต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ณ เวลาใด ๆ จึงต้องทำการหักลบปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ณ เวลาใด ๆ ด้วยปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ และกรดอะมิโนทั้งหมดของถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมงมีปริมาณมากกว่าถั่วเขียวเพาะ 0 ชั่วโมง จึงส่งผลให้ระดับการย่อยที่คำนวณได้ไม่เพิ่มขึ้นตามปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เพิ่มขึ้น

ในกรณีโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วอะชูกิงอก ภาวะที่มีระดับการย่อยสูงที่สุด คือ ภาวะการย่อยโปรตีนจากถั่วอะชูกิงอก 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก โดยมีระดับการย่อยเท่ากับ 20.24 ± 0.65 ซึ่งแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ศุภรจิตต์ เอี่ยมนเรพร (2551) รายงานว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® ร้อยละ 5 และ 7.5 (w/w) ทำให้ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสจากใบยาสูบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่มี Flavourzyme® แต่ค่าที่ได้จากทั้งสองภาวะข้างต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น Flavourzyme ® (%w/w)	ระดับการย่อย (%)			
	ถั่วเขียว		ถั่วอะชูกิงอก	
	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง
0	$0.00^a \pm 0.00$	$0.00^a \pm 0.00$	$0.00^a \pm 0.00$	$0.00^a \pm 0.00$
3	$48.37^c \pm 0.91$	$25.14^b \pm 1.08$	$12.01^b \pm 0.33$	$13.25^c \pm 0.35$
5	$67.16^f \pm 1.10$	$29.51^c \pm 0.38$	$15.02^d \pm 0.40$	$16.82^c \pm 0.05$
7	$68.88^f \pm 1.83$	$34.32^d \pm 2.52$	$17.14^c \pm 0.36$	$20.24^f \pm 0.65$

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวงอก พบว่า ระยะเวลาการเพาะ ความเข้มข้น Flavourzyme® และอิทธิพลร่วมของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และตารางภาคผนวกค.25 ภาวะในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวงอกที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ การย่อยโปรตีนของถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก ($1334.10 \pm 47.83 \mu\text{g gallic acid ml}^{-1}$) ซึ่งแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยที่ภาวะการย่อยนี้ก็เป็นภาวะที่ให้หมู่อะมิโนอิสระสูงที่สุดเช่นกัน โดยปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกของโปรตีนไฮโดรไลเสตในภาวะดังกล่าวเพิ่มขึ้นจากภาวะการย่อยโปรตีนของถั่วเขียวเพาะ 0 ชั่วโมง ในภาวะที่ไม่มี Flavourzyme® ประมาณ 3.5 เท่า

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก พบว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น Flavourzyme® และอิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และตารางภาคผนวก ค.26 ภาวะในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอกที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ การย่อยโปรตีนของถั่วอะชูกิงอกเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก ($770.82 \pm 12.26 \mu\text{g gallic acid ml}^{-1}$) ซึ่งแตกต่างจากภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเป็นภาวะการย่อยเดียวกับที่ให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูงที่สุด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของโปรตีนไฮโดรไลเสตในภาวะดังกล่าวเพิ่มขึ้น จากภาวะการย่อยโปรตีนของถั่วอะชูกิงอกเพาะ 0 ชั่วโมง ที่ไม่มี Flavourzyme® ประมาณ 1.3 เท่า

Asano, Shinagawa และ Hashimoto (1982) อธิบายว่า อันตรกิริยาที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก แต่ Siebert, Troukhanova และ Lynn (1996) พบว่า อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนมีบทบาทที่สำคัญมากกว่าพันธะไฮโดรเจน Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส ทำหน้าที่ตัดพันธะเพปไทด์ให้ได้เพปไทด์สายสั้น (Brenntag, Mülheim) อาจส่งผลต่อตำแหน่งและระยะห่างระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและหมู่อะมิโนในสายพอลิเพปไทด์หรือเพปไทด์ ทำให้การเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกลดลง จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในโปรตีนไฮโดรไลเสตได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้ถั่วอะชูกิงอกที่มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าถั่วเขียว น่าจะมีผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สูงมากขึ้นด้วย

Wang และ Tang (2012) พบว่า เมื่อนำโปรตีนไอโซเลตที่ได้จาก buckwheat มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ เปรียบเทียบกับเวลาที่ให้ย่อย 0 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.38 เป็นร้อยละ 0.97

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้น Flavourzyme® (%w/w)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g gallic acid ml}^{-1}$)			
	ถั่วเขียว		ถั่วอะชูกิงอก	
	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง	เพาะ 0 ชั่วโมง	เพาะ 27 ชั่วโมง
0	377.62 ^a ± 10.38	752.06 ^b ± 9.12	571.82 ^b ± 12.68	513.33 ^a ± 11.54
3	814.71 ^{bc} ± 47.44	1107.70 ^c ± 46.38	672.32 ^c ± 10.69	661.98 ^c ± 9.25
5	842.07 ^{cd} ± 38.30	1218.10 ^f ± 53.89	697.10 ^d ± 21.35	698.33 ^d ± 6.88
7	899.05 ^d ± 5.25	1334.10 ^g ± 47.83	739.66 ^e ± 5.12	770.82 ^f ± 12.26

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

เนื่องจากผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ไม่สามารถอธิบายได้ว่าหมู่อะมิโนอิสระที่เพิ่มขึ้นในโปรตีนไฮโดรไลส เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโนอิสระหรือการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน จึงวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับอธิบายการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ว่ามาจากปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่มีในโปรตีนไฮโดรไลสเมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้นหรือไม่

4.2.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

เนื่องจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62.62 และ 62.9 โดยน้ำหนักแห้งของถั่ว (USDA, 2010) ตามลำดับ ดังนั้นก่อนทำการย่อยโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกด้วย Flavourzyme® ต้องนำตัวอย่างไปผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ BAN® 480 L ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท α -amylase เพื่อป้องกันการเกิดเจลระหว่างกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกในภาวะต่างๆ (ตารางที่ 4.7 และ 4.8 และโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ แสดงในภาคผนวก ข.8) พบว่า เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 0, 3, 5 และ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่ว) จะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีน

ไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะซูกิที่เพาะเป็นเวลา 0 และ 27 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณ หมู่อะมิโนอิสระในข้อ 4.2.1 การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระเมื่อเพิ่มความเข้มข้น Flavourzyme® จึงช่วยยืนยันว่า Flavourzyme® ที่ใช้มีสมบัติเป็นทั้งเอกซ์โซเพปติเดส และเอนโดเพปติเดส ซึ่งมีการตัดพันธะเพปไทด์แบบสุ่ม เมื่อทำงานมากขึ้นจึงเกิด กรดอะมิโนอิสระมากขึ้น

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอกจะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดและ กรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ งอก เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากโปรตีนของถั่วเขียวถูกย่อยด้วย Flavourzyme® ได้ง่ายกว่า โปรตีนของถั่วอะซูกิ

จากตารางที่ 4.7 พบว่า ชนิดกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว เพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง ที่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ได้แก่ อาร์จินิน กรดแอสพาร์ติก ซิสเทอีน กรดกลูตามิก ฮีสทีดีน ไอโซลูซีน ลูซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน ซีรีน ไทโอนีน และวาลีน แต่อย่างไรก็ตามมีกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ อะลานีน ไกลซีน เมไทโอนีน โพรลีน และไทโรซีน ที่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ กรดอะมิโนอิสระน้อยมาก เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากในถั่วเขียวเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง มีปริมาณของกรดอะมิโนเหล่านี้ต่ำ โดยเฉพาะเมไทโอนีน และอะลานีนที่พบ ในปริมาณที่ต่ำกว่า 50 mg per 100 g sample db (ตารางที่ 4.2) ดังนั้น โอกาสที่จะได้ กรดอะมิโนอิสระเหล่านี้จึงน้อย

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ชนิดกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิ เพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง ที่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ได้แก่ อาร์จินิน ซิสเทอีน กรดกลูตามิก ฮีสทีดีน ไอโซลูซีน ลูซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน ซีรีน ไทโอนีน และไทโรซีน รวมถึง วาลีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิเพาะ 0 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีกรดอะมิโนอิสระบางชนิดในโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ อะลานีน กรดแอสพาร์ติก ไกลซีน เมไทโอนีน และโพรลีน รวมทั้ง วาลีน ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ที่แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ซึ่งแนวโน้มนี้ก็พบในถั่วเขียวเช่นเดียวกัน ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ น่าจะสัมพันธ์กับปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในถั่วแต่ละชนิด

ฉันทพร จันทน์แสนโรจน์ (2550) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย จะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น เนื่องจากระดับการย่อยที่สูงขึ้น ทำให้โปรตีนถูกย่อยได้มาก ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงสูงขึ้นด้วย และภาวะที่ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป่าสูงที่สุด คือ การย่อยด้วย Flavourzyme[®] ร้อยละ 1.5 ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 229.16 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® ต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg mL⁻¹) ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวเพาะที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ชนิดของ กรดอะมิโน	ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมง				ระยะเวลาเพาะ 27 ชั่วโมง			
	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)				ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)			
	0	3	5	7	0	3	5	7
Alanine	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000
Arginine	0.008 ± 0.000	0.033 ± 0.006	0.041 ± 0.009	0.052 ± 0.007	0.011 ± 0.004	0.033 ± 0.005	0.028 ± 0.010	0.064 ± 0.011
Aspartic acid	0.003 ± 0.000	0.013 ± 0.002	0.025 ± 0.019	0.033 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.038 ± 0.006
Cysteine [†]	0.000 ± 0.000	0.019 ± 0.002	0.023 ± 0.006	0.029 ± 0.004	0.002 ± 0.000	0.018 ± 0.004	0.017 ± 0.001	0.031 ± 0.005
Glutamic acid	0.010 ± 0.001	0.025 ± 0.003	0.033 ± 0.012	0.070 ± 0.005	0.034 ± 0.005	0.032 ± 0.004	0.039 ± 0.002	0.083 ± 0.014
Glycine	0.001 ± 0.000	0.006 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.009 ± 0.002
Histidine [†]	0.002 ± 0.000	0.026 ± 0.003	0.034 ± 0.008	0.049 ± 0.005	0.009 ± 0.002	0.031 ± 0.005	0.029 ± 0.001	0.057 ± 0.011
Isoleucine	0.001 ± 0.000	0.020 ± 0.002	0.025 ± 0.005	0.038 ± 0.004	0.005 ± 0.001	0.019 ± 0.004	0.019 ± 0.001	0.039 ± 0.006
Leucine	0.003 ± 0.000	0.047 ± 0.004	0.057 ± 0.012	0.085 ± 0.009	0.004 ± 0.001	0.043 ± 0.008	0.042 ± 0.001	0.086 ± 0.013
Lysine	0.001 ± 0.000	0.026 ± 0.005	0.034 ± 0.004	0.061 ± 0.005	0.004 ± 0.001	0.020 ± 0.003	0.022 ± 0.002	0.051 ± 0.009
Methionine [†]	0.002 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.004	0.001 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.010 ± 0.002
Phenylalanine [†]	0.004 ± 0.000	0.061 ± 0.007	0.068 ± 0.018	0.085 ± 0.015	0.007 ± 0.001	0.057 ± 0.010	0.054 ± 0.004	0.096 ± 0.013
Proline	0.005 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.007 ± 0.002	0.007 ± 0.002	0.012 ± 0.002
Serine	0.004 ± 0.000	0.039 ± 0.003	0.045 ± 0.015	0.073 ± 0.006	0.064 ± 0.012	0.062 ± 0.007	0.062 ± 0.007	0.121 ± 0.019
Threonine	0.036 ± 0.003	0.033 ± 0.004	0.036 ± 0.006	0.0056 ± 0.004	0.027 ± 0.006	0.027 ± 0.003	0.030 ± 0.003	0.058 ± 0.012
Tyrosine [†]	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.009 ± 0.022	0.011 ± 0.002	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.001
Valine	0.000 ± 0.000	0.027 ± 0.002	0.034 ± 0.007	0.046 ± 0.016	0.000 ± 0.000	0.027 ± 0.005	0.027 ± 0.001	0.055 ± 0.008
Total	0.080 ± 0.006	0.383 ± 0.032	0.487 ± 0.098	0.703 ± 0.065	0.202 ± 0.036	0.404 ± 0.066	0.410 ± 0.017	0.811 ± 0.140

[†]เป็นกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

ตารางที่ 4.8 ผลของปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® ต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg mL⁻¹) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วอะซูกิเพาะที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ชนิดของ กรดอะมิโน	ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมง				ระยะเวลาเพาะ 27 ชั่วโมง			
	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)				ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)			
	0	3	5	7	0	3	5	7
Alanine	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
Arginine	0.023 ± 0.003	0.032 ± 0.003	0.056 ± 0.005	0.052 ± 0.005	0.022 ± 0.009	0.025 ± 0.002	0.039 ± 0.004	0.048 ± 0.009
Aspartic acid	0.008 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.016 ± 0.014	0.014 ± 0.003	0.016 ± 0.002
Cysteine [†]	0.001 ± 0.000	0.016 ± 0.002	0.028 ± 0.003	0.024 ± 0.004	0.003 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.019 ± 0.002	0.023 ± 0.005
Glutamic acid	0.015 ± 0.002	0.021 ± 0.003	0.040 ± 0.003	0.044 ± 0.002	0.009 ± 0.004	0.015 ± 0.004	0.030 ± 0.006	0.036 ± 0.004
Glycine	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.009 ± 0.002
Histidine [†]	0.002 ± 0.000	0.020 ± 0.002	0.038 ± 0.004	0.039 ± 0.007	0.009 ± 0.004	0.016 ± 0.002	0.028 ± 0.003	0.035 ± 0.006
Isoleucine	0.001 ± 0.000	0.015 ± 0.002	0.028 ± 0.003	0.026 ± 0.002	0.002 ± 0.000	0.011 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.024 ± 0.003
Leucine	0.002 ± 0.000	0.035 ± 0.004	0.061 ± 0.006	0.056 ± 0.005	0.003 ± 0.001	0.026 ± 0.003	0.046 ± 0.004	0.053 ± 0.007
Lysine	0.002 ± 0.000	0.018 ± 0.002	0.031 ± 0.003	0.032 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.028 ± 0.007	0.032 ± 0.004
Methionine [†]	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.001
Phenylalanine [†]	0.003 ± 0.000	0.044 ± 0.005	0.075 ± 0.009	0.085 ± 0.015	0.003 ± 0.001	0.030 ± 0.004	0.050 ± 0.005	0.121 ± 0.023
Proline	0.004 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.004 ± 0.001
Serine	0.005 ± 0.001	0.029 ± 0.003	0.054 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.009 ± 0.003	0.020 ± 0.008	0.039 ± 0.004	0.048 ± 0.007
Threonine	0.005 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.027 ± 0.002	0.027 ± 0.002	0.009 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.025 ± 0.005	0.027 ± 0.004
Tyrosine [†]	0.001 ± 0.000	0.024 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.040 ± 0.004	0.005 ± 0.001	0.018 ± 0.002	0.032 ± 0.003	0.038 ± 0.005
Valine	0.002 ± 0.000	0.005 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.127 ± 0.019	0.001 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Total	0.075 ± 0.009	0.296 ± 0.033	0.528 ± 0.054	0.564 ± 0.059	0.089 ± 0.016	0.250 ± 0.046	0.386 ± 0.045	0.524 ± 0.067

[†]เป็นกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

4.2.3 การเกิดสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

การวิเคราะห์การเกิดสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (รูปที่ 4.1) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก 0 ชั่วโมง มีค่าของการดูดกลืนแสงที่มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก 27 ชั่วโมง ซึ่งหมายถึงมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลมากกว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียว 0 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นประมาณ 0.1 หน่วย (จาก 0.722 เป็น 0.844) เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น Flavourzyme® จากร้อยละ 3 เป็น 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอกในถั่วเขียว 27 ชั่วโมง และถั่วอะชูกิงอก 0 และ 27 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ มีค่าการดูดกลืนแสงของเพิ่มขึ้นประมาณ 0.06 – 0.08 หน่วย อย่างไรก็ตามในภาวะที่ไม่มี Flavourzyme® โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ ในช่วงเวลาการเพาะดังกล่าวจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด

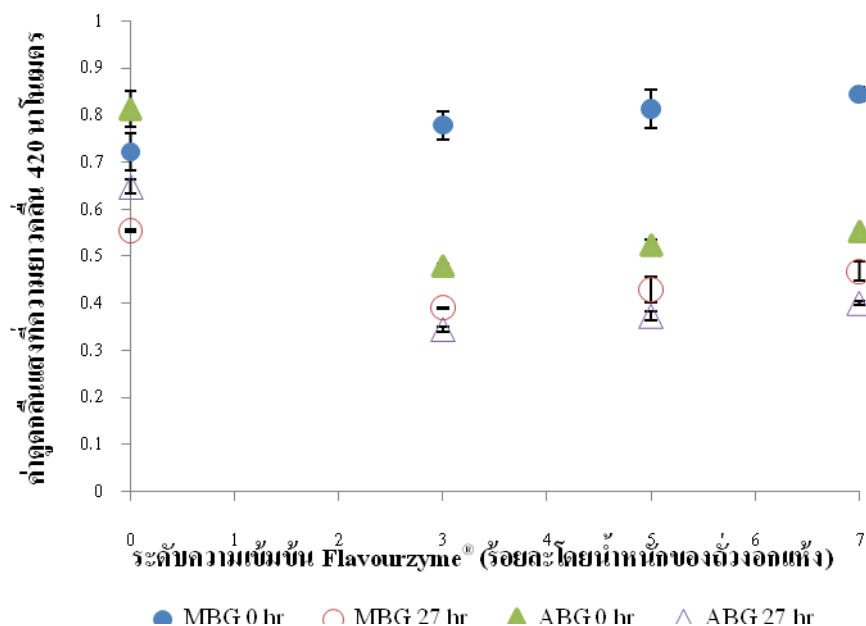
การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร อาจเกิดจากปฏิกิริยาสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ คือ ปฏิกิริยามอลดาร์ด โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลอิสระของน้ำตาลรีดิวซ์ กับหมู่อะมิโนอิสระของกรดอะมิโน โปรตีน หรือ เปปไทด์ แล้วเกิดเป็นสารสีน้ำตาลที่เรียกว่า melanoidins โดยทั่วไปปฏิกิริยานี้ อาจเกิดระหว่างกระบวนการผลิตที่ใช้อุณหภูมิสูง หรือ การเก็บรักษาทำให้เกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์

ทั้งนี้ น้ำตาลรีดิวซ์ ได้จากกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตระหว่างการงอก (Rahman *et al.*, 2007) และจากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขณะที่กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นมีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลส เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลสได้รับความร้อนจากกระบวนการผลิตในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส จึงอาจก่อให้เกิดสีน้ำตาลได้ นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยามอลดาร์ดจะเกิดได้ดีเมื่อค่า pH ของสารละลายสูงกว่าค่า pI ของเปปไทด์หรือโปรตีนชนิดนั้น ๆ เพื่อให้หมู่อะมิโนอยู่ในรูปของเอมีน โปรตีนของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกมีค่า pI อยู่ในช่วง pH 4 – 5 (Mohamed, Bakar and Hamid, 1996; Peterbauer and Richter, 1998) ดังนั้นกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสที่มีช่วง pH 6 จึงเอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยามอลดาร์ดของโปรตีนไฮโดรไลส Fry และ Stegink (1982) พบว่า ชนิดของกรดอะมิโนมีผลต่ออัตราการเกิด ปฏิกิริยามอลดาร์ดใน parental nutrition solution โดยกรดอะมิโนที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามอลดาร์ดค่อนข้างมาก คือ ไลซีน ทรีปโทเฟน ซีรีน และไทโอนีน

กรดอะมิโนที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ปานกลาง คือ วาลีน ไอโซลูซีน ลูซีน และ โพรลีน ขณะที่อาร์จินิน อะลานิน เนิลอะลานิน ฮีสทีดีน เมไทโอนีน และไกลซีน เป็นกรดอะมิโนที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดน้อย จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก (ตารางที่ 4.7 และ 4.8) พบว่า ความเข้มข้น Flavourzyme® ที่เพิ่มขึ้น ไม่ได้ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในปริมาณที่สูง จึงอาจเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.1) เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น

ถึงแม้ว่าการเกิดปฏิกิริยาน้ำตาลจะทำให้กรดอะมิโนและเปปไทด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีปริมาณลดลง เนื่องจากถูกใช้ไปในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด แต่ Maillard reaction product ก็มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ (Kurozawa, Park and Hubinger, 2009)

Liu และคณะ (2010) พบว่า การละลายผงโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเหลือง 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำตาลไซโลสจนสารละลายมีความเข้มข้นร้อยละ 12 (w/v) และมี pH 7.4 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิด Maillard reaction product จากกรดอะมิโนและน้ำตาลไซโลส มากกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมน้ำตาลไซโลส เห็นได้ว่าในกรณีนี้ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลส (50-70 องศาเซลเซียส) อย่างมาก



รูปที่ 4.1 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อการเกิดสีน้ำตาลของโปรตีนไฮโดรไลส

จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

(MBG 0 hr หมายถึง ถั่วเขียวงอก 0 ชั่วโมง MBG 27 hr หมายถึง ถั่วเขียวงอก 27 ชั่วโมง ABG 0 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 0 ชั่วโมง ABG 27 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 27 ชั่วโมง)

4.2.4 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิงอก

4.2.4.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power

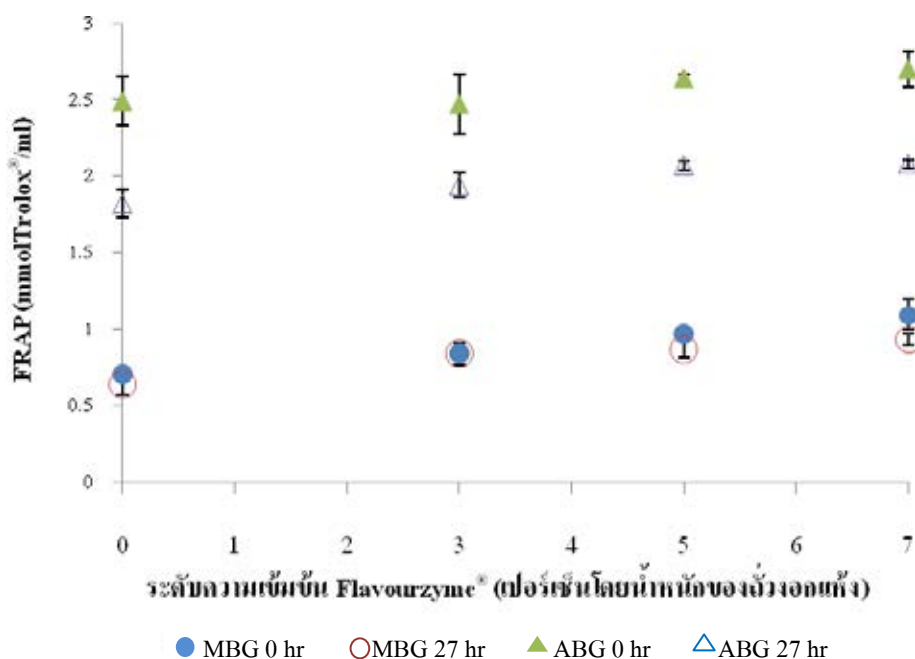
(FRAP)

รูปที่ 4.2 รายงานผลการวิเคราะห์เป็นค่า FRAP ($\text{mmol Trolox}^{\text{®}} \text{mL}^{-1}$) เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 3, 5 และ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก) ทำให้ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วงอกทั้งสองชนิด พบว่า ที่ระดับการงอกเดียวกัน ความเข้มข้น Flavourzyme® ที่เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 3, 5 และ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก) ทำให้ระดับการย่อยของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกอยู่ในช่วงร้อยละ 25 – 69 และ 12 – 20 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.5) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ตารางที่ 4.3, 4.4 และ 4.6) และกรดอะมิโนอิสระที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ ซิสเทอีน ฮีสทีดีน เมไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 4.7 และ 4.8) ดังนั้น

การที่กรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้น และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe (III) ได้ (Kartika *et al.*, 2007) มีปริมาณเพิ่มขึ้นไม่มาก จึงทำให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ โปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® เพิ่มขึ้น

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จาก ถั่วอะชูกิงอก มีแนวโน้มสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอก และเกิดขึ้นที่ทุกระดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีน ไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP เป็นผลจากสมบัติของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ของโปรตีนไฮโดรไลส โดยกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้น และ สารประกอบฟีนอลิก มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe(III) ได้ (Kartika *et al.*, 2007) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ถั่วเขียวอกมีสารประกอบฟีนอลิก หมู่อะมิโนอิสระและกรดอะมิโนอิสระมากกว่าถั่วอะชูกิงอก แต่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ที่วิเคราะห์ได้ขึ้นกับชนิดของสารประกอบฟีนอลิก เปปไทด์และชนิดของกรดอะมิโนมากกว่า ที่จะขึ้นกับปริมาณของสารดังกล่าวที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลส

Lin และคณะ (2010) รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลสได้จาก porcine plasma ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® มีค่า FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อระดับการย่อย เพิ่มขึ้น โดยค่า FRAP เพิ่มขึ้นจาก 456.4 ± 1.4 เป็น 1409.9 ± 9.9 FeSO₄ equivalent (μ M) คิดเป็น ร้อยละการเพิ่มจากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 17.6 ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลสจากหมู่อะมิโนอิสระ มากขึ้นระหว่างการย่อย



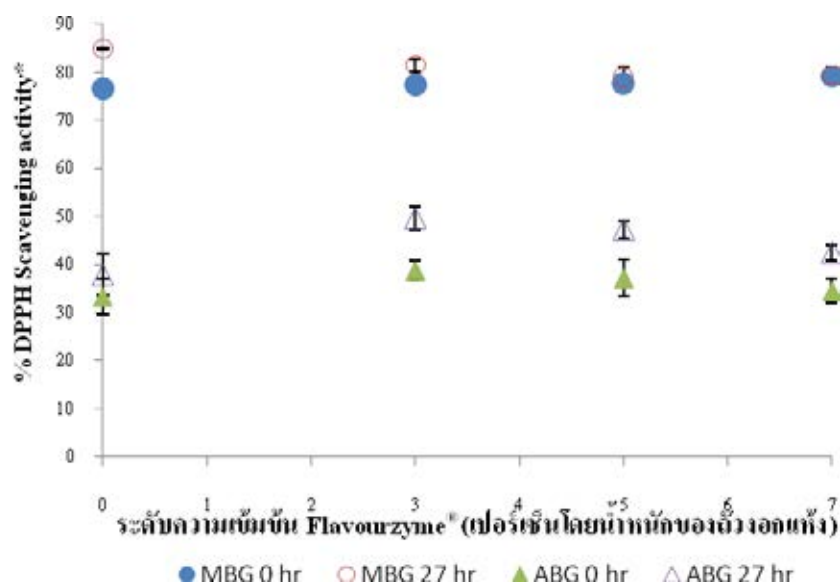
รูปที่ 4.2 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (MBG 0 hr หมายถึง ถั่วเขียวงอก 0 ชั่วโมง MBG 27 hr หมายถึง ถั่วเขียวงอก 27 ชั่วโมง ABG 0 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 0 ชั่วโมง ABG 27 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 27 ชั่วโมง)

4.2.4.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ผลการวิเคราะห์รายงานเป็นค่าร้อยละ DPPH scavenging activity โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต 0.3 มิลลิลิตรในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ DPPH (รูปที่ 4.3) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ของโปรตีนที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกโดยใช้ Flavourzyme® ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 3, 5 และ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วงอก) อยู่ในช่วง 76-84 และ 33-42 ตามลำดับ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน ขณะที่ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิก (ตารางที่ 4.3, 4.4 และ 4.6) และกรดอะมิโนอิสระ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ตารางที่ 4.7 และ 4.8) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน การที่ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วงอกแต่ละชนิด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่โมเลกุลที่ขาดอิเล็กตรอน เช่น อนุมูลอิสระของ DPPH ได้แตกต่างกัน (Rajapakse *et al.*, 2005) นอกจากนี้การที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต จากถั่วอะชูกิ

อาจเนื่องมาจากโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวน่าจะมีสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระของ DPPH มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิ โดย Sosulski และ Dabrowski (1984) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกได้แก่ *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, syringic, gallic, *trans-p*-coumaric และ *trans*-ferulic มีมากในถั่วเขียวและเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Tang และคณะ (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จาก buckwheat protein isolate ด้วยวิธี DPPH radical scavenging ability ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสเท่ากับ 0.2 mg mL^{-1} พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 มีค่าร้อยละ DPPH radical scavenging ประมาณร้อยละ 20 ในขณะที่ระดับการย่อยร้อยละ 15 มีค่าร้อยละ DPPH radical scavenging ประมาณร้อยละ 15 ทั้งนี้การที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 มีค่า DPPH radical scavenging สูงกว่าระดับการย่อยร้อยละ 15 เนื่องจากระดับการย่อยที่แตกต่างกันทำให้ปริมาณเพปไทด์สายสั้น กรดอะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกเกิดขึ้นได้ต่างกัน



รูปที่ 4.3 ผลของระดับความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี

DPPH radical scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

(MBG 0 hr หมายถึง ถั่วเขียวออก 0 ชั่วโมง MBG 27 hr หมายถึง ถั่วเขียวออก 27 ชั่วโมง ABG 0 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 0 ชั่วโมง ABG 27 hr หมายถึง ถั่วอะชูกิงอก 27 ชั่วโมง)

* หมายถึง ปริมาณ โปรตีนไฮโดรไลสที่ใช้ในการวิเคราะห์ 0.3 มิลลิกรัม

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก เป็นผลมาจากกรดอะมิโน หมูอะมิโนอิสระ เพปไทด์สายสั้นและสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกยังขึ้นกับชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วย โดยชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อกลไกการทำงานของสารประกอบฟีนอลิกในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ต่างกัน Sosulski และ Dabrowski (1984) รายงานว่าเปลือกหุ้มถั่วเขียวมีสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, syringic, gallic, *trans-p*-coumaric และ *trans-ferulic* ส่วนแอนโทสปีร์มของถั่วเขียวมีสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ *trans-p*-coumaric ในขณะที่ถั่วอะชูกิยังไม่พบรายงานชนิดของสารประกอบฟีนอลิก มีรายงานเพียงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่านั้น (Amarowicz and Pegg, 2008) Lin และ Lai (2006) รายงานว่า ถั่วมีสารประกอบฟีนอลิก เช่น flavonol, flavones และ isoflavonoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยถั่วเขียวและถั่วอะชูกิมี flavonol เป็นองค์ประกอบภายในเมล็ด (Kim *et al.*, 2012; Lin and Lai, 2006) ซึ่งช่วยเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกได้

โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ที่ย่อยด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็นภาวะที่ทำให้ปริมาณหมูอะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และกรดอะมิโนอิสระสูงที่สุด จึงนำตัวอย่างทั้งสองตัวอย่างไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิที่เพาะที่ 0 ชั่วโมง และใช้ภาวะในการย่อยเดียวกัน แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

4.3 ผลของมอลโทเด็กซ์ทริน ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิระยะงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การศึกษาองค์ประกอบและสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะ 0 และ 27 ชั่วโมง ย่อยด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก มีตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ 4 ตัวอย่าง คือ โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวเพาะ 0 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก (MBG 0-7) โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก (MBG 27-7) โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วอะชูกิเพาะ 0 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก (ABG 0-7) และโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วอะชูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั่วอก (ABG 27-7) ตัวอย่างทั้ง 4

ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทริน (DE=18) ร้อยละ 5 (w/v) กับไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

จากผลการคำนวณร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก (ตารางที่ 4.9) พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก มีร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอกทั้งสองชนิดที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวกค.27 และ ค.28)

MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินจะมีร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 63.37 และ 86.64 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอกที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีปริมาณของของแข็งเริ่มต้นก่อนการทำแห้ง มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวอกที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน ขณะที่ร้อยละผลผลิตของ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทรินมีร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 43.91 และ 67.40 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของของแข็งเริ่มต้นในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอกที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินและไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน

มอลโทเด็กซ์ทรินเป็นสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ที่เติมลงไปในการเพิ่มเนื้อให้แก่อาหาร ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอกทั้งสองชนิดที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทรินจึงมีร้อยละผลผลิตมากกว่าโปรตีนจากถั่วอกที่ไม่ผสมมอลโทเด็กซ์ทริน นอกจากนี้ปริมาณของของแข็งเริ่มต้นที่ละลายอยู่ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสเป็นส่วนประกอบหนึ่งที่ช่วยบอกแนวโน้มของผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการทำแห้ง

Peng และคณะ (2013) พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทริน (DE=20) ร้อยละ 0, 10, 20, 30 และ 40 ลงใน purple sweet potato flours ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย มีร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 23, 26, 28, 40 และ 41 ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของร้อยละผลผลิตเป็นผลมาจากมอลโทเด็กซ์ทรินซึ่งเป็นสารเพิ่มเนื้อให้แก่ purple sweet potato flours

ตารางที่ 4.9 ร้อยละผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	ปริมาณของแข็งทั้งหมด ก่อนการทำแห้ง	ร้อยละผลผลิต หลังการทำแห้ง
MBG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	9.00 ± 0.00	8.30 ^b ± 0.18
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	13.20 ± 0.28	13.56 ^d ± 0.79
MBG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	8.00 ± 0.00	6.51 ^a ± 0.16
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	13.65 ± 0.49	12.15 ^c ± 0.01
ABG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	10.90 ± 1.27	10.02 ^a ± 0.88
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	14.35 ± 0.21	14.42 ^b ± 1.10
ABG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	9.85 ± 0.35	8.13 ^a ± 1.09
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	13.75 ± 0.35	13.61 ^b ± 0.41

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในตัวชนิดเดียวกัน

4.3.1 ผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากตารางที่ 4.10 พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลการคำนวณทางสถิติแสดงในตารางที่ ค.29 ถึง ค.32

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระใน MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินเมื่อเทียบกับ MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่ไม่ได้เติมมอลโทเด็กซ์ทริน พบว่า MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงร้อยละ 22.78 และ 31.12 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่เติมมอลเด็กซ์ทรินก็มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงร้อยละ 16.80 และ 31.00 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน นอกจากนี้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วทั้งสองชนิดที่เพาะเป็นเวลา 27 ชั่วโมง มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วที่เพาะเป็นเวลา 0 ชั่วโมง เนื่องจากระหว่างการงอกของเมล็ดจะเกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโน และเพปไทด์สายสั้น

การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง trinitrobenzenesulfonic acid กับหมู่อะมิโนของสายเพปไทด์ การเติมมอลโทเด็กซ์ทริน

ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงอาจทำให้หมู่เอมีโนของสายเปปไทด์ขาดความเป็นอิสระ เนื่องจาก (1) มอลโทเด็กซ์ทรินอาจเกิดการรวมตัว (incorporated) กับองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Chik *et al.*, 2011) แต่ในการทดลองนี้เติมมอลโทเด็กซ์ทรินเพียงร้อยละ 5 (w/w) จึงอาจไม่ส่งผลต่อการรวมตัวของมอลโทเด็กซ์ทรินกับองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต (2) กระบวนการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน (non-enzymatic glycation of protein) เป็นอันตรกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของมอลโทเด็กซ์ทริน กับหมู่เอมีโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต (Lapolla, Traldi and Fedele, 2005) ทำให้ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินที่วิเคราะห์ได้มีน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ผสมมอลโทเด็กซ์ทริน แต่อย่างไรก็ตาม Owusu-Apenten (2002) รายงานว่า ตัวอย่างที่มีคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลแลคโตสในปริมาณสูง จะก่อให้เกิดการรบกวน (interferences) การวิเคราะห์หมู่เอมีโนอิสระด้วย TNBS

ตารางที่ 4.10 ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	หมู่เอมีโนอิสระ ($\mu\text{mole g}^{-1}$ sample, db)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g gallic acid g}^{-1}$ sample, db)
MBG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	539.69 ^{bc} \pm 38.22	841.84 ^b \pm 63.87
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	416.73 ^a \pm 24.54	613.83 ^a \pm 36.06
MBG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	632.22 ^c \pm 56.81	888.33 ^b \pm 102.53
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	435.50 ^b \pm 38.93	570.50 ^a \pm 52.33
ABG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	616.38 ^{ab} \pm 97.09	1058.80 ^b \pm 6.84
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	512.82 ^a \pm 32.78	756.25 ^a \pm 16.86
ABG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	718.20 ^b \pm 46.31	1119.92 ^c \pm 12.37
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	495.53 ^a \pm 3.93	788.16 ^a \pm 35.83

a,b,c... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในสัณภูมิเดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใน MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินเมื่อเทียบกับ MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน พบว่า MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงร้อยละ 27.08 และ 35.77 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงร้อยละ 28.57 และ 29.62 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ

ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินซ์ (ตารางที่ 4.10) และโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วทั้งสองชนิดที่เพาะ 27 ชั่วโมง จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วที่เพาะ 0 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในถั่วเพาะ 27 ชั่วโมง เป็นผลมาจากการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของเมล็ดระหว่างกระบวนการงอก

การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของมอลโทเด็กซ์ทริน และหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิก ทำให้สารประกอบฟีนอลิกขาดความเป็นอิสระ ส่งผลให้การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิก และ tungsten หรือ molybdenum oxides (Waterhouse, 2005) มีค่าลดลง ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน จึงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจวิเคราะห์ได้น้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเด็กซ์ทริน Waterhouse (2005) กล่าวว่า น้ำตาลในตัวอย่างเป็น interference ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

Chik และคณะ (2011) พบว่า การผสมมอลโทเด็กซ์ทรินที่มีค่า DE มากขึ้น คือ 10, 15 และ 20 ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของ pitaya juice มีแนวโน้มลดลงจาก 252.5 เป็น 210.6 และ 222.5 mg gallic acid per 100 g powder ตามลำดับ การลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกใน pitaya juice เกิดจากการรวมตัว (incorporated) ของมอลโทเด็กซ์ทรินและสารประกอบฟีนอลิก Peng และคณะ (2013) พบว่า การทำแห้งแบบพ่นฝอยของ purple sweet potato flours ที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 30 (DE=20) ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินของ purple sweet potato flours powder ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน (31.99 ± 0.07 เป็น 26.48 ± 0.06 mg per 100 g sample, db) แต่ปริมาณฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกทั้งหมดของ purple sweet potato flours powder เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน (0.67 ± 0.01 เป็น 0.76 ± 0.02 mg per 100 g sample, db และ 1.39 ± 0.01 เป็น 1.45 ± 0.02 mg per 100 g sample, db ตามลำดับ) การลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินอาจเป็นผลมาจากความร้อนของวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ขณะที่การเพิ่มขึ้นของปริมาณฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกทั้งหมด อาจเป็นผลมาจากมอลโทเด็กซ์ทรินมีส่วนช่วยป้องกันการถูกทำลายของฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกระหว่างกระบวนการทำแห้ง

4.3.2 ผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

4.3.2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ด้วย spectrophotometer

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.11 พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสที่แตกต่างกัน มีผลต่อค่าร้อยละ DPPH scavenging activity โดยค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลสที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลสที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ย่อมมีสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระสังเคราะห์เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิ เป็นผลจากองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วทั้งสองชนิด ที่มีความสามารถในการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระของ DPPH ซึ่งพิจารณาได้จากการปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วทั้งสองชนิด (ตารางที่ 4.10) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของร้อยละ DPPH scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลสทั้งภาวะที่เดิมและไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินให้ผลการทดลองไปในทำนองเดียวกัน คือ ความเข้มข้นโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.11 ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ที่ได้จากความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

ความเข้มข้นโปรตีน ไฮโดรไลส (mg mL ⁻¹)	ร้อยละ DPPH scavenging activity							
	ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน				เติมมอลโทเด็กซ์ทริน			
	MBG 0-7	MBG 27-7	ABG 0-7	ABG 27-7	MBG 0-7	MBG 27-7	ABG 0-7	ABG 27-7
0.25	21.07 ± 1.82	10.53 ± 5.04	11.48 ± 0.49	10.88 ± 1.15	-	-	11.09 ± 5.06	-
0.50	24.52 ± 1.85	13.51 ± 2.53	18.57 ± 0.12	16.32 ± 1.32	11.40 ± 0.47	8.82 ± 0.52	15.91 ± 2.18	9.18 ± 1.75
0.75	27.52 ± 3.26	14.05 ± 1.70	21.34 ± 4.11	23.75 ± 5.47	13.06 ± 2.58	-	14.14 ± 0.52	9.56 ± 2.87
1	18.56 ± 2.72	24.68 ± 4.43	28.55 ± 1.67	41.73 ± 2.78	13.71 ± 0.97	10.09 ± 1.58	26.17 ± 0.44	17.39 ± 2.72
2	31.31 ± 4.79	-	-	40.82 ± 7.20	22.22 ± 2.42	23.16 ± 3.71	41.47 ± 0.62	29.30 ± 9.75
3	43.01 ± 4.65	38.58 ± 4.60	53.54 ± 1.70	50.83 ± 3.69	31.16 ± 0.69	33.81 ± 1.11	45.51 ± 3.14	35.07 ± 0.97
4	52.32 ± 6.76	53.16 ± 5.09	38.23 ± 1.15	52.80 ± 3.59	38.29 ± 4.79	45.31 ± 2.31	56.34 ± 0.24	53.56 ± 4.05
5	59.64 ± 5.77	-	-	-	-	-	61.37 ± 1.89	57.23 ± 4.26
6	63.15 ± 4.02	60.02 ± 2.91	57.95 ± 1.39	58.52 ± 6.55	57.12 ± 0.18	47.61 ± 0.59	64.25 ± 0.49	66.26 ± 4.70

-หมายถึง ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ได้ทำการวิเคราะห์

จากตารางที่ 4.11 เมื่อนำความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตกับร้อยละ DPPH scavenging activity มาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงที่จะนำไปคำนวณเป็นค่า EC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเสตในแต่ละตัวอย่าง (การสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อสร้างสมการคำนวณ EC_{50} ต้องทำให้กราฟเส้นตรงครอบคลุม DPPH scavenging activity ในช่วงร้อยละ 50) โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้นต่ำสามารถลดความเข้มข้นของ DPPH ได้ร้อยละ 50 เราจะจัดให้โปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ที่ดี (แสดงเป็นค่า EC_{50} ในตารางที่ 4.12)

จากตารางที่ 4.12 และตารางภาคผนวก ค.33 และ ค. 34 เมื่อพิจารณาจากค่า EC_{50} พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน จะต้องใช้ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน โดยค่า EC_{50} ของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

แต่เนื่องจากตัวเลขที่ได้จากค่า EC_{50} อาจไม่สามารถสื่อให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐาน จึงต้องนำค่า EC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเสตมาคำนวณเป็นค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, AEAC) แสดงผลในตารางที่ 4.12

จากผลการคำนวณค่า AEAC พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ทำให้ค่า AEAC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน (ตารางที่ 4.12 และตารางภาคผนวก ค.35 และ ค.36) MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินมีค่า AEAC ลดลงร้อยละ 22.92 และ 35.52 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่ไม่ได้เติมมอลโทเด็กซ์ทริน เช่นเดียวกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีค่า AEAC ลดลงร้อยละ 42.51 และ 55.07 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ไม่ได้เติมมอลโทเด็กซ์ทริน การลดลงของค่า AEAC ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากถั่วอกทั้งสองชนิดที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน (ตารางที่ 4.10)

การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินทำให้ค่า AEAC ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดลดลง อาจเนื่องมาจาก (1) โมเลกุลของหมู่อะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมในโปรตีนไฮโดรไลเสตเกิดอันตรกิริยากับมอลโทเด็กซ์ทริน ทำให้ค่า

AEAC ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินลดลง (2)อาจเกิดการรวมตัว (incorporated) ของมอลโทเด็กซ์ทรินกับสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของโปรตีนไฮโดรไลเสต แต่การทดลองนี้มีการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินเพียงร้อยละ 5 จึงอาจไม่ทำให้มอลโทเด็กซ์ทรินรวมตัว (incorporated) กับสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของโปรตีนไฮโดรไลเสตได้

Chik และคณะ (2011) รายงานว่า การผสมมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 25 (DE = 10, 15 และ 20) ใน pitayo juice power จะให้ร้อยละ DPPH scavenging activity ลดลงจากร้อยละ 41.5 เป็น 28.7 และ 38.8 ตามลำดับ การลดลงของร้อยละ DPPH scavenging activity เกิดจากการรวมตัว (incorporated) ระหว่างมอลโทเด็กซ์ทรินกับ pitayo juice

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity และ FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	DPPH radical scavenging activity		FRAP (mg Trolox [®] g ⁻¹ sample, db)
	EC ₅₀ (mg ml ⁻¹)	AEAC (mg ascorbic acid g ⁻¹ sample, db)	
MBG 0-7			
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.07 ^a ± 0.59	0.96 ^c ± 0.14	12.13 ^b ± 0.29
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	5.28 ^b ± 0.21	0.74 ^{ab} ± 0.04	1.99 ^a ± 0.17
MBG 27-7			
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.23 ^a ± 0.23	0.92 ^{bc} ± 0.05	16.64 ^c ± 2.93
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	6.19 ^b ± 0.14	0.63 ^a ± 0.01	2.42 ^a ± 0.18
ABG 0-7			
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	1.88 ^a ± 0.09	2.07 ^b ± 0.10	2814.50 ^b ± 141.75
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	3.27 ^b ± 0.01	1.19 ^a ± 0.01	494.53 ^a ± 43.62
ABG 27-7			
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	1.90 ^a ± 0.30	2.07 ^b ± 0.32	2824.30 ^b ± 102.80
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.22 ^c ± 0.20	0.93 ^a ± 0.04	516.36 ^a ± 3.82

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเปรียบเทียบในถั่วชนิดเดียวกัน

4.3.2.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.12 พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกทำให้ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางภาคผนวก ค.37 และ ค.38)

การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินใน MBG 0-7 และ MBG 27-7 ทำให้ค่า FRAP ลดลงร้อยละ 83.59 และ 85.46 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน เช่นเดียวกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน จะทำให้ค่า FRAP ลดลงร้อยละ 82.43 และ 81.72 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน การเปลี่ยนแปลงของค่า FRAP จากการทดลอง ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกับปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดคือมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกลดลงเมื่อเติมมอลโทเด็กซ์ทริน (ตารางที่ 4.10)

การเติมมอลโทเด็กซ์ทริน ทำให้ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดลดลง เนื่องจาก (1) มอลโทเด็กซ์ทรินที่เติมลงในโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจเกิดอันตรกิริยากับโครงสร้างของกรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น (Lapolla *et al.*, 2005) และสารประกอบฟีนอลิกที่มีสมบัติในการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ที่ดี จึงทำให้โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีสมบัติเป็นรีดิวซิงเอเจนต์เปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ค่า FRAP ลดลง (2) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินจะมีปริมาณโปรตีนในสารละลายที่นำมาวิเคราะห์น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน แต่การทดลองนี้มีการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินเพียงร้อยละ 5 ดังนั้นปริมาณโปรตีนในสารละลายที่นำมาวิเคราะห์จึงมีปริมาณแตกต่างกันไม่มาก ซึ่งไม่น่าส่งผลอย่างชัดเจนต่อการลดลงของค่า FRAP ที่วิเคราะห์ได้

Silva และคณะ (2012) พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยแมงภู่ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 และ 30 จะมีค่า FRAP ลดลงจาก 35.99 ± 0.27 เป็น 10.16 ± 0.03 และ $5.86 \pm 0.03 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}} \text{g}^{-1} \text{protein hydrolysate}$ ตามลำดับ โดยอธิบายว่า การลดลงของค่า FRAP อาจเป็นผลมาจากปริมาณโปรตีนของตัวอย่างลดลง เนื่องจากการเติมมอลโทเด็กซ์ทริน แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะขึ้นอยู่กับกรดอะมิโน และเพปไทด์สายสั้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้

การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตทำให้ค่า AEAC และค่า FRAP ลดลง โดย MBG 0-7 และ MBG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินจะมีค่า AEAC และค่า FRAP ลดลง ประมาณร้อยละ 22-35 และ 83-85 ตามลำดับ ABG 0-7 และ ABG 27-7 ที่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีค่า AEAC และค่า FRAP ลดลงประมาณร้อยละ 42-55 และ 81-82 ตามลำดับ การที่โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดมีค่า FRAP ลดลงมากกว่าค่า AEAC อาจเนื่องมาจากมอลโทเด็กซ์ทริน อาจเกิดอันตรกิริยากับสารที่มีสมบัติเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ได้มากกว่าสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำให้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยกลไก DPPH radical scavenging activity ต่างจากค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยกลไกการรีดิวซ์ Fe (III) ให้เป็น Fe (II)

4.3.2.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ด้วยการใช้อุปกรณ์ electron spin resonance (ESR)

เนื่องจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ด้วย spectrophotometer (ตารางที่ 4.12) เป็นการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH เพื่อเป็นการยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นว่าการเปลี่ยนแปลงสีเกิดจากการที่อนุมูลอิสระของ DPPH ได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากโปรตีนไฮโดรไลเสต จึงได้ทำการวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ด้วยเครื่อง ESR ซึ่งอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH (สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระ แสดงในภาคผนวก ข.9) จากสเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระที่ปรากฏ จะติดตามการเปลี่ยนแปลงอิเล็กตรอนของพีคที่สูงที่สุด เนื่องจากสามารถสังเกตถึงการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนเดี่ยวได้ชัดเจน เมื่ออนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH เกิดการจับ (scavenging) กับอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต จะทำให้ค่าสเปกตรัมของสัญญาณของอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ลดลง (สเปกตรัมของโปรตีนไฮโดรไลเสตในภาวะที่ไม่เติมและเติมมอลโทเด็กซ์ทรินแสดงในภาคผนวก ข.9)

เมื่อเปรียบเทียบผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ด้วย spectrophotometer และเครื่อง ESR (ตารางที่ 4.13) พบว่า ร้อยละ DPPH scavenging activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่เติมและไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน (ความเข้มข้นโปรตีนไฮโดรไลเสต

เท่ากับ 3 mg mL^{-1}) ให้ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ในทำนองเดียวกัน คือ การผสมมอลโท-เด็คซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิงอก ทำให้ร้อยละ DPPH scavenging activity ลดลง อย่างไรก็ตามค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง ESR จะมีค่าสูงกว่าการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ESR เป็นการติดตามสัญญาณคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของอิเล็กตรอนเดี่ยวที่มีทั้งหมดของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH เมื่ออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ถูกจับ (scavenging) โดยสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำให้จำนวนอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ลดลง ค่าที่ได้จากสัญญาณคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจึงลดลง ส่วนการใช้ spectrophotometer เป็นการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH Brand-Williams, Cuvelier และ Berset (1995) รายงานว่า เมื่อสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จะสามารถลดความเข้มข้นของ DPPH ได้ประมาณร้อยละ 75 จากนั้นค่าความเข้มข้นของ DPPH จะเริ่มคงที่ (steady state) นอกจากนี้ Yamaguchi และคณะ (1998) รายงานว่า สีของตัวอย่าง (food pigments) ก่อให้เกิดการรบกวน (interference) ของค่าการดูดกลืนแสง DPPH ด้วยเหตุผลดังกล่าวการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยเครื่อง spectrophotometer จึงอาจให้ค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ที่ต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ESR ที่สามารถตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH จากการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนเดี่ยว

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยใช้ DPPH ที่วิเคราะห์ด้วย spectrophotometer และเครื่อง ESR ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	DPPH scavenging activity (%)	
	Chemical analysis	ESR analysis
MBG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	43.01 ± 4.65	89.19 ± 2.16
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	31.16 ± 0.69	87.09 ± 3.57
MBG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	38.58 ± 4.60	92.76 ± 3.27
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	33.81 ± 1.11	88.77 ± 4.70
ABG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	53.54 ± 1.70	97.12 ± 0.67
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	45.51 ± 3.14	95.74 ± 2.35
ABG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	50.83 ± 3.69	97.34 ± 0.18
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	35.07 ± 0.97	92.74 ± 1.95

4.3.3 ผลของการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินต่อสมบัติทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก

4.3.3.1 ค่า surface hydrophobicity

ค่า surface hydrophobicity เป็นดัชนีที่ใช้ในการบอกปริมาณของ hydrophobic patch ที่อยู่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีน โปรตีนที่มีปริมาณหมู่ hydrophobic มาก จะละลายน้ำได้ยาก (Kamara *et al.*, 2010) วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนคือ probe spectra fluorometry เป็นการวัดการเรืองแสง fluorescence ของสารตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มของแสง fluorescence (FI) และปริมาณโปรตีน (%) เพื่อหาค่าความชันจากสมการเส้นตรง ซึ่งเป็นค่า surface hydrophobicity ของสารตัวอย่าง โดยสารที่มีค่าความเข้มในการเรืองแสง fluorescence สูงจะมีค่า surface hydrophobicity สูง สารที่สามารถเกิดการเรืองแสง fluorescence ได้ดี

มักเป็นสารประกอบกลุ่ม aromatic และสารประกอบในกลุ่ม alicyclic carbonyl compounds ในการทดลองใช้ 1-anilino-8-naphthalene-sulphonate (ANS) เป็น fluorescence probe ซึ่งทำหน้าที่ complexing agent โดย ANS จะเกิดอันตรกิริยากับบริเวณ hydrophobic ของโปรตีนตัวอย่าง ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลง ได้สารที่เป็น fluorescence complex (Möller and Denicolat, 2002) ในการทดลองนี้หาค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลสเสด เทียบกับ bovine serum albumin (BSA)

จากตารางที่ 4.14 เมื่อเปรียบเทียบค่า surface hydrophobicity ระหว่าง BSA และโปรตีนไฮโดรไลสเสดจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ทั้งในภาวะที่เติมและไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน พบว่า BSA มีค่า surface hydrophobicity มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสดจากถั่วทั้งสองชนิด และทั้งสองภาวะ เนื่องจาก (1) BSA เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ที่มีโครงสร้าง aromatic และ alicyclic carbonyl hydrocarbon ส่งผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ hydrophobic ของ BSA กับ ANS ได้สาร fluorescence complex ที่ให้ความเข้มของการเรืองแสง fluorescence มาก โมเลกุล BSA จึงมีค่า surface hydrophobicity สูง ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลสเสดจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ของถั่วทั้งสองชนิดถูกตัดให้สั้นลง ขนาดโมเลกุลเล็กกว่า BSA จึงทำให้บริเวณผิวด้านนอกของโปรตีนไฮโดรไลสเสดจากถั่วทั้งสองชนิดมีหมู่ hydrophobic น้อยกว่า BSA การเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ hydrophobic ของโปรตีนไฮโดรไลสเสด กับ ANS จึงเกิดได้น้อยลง นอกจากนี้ MBG 0-7, MBG 27-7, ABG 0-7 และ ABG 27-7 มีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ ได้แก่ อะลานิน ไอโซลูซีน และไทโรซีน ซึ่งเป็น amino acid hydrophobic side chain ในปริมาณที่ต่ำ (ตารางที่ 4.7 และ 4.8) ดังนั้นโอกาสที่เกิด fluorescence complex จึงน้อยลง (2) การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินลงในโปรตีนไฮโดรไลสเสดทำให้มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของมอลโทเด็กซ์ทรินกับโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสเสด และผลของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ทำให้มีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลโปรตีนไฮโดรไลสเสด ทั้งสองกรณี มีผลต่อการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลโปรตีนไฮโดรไลสเสด ทำให้ตำแหน่งของหมู่ hydrophobic ที่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีนไฮโดรไลสเสดเกิดการเปลี่ยนแปลงอันตรกิริยาระหว่างหมู่ hydrophobic ของโปรตีนไฮโดรไลสเสด กับ ANS จึงเกิด fluorescence complex ได้น้อย ทำให้ความเข้มของการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนไฮโดรไลสเสดมีค่าน้อยกว่า BSA อย่างไรก็ตามการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินเพียงร้อยละ 5 อาจไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของหมู่ hydrophobic ในโมเลกุลโปรตีนไฮโดรไลสเสดมากนัก เนื่องจากค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลสเสดจากถั่วทั้งสองชนิดในภาวะที่เติมและไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน มีค่าใกล้เคียงกัน (มีค่าระหว่าง 1 – 5)

ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลสที่วิเคราะห์ได้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการนำโปรตีนไฮโดรไลสไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากค่า surface hydrophobicity มีความสัมพันธ์กับความไม่ชอบน้ำที่บริเวณผิวด้านนอกของโปรตีน (Kristinsson and Rosca, 2000) ดังนั้นหากโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้มีค่า surface hydrophobicity ค่อนข้างต่ำ แสดงถึงบริเวณผิวด้านนอกของโปรตีนที่มีความชอบน้ำสูง ซึ่งจะส่งผลให้การละลายเกิดได้ดีขึ้น

ศุภรจิตต์ เอี่ยมรพร (2551) รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากไบยาสูบที่ขยด้วย เอนไซม์ Flavourzyme[®] เข้มข้น 7.5 % (w/w) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 5 (DE=10) นำไปผ่านการทำให้แบบแช่เยือกแข็ง มีค่า surface hydrophobicity น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากไบยาสูบที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน เนื่องจากโมเลกุลของมอลโทเด็กซ์ทริน จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของโปรตีน เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลโปรตีน หรืออาจเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนถูกกำจัด hydration shell ออกไปขณะทำให้แบบแช่เยือกแข็ง ส่งผลให้ตำแหน่งของหมู่ hydrophobic ที่บริเวณผิวด้านนอกของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง (Wang, 2000; Anokhina *et al.*, 2005)

ตารางที่ 4.14 ค่า surface hydrophobicity ของ BSA และ โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิงอกที่ผ่านการทำให้แบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	Surface hydrophobicity (slope [*])
Bovine serum albumin (BSA)	27661 ± 32.22
MBG 0-7	
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	5.46 ± 0.67
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.51 ± 1.50
MBG 27-7	
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.75 ± 0.68
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	4.97 ± 1.56
ABG 0-7	
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	2.93 ± 0.55
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	1.90 ± 1.06
ABG 27-7	
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	2.65 ± 0.09
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	2.41 ± 0.51

4.3.3.2 ค่าปริมาณน้ำอิสระ และการดูดน้ำ

ค่าปริมาณน้ำอิสระ เป็นอัตราส่วนของความดันไอของน้ำในอาหารต่อความดันไอของน้ำบริสุทธิ์ที่จุดอิ่มตัว ณ อุณหภูมิเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณน้ำอิสระจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้งหรือกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง อาหารที่มีความสามารถในการดูดความชื้นจากอากาศได้มากจัดเป็นอาหารประเภท hygroscopic product ความสามารถในการดูดน้ำของอาหารจึงสัมพันธ์กับค่าปริมาณน้ำอิสระ โดยอาหารพวก low hygroscopic จะมีค่าปริมาณน้ำอิสระสูงกว่าอาหารพวก high hygroscopic (นิธิยา รัตนานนท์, 2549)

จากตารางที่ 4.15 พบว่า ค่าปริมาณน้ำอิสระที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิงอก ที่เต็มและไม่เต็มมอลโทเด็กซ์ทรินมีค่าอยู่ในช่วง 0.25-0.32 ปริมาณน้ำอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว และถั่วอะชูกิที่เต็มมอลโทเด็กซ์ทรินเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วชนิดเดียวกันที่ไม่เต็มมอลโทเด็กซ์ทริน ปริมาณน้ำอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วงที่ได้จากการทดลองแม้จะไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และรา แต่เป็นช่วงที่สามารถเกิดปฏิกิริยาฟิสิกัลเคมีได้ แต่เนื่องจากปริมาณไขมันในโปรตีนไฮโดรไลเสตของถั่วเขียวและถั่วอะชูกิมีน้อยมาก ดังนั้นปฏิกิริยาฟิสิกัลเคมีจึงไม่ใช่สาเหตุของการเสื่อมเสียในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้การที่ค่าปริมาณน้ำอิสระที่ได้จากการทดลองมีค่าต่ำกว่า 0.5 จึงเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษาโปรตีนไฮโดรไลเสตเช่นกัน จากตารางที่ 4.15 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสต ทั้งในภาวะที่เต็มและไม่เต็มมอลโทเด็กซ์ทริน มีค่าการดูดน้ำประมาณ 0.45-0.66 g water g⁻¹ sample, db ซึ่งถือว่า มีค่าการดูดน้ำกลับสูง ดังนั้นเมื่อมีการเปิดภาชนะบรรจุ จะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตจะแสดงสมบัติ hygroscopicity โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตจะดูดความชื้นจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีผลต่อการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

Silva และคณะ (2012) พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยแมงภู่ที่เต็มมอลโทเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 และ 30 มีค่าการดูดน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่เต็มมอลโทเด็กซ์ทริน (42.7 ± 0.2 เป็น 18.6 ± 0.1 และ 17.1 ± 0.2 g water per 100 g sample ตามลำดับ) ทั้งนี้คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสตก่อนการทำแห้ง เช่น ปริมาณของของแข็ง ความหนืดและความคงตัว จะส่งผลต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้ง ในด้านความชื้น การดูดน้ำ และขนาดเฉลี่ยของอนุภาค

ตารางที่ 4.15 ปริมาณน้ำอิสระและค่าการดูดน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก
ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำอิสระ	ค่าการดูดน้ำ (g water g ⁻¹ sample, db)
MBG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.25 ± 0.01	0.58 ± 0.03
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.32 ± 0.01	0.46 ± 0.06
MBG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.27 ± 0.02	0.66 ± 0.01
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.32 ± 0.02	0.47 ± 0.02
ABG 0-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.27 ± 0.00	0.58 ± 0.13
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.31 ± 0.00	0.50 ± 0.11
ABG 27-7		
ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.27 ± 0.01	0.60 ± 0.10
เติมมอลโทเด็กซ์ทริน	0.32 ± 0.00	0.45 ± 0.09

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะถั้วเขียว (0, 9, 18, 27 และ 36 ชั่วโมง) ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนหยาบอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) โดยการเพาะถั้วเขียว 36 ชั่วโมง ให้ TPC สูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปริมาณ TPC ในถั้วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมง ($p>0.05$) ขณะที่ระยะเวลาการเพาะถั้วอะซูกิ (0, 9, 18, 27 และ 36 ชั่วโมง) มีผลต่อทั้งปริมาณโปรตีนหยาบและสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) โดยถั้วอะซูกิเพาะ 36 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนหยาบสูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนหยาบในถั้วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ($p>0.05$) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิกเกิดจากการสังเคราะห์กรดอะมิโน และเพปไทด์สายสั้น รวมถึงการสร้างสารทุติยภูมิในกลุ่มฟีนอลิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ด

เมื่อนำถั้วเขียวเพาะ 27 ชั่วโมงมาย่อยด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั้วงอกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และกรดอะมิโนอิสระสูงที่สุด และการย่อยถั้วอะซูกิเพาะ 27 ชั่วโมง ด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักแห้งของถั้วงอก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และกรดอะมิโนอิสระสูงที่สุดเช่นกัน สอดคล้องกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น Flavourzyme® ที่ใช้ในการย่อยเพิ่มขึ้น

การเติมมอลโทเด็กซ์ทริน (DE=18) ร้อยละ 5 (w/w) ในโปรตีนไฮโดรไลเสตถั้วเขียวและถั้วอะซูกิที่ได้เทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่เติมมอลโทเด็กซ์ทริน แล้วผ่านการทำให้แบบแช่เยือกแข็ง พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) ส่งผลให้ค่า FRAP และค่า ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั้วเขียวและถั้วอะซูกิที่เติมมอลโทเด็กซ์ทรินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยการใช้ ESR พบว่า การเติมมอลโทเด็กซ์ทรินทำให้ร้อยละ DPPH scavenging activity ลดลง

เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer เนื่องจากโมเลกุลของมอลโทเด็กซ์ทรินอาจเกิดอันตรกิริยากับสารที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามการเติมมอลโทเด็กซ์ทรินในโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก ส่งผลให้ร้อยละผลผลิตและค่าปริมาณน้ำอิสระเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า surface hydrophobicity และค่าการคูดน้ำของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกที่ผสมมอลโทเด็กซ์ทริน ลดลง

5.2 ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

ผลการศึกษากฎที่ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอกพบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิดน่าจะเป็นผลมาจากกรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังนั้นการศึกษานเชิงลึกควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับขนาดโมเลกุลของเพปไทด์สายสั้น การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ และชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีในโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิงอก เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกฎที่ต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากถั่วอกทั้งสองชนิด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมวิชาการเกษตร. 2552. ถั่วเขียว [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=33>.
- ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล. 2555. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบผสมผสาน: การนำมาใช้เพื่อถนอมผลิตภัณฑ์อาหารที่ไวต่อความร้อน. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 35(2): 269-283.
- ธัญพร จันท์แสนโรจน์. 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิธิยา รัตนานพนนท์. 2549. เคมีอาหาร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- พิกุล ชุนพุ่ม. 2550. ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบผลผลิตของพันธุ์ถั่วอะซูกิที่มีขนาดเมล็ดแตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รัมภ์รดา มีบุญญา และ นัทรชัย เงินแสงสรวย. 2553. การศึกษาเบื้องต้นของพืชสกุล *Vigna Savi* (Leguminosae-Papilionoideae) ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5.
- วัชรีย์ หาญยิ่ง. 2549. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในกลไกของการเกิดมะเร็ง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 34: 199-208.
- ศุภรจิตต์ เอี่ยมนเรพร. 2551. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลสจากใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร. 2555. ถั่วอะซูกิพันธุ์ปางคะ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/pvp/planttabian/t17.pdf>.
- โสภิตา คำหาญ. 2546. การงอกของเมล็ดพันธุ์ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.agri.ubu.ac.th/masterstu/article.html>.
- อรอนงค์ นัยวิกุล และ พัชรี โสธนาสมบุญ. 2532. ปริมาณสารอาหารและสารต่อต้านอนุมูลอิสระทางโภชนาการของถั่วเขียวงอก. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์). 23: 188-197.

ภาษาอังกฤษ

- Achouri, A., Zhang, w. and Shiyang, X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysate. Food Research International. 31(9): 617-623.
- Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N. and Aluko, R. E. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. International Journal of Molecular Sciences. 12: 6685-6702.
- Alder-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 27: 256-266.
- Alder-Nissen, J. 1986. A review of food hydrolysis-specific areas. In J. Adler-Nissen (ed.), Enzymic Hydrolysis of food protein. pp.57-109. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Ali, H. 2002. Protein-Phenolic Interactions in Food. McGill University.
- Alonso, R., Aguirre, A. and Marzo, F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. Food Chemistry. 68:159-165.
- Alvise, N.D., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., Dhulster, P. and Guillochon, D. 2000. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology. 27: 286-294.
- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T. and Troszynska, A. 2008. Antioxidant activity of extract of adzuki bean and its fractions. Journal of Food Lipid. 15:119-136.
- Amarowicz, R. and Pegg, R.B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. European Journal of Lipid Science and Technology. 110: 865-878.
- Anokhina, M.S., LL'in, M.M., Semenova, M.G., Belyakova, L.E. and Polikarpov, Y.N. 2005. Caloimetric investigation of the thermodynamic basis of the effect of maltodextrins on the foaming ability of legumin in the presence of small-molecule surfactant. Food Hydrocolloids. 19: 455-466.
- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersbury : The Association of Official Analytical Chemists.

- Asano, K., Shinagawa, K. and Hashimoto, N. 1982. Characterization of haze-forming protein of beer and their roles in chill haze formation. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 40: 147-154.
- Balk, B-K., Klamczynska, B. and Czuchajowska, Z. 1998. Particle size of unsweetened azuki paste as related to cultivar and cooking time. Journal of Food Science. 63.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., and Del Rio, J.A. 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 4505-4515.
- Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 3423-3430.
- Benzie, I. F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 28: 25-30.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Chew, Y.L. 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. Food Chemistry. 102: 1214-1222.
- Chen, C., Chi, Y-J. and Xu, W. 2012. Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. Food and Bioprocess Technology. 5: 2342-2352.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J. and Liu, S. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. Peptides. 38: 344-349.
- Chik, C.T., Abdullah, A., Abdullah, N. and Mustapha, W.A.W. 2011. The effect of maltodextrin and added towards pitaya juice powder total phenolic content and antioxidant activity. International Conference on Food Engineering and Biotechnology. 9: 224-228.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M.K., Kozłowska, H. and Vidal-Valverde, C. 2008. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emmerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. Food Chemistry. 111: 622-630.
- Fournier, E. 2005. Mono- and oligosaccharides. In Wrolstad, R.E., et al. (ed.). Handbook of food analytical chemistry. pp. 651-660. London: Wiley interscience.

- Fry, L.K. and Stegink, L.D. 1982. Formation of maillard reaction products in parenteral alimentation solutions. Journal of Nutrition. 112(8): 1631-1637.
- Ghavidel, R.A. and Prakash, J. 2007. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 40: 1292-1299.
- Giri, A. Osako, K., Okamoto, A., Okazaki, E. and Oshima, T. 2011. Antioxidant properties of aqueous and aroma extracts of squid miso prepared with *Aspergillus oryzae*-inoculated koji. Food Research International. 44: 317-325.
- Gordon, M. 2001. Measuring antioxidant activity. In Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (ed.), Antioxidants in Food Practical Applications. pp. 71-84. New York: CRC Press.
- Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme. 19-20: 489-498.
- Hagan, R.C. and Villota, R. 1987. Effect of nonprotein substances on protein hydrolysis and plastein formation. Food Chemistry. 23:277-294.
- Harborne, J.B. 1999. Classes and functions of secondary products from plants. In Walton, N.J. and Brown, D.E. Chemicals from Plants. pp. 1-25.
- Kamara, M.T., Amadou, I., Tarawalie, F. and Huiming, Z. 2010. Effect of enzymatic hydrolysis on the functional properties of foxtail millet (*Setaria italica* L.) proteins. International Journal of Food Science and Technology. 45: 1175-1183.
- Kammerdpech, C., Weiss, M., Kasper, C. and Scheper, T. 2007. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. Enzyme and Microbial Technology. 40:508-514.
- Kartika, H., Li, Q.X., Wall, M.M., Nakamoto, S.T. and Iwaoka, W.T. 2007. Major phenolic acids and total antioxidant activity in mamaki leaves, *Pipturus albidus*. Journal of Food Science. 72: 696-701.
- Kim, D-K., Jeong, S.C., Gorinstein, S. and Chon, S-U. 2012. Total polyphenols, antioxidant and antiproliferative activities of different extracts in mungbean seeds and sprouts. Plant Foods for Human Nutrition. 67: 71-75.

- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry. 102: 1317-1327.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal. 16: 945-960.
- Kristinsson, H.G. and Rosca, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40(1): 43-81.
- Kuo, Y-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J. and Vidal-Valverde, C. 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. Food Chemistry. 86: 537-545.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D. 2009. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. Journal of Food Engineering. 94: 326-333.
- Lapolla, A., Traldi, P. and Fedele, D. 2005. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of protein. Clinical Biochemistry. 38:103-115.
- Lin, P-Y. and Lai, H-M. 2006. Bioactive compounds in legumes and their germinated product. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 3807-3814.
- Liu, P., Huang, M., Song, S., Hayat, K., Zhang, X., Xia, S. and Jia, C. 2010. Sensory characteristics and antioxidant activities of maillard reaction products from soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. Food and Bioprocess Technology.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L. and Xia, X. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chemistry. 118: 403-410.
- Maneemegalai, S. and Nandakumar, S. 2011. Biochemical studies on the germinated seeds of *vigna radiate* (L.) R. Wilczek, *vigna mungo* (L.) Hepper and *Pennisetum typhoides* (Burm f.) stapf and c.e. hub. International Journal of Agricultural Research. 6(7): 601-606.
- Martínez-Villaluenga, C., Gulewicz, P., Frias, J., Gulewicz, K. and Vidal-Valverde, C. 2008. Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination. European Food Research and Technology. 40:116-120.

- McCue, P. and Shetty, K. 2002. A biochemical analysis of mungbean (*Vigna radiata*) response to microbial polysaccharides and potential phenolic-enhancing effects for nutraceutical applications. Food Biotechnology. 16: 57-79.
- Mohamed, S., Bakar, J. and Hamid, N.A. 1996. Differences in functional properties of mungbean protein concentrate and the effect of incorporation into fish sausages. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science. 19(1): 69-75.
- Möller, M. and Denicolat, A. 2002. Study of protein-ligand binding by fluorescence. Biochemistry and Molecular Biology Education. 30(5): 309-312.
- Mubarak, A.E. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mungbean seed (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. Food Chemistry. 89: 489-495.
- Ngo, D-H., Vo, T-S., Ngo, D-N., Wijesekara, I. and Kim, S-K. 2012. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. International Journal of Biological Macromolecules. 51: 378-383.
- Owusu-Apenten, R.K. 2002. Biological and chemical tests for protein nutrient value. In R.K. Owusu-Apenten (e.d.). Food Protein Analysis. Pp. 341-380. New York: Marcel Dekker.
- Park, E.Y., Morimae, M., Matsumura, Y., Nakamura, Y. and Sato, K. 2008. Antioxidant activity of some protein hydrolysates and their fraction with different isoelectric points. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 9246-9251.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y. and Zhao, G. 2013. Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. LWT-Food Science and Technology. 51: 348-355.
- Pernollet, J-C. and Mossé, J. 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage protein. In Daussant, J., et al. (ed.). Seed Protein. pp. 155-221. London: Academic Press.
- Peterbauer, T. and Richter, A. 1998. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Plant Physiology. 117: 165-172.
- Pownall, T.L., Udenigwe, C.C. and Aluko, R.E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 4712-4718.
- Rachie, K.O. and Roberts, L.M. 1974. Grain legumes of the lowland tropics. Advances in Agronomy. 26: 1-132.

- Rahman, M.M., Banu, L.A., Rahman, M.M. and Shahjadee, U.F. 2007. Changes of the enzymes activity during germination of different mungbean varieties. Journal of Science and Industrial Research. 42: 213-216.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. In D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe (eds.). Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health Perspectives. pp.65-157. New York: Marcel Dekker.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W-K., Je, J-Y. and Kim, S-K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International. 38: 175-182.
- Randhir, R., Lin, Y.T. and Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Process Biochemistry. 39: 637-646.
- Rodríguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C. and Hernández, A. 2008. Correlations between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. Food Chemistry. 108: 245-252.
- Sablani, S.S., Rahman, M.S. and Labuza, T.P. 2001. Measurement of water activity using isopiestic method. In Wrolstad, R.E., et al. (ed.). Current Protocols In Food Analytical Chemistry. London: Wiley interscience.
- Sangronis, E. and Machado, C.J. 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 40: 116-120.
- Sattar, A., Durrani, S.K., Mahmood, F., Ahmad, A. and Khan, I. 1989. Effect of soaking and germination temperatures on selected nutrients and antinutrients of mungbean. Food Chemistry. 34: 111-120.
- Shahidi, F., Han, X.Q. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chemistry. 53: 285-293.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V. and Lynn, P.Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 80-85.
- Silva, V.M., Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D. 2012. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of mussel protein hydrolysate powder. Drying Technology: An International Journal. 30: 653-663.

- Sosulski., F.W. and Dabrowski., K.J. 1984. Composition of free and hydrolysable phenolic acids in the flours and hulls of ten legume species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 32: 131-133.
- Tang, H., Watanabe, K. and Mitsunaga, T. 2002. Characterization of storage starches from quinoa, barley and adzuki seeds. Carbohydrate Polymers. 49: 13-22.
- Tang, C.H., Chen, L. and Ma, C.Y. 2009. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. Food Chemistry. 113: 957–963.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2010. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usds.gov/nutrientdata>.
- Venkateswaran, V. and Vijayalakshmi, G. 2010. Value addition to finger millet (*Eleusine coracana*) by germination and fermentation with *Monascus purpureus*. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 61(7): 722–727.
- Wagner, J.R. and Anon, M.C. 1990. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolate. Journal of Food Science. 55(3): 765-770.
- Wang, W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics. 203: 1-60.
- Wang, X.Y. and Tang, C.H. 2012. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat protein isolates with different polyphenolic content modified by limited hydrolysis with trypsin. Food Technology and Biochemistry. 50(1): 17-24.
- Waterhouse, A.L. 2005. Polyphenolics. In Wrolstad, R.E., et al. (ed.). Handbook of Food Analytical Chemistry. pp. 461-470. London: Wiley interscience.
- Wongekalak, L-o., Sakulsom, P., Jirasripongpun, K. and Hongsprabhas, P. 2011. Potential use of antioxidant mungbean protein hydrolysate as an anticancer Asiatic acid carrier. Food Research International. 44: 812-817.

- Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International. 36: 949-957.
- Xiao, J. and Kai, G. 2012. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. International Journal of Food Science and Nutrition. 52: 85-101.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 62: 1201-1204.
- Zhang, T., Li, Y., Miao, M. and Jiang, B. 2011. Purification and characterization of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. Food Chemistry. 128: 28-33.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รายละเอียดของเอนไซม์

ก.1 รายละเอียดเอนไซม์ α -amylase (BEN[®] 480L)**BAN[®] 480 L**

Valid from	2011-06-17
Product Characteristics:	
Declared enzyme	Alpha-amylase
Declared activity	480 KNU-B/g
Colour	Brown
Physical form	Liquid
Approximate density (g/ml)	1.25
Viscosity (cps)	10-40
Stabilisers	Sodium chloride Glycerol
Production organism	Bacillus amyloliquefaciens
Production method	Produced by submerged fermentation of a micro organism. The enzyme protein is separated and purified from the production organism.

ก.2 รายละเอียดเอนไซม์ Flavourzyme500 MG®



Flavourzyme® 500 MG

Valid From	2007-01-01
Product Characteristics:	
Declared Enzyme	Aminopeptidase
Declared Activity	500 LAPU/g
Side activities	The product contains activity of Protease
Colour	Brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Granulate
Properties	Freeflowing
Carriers	
Diluents	
Stabilisers	Sodium chloride
Preservatives	
Production organism	Aspergillus oryzae
Production Method	Produced by submerged fermentation of a micro organism. The enzyme protein is separated and purified from the production organism.

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ตามวิธีของ A.O.A.C (2006) ข้อ 925.40

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนัก 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ภาชนะอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบแห้งและและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างเข้าอบแห้งในตู้อบลมร้อน โดยเปิดฝาภาชนะอะลูมิเนียม โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 110 ± 1 องศาเซลเซียส
3. นำตัวอย่างออกมาชั่งน้ำหนัก โดยทิ้งให้ตัวอย่างเย็นใน โถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนัก ทำการทดลองข้อ 2 และ 3 จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่
4. คำนวณหาความชื้นโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลังอบแห้ง (กรัม)}]}{\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (กรัม)}} \times 100$$

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีของ A.O.A.C (2006) ข้อ 955.04

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
3. สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร
4. สารละลายอินดิเคเตอร์ (เตรียมจากร้อยละ 0.2 ของ methyl red ผสมกับร้อยละ 0.1 ของ bromocresol green)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร

6. สารเร่งปฏิกิริยา (selenium reagent mixture)

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่มีน้ำหนักแน่นอน 1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
4. ย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง Buchi Digestion ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียสจนกระทั่งได้สารละลายสีน้ำตาลใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. กลั่นตัวอย่างที่ย่อยได้ด้วยเครื่อง Buchi Distillation โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มากเกินไปเป็นตัวทำปฏิกิริยา และเก็บสารละลายที่กลั่นได้ในสารละลายกรดบอริกที่เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด
6. นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นทั้งหมดมาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
7. กำหนดหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1.4}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} \times 6.25$$

เมื่อ V_a คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

V_b คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรต blank

N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu คัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse (2005)

การเตรียมสารละลาย

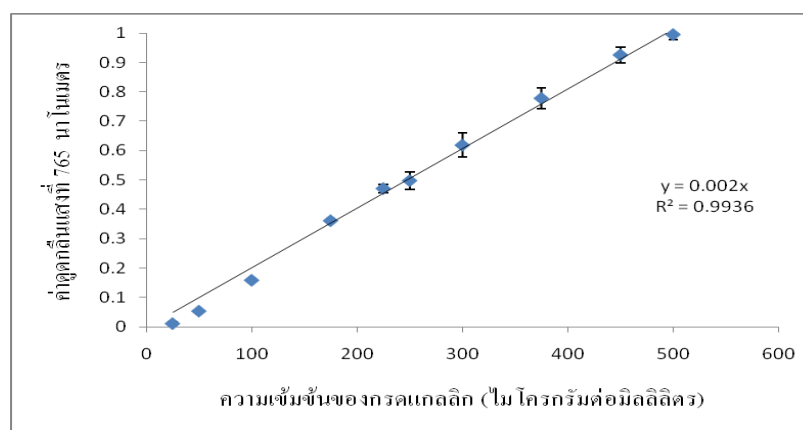
สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 200 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มารองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

การทำกราฟมาตรฐาน

1. ละลายกรดแกลลิก 0.5 กรัม ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3.5, 4.5, 5, 6, 7.5, 9 และ 10 มิลลิลิตรใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยสารละลายกรดแกลลิกที่ได้จะมีความเข้มข้น 25, 50, 100, 175, 225, 250, 300, 375, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดตามการทดลองข้อ 3.1.5 แล้วสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกหมด

ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi - Nelson

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi - Nelson ดัดแปลงจากวิธีของ Fournier (2005)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายอะซิโน โมลิบเดต (Arsenomolybdate)

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate) 25 กรัม แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร คนจนสารละลายละลายหมด จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร โดยมีไดโซเดียมไฮโดรเจนอะซิเนตเฮปทาไฮเดรต (disodium hydrogen

arsenate heptahydrate) 3 กรัม กวนสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายที่เตรียมสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน

2. สารละลาย Low – alkalinity copper reagent

2.1 ชั่ง sodium potassium tartrate 12 กรัม และ anhydrous sodium carbonate 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2.2 ชั่ง copper sulfate pentahydrate 4 กรัม และ sodium hydrogen carbonate 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายที่เตรียมในข้อ 2.1

2.3 ชั่ง anhydrous sodium sulfate 180 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

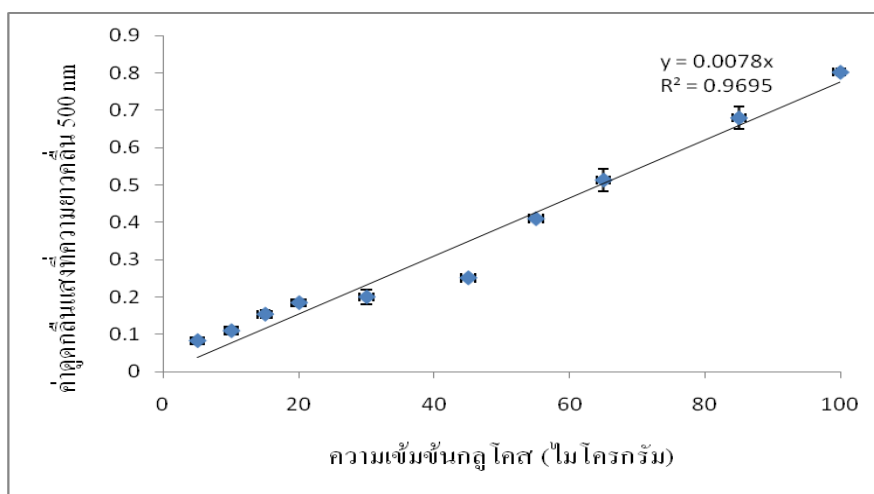
2.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.2 และข้อ 2.3 มาผสมกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายที่เตรียมได้สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี

การทำกราฟมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 5, 10, 15, 20, 30, 45, 55, 65, 85 และ 100 ไมโครลิตร โดยสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ได้จะมีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30, 45, 55, 65, 85 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามการทดลองข้อ

3.1.6 แล้วสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข.2



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ข.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม Waters AccQ. reagent เพื่อทำอนุพันธ์กรดอะมิโน

เปิด Waters AccQ. fluor™ reagent diluents flammable 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Waters AccQ. fluor™ reagent powder ปิดฝาให้สนิทและปิดทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เขย่าให้สารละลายทั้งหมดเข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 ± 0.1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ระวังอย่าให้ความร้อนนานเกิน 10 นาที Waters AccQ. reagent ที่เตรียมเสร็จสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์

2. การเตรียมสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน

เปิด amino acid hydrolysate standard 40 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่างขนาด 6 x 50 มิลลิเมตร เติมน้ำ Milli-Q 960 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายทั้งหมดเป็นเนื้อเดียว ดังนั้นสารมาตรฐานที่เตรียมได้จะประกอบด้วย 100 pmol ต่อไมโครลิตรของกรดอะมิโนแต่ละชนิด และสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้นาน 1 เดือน

3. การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการย่อยด้วยกรด (acid hydrolysate)

3.1 ชั่งตัวอย่างถั่วเขียวหรือถั่วอะซูกิให้มีปริมาณ โปรตีน 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอด vacuum hydrolysis จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ (ที่มีฟีนอล 0.1 % w/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

3.2 ผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในหลอด vacuum hydrolysis เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงดูดอากาศออกจากหลอด vacuum hydrolysis ด้วยปั๊มสุญญากาศเป็นเวลา 10 นาที

3.3 นำตัวอย่างที่ได้เข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยให้อยู่ในช่วง 2 - 3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์

3.5 กรองสารตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 สารสกัดที่ย่อยด้วยกรดสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 6 - 10 องศาเซลเซียสได้นาน 1 สัปดาห์

4. สร้างอนุพันธ์ของกรดอะมิโนอิสระในสารตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรด

ปีเปตสารตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรด 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 6 x 50 มิลลิลิตร เติม Waters AccQ. Fluor borate buffer 60 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม Waters AccQ. Reagent 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้กรองผ่าน nylon filter 0.45 ไมครอน ลงใน insert tube และปิดทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปให้ความร้อนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC

ข.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป FRAP โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอสซิเตด ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6

ชั่งโซเดียมแอสซิเตด 40.824 กรัม ละลายในน้ำ 700 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วยกรดแอสซิดิกเข้มข้น (ร้อยละ 99.8) แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.3244 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

ปีเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

5. สารละลาย FRAP (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ปีเปตสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอสซิเตด 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย TPTZ 2.5 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายให้เข้ากัน

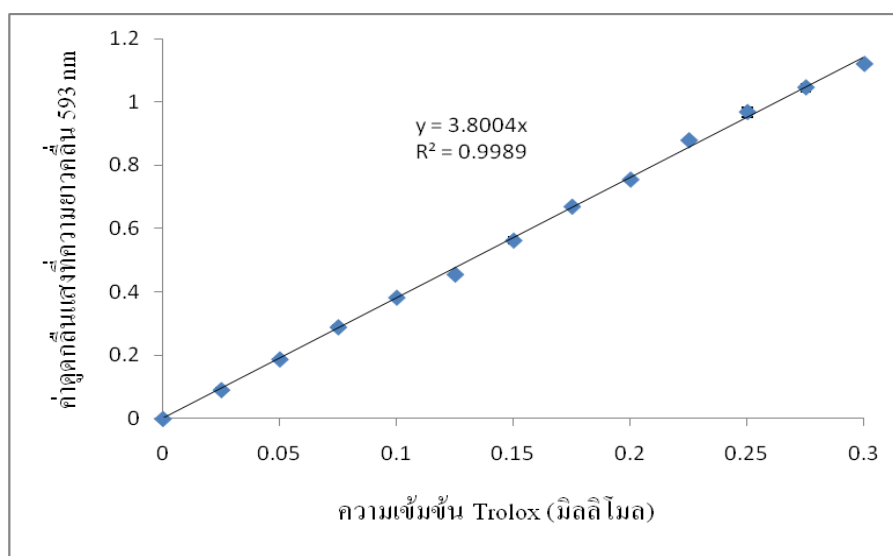
วิธีการทดลอง

1. ปีเปตสารละลาย FRAP 1900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย FRAP เขย่าให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox[®] (ภาพที่ ก.3) เพื่อคำนวณหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีในตัวอย่าง

การทำกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย Trolox[®] 0.025 กรัมในเมทานอล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 และ 3.00 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยสารละลาย Trolox[®] มีความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 และ 3.00 มิลลิโมล ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ห้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป FRAP เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ก.3



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox[®] ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป FRAP

ข.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

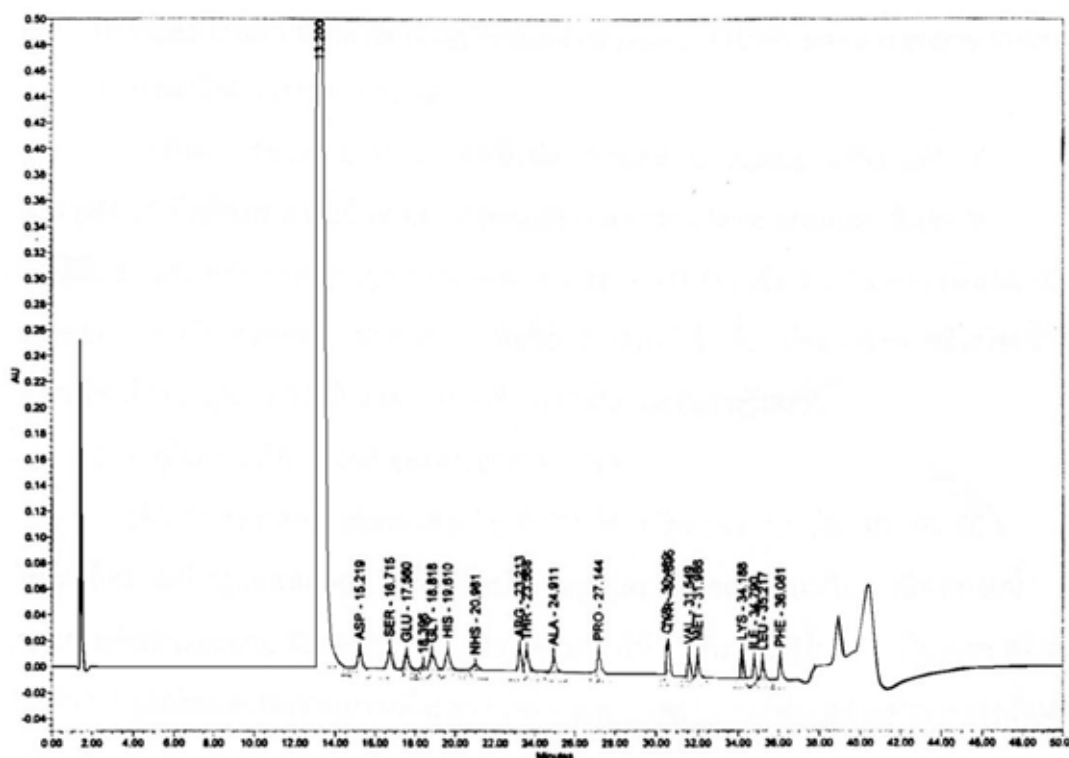
วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูป 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ Park และคณะ(2008)

การเตรียมสารละลาย

เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

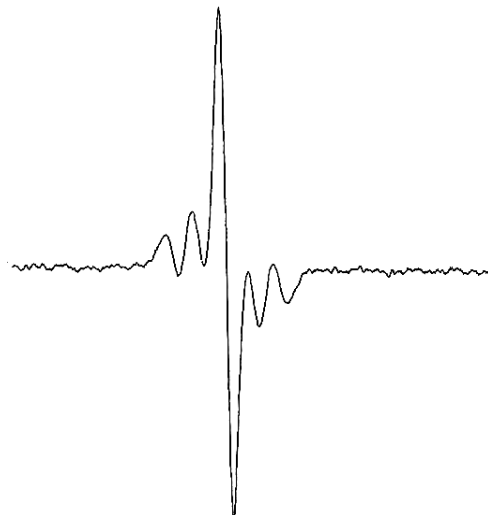
ละลาย DPPH 0.004 กรัมในเมทานอลร้อยละ 80 แล้วปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาทีก่อนนำไปใช้วิเคราะห์

ข.8 โครมาโตแกรมของสารของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

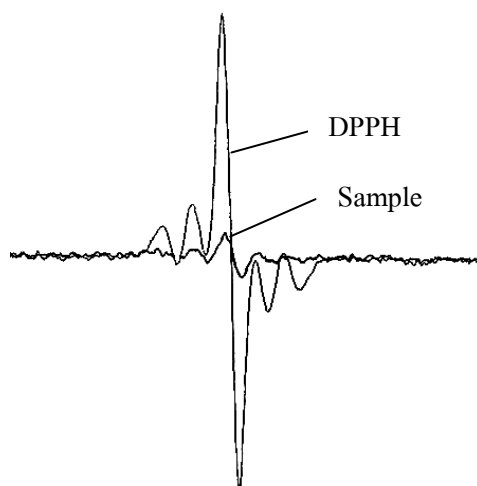


รูปที่ ข4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดอะมิโน

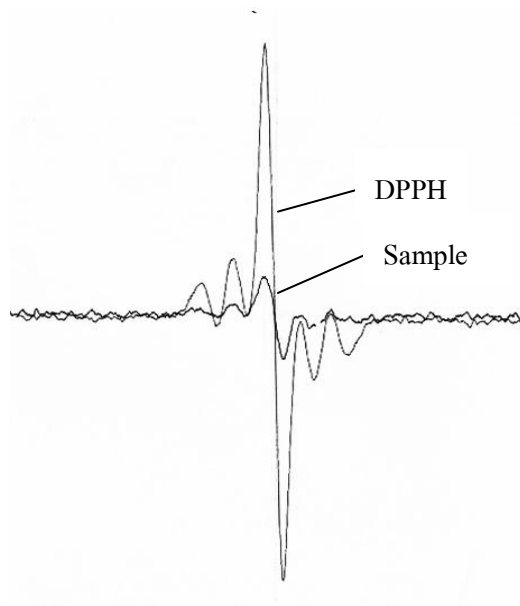
ข.9 สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง electron spin resonance (ESR)



รูปที่ ข.5 สเปกตรัมของสัญญาณอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH (control)



รูปที่ ข.6 สเปกตรัมของสัญญาณของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH และ โปรตีนไฮโดรไลสัดที่ไม่เติม
มอลโทเด็กซ์ทริน



รูปที่ ๗.7 สเปกตรัมของสัญญาณของอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH และ โปรตีนไฮโดรไลสที่เติม
มอลโทเด็กซ์ทริน

ภาคผนวก ค

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณความชื้น

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	601.591	4	150.398	23.284	.000
Error	64.593	10	6.459		
Total	56428.737	15			

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	.121	4	.030	1.017	.444
Error	.298	10	.029		
Total	209.337	15			

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณโปรตีน
ในโตรเจน

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	.340	4	.085	.664	.631
Error	1.280	10	.128		
Total	155.476	15			

ตารางที่ ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วเขียวต่อปริมาณ

Non-protein nitrogen

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	.122	4	.031	.452	.769
Error	.675	10	.068		
Total	5.000	15			

ตารางที่ ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วเขียวต่อปริมาณ โปรตีนหยาบ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	4.724	4	1.181	1.028	.439
Error	11.492	10	1.149		
Total	8182.416	15			

ตารางที่ ค.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วเขียวต่อปริมาณ
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	113.668	4	28.417	69.315	.000
Error	4.100	10	.410		
Total	1073.947	15			

ตารางที่ ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วเขียวต่อปริมาณ น้ำตาลรีดิวิซ์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	7.696	4	1.924	41.135	.000
Error	.468	10	.047		
Total	51.605	15			

ตารางที่ ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วอะชุกิต่อปริมาณความชื้น

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	726.076	4	181.519	57.036	.000
Error	31.826	10	3.183		
Total	56751.164	15			

ตารางที่ ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิต่อปริมาณ
ไนโตรเจนทั้งหมด

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	2.435	4	.609	4.947	.018
Error	1.231	10	.123		
Total	319.963	15			

ตารางที่ ค.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิต่อปริมาณ
โปรตีนไนโตรเจน

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	5.804	4	1.451	19.628	.000
Error	.739	10	.074		
Total	233.058	15			

ตารางที่ ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิต่อปริมาณ
Non-protein nitrogen

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	1.599	4	.400	16.569	.000
Error	.241	10	.024		
Total	9.316	15			

ตารางที่ ค.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั่วอะซูกิต่อปริมาณ
โปรตีนหยาบ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	94.713	4	23.678	4.940	.019
Error	47.927	10	4.793		
Total	12499.712	15			

ตารางที่ ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วอะซูกิต่อปริมาณ
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	338.526	4	84.632	143.046	.000
Error	5.916	10	.592		
Total	1667.963	15			

ตารางที่ ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะถั้วอะซูกิต่อปริมาณ
น้ำตาลรีดิวิซ์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	2.507	4	.627	31.552	.000
Error	.199	10	.020		
Total	14.373	15			

ตารางที่ ค.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme®
ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั้วเขียวอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	332521.333	1	332521.333	452.452	.000
Concentration	2201664.017	3	733888.006	998.581	.000
germination * concentration	56282.200	3	18760.733	25.527	.000
Error	11758.898	16	734.931		
Total	1.162E7	24			

ตารางที่ ค.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme®
ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั้วอะซูกิอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	819.119	1	819.119	17.469	.001
Concentration	474951.356	3	158317.119	3.376E3	.000
germination * concentration	338.565	3	112.855	2.407	.105
Error	750.226	16	46.889		
Total	2513751.227	24			

ตารางที่ ค.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น

Flavourzyme® 0% (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	411.019	1	411.019	222.153	.000
Error	7.401	4	1.850		
Total	21144.248	6			

ตารางที่ ค.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น

Flavourzyme® 3% (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	25.751	1	25.751	.563	.495
Error	182.967	4	45.742		
Total	568364.463	6			

ตารางที่ ค.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น

Flavourzyme® 5% (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Germination	31.832	1	31.832	.847	.410
Error	150.358	4	37.590		
Total	832719.690	6			

ตารางที่ ค.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะ ที่ระดับความเข้มข้น

Flavourzyme® 7% (w/w) ต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Gremination	689.082	1	689.082	6.731	.060
Error	409.500	4	102.375		
Total	1091522.826	6			

ตารางที่ ค.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้น Flavourzyme® ที่ระยะเวลาเพาะ 0 ชั่วโมงต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Concentration	239188.565	3	79729.522	1.680E3	.000
Error	379.693	8	47.462		
Total	1217577.060	12			

ตารางที่ ค.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้น Flavourzyme® ที่ระยะเวลาเพาะ 27 ชั่วโมงต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Concentration	236101.357	3	78700.452	1.699E3	.000
Error	370.533	8	46.317		
Total	1296174.166	12			

ตารางที่ ค.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme® ต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	3415.798	1	3415.798	2.116E3	.000
Concentration	10072.004	3	3357.335	2.080E3	.000
germination * concentration	1311.382	3	437.127	270.808	.000
Error	25.827	16	1.614		
Total	42849.878	24			

ตารางที่ ค.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme®
ต่อระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	14.091	1	14.091	117.123	.000
Concentration	1226.453	3	408.818	3.398E3	.000
germination * concentration	7.429	3	2.476	20.582	.000
Error	1.925	16	.120		
Total	4597.561	24			

ตารางที่ ค.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme®
ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	819687.793	1	819687.793	581.424	.000
Concentration	1071453.735	3	357151.245	253.336	.000
germination * concentration	15328.662	3	5109.554	3.624	.036
Error	22556.684	16	1409.793		
Total	2.216E7	24			

ตารางที่ ค.26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาการเพาะและความเข้มข้น Flavourzyme®
ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	497.588	1	497.588	3.393	.084
Concentration	145221.776	3	48407.259	330.062	.000
germination * concentration	6253.510	3	2084.503	14.213	.000
Error	2346.580	16	146.661		
Total	1.079E7	24			

ตารางที่ ค.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อร้อยละผลผลิตของ
โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	64.601	3	21.534	126.168	.000
Error	.683	4	.171		
Total	886.624	8			

ตารางที่ ค.28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อร้อยละผลผลิตของ
โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	53.035	3	17.678	21.174	.006
Error	3.340	4	.835		
Total	1122.671	8			

ตารางที่ ค.29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ
ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	60011.027	3	20003.676	11.758	.019
Error	6805.255	4	1701.314		
Total	2115407.894	8			

ตารางที่ ค.30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ
ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	63881.299	3	21293.766	6.727	.048
Error	12661.570	4	3165.392		
Total	2821203.362	8			

ตารางที่ ค.31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมลโทเด็กทรินต่อปริมาณสารประกอบ
ฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	153007.198	3	51002.399	10.950	.021
Error	18630.754	4	4657.689		
Total	4418778.504	8			

ตารางที่ ค.32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมลโทเด็กทรินต่อปริมาณสารประกอบ
ฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	205943.562	3	68647.854	155.332	.000
Error	1767.777	4	441.944		
Total	7138708.763	8			

ตารางที่ ค.33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมลโทเด็กทรินต่อค่า EC_{50} ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	5.871	3	1.957	16.798	.010
Error	.466	4	.117		
Total	201.665	8			

ตารางที่ ค.34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมลโทเด็กทรินต่อค่า EC_{50} ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	7.795	3	2.598	76.475	.001
Error	.136	4	.034		
Total	71.324	8			

ตารางที่ ค.35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อค่า AEAC ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trt	.143	3	.048	7.983	.037
Error	.024	4	.006		
Total	5.416	8			

ตารางที่ ค.36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อค่า AEAC ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	2.118	3	.706	25.135	.005
Error	.112	4	.028		
Total	21.730	8			

ตารางที่ ค.37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อค่า FRAP ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trtment	317.104	3	105.701	48.291	.001
Error	8.755	4	2.189		
Total	875.818	8			

ตารางที่ ค.38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเติมมอลโทเด็กทรีนต่อค่า FRAP ของโปรตีน
ไฮโดรไลเสตจากถั่วอะซูกิงอก

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Trt	1.071E7	3	3569659.306	438.275	.000
Error	32579.191	4	8144.798		
Total	3.285E7	8			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐสรพร แสงสุขเอี่ยม เกิดเมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานครฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2552

รายการสิ่งตีพิมพ์และเผยแพร่

ฐสรพร แสงสุขเอี่ยม และ เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์. 2555. โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว และถั่วอะซูกิ: ผลของการเพาะ. ใน การประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10 (ภาคบรรยาย). วันที่ 24 – 25 กรกฎาคม 2555 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก.