สมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรโดยดีแอมิเดชันด้วยโปรตีนกลูทามิเนส

นางสาววรัญญา เต็มทวี

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
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 University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FLAVOR-BINDING PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE

Miss Waranya Temthawee

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2017
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรโดยดีแอมิเดชันด้วยโปรตีนกลูทามิเนส
โดย	นางสาววรัญญา เต็มทวี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.อติกร ปัญญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.อติกร ปัญญา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.เยาวภา หล่อเจริญผล)

วรัญญา เต็มทวี : สมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรโดยดีแอมิเดชันด้วยโปรตีนกลูทามิเนส (FLAVOR-BINDING PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.อติกร ปัญญา, 92 หน้า.

กลิ่นรสในอาหาร (flavor) ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคยอมรับผลิตภัณฑ์อาหาร สารให้กลิ่นรสที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหากลิ่นรสในอาหารจางลง (flavor fade) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG) ต่อสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนจากมะพร้าวด้วยเทคนิค equilibrium dialysis โดยใช้วานิลลินเป็นตัวแทนสารให้กลิ่นรส โดยนำโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (untreated coconut protein; CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (deamidated coconut protein; DCP) ความเข้มข้น 3% (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH = 7.0) ทำอันตรกิริยากับวานิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10 - 100 ppm) ที่อุณหภูมิ 5, 15, และ 25 °C ตัวแปรการจับได้แก่ จำนวนพื้นที่ที่โปรตีนจับกับสารให้กลิ่นรส (n) และค่าคงที่ของการจับกัน (K) หาได้จากกราฟ Klotz plots จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์ PG (36.12 % degree of deamidation) ลดความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวต่อวานิลลินลง นอกจากนี้การจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ของการจับกันบ่งชี้ว่าการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง ($-\Delta G°$) และอันตรกิริยาขับเคลื่อนโดยเอนทาลปี กลไกของการจับกันของ CP และ DCP กับวานิลลินเป็นการเกิดผ่านแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่รับรู้ได้ของวานิลลินในตัวอย่าง DCP ต่ำกว่าในตัวอย่าง CP จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนสสามารถลดการจับของโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินลงได้ และยังพบว่าโปรตีนมีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้นหลังจากดัดแปรด้วยดีแอมิเดชัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต	....
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	....
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	....

5872145323 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: FLAVOR-BINDING / ENZYMATIC DEAMIDATION / PROTEIN-GLUTAMINASE / COCONUT PROTEIN / VANILLIN

WARANYA TEMTHAWEE: FLAVOR-BINDING PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE. ADVISOR: ASST. PROF. INTHAWOOT SUPPAVORASATIT, CO-ADVISOR: ATIKORN PANYA, 92 pp.

Flavor is a major determinant of consumer acceptance of a food product. Flavor compounds added to food products can interact with protein presented in food and may result in the reduction of flavor intensity (flavor fade). The objective of this study was to study the effect of enzymatic deamidation by protein-glutaminase (PG) on the flavor-binding property of coconut protein by equilibrium dialysis technique using vanillin as a model. Three percent (w/v) of untreated coconut protein (CP) and deamidated coconut protein (DCP) in 0.05 M phosphate buffer (pH = 7.0) were bound to vanillin at different concentrations (10 - 100 ppm) and temperatures (5, 15, and 25 °C). Binding parameters, including number of binding site (n) and binding constant (K), were derived from Klotz plots. The results show that deamidation by PG (36.12 % degree of deamidation) could decrease overall flavor-binding affinity (nK) of the protein to vanillin. In addition, the nK was decreased with increasing in temperature. The thermodynamic parameters of binding indicated that the vanillin-protein interactions were spontaneous (- $\Delta G°$). Furthermore, the interactions were driven by enthalpy. Mechanism of the binding of CP and DCP to vanillin were suggested as van der Waals forces or hydrogen bonding. It was also found that odor detection threshold of vanillin in DCP sample was lower than in CP. From the results indicated that the deamidation of coconut protein by PG can decrease the binding of coconut protein to vanillin. It was also found that small molecular proteins were increased after deamidation.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Food Technology	Student's Signature	....
Field of Study:	Food Technology	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2017	Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และทุนอุดหนุนงานวิจัย “ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” บริษัทน้ำมันมะพร้าวไทย จำกัด จังหวัดสมุทรสาครที่ให้การสนับสนุนวัตถุดิบหางกะทิ และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.อติกร ปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่ให้แนวคิดงานวิจัย และคำแนะนำในด้านวิชาการ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์ และ อาจารย์ ดร.เยาวภา หล่อเจริญผล ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำ การตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวก และการให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.... จ
กิตติกรรมประกาศ.... ฉ
สารบัญ.... ช
สารบัญตาราง.... ญ
สารบัญภาพ....ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.... 3
2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน.... 3
2.2 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน.... 4
2.2.1การศึกษาโดยใช้เครื่องมือ 5
2.2.1.1 เทคนิค static headspace.... 5
2.2.1.2 เทคนิค equilibrium dialysis 6
2.2.1.3 เทคนิค inverse gas chromatography 7
2.2.2 การทดสอบทางประสาทสัมผัส 7
2.2.3 เทคนิคอื่น ๆ 8
2.3 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิลและโปรตีนชนิดต่าง ๆ.... 9
2.3.1 วานิลลิน 17
2.3.1.1 การเกิดออกซิเดชันของวานิลลิน.... 17
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน.... 18
2.4.1 อุณหภูมิ.... 19
2.4.2 pH.... 20

หน้า

2.4.3 ionic strength ... 21
2.4.4 การดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน ... 21
2.5 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันต่อการจับกลิ่นรส ... 22
2.6 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส ... 23
2.7 โปรตีนจากมะพร้าว ... 24
2.7.1 molecular mass distribution ... 24
2.7.2 คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนมะพร้าว ... 26
2.7.2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโน ... 26
2.7.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว ... 27
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย ... 29
3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์ ... 29
3.1.1 วัตถุดิบ ... 29
3.1.2 สารเคมี ... 29
3.1.3 อุปกรณ์ ... 30
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย ... 32
3.2.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว ... 32
3.2.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวดัดแปร ... 32
3.2.3 molecular mass distribution ... 33
3.2.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว ... 33
3.2.4.1 การแยกและหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ ... 34
3.2.4.2 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) ... 35
3.2.4.3 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส ... 36
3.2.4.4 การหาสมบัติในการจับกลิ่นรส ... 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.2.4.5 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ 37

3.2.5 การประเมินทางประสาทสัมผัส 38

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ 39

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 40

4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว 40

4.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวดัดแปร 40

4.3 molecular mass distribution 41

4.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว 43

4.4.1 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส 43

4.4.2 สมบัติในการจับกลิ่นรส 46

4.4.3 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ 51

4.5 การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) 53

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 56

5.1 สรุปผลการทดลอง 56

5.2 ข้อเสนอแนะ 57

รายการอ้างอิง 58

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 92

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคีโตนกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ 13

ตารางที่ 2.2 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มอัลดีไฮด์กับโปรตีนชนิดต่าง ๆ 16

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนจากมะพร้าว 27

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ 40

ตารางที่ 4.2 เวลาที่จุดสมดุลของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C, 15°C, และ 25 °C 46

ตารางที่ 4.3 สมการเส้นตรงจาก Klotz plot ในการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) 49

ตารางที่ 4.4 Binding parameter ของการจับกันของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) 51

ตารางที่ 4.5 ค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) 53

ตารางที่ 4.6 ค่า group best estimate thresholds (BET) ของวานิลลินในโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) (n=27) 54

ตารางที่ ค.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าว 80

ตารางที่ ฉ.1 ความเข้มข้นสุดท้ายของวานิลลินในตัวอย่างทดสอบสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น 85

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โอกาสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโมเลกุลของโปรตีน 4

รูปที่ 2.2 เทคนิค equilibrium dialysis 7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของวานิลลิน (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)................... 17

รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวานิลลินและโครงสร้าง Schiff base ของวานิลลิน 18

รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันของกลูตามีน... 22

รูปที่ 2.6 การกระจายตัวของโปรตีน 11S กลอบูลิน (cocosin) จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE.. 25

รูปที่ 2.7 การกระจายตัวของโปรตีน 7S กลอบูลิน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE.................... 25

รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการแยกและหาปริมาณวานิลลินอิสระ 35

รูปที่ 3.2 ตัวอย่าง Klotz plot ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร (SPI) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (DSPI) ที่อุณหภูมิ 25 °C.. 37

รูปที่ 4.1 molecular mass distribution ของโปรตีนมะพร้าว.. 43

รูปที่ 4.2 เวลาที่จุดสมดุลในการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (untreated coconut protein, CP) และผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (deamidated coconut protein, DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C (a), 15°C (b), และ 25 °C (c). 45

รูปที่ 4.3 Klotz plot ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C (a), 15°C (b) และ 25 °C (c) 50

รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมโมเนีย.. 75

รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย 77

รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของ vanillin vs vanillin-d_3... 83

หน้า

รูปที่ จ.2 โครมาโตแกรมของ vanillin และ vanillin-d_3 84

รูปที่ ฉ.1 ชุดตัวอย่างทดสอบสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น 85

รูปที่ ฉ.2 แบบประเมินการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น 88

รูปที่ ฉ.3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของกลุ่มผู้ทดสอบสำหรับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยดีแอมิเดชัน (DCP) “0” หมายถึงผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างทดสอบในชุดการทดสอบผิด “+”หมายถึงผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างทดสอบในชุดการทดสอบถูกต้อง (n=27) 89

รูปที่ ฉ.4 ใบรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น 91

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบัน อาหารประเภทโปรตีนสูงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากผู้บริโภคมีความต้องการที่จะลดอาหารประเภทไขมันและน้ำตาลสูงลง แต่อาหารประเภทโปรตีนสูงมักมีปัญหาเกี่ยวกับการจางลงของกลิ่นรส กล่าวคือเมื่อมีการเติมสารให้กลิ่นรสลงไปในผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โปรตีนจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารให้กลิ่นรสได้ (Guichard, 2002; Suppavorasatit and Cadwallader, 2010) ทำให้ปริมาณกลิ่นรสที่ผู้บริโภคสามารถรับรู้ได้ขณะบริโภคลดลงหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่งการที่กลิ่นรสของอาหารจางลงอาจส่งผลให้การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้น ๆ ลดลงด้วย (Gkionakis et al., 2007) และอาจส่งผลให้เกิดปัญหากับผู้ผลิตอาหารประเภทโปรตีนสูงในการเลือกชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของสารให้กลิ่นรสที่จะเติมลงไปในอาหารนั้น ๆ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ คือปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ และแบบผันกลับไม่ได้ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของโปรตีนและสารให้กลิ่นรสแต่ละชนิด (Kühn et al., 2008)

อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน การดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันเป็นกระบวนการดัดแปรโปรตีนวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนโดยสามารถทำได้หลายวิธีทั้งทางเคมี กายภาพ และการใช้เอนไซม์ การดัดแปรโดยใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้วิธีทางเคมี คือเกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่รุนแรง และมีความจำเพาะสูง (Hamada, 1994) โปรตีนกลูทามิเนส (protein-glutaminase; PG) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถทำปฏิกิริยาดีแอมิเดชันได้และยังมีความจำเพาะสูง คือสามารถเข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะที่กลูตามีน (glutamine) ในสายโปรตีนเท่านั้น และไม่เกิดปฏิกิริยากับกลูตามีนอิสระ (Yamaguchi et al., 2001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โปรตีนมะพร้าวสามารถสกัดได้จากหางกะทิซึ่งถือเป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ซึ่งได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน จากการศึกษาพบว่าโปรตีนมะพร้าวเป็นโปรตีนจากพืชที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทุกชนิด (Thaiphanit and Anprung, 2014) โปรตีนมะพร้าวนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการแล้ว ยังมีสมบัติในการเกิดอิมัลชันที่ดี ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารประเภทอิมัลชันได้ และยังมีคุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยรวมที่ดี ซึ่งส่งผลให้มีประโยชน์ในการใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ (Naik et al., 2012)

ปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์จากโปรตีนมะพร้าวในทางอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีนจากมะพร้าวอาจเกิดปัญหาการจางลงของกลิ่นรสได้เช่นเดียวกันกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันด้วยการใช้เอนไซม์ PG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

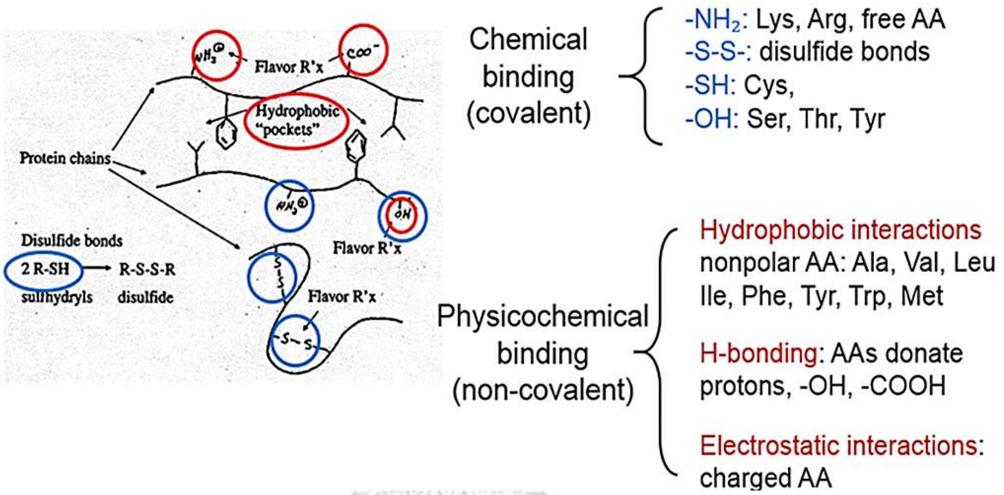
บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน

ในระบบอาหาร การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหาร เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนมีผลกระทบต่อการรับรู้กลิ่นรส ไขมันในอาหารส่งผลกระทบที่สำคัญต่อการรับรู้กลิ่นรสเป็นอย่างมากเนื่องจากไขมันทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารให้กลิ่นรสชนิดที่ละลายในไขมัน ซึ่งทำให้ลดอัตราการปลดปล่อยกลิ่นรสในขณะบริโภคอาหารลง คาร์โบไฮเดรตสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารให้กลิ่นรสโดยเฉพาะโมเลกุลที่มีขั้วโดยอันตรกิริยา dipole-dipole และพันธะไฮโดรเจน จึงส่งผลกระทบต่อการปลดปล่อยและการรับรู้กลิ่นรสเช่นเดียวกับไขมัน นอกจากไขมันและคาร์โบไฮเดรตแล้ว โปรตีนยังมีอิทธิพลต่อการรับรู้กลิ่นรสด้วยเช่นกัน โดยการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารให้กลิ่นรสเป็นปัญหาสำคัญสำหรับอาหารที่มีโปรตีนสูงเนื่องจากอันตรกิริยาดังกล่าวส่งผลให้เกิดการสูญเสียกลิ่นรส การจางลงของกลิ่นรสหรือการที่กลิ่นรสเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลให้การยอมรับของผลิตภัณฑ์ลดลงได้

ปัจจุบันอาหารประเภทโปรตีนสูงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากผู้บริโภคมีความต้องการที่จะลดอาหารประเภทไขมันและน้ำตาลสูงลง แต่อาหารประเภทโปรตีนสูงมักมีปัญหาเกี่ยวกับการจางลงของกลิ่นรส กล่าวคือเมื่อมีการเติมสารให้กลิ่นรส (flavor compound) ลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โปรตีนจะสามารถเกิดอันตรกริยากับสารให้กลิ่นรสได้ (Guichard, 2002; Suppavorasatit and Cadwallader, 2010) ทำให้ปริมาณกลิ่นรสที่ผู้บริโภคสามารถรับรู้ได้ขณะบริโภคลดลงหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ การที่กลิ่นรสของอาหารจางลงนี้อาจส่งผลให้การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้น ๆ ลดลงเช่นเดียวกับอาหารที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นด้วย (Gkionakis et al., 2007) การเกิดอันตรกิริยาหรือการจับกันระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) คือปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ (reversible) และแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของโปรตีนและสารให้กลิ่นรสแต่ละชนิด (Kühn et al., 2008) ปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ เช่นการเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) พันธะไฮโดรโฟบิค (hydrophobic interaction) และพันธะไอออนิก (ionic bond) ส่วนปฏิกิริยาแบบผันกลับไม่ได้ เป็นการเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของสารให้กลิ่นรสกับหมู่เอมีน (amine group) ของกรดอะมิโนใน

โมเลกุลของโปรตีน หรือเรียกอีกอย่างว่าการเกิดชิฟฟ์เบส (Schiff base) (Kühn et al., 2006; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาแบบผันกลับไม่ได้ระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนจะทำให้เกิดปัญหากลิ่นรสที่เติมลงไปในอาหารจางลง (flavor fade) ซึ่งจะทำให้กลิ่นรสโดยรวมของอาหารเปลี่ยนแปลงไป อันอาจส่งผลให้เกิดปัญหากับผู้ผลิตอาหารประเภทโปรตีนสูงในการเลือกชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของสารให้กลิ่นรสที่จะเติมลงไปในอาหารนั้น ๆ (Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)



รูปที่ 2.1 โอกาสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโมเลกุลของโปรตีน

ที่มา : Wang and Arntfield (2016b)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน

การศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมีหลากหลายวิธีซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งใช้เครื่องมือและทดสอบทางประสาทสัมผัส การศึกษาโดยใช้เครื่องมือเป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการใช้เครื่องมือไม่สามารถอธิบายได้ถึงการรับรู้กลิ่นรสเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารเข้าไปจริง ๆ ดังนั้นการทดสอบทางประสาทสัมผัสจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อใช้เชื่อมโยงความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เครื่องมือกับการรับรู้ของผู้บริโภค

2.2.1การศึกษาโดยใช้เครื่องมือ (instrumental techniques)

เทคนิคหลักที่ใช้ในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนมี 2 เทคนิค ได้แก่ การใช้หลักการ static headspace และ equilibrium dialysis โดยทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำภายใต้ภาวะสมดุล (equilibrium)

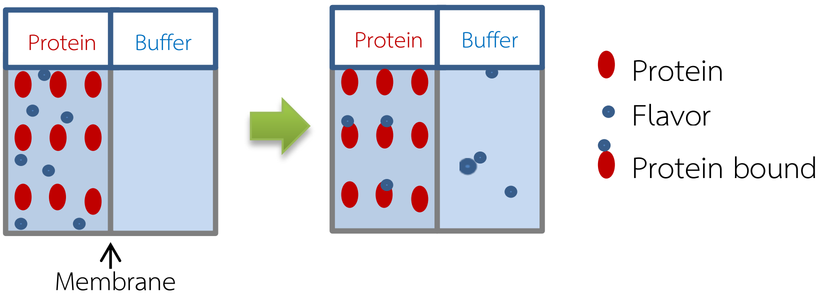
2.2.1.1 เทคนิค static headspace

เทคนิค static headspace เป็นวิธีพื้นฐานที่สามารถใช้ได้กับตัวอย่างอาหารหลากหลายรูปแบบทั้งของเหลวและของแข็ง ซึ่งหลักการที่ใช้คือการวัดปริมาณสารให้กลิ่นที่ระเหยออกมาจากตัวอย่างอาหารที่เข้าสู่ภาวะสมดุล (Suppavorasatit and Cadwallader, 2010) โดยนำอาหารที่ต้องการวัดใส่ภาชนะปิดสนิทวางในสภาวะที่ต้องการ สารระเหยในอาหารจะค่อย ๆ ระเหยออกมา เมื่อเข้าสู่ภาวะสมดุลแล้วจะนำสารระเหยดังกล่าวไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโดยเทคนิค gas chromatography (GC) เทคนิค static headspace นี้เป็นวิธีที่ง่ายในการวัดผลกระทบของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นของเหลว อย่างไรก็ตาม เทคนิค headspace นี้อาจไม่เหมาะกับสารระเหยประเภท semi-volatile นอกจากการใช้เทคนิค headspace ซึ่งเป็นการดึงสารระเหยเหนือตัวอย่างอาหารมาศึกษาโดยตรงแล้ว เทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค headspace คือ เทคนิค solid-phase microextraction (SPME) (Flores et al., 2007; Kühn et al., 2007; 2008) ซึ่งเป็นการใช้ไฟเบอร์ชนิดที่สามารถดูดซับสารระเหยได้ ดูดซับสารระเหยให้กลิ่นบริเวณเหนืออาหาร แล้วนำไปปลดปล่อยสารระเหยเข้าสู่ GC เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณต่อไป จากการศึกษา พบว่า SPME เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ร่วมกับ static headspace และ dynamic headspace ในการวัดการเกิด อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนนมและสารให้กลิ่นรส (Fabre et al., 2002) นอกจากนี้ SPME ยังสามารถใช้วัดความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสที่ใช้เทคนิค equilibrium dialysis ได้อีกด้วย (Zhou et al., 2002) SPME เป็นเทคนิคที่มี sensitivity สูง ทำได้รวดเร็ว ราคาไม่แพง มีความจำเพาะ และเป็นเทคนิคที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย (solvent-free) เหมาะกับการใช้ในระบบอัตโนมัติ และสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในตัวอย่างที่เป็นของเหลว ของกึ่งแข็ง และของแข็ง ยิ่งไปกว่านั้นเทคนิคนี้ยังสามารถใช้กับเทคนิคการแยกที่หลากหลายได้เช่น GC, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) และ high performance liquid chromatography (HPLC) อย่างไรก็ตามเทคนิค SPME ยากที่จะนำมาใช้กับ

external standard ในแมทริกซ์ที่มีความซับซ้อนและสามารถเกิด bias ในเรื่องของการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้เนื่องจากการแข่งขันกันของสารให้กลิ่นรสในการจับกับไฟเบอร์ ดังนั้นเทคนิค SPME จึงเหมาะกับการใช้แต่ในระบบที่ไม่ซับซ้อน (Kühn et al., 2006)

2.2.1.2 เทคนิค equilibrium dialysis

เทคนิค equilibrium dialysis เป็นเทคนิคที่ใช้โดยทั่วไปในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับแมทริกซ์ต่าง ๆ ภายใต้ภาวะสมดุล เทคนิคนี้ใช้ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนในระบบที่เป็นของเหลวเท่านั้น ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือการใช้เยื่อเลือกผ่านที่มีขนาดรูผ่านจำกัดเป็นตัวคัดแยกสารที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกัน โดยในระบบจะแบ่งเป็นสองส่วนด้านหนึ่งเป็นสารละลายโปรตีนที่มีการเติมสารให้กลิ่นรสที่ต้องการศึกษาลงไป อีกด้านหนึ่งของเซลล์บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายโปรตีน ระหว่างนี้จะมีการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเยื่อเลือกผ่าน (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) จนเมื่อเข้าสู่สมดุลจึงนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารให้กลิ่นรสละลายอยู่ไปสกัดด้วยตัวทำละลาย และนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโดย GC (Domadaran and Kinsella, 1981a, b; O’Neill and Kinsella, 1987; Kühn et al., 2008; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) การใช้เทคนิค equilibrium dialysis สามารถให้ข้อมูลค่าคงที่ของการจับ (binding constant, K) จำนวนพื้นที่ที่โปรตีนจับหรือเกิดอันตรกิริยากับสารให้กลิ่นรส (number of binding sites, n) และตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic parameters) ซึ่งแสดงถึงธรรมชาติในการจับ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ใช้เวลานานและอาจทำให้สูญเสียสารให้กลิ่นรสไประหว่างการทดสอบ โดยปัจจัยที่ทำให้การจับเปลี่ยนแปลงไปมีหลายอย่างเช่น ค่า pH, การที่มี reducing agent อยู่ในบัฟเฟอร์ กระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายรวมถึงชนิดของเยื่อเลือกผ่านที่อาจจะเกิดการจับกับสารให้กลิ่นรสได้ (Suppavorasatit and Cadwallader, 2010) ด้วยเหตุที่ต้องอาศัยภาวะสมดุลโดยใช้เยื่อเลือกผ่านนี้จึงไม่เหมาะกับการศึกษาในระบบที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง



รูปที่ 2.2 เทคนิค equilibrium dialysis

2.2.1.3 เทคนิค inverse gas chromatography

เทคนิค inverse gas chromatography (IGC) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน ซึ่งเหมาะสำหรับการศึกษาในตัวอย่างอาหารที่มีความชื้นต่ำหรือเป็นผงแห้ง (Zhou and Cadwallader, 2004) โดยใช้หลักการ gas-solid adsorption chromatography การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนด้วยวิธี IGC สามารถทำได้โดยการบรรจุผงแห้งของโปรตีนลงในคอลัมน์ (stationary phase) แล้วฉีดสารให้กลิ่นที่ทราบชนิดและปริมาณผ่านเข้าไปในคอลัมน์ สารให้กลิ่นรสต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่ผ่านโปรตีนด้วยความเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนภายในคอลัมน์ ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีนี้สามารถนำมาคำนวณและใช้อธิบายอันตรกิริยาได้ด้วยอุณหพลศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.2 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนด้วยการใช้เครื่องมือนั้นสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในเรื่องของกลไกซึ่งมีความสำคัญในการทำให้เข้าใจธรรมชาติในการจับกัน อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องมือนั้นไม่สามารถอธิบายได้ถึงการรับรู้กลิ่นรสเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารเข้าไป เพราะในการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในรูปแบบจำลองที่สร้างขึ้นมาเลียนแบบระบบอาหาร และผลการศึกษาให้ข้อมูลที่มีค่าเป็นตัวเลขซึ่งข้อมูลตัวเลขดังกล่าวไม่สามารถบอกได้ว่าผู้บริโภคสามารถรับรู้กลิ่นรสได้หรือไม่ จึงไม่สามารถอธิบายถึงผลกระทบของการจับกันของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนในระบบอาหารจริงได้ ดังนั้นการทดสอบทางประสาทสัมผัสจะสามารถใช้เชื่อมโยงข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยการใช้เครื่องมือ และทำให้สามารถเข้าใจการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนได้ดีขึ้น ซึ่งความรู้ในการศึกษาด้วยวิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสูตรของผลิตภัณฑ์อาหารให้มีกลิ่นรสที่เป็นที่

ยอมรับของผู้บริโภคได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน รวมถึงยังเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เวลานานในการศึกษา วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนได้แก่ การทดสอบโดยการดม (sniffing) ซึ่งเป็นการประเมินผลของกลิ่นในอาหารโดยวัดความเข้มของสารระเหยให้กลิ่นที่อยู่เหนืออาหารเมื่อเข้าสู่ภาวะสมดุล Zhou and Cadwallader (2006) ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสเนย (diacetyl และ butyric acid) กับแครกเกอร์ที่มีการเติมโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค IGC ร่วมกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วย IGC มีความสอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยพบว่าแครกเกอร์ที่มีการเติมโปรตีนถั่วเหลืองลงไปทำให้การรับรู้กลิ่นรสของเนยลดลง Suppavorasitit et al. (2013) ทดสอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบผลของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนนมถั่วเหลืองด้วยวิธีดีแอมิเดชันต่อสมบัติการจับกันกับวานิลลินและมอลทอล พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของกลิ่นรสที่ผู้บริโภคสามารถรับรู้ได้ (odor detection threshold) ลดลงในตัวอย่างโปรตีนนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรโครงสร้างเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับวานิลลินและมอลทอลโดยการใช้เครื่องมือ (Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)

2.2.3 เทคนิคอื่น ๆ

นอกจากเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีเทคนิคอื่น ๆ ที่สามารถใช้ในการอธิบายถึงกลไกการเกิดอันตรกิริยาได้อีก เช่นการใช้เทคนิคทางสเปคโทรสโคปี (spectroscopy) ซึ่งสามารถใช้ในการให้ข้อมูลเพิ่มเติมในเรื่องของโครงสร้างของสารประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการเกิดอันตรกิริยา โดยเทคนิคที่นิยมใช้คือ fluorescence spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และ fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

fluorescence spectroscopy ให้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งที่เกิดอันตรกิริยาโดยสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นและความเข้มแสง fluorescence ที่ปลดปล่อยออกมาของกรดอะมิโน tryptophane ในโปรตีน เช่นเมื่อมีการจับกันระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโมเลกุลของโปรตีนจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ค่าคงที่ในการจับ (binding constant) และจำนวนพื้นที่ที่โปรตีนจับกับกลิ่นรส (number of binding site) สามารถหาได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มของ fluorescence โดยมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น Dofour and Haertlé (1990) ศึกษาผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง β-ionone กับ β-lactoglobulin โดยใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy Meynier et al. (2004) ใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy ในการศึกษาการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มอัลดีไฮด์ (hexanal และ t-2-hexenal) กับโปรตีน whey และ sodium caseinate Liu et al. (2005) ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาอันตรกิริยาของโปรตีนเวย์เข้มข้น (WPC) สำหรับเทคนิค NMR spectroscopy พบว่าเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับอะตอม ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบอันตรกิริยาภายในโมเลกุล และอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลได้ Lübke et al. (2002) ใช้เทคนิค 2D NMR ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน β-lactoglobulin ที่ถูกจับโดยสารให้กลิ่นรส เทคนิค FT-IR spectroscopy เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ differential scanning calorimetry (DSC) ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนระหว่างโปรตีน native และ โปรตีนที่เสียสภาพ (Wang and Arntfield, 2014, 2015a, 2016a)

2.3 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิลและโปรตีนชนิดต่าง ๆ

การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนที่ผ่านมา ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในโปรตีนนม เช่น whey protein, sodium caseinate และ β-lactoglobulin (O’Neill and Kinsella, 1987; Dufour and Haertlé, 1990; Stevenson et al., 1996; Guichard and Langourieux, 2000; Jouenne and Crouzet, 2000; Li et al., 2000; Yang et al., 2003; Meynier et al., 2004; Liu et al., 2005; Kühn et al., 2006, 2007, 2008) bovine serum albumin (Tan and Siebert, 2008) α-lactalbumin, casein, α_{S1}-casein, β-casein (Gkionakis et al., 2007; Kühn et al., 2007) และการศึกษาในโปรตีนประเภทอื่น ๆ เช่น โปรตีนถั่วเหลือง (Domadaran, 1981a, b; Malcolmson et al., 1987; Li et al., 2000; Zhou et al., 2002; Gkionakis et al., 2007; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012; Suppavorasatit et al, 2013) โปรตีน myofibrillar (Pérez-Juan et al., 2008) โปรตีน broad bean (Semenova et al., 2002) ในโปรตีน faba bean (Ng et al., 1989) โปรตีนถั่ว (Dumont and Land., 1986; Heng et al., 2004; Wang and Arntfield, 2014; 2015a,b; 2016a,b) โปรตีน canola (Wang

and Arntfield, 2014, 2015a) โปรตีนข้าวสาลี (Wang and Arntfield, 2014) โปรตีนเนื้อหมู (Pérez-Juan et al., 2007, 2008) โปรตีน myosin (Lv et al., 2017) โปรตีนต่างชนิดกันจะมีลักษณะการเกิดอันตรกิริยาที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติในการจับของโปรตีนชนิดนั้น การเปรียบเทียบการเกิดอันตรกิริยาของสารให้กลิ่นรสและโปรตีนชนิดต่าง ๆ อาจจะมีค่าใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 ซึ่งเป็นการแสดงค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิลซึ่งได้แก่ อัลดีไฮด์และคีโตนกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งค่าที่มีความแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้ในการศึกษา ชนิดของโปรตีน ชนิดของสารให้กลิ่นรส และสภาวะการทดลองที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นการเปรียบเทียบส่วนใหญ่จึงเป็นการเปรียบเทียบกันแบบแนวโน้ม

สารประกอบกลุ่มคาร์บอนิล (อัลดีไฮด์และคีโตน) เป็นสารให้กลิ่นรสที่นิยมเลือกมาศึกษามากที่สุด โดยกลุ่มผู้วิจัยมักจะใช้สารให้กลิ่นรสชนิดเดียวกันในการศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสในโปรตีนที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มวิจัยของ Kinsella ใช้ 2-nonanone เป็นสารให้กลิ่นรสเพื่อศึกษาเปรียบเทียบสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของ whole soy protein, soy protein isolate, soy protein fractions (7S และ 11S) และ β-lactoglobulin โดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบตัวแปรในการจับกับการศึกษาอื่นได้ (Damodaran and Kinsella, 1981a; O'Neill and Kinsella, 1987) นักวิจัยกลุ่มอื่นก็ใช้ 2-nonanone ในการศึกษากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ด้วยรวมถึง whey protein isolate, whey protein concentrate, β-lactoglobulin และ bovine serum albumin (BSA) (Liu et al., 2005; Kühn et al., 2007) อย่างไรตามผลที่ได้จากการศึกษาอาจไม่สามารถที่จะเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจนเนื่องจากแต่ละกลุ่มวิจัยมีการใช้เทคนิคและสภาวะในการทดลองที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปรียบเทียบความสามารถในการจับของโปรตีนจึงควรที่จะเปรียบเทียบโดยใช้สารให้กลิ่นรสชนิดเดียวกัน ใช้เทคนิคและสภาวะการทดลองที่เหมือนกันเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับของโปรตีนถั่วเหลืองและโปรตีนชนิดอื่น ๆ กับ 2-nonanone ซึ่งใช้เทคนิค equilibrium dialysis ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบว่าจำนวนพื้นที่ที่โปรตีนจับกับสารให้กลิ่นรส (n) และ ค่าคงที่ในการจับ (K) ระหว่าง whole soy protein (5.5 และ 570 M^{-1}), soy protein isolate (SPI) (4 และ 930 M^{-1}) และ glycinin (3.1 และ 540 M^{-1}) แตกต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตามค่า n และ K ระหว่าง β-conglycinin (1.8 และ 3050 M^{-1}) กับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โปรตีนถั่วเหลืองตัวอื่น ๆ มีค่าที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า β-conglycinin มีความสามารถในการจับกับ 2-nonanone ได้สูงกว่า whole soy protein, SPI และ glycinin นอกจากนี้พบว่าค่า n และ K ระหว่าง BSA (6 และ 1800 M^{-1}) กับ β-lactoglobulin (1 และ 2240 M^{-1}) (O'Neill and Kinsella, 1987) สามารถสรุปได้ว่า BSA มีความสามารถในการจับกับ 2-nonanone ได้สูงกว่า β-lactoglobulin และเมื่อเปรียบกันระหว่าง β-conglycinin กับ β-lactoglobulin พบว่า β-conglycinin มีความสามารถในการจับกับ 2-nonanone ได้สูงกว่า β-lactoglobulin แต่ต่ำกว่า BSA อย่างไรก็ตาม O'Keefe et al. (1991) ใช้เทคนิค headspace ในการศึกษารายงานว่า glycinin มีความสามารถในการจับกับสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิล (2-nonanone) ได้ดีกว่า β-conglycinin ซึ่งให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จากการใช้เทคนิค equilibrium dialysis

สารให้กลิ่นรสอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษาด้านการจับสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนคือ วานิลลิน (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสที่นิยมเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์นมซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก Li et al. (2000) ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินและโปรตีน casein, whey, และ ถั่วเหลือง พบว่าค่า n ของโปรตีน whey และ casein ใกล้เคียงกัน (0.66 และ 0.67 ตามลำดับ) โดยโปรตีนถั่วเหลืองมีค่า n สูงกว่าโปรตีนสองตัวแรก (3.81) ค่าพลังงานอิสระ (free energy, ΔG) ของ casein (-3321.61 cal/mol), whey (-4216.65 cal/mol) และโปรตีนถั่วเหลือง (-3696.33 cal/mol) แสดงว่าโปรตีน whey มีความสามารถในการจับกับวานิลลินได้มากกว่า casein และโปรตีนถั่วเหลือง และเมื่อพิจารณาค่าเอนทาลปี (ΔH) และ เอนโทรปี (ΔS) พบว่าการจับของวานิลลินกับโปรตีน whey (-8495.76 และ-15.01 cal/mol) และ casein (-1264.20 และ -32.70 cal/mol) การเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนแบบเอนทาลปี (enthalpy driven) ในขณะที่การจับของวานิลลินและโปรตีนถั่วเหลือง (7423.97 และ 39.02 cal/mol) การเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนแบบเอนโทรปี (entropy driven) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำมาเปรียบเทียบผลการศึกษากับงานของ Burova et al. (2003) ซึ่งทำการศึกษาความสามารถในการจับกันของ BSA กับวานิลลิน โดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis พบว่า n ของ BSA เท่ากับ 2 ซึ่งไม่แตกต่างกับโปรตีนตัวอื่น ๆ แต่ค่าคงที่ในการจับสูงกว่าที่พบใน WPI, SPI และ casein ซึ่งรายงานไว้ในการศึกษาของ Li et al. (2000) จึงสามารถสรุปได้ว่า BSA มีความสามารถในการจับกับวานิลลินได้สูงที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้ Chobpattana et al. (2002) ยังพบว่า BSA สามารถเกิดอันตรกิริยากับวานิลลินได้มากกว่า sodium caseinate ในปี 2013 Suppavorasatit และคณะ (Suppavorasatit et al., 2013) ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินและโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis พบว่าค่า n ที่ 5, 15, และ 25 ℃ (13.6, 2.31, และ 0.48 ตามลำดับ) มีความสอดคล้องกับที่ Li et al. (2000) ที่รายงานค่า n ของโปรตีนถั่วเหลืองที่ 4 และ 12 ℃ ไว้ที่ 10.92 และ 3.81 ตามลำดับ) ส่วนค่า K ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันอาจเป็นเพราะการใช้แหล่งโปรตีนที่แตกต่างกัน และมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคีโตนกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ

flavor compound	protein	number of binding sites (n)	binding constant (M^{-1}) (K)	technique	reference
2-nonanone	whole soy	5.5	570	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
	ß-conglycinin	1.8	3,050	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
	glycinin	3.1	540	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
	soy protein, native	4	930	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1981a)
	soy protein, partly denaturated	4	1,240	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1981a)
	soy protein, succinylated	2	850	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1981a)
	glycinin	71	891	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
2-nonanone	ß-conglycinin	46	251	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
	ß-lactoglobulin	1	2,440	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
	ß-lactoglobulin	-	2,440	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
	ß-lactoglobulin	1.1	2,700	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	ß-lactoglobulin	0.2	5.3×10^7	headspace analysis	(Liu et al., 2005)
	bovine serum albumin	2.4	16,000	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	bovine serum albumin	6	1,800	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1980)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคีโตนกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

flavor compound	protein	number of binding sites (n)	binding constant (M^{-1}) (K)	technique	reference
2-nonanone	α-lactalbumin	1	900	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	whey protein isolate (WPI)	0.2	24,000	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	WPI	1.1	370	equilibrium dialysis	(Kühn et al., 2008)
	α_{s1}-casein	0.8	420	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	ß-casein	0.32	810	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
	sodium caseinate	1.1	370	headspace-SPME	(Kühn et al., 2007)
2-heptanone	soy protein isolate (SPI)	4	110	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1981a)
	whey protein concentrate (WPC)	0.24	4×10^7	headspace analysis	(Liu et al., 2005)
	ß-lactoglobulin	-	150	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
2-octanone	SPI	4	310	equilibrium dialysis	(Damodaran and Kinsella, 1981a)
	WPC	0.21	4.5×10^7	headspace analysis	(Liu et al., 2005)
	ß-lactoglobulin	-	480	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)
ß-ionone	ß-lactoglobulin	-	150	equilibrium dialysis	(O'Neill and Kinsella, 1987)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2.1 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มคีโตนกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

flavor compound	protein	number of binding sites (n)	binding constant (M^{-1}) (K)	technique	reference
ß-ionone	ß-lactoglobulin	0.8	1.9×10^{6}	fluorescence spectroscopy	(Muresan et al., 2001)
	ß-lactoglobulin	0.85	15015	equilibrium dialysis	(Muresan et al., 2001)
maltol	SPI (5°C)	10.7	30.5×10^{4}	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)
	SPI (15°C)	8.38	37.9×10^{4}	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)
	SPI (25°C)	3.27	92.5×10^{4}	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Suppavorasatit and Cadwallader (2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.2 อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มอัลดีไฮด์กับโปรตีนชนิดต่าง ๆ

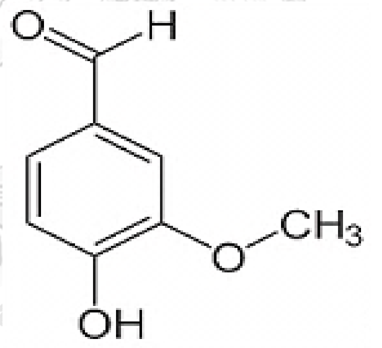
flavor compound	protein	number of binding sites (n)	binding constant (M^{-1}) (K)	technique	reference
hexanal	ß-conglycinin	23	1437	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
	ß-conglycinin	32	256	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
	glycinin	84	483	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
	glycinin	96	270	headspace analysis	(O'Keefe et al., 1991)
vanillin	SPI	3.18	683.5	equilibrium dialysis	(Li et al., 2000)
	SPI (5°C)	13.6	5.16×10^4	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)
	SPI (15°C)	2.31	29.8×10^4	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)
	SPI (25°C)	0.48	186×10^4	equilibrium dialysis	(Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)
	casein	0.66	352.66	equilibrium dialysis	(Li et al., 2000)
	WPI	0.67	1713.04	equilibrium dialysis	(Li et al., 2000)
	ß-lactoglobulin	1	17000	UV-VIS spectroscopy	(Mikheeva et al., 1998)
	bovine serum albumin	2	4600	equilibrium dialysis	(Burova et al., 2003)
	bovine serum albumin	0.72	310000	UV-VIS spectroscopy	(Mikheeva et al., 1998)
	ovalbumin	0.24	4500	UV-VIS spectroscopy	(Mikheeva et al., 1998)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Suppavorasatit and Cadwallader (2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.1 วานิลลิน

วานิลลินหรือ 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde เป็นสารให้กลิ่นรสชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม การผลิตเครื่องหอม และทางเภสัชกรรม (Walton et al., 2003; Gallage and MØller, 2015) วานิลลินเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสวานิลลา และมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบฟีนอลที่มีหมู่อัลดีไฮด์และหมู่เมทอกซีเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 2.3 วานิลลินมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำที่อุณหภูมิห้อง แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอีเทอร์ โดยวานิลลินเป็นสารให้กลิ่นรสอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษาด้านการจับสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน เนื่องจากเป็นสารให้กลิ่นรสที่มีหมู่คาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้าง ซึ่งหมู่คาร์บอนิลดังกล่าวสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์หรือเกิดชิฟฟ์เบสกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโนในโมเลกุลของโปรตีนได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดปัญหากลิ่นรสที่เติมลงในอาหารจางลง



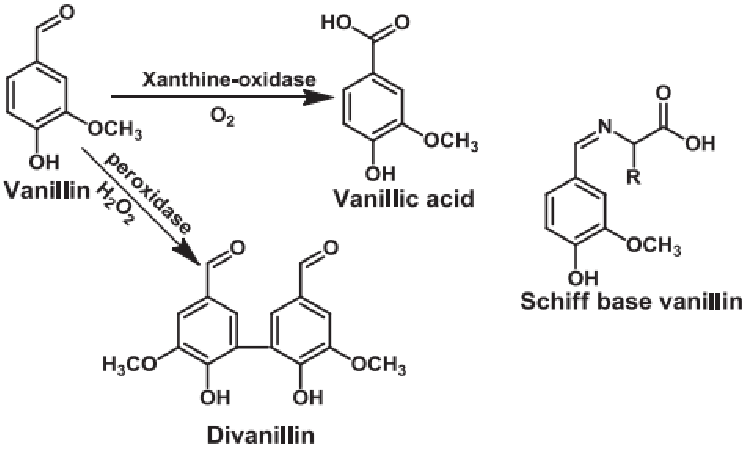
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของวานิลลิน (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)

2.3.1.1 การเกิดออกซิเดชันของวานิลลิน

วานิลลินประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้หลายปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพกลิ่นรสโดยรวมของอาหารได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวานิลลินสามารถถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็น vanillic acid ได้ ภายใต้สภาวะด่างและสามารถเกิดโดยเอนไซม์ ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ในน้ำนม เช่น xanthine oxidase และ peroxidase วานิลลินจะถูกออกซิไดซ์ได้สูงมากเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในสภาวะด่าง โดยอัตราการเกิดออกซิเดชันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของวานิลลิน และความเข้มข้นของออกซิเจนซึ่งจะมีผลต่ออัตราการ

เกิดออกซิเดชันของวานิลลินเฉพาะที่ pH สูง (pH > 12) โดยที่ pH ต่ำ (pH < 4) จะไม่เกิดการสร้าง vanillic acid (Weerawatanakorn et al., 2015) Anklam et al. (1997) ศึกษาการเกิดออกซิเดชันของวานิลลินในผลิตภัณฑ์นม พบว่าวานิลลินที่เติมลงในนมสดและนมพาสเจอร์ไรส์จะถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็น vanillic acid โดยเอนไซม์ xanthine oxidase ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นกับ pH อย่างไรก็ตามวานิลลินจะมีความเสถียรโดยไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อเติมลงไปในผลิตภัณฑ์นมที่มี pH ต่ำ เช่น โยเกิร์ต รวมถึงไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์นม UHT เนื่องจากเอนไซม์ถูกทำลายด้วยความร้อนสูงในกระบวนการฆ่าเชื้อนม



รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวานิลลินและโครงสร้าง Schiff base ของวานิลลิน

ที่มา : Weerawatanakorn et al. (2015)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน

ในระบบอาหาร โปรตีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำ ไขมัน น้ำตาล สารให้กลิ่นรส และส่วนประกอบในอาหารอื่น ๆ ได้ สำหรับสมบัติของการจับกลิ่นรสของโปรตีนนั้น ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนมีผลกระทบมากที่สุดต่อสมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีน (Damodaran and Kinsella, 1980) ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสามารถส่งผลกระทบต่อการจับกลิ่นรสของโปรตีนด้วย ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH Ionic strength และการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน (Damodaran and Kinsella, 1981b; O’Neill and Kinsella, 1987; Li et al., 2000; Chobpattana et al., 2002; Zhou et al., 2002; Kühn et al., 2007)

2.4.1 อุณหภูมิ

การให้ความร้อนมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนโดยไม่มีการทำลายพันธะโควาเลนต์ การให้ความร้อนเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการผลิตอาหาร โดยความร้อนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ ซึ่งอาจทำให้โปรตีนเกิดการคลายเกลียว (protein unfolding) หรือเกิดการรวมตัวกัน (aggregation) อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีนเป็นอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนมีผลกระทบต่อการจับของสารให้กลิ่นรส จากการศึกษาพบว่าความร้อนสูงขึ้นทำให้การเกิดอันตรกิริยาเพิ่มขึ้น (Ng et al., 1989; Gkionakis et al., 2007; Wang and Arntfield, 2015a) เนื่องจากโปรตีนเกิดการคลายเกลียวแล้วเผยส่วนไฮโดรโฟบิคที่ฝังตัวอยู่ภายในโครงสร้างออกมา ทำให้พื้นที่ในการจับเพิ่มมากขึ้น และพบว่าความร้อนอาจทำให้การเกิดอันตรกิริยาลดลง (O’Neill and Kinsella, 1987; Chobpattana et al., 2002; Kühn et al., 2008) เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนเกิดการรวมตัวกันทำให้ลดการจับของกลิ่นรสเพราะเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิคระหว่างโปรตีนกับโปรตีนแทนที่การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารให้กลิ่นรส O’Neill and Kinsella (1988) ศึกษาผลของการให้ความร้อน (75 °C) ต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง 2-nonanone กับ β-lactoglobulin พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนทำให้ค่าคงที่ในการจับ (K) ลดลง โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเกิดเนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (aggregation) ซึ่งพิสูจน์ได้จากผลเสปคตรัมของ fluorescence และผลการทดสอบจาก non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนมีมวลโมเลกุลที่สูงขึ้นหลังการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกันโดยการศึกษาของ Chobpattana et al. (2002) โดยศึกษาผลของการเสียสภาพของโปรตีนจากการให้ความร้อน (68 °C, 30 นาที และ 75 °C, 15 นาที) ต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับโปรตีนนม (BSA) พบว่าปริมาณของวานิลลินอิสระมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ความร้อนสารละลาย BSA เมื่อเทียบกับ BSA ที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน การที่ปริมาณของวานิลลินอิสระมากกว่านั้นเนื่องจากการจับของวานิลลินกับ BSA ลดลง ซึ่งเกิดจากความร้อนที่ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

นอกจากการให้ความร้อนแล้ว อุณหภูมิต่ำก็มีผลกระทบต่อการเกิดอันตรกิริยาของสารให้กลิ่นรสและโปรตีนด้วยเช่นกัน โดยที่ 5 °C โครงสร้างตติยภูมิและจตุรภูมิของโปรตีนถั่วเหลืองจะเกิดการเปลี่ยนแปลง ดังการศึกษาของ Damodaran and Kinsella (1981a) พบว่าค่าคงที่ในการจับของ 2-nonanone กับ SPI ที่ 5 °C (2000 M^{-1}) สูงกว่าที่ 25 °C และ 40 °C (930 M^{-1}) อาจเป็นเพราะอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิคภายในโครงสร้างของโปรตีนอ่อนแอที่ 5 °C ส่งผลให้หน่วยย่อยของโปรตีนเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ภายในโมเลกุลของโปรตีนเอง สายโซ่ของโปรตีนที่เกิดการคลายเกลียวจึงเผย

hydrophobic binding sites ออกมาด้านนอกมากขึ้น เป็นผลทำให้ความสามารถในการจับเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Li et al. (2000) ยังพบว่าการลดอุณหภูมิจาก 12 °C ไป 4 °C ทำให้จำนวนพื้นที่ในการจับ (n) ของ sodium caseinate, WPI, และ SPI เพิ่มขึ้น และค่าคงที่ในการจับของ sodium caseinate และ WPI เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ที่พบว่าจำนวนพื้นที่ในการจับ (n) ของ SPI ที่จับวานิลลินและมอลทอล (maltol) เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำลง (จาก25 °C ไป 5°C)

2.4.2 pH

pH มีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนเนื่องจากสามารถทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลง pH สามารถทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ และทำให้ประจุของโปรตีนเปลี่ยน ที่ pH เป็นกลาง โปรตีนส่วนมากจะมีความเสถียรเนื่องจากมี net electrostatic repulsive energy เล็กน้อย อย่างไรก็ตามที่ pH เป็นด่างพันธะ disulfide ในโมเลกุลของโปรตีนสามารถถูกทำลายได้ ทำให้เกิดการคลายเกลียวของโปรตีน ซึ่งโดยปกติจะเป็นผลให้เกิดการจับของกลิ่นรสที่เพิ่มมากขึ้น Zhou et al. (2002) ศึกษาผลของ pH (4.5, 7 และ 9) ต่อสมบัติการจับของ 2-pentyl pyridine (2PP) กับโปรตีนถั่วเหลืองพบว่า 2PP จับกับโปรตีนถั่วเหลือง (SPI, β-conglycinin และ glycinin) ได้อย่างแข็งแรงภายใต้สภาวะด่าง ตามด้วยสภาวะที่เป็นกลางและกรดตามลำดับ อย่างไรก็ตามในสภาวะที่เป็นด่างสูงอาจทำให้การจับลดลงเนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพได้ดังการศึกษาของ Jouenne and Crouzet (2000) พบว่าการจับกันของสารให้กลิ่น (methylketones, ester และ terpenes) กับ β-lactoglobulin เพิ่มขึ้นระหว่าง pH 3 และ 9 แต่พบว่าการจับจะลดลงมากที่สุดที่ pH 11 เนื่องจาก β-lactoglobulin เกิดการเสียสภาพภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง Wang and Arntfield (2015b) ศึกษาผลของ pH (3-11) ต่อการจับกลิ่นรสของคีโตน (2-hexanone, 2-heptanone และ 2-octanone) และโปรตีนถั่วพบว่า การจับกลิ่นรสเกิดขึ้นน้อยที่สุดที่สภาวะกรด (pH 3) ให้ผลที่สอดคล้องกับ Semenova et al. (2002) ซึ่งพบว่า native 11S globulin (legume) มีความสามารถในการจับกับ hexyl acetate มากที่สุดที่ pH 7.2 และต่ำสุดที่ pH 3 ซึ่งโปรตีนเกิดการเสียสภาพ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Heng et al. (2004) ที่ทำการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกลุ่มอัลดีไฮด์และคีโตนกับโปรตีนถั่ว พบว่าโปรตีนถั่วจับกับอัลดีไฮด์ที่ pH 7.6 เท่านั้นและไม่เกิดการจับกับอัลดีไฮด์หรือคีโตนที่ pH 3.8

2.4.3 ionic strength

ionic strength มีผลกระทบต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีน เนื่องจากมีผลในการทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง Pérez-Juan et al. (2007) ศึกษาผลของเกลือคลอไรด์ที่แตกต่างกัน (NaCl, KCl, $MgCl_2$ และ $CaCl_2$) ต่อความสามารถในการจับของโปรตีน porcine พบว่า NaCl และ KCl ทำให้ความเข้มข้นของสารระเหย (อัลดีไฮด์และคีโตน) บริเวณ headspace เพิ่มขึ้นมากกว่า 5-10 เท่า ในขณะที่ $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ มีผลเพียงเล็กน้อย (เพิ่มขึ้น 2 เท่า) ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Poll and Flink (1984) พบว่าเมื่อเติม NaCl ลงในน้ำแอปเปิ้ล ความเข้มข้นของสารระเหยของ alcohol, aldehyde และ ester บริเวณ headspace เพิ่มขึ้นมากกว่า 4 เท่า, 1.75-3.5 เท่า และ 1.75 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับน้ำแอปเปิ้ลที่ไม่มีการเติม NaCl Guichard (2002) ระบุว่าการเติมเกลือที่ละลายได้ในสารละลายสามารถช่วยขับเคลื่อนสารระเหยอินทรีย์จากเฟสของเหลวไปยังเฟสของแก๊สได้ ทำให้ความเข้มข้นของสารระเหยใน headspace เพิ่มมากขึ้น (salting out) โดยปริมาณความเข้มข้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของเกลือและสารให้กลิ่นรสที่ใช้ และยังพบอีกว่าการเกิด salting out เป็นสาเหตุที่ทำให้ลดการจับของ benzaldehyde โดย β-lactoglobulin ซึ่งสอดคล้องกับ Zhou et al. (2002) ซึ่งพบว่าการจับของ 2PP ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเกิดการทำลายเสถียรภาพของอันตรกิริยา electrostatic

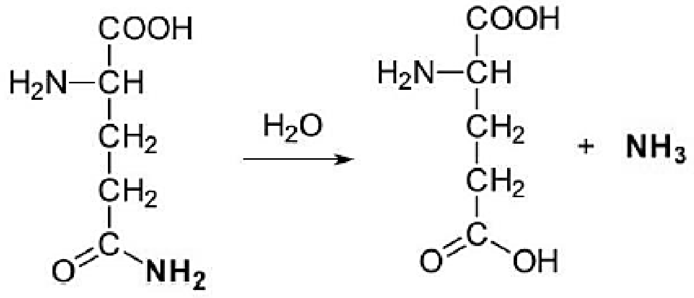
2.4.4 การดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน

การดัดแปรโครงสร้างด้วยวิธีทางเคมีเช่นวิธี succinylation, acetylation, ethylation และ deamidation ทำเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เมื่อหมู่ข้างของโปรตีนถูกดัดแปรโดยทั่วไปจะทำให้ความมีขั้ว และอาจทำให้ประจุรวมของโปรตีนเปลี่ยนแปลง ดังนั้นโครงสร้างของโปรตีนอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากการขดเกลียว คลายเกลียว หรือเกิดการรวมตัวของโมเลกุลโปรตีน (Suppavorasatit and Cadwallader, 2010) Damodaran and Kinsella (1981b) พบว่าการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธี succinylation ทำให้ค่าคงที่ในการจับ (K) กับ 2-nonanone ลดลง เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งยืนยันได้จากการเปลี่ยนแปลง fluorencence ของโปรตีนถั่วเหลือง แต่อย่างไรก็ตาม Wang and Arntfield (2016a) พบว่าการดัดแปรโปรตีนถั่วด้วยวิธี acetylation และ succinylation ทำให้การจับกันของโปรตีนกับ 2-octanone และ dibutyl disulfide เพิ่มขึ้น แต่ทำให้การจับกันของโปรตีนกับ octanal และ hexyl acetate ลดลง O’Neill and Kinsella (1987) ศึกษาการจับกันของ 2-nonanone กับ β-lactoglobulin ที่ไม่ผ่านการดัดแปรเทียบกับ β-lactoglobulin ที่ดัดแปรด้วยวิธี ethylation

(ethyl esterification) และลดพันธะ disulfide ด้วยโซเดียมซัลเฟต พบว่าการจับกันลดลงหลังจากการดัดแปร เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนซึ่งเป็นผลมาจากการเสียเสถียรภาพของหมู่คาร์บอกซิลิกอิสระที่ถูก esterified จึงทำให้โครงสร้างดั้งเดิมของโปรตีนคลายเกลียว และเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิคกับโปรตีนโมเลกุลอื่น ๆ

2.5 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันต่อการจับกลิ่นรส

ดีแอมิเดชันเป็นกระบวนการดัดแปรโปรตีนวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีน โดยการทำปฏิกิริยาดีแอมิเดชันสามารถเปลี่ยนโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนโดยการเปลี่ยนหมู่เอไมด์ในกลูตามีน (Gln) และแอสปาราจีน (Asn) ไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลและปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาตามรูปที่ 2.5 ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปลดปล่อยมานี้ถือเป็นตัวบ่งชี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของดีแอมิเดชันได้ (Hamada, 1992)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันของกลูตามีน

ที่มา: Hamada (1992)

ดีแอมิเดชันสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และการใช้เอนไซม์ การใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้วิธีทางเคมี คือ มีความจำเพาะสูง เกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่รุนแรง สามารถควบคุมได้ง่าย ลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงและมีความปลอดภัย เอนไซม์ที่สามารถใช้ทำปฏิกิริยาดีแอมิเดชันได้เช่น peptidoglutaminases, transglutaminases, proteases และ protein glutaminase (PG) การดัดแปรโดยใช้ enzymatic deamidation สามารถลดการจับกันระหว่างโปรตีนและสารให้กลิ่นรสลงได้เนื่องจากการดัดแปรทำให้สูญเสียหมู่เอไมด์ทำให้ความสามารถในการที่จะเกิดพันธะโควาเลนต์กับสารให้กลิ่นรสลดลง Lozano (2009) ศึกษาผลของการดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยดีแอมิเดชัน

โดยวิธีทางเคมีต่อการจับกลิ่นรสโดยใช้เทคนิค IGC พบว่าการใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) สำหรับทำดีแอมิเดชันทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดลดลง ต่อมา Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ศึกษาผลของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองโดยเอนไซม์ PG ต่อสมบัติการจับกลิ่นรสโดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis พบว่าความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall binding affinity) ของวานิลลินและมอลทอลกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรลดลง ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการศึกษาอันตรกิริยาของสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยการใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัส ซึ่ง Suppavorasatit et al. (2013) ได้ศึกษาผลของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดย PG ต่อสมบัติการจับกลิ่นรสของนมถั่วเหลือง โดยใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้กลิ่นได้ (odor detection threshold) ของวานิลลินและมอลทอลในนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร ซึ่งหมายถึงความสามารถในการจับกลิ่นรสของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรลดลง

2.6 การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส

เอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG; EC 3.5.1) เป็นเอนไซม์ที่มีรายงานการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 2000 จากแบคทีเรีย *Chryseobacterium proteolyticum* strain 9670 ที่พบในดิน (Yamaguchi and Yokoe, 2000) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถทำปฏิกิริยาดีแอมิเดชันได้และยังมีความจำเพาะสูง คือสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันในกลูตามีนที่อยู่ในสายโปรตีนได้ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับกลูตามีนอิสระ แอสปาราจีน และเอไมด์ตัวอื่น ๆ PG แตกต่างจากเอนไซม์กลูทามิเนสชนิดอื่น ๆ คือไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเช่น cross-linking เหมือนกับทรานกลูตามิเนส ไม่เกิดการไฮโดรไลซิสของเปปไทด์เหมือนกับ โปรตีเอส และไม่จำกัดการเร่งปฏิกิริยาเฉพาะในเปปไทด์สายสั้นเท่านั้นเหมือนกับเปปทิโดกลูตามิเนส

นอกจากนี้ยังมีการนำ PG ไปใช้ในการศึกษาผลของการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันต่อสมบัติต่าง ๆ ในโปรตีนหลายชนิดเช่น α-lactalbumin, α-zein, wheat gluten, skim milk, rice glutelin โปรตีนจากถั่วเหลือง โปรตีนจากโอ๊ต และโปรตีนมะพร้าว (Gu et al., 2001; Yong et al., 2004; Miwa et al., 2010; Liu et al., 2011; Suppavorasatit et al., 2011; Jiang et al., 2015; Kunarayakul et al., 2018) จากการศึกษาพบว่า การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้ดีขึ้นได้เช่น ความสามารถในการละลาย (solubility) เนื่องจากการทำดีแอมิเดชันทำให้ค่า pI ลดลงซึ่งเกิดจากการที่มีประจุลบของหมู่

คาร์บอกซิลมากขึ้นทำให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้นที่ค่า pH เป็นกรด นอกจากนี้การทำดีแอมิเดชันยังทำให้โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้โปรตีนเกิดการคลายเกลียว เนื่องจากเกิดแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลที่เกิดขึ้น ซึ่งการคลายเกลียวของโปรตีนนี้ทำให้หมู่ไฮโดรโฟบิกที่ฝังตัวอยู่ด้านในโครงสร้างของโปรตีนเผยออกมาสู่ด้านนอก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสมบัติการเกิดโฟม (foaming capacity) และการเกิดอิมัลชัน (emulsification properties) อีกทั้งยังสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านการจับกลิ่นรส (flavor-binding property) ระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall flavor binding affinity) ระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนลดลงอีกด้วย (Suppavorasatit and Cadwallader, 2012; Suppavorasatit et al., 2013)

2.7 โปรตีนจากมะพร้าว

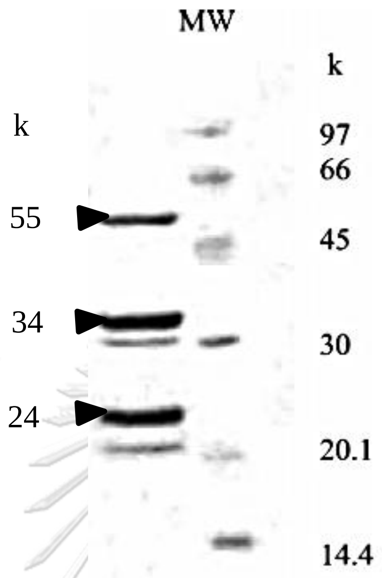
โปรตีนจากมะพร้าวสามารถสกัดได้จากหางกะทิ (coconut skim milk) ซึ่งถือเป็นผลิตผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (virgin coconut oil) โดยปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนจากมะพร้าวจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดที่ใช้

2.7.1 molecular mass distribution

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

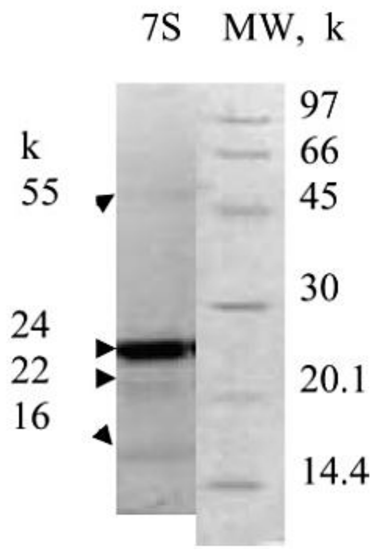
จากการศึกษาพบว่าโปรตีนหลักในมะพร้าวคือ 11S กลอบูลิน หรือที่เรียกว่า cocosin และ 7S กลอบูลิน โดย Carr et al. (1990) รายงานว่า cocosin มีน้ำหนักโมเลกุล 300-360 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนขนาด 22 และ 30 kDa DeMason and Sekhar (1990) รายงานว่าโปรตีนจากมะพร้าวจะแสดงแถบโปรตีนหลัก 7 แถบในช่วง 17–55 kDa (17, 20, 22, 25, 31, 34, และ 55 kDa) Kwon et al. (1996) รายงานผลที่คล้ายคลึงกันว่าโปรตีนจากมะพร้าวจะแสดงแถบโปรตีนหลัก 7 แถบในช่วง 14-52 kDa ในเวลาต่อมา Garcia et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนจากมะพร้าวโดยใช้วิธี SDS-PAGE และสรุปว่าโปรตีนหลักในมะพร้าวประกอบไปด้วย โปรตีนกลุ่ม 11S และ 7S กลอบูลินโดยมีปริมาณร้อยละ 86 และ 14 ตามลำดับ โปรตีนจากมะพร้าวส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม 11S ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 326 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในการทำ SDS-PAGE ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 24, 34, และ 55 kDa ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยแถบโปรตีนขนาด 55 kDa เกิด

จากการรวมตัวของแถบโปรตีนขนาด 24 และ 34 kDa และโปรตีนกลุ่ม 7S มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 156 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 16, 22 และ 24 kDa ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.6 การกระจายตัวของโปรตีน 11S กลอบูลิน (cocosin) จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

ที่มา: Garcia et al. (2005)



รูปที่ 2.7 การกระจายตัวของโปรตีน 7S กลอบูลิน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

ที่มา: Garcia et al. (2005)

2.7.2 คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนมะพร้าว

โปรตีนจากมะพร้าวประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดที่จำเป็นเช่น lysine methionine และ tryptophan (DebMandal and Mandal, 2011) และชนิดที่ไม่จำเป็นหลายชนิด โดยมี glutamic acid และ arginine เป็นองค์ประกอบหลัก (เพ็ญพรรณ, 2556; Rasyid et al., 1992; Onsaard et al., 2006; Thaiphanit et al., 2016; Kunarayakul et al., 2018) ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีส่วนช่วยในการส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ จากการศึกษาพบว่าในทางการแพทย์โปรตีนจากมะพร้าวมีฤทธิ์ควบคุมระดับน้ำตาลซึ่งช่วยป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน (Salil et al., 2011) ควบคุมระดับซีรัมคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ (เพ็ญพรรณ, 2556; Remya et al., 2013) ช่วยลดภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งการลดความเสี่ยงในสภาวะดังกล่าวเป็นผลมาจากกรดอะมิโน L-arginine ที่มีอยู่ในโปรตีนจากมะพร้าว (Salil and Rajamohan, 2001) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Thaiphanit and Anprung, 2013) และกรดอะมิโนจำเป็นทั้งหมดที่พบในโปรตีนจากมะพร้าวมีมากเพียงพอสำหรับความต้องการของผู้ใหญ่ตามคำแนะนำของ FAO/WHO (Thaiphanit and Anprung, 2014)

2.7.2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนจากมะพร้าวมีกรดอะมิโนทั้งหมด 18 ชนิดประกอบด้วย กรดอะมิโนชนิดจำเป็น 9 ชนิด และกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็น 9 ชนิด โดยมี glutamic acid, arginine และ aspartic acid เป็นองค์ประกอบหลัก (Rasyid et al., 1992; Onsaard et al., 2006; Thaiphanit and Anprung, 2014) โดยโปรตีนจากมะพร้าวมีกรดอะมิโนจำเป็นครบทั้ง 9 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 Rasyid et al. (1992) พบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนมะพร้าวมีปริมาณ glutamic acid ร้อยละ 16.63-17.79, arginine ร้อยละ 8.78-13.01, และ aspartic acid ร้อยละ 9.36-11.12 ในขณะที่ Thaiphanit and Anprung (2014) รายงานว่ามีปริมาณ glutamic acid, arginine, และ aspartic acid ร้อยละ 24.88, 14.03, และ 9.93 ตามลำดับ นอกจากนี้ Kunarayakul et al. (2018) ได้ผลที่คล้ายคลึงกันคือพบว่ามีปริมาณ glutamic acid, arginine, และ aspartic acid ร้อยละ 24.61, 15.96, และ 9.70 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนจากมะพร้าว

essential amino acid	g/100 g	non-essential amino acid	g/100 g
Histidine	2.2925	Alanine	3.6468
Isoleucine	2.0545	Arginine	12.2219
Leucine	4.7699	Aspartic acid	8.6481
Lysine	3.3476	Cysteine	1.6299
Methionine	1.5512	Glutamic acid	21.6721
Phenylalanine	4.3078	Glycine	3.9061
Threonine	2.7611	Proline	3.3710
Tryptophan	1.3807	Serine	4.1111
Valine	3.3253	Tyrosine	2.1073

ที่มา : Thaiphanit and Anprung (2014)

2.7.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว

การนำโปรตีนไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นขึ้นอยู่กับสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งโปรตีนจากพืชอาจมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้เนื่องจากขาดสมบัติเชิงหน้าที่บางประการ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ของโปรตีนจากมะพร้าวมากขึ้นได้แก่ สมบัติการละลาย สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน สมบัติการเกิดอิมัลชัน และสมบัติการเกิดโฟม

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติที่สำคัญสมบัติหนึ่งของโปรตีน ซึ่งเป็นสมบัติที่บ่งชี้การนำโปรตีนไปใช้งาน ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวขึ้นอยู่กับวิธีในการสกัดโปรตีน จากการศึกษาพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวจะต่ำที่สุดที่ช่วง pH 4-5 (Naik et al., 2012; Thaiphanit and Anprung, 2013; Kunarayakul et al., 2018; Rodsamarn and Sothornvit, 2018) เนื่องจาก pH ใกล้เคียงกับค่า pI ของโปรตีนจากมะพร้าวซึ่งเท่ากับ pH 4 และพบว่าความสามารถในการละลายสูงที่สุดในช่วงกรด (pH 2) หรือด่าง (pH 11) เข้มข้น (Rodsamarn and Sothornvit, 2018)

สมบัติการเกิดอิมัลชันนั้นเป็นสมบัติที่ทำให้สามารถประยุกต์ใช้โปรตีนจากมะพร้าวในอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลาย เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นอิมัลชัน สมบัติการเกิดอิมัลชันคือความสามารถของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในระบบอิมัลชันเพื่อให้อิมัลชันเกิดความเสถียร จากการศึกษาพบว่าโปรตีนจากมะพร้าวมีสมบัติในการเกิดอิมัลชันที่ดี (Naik

et al., 2012; Rodsamarn and Sothornvit, 2018) ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดนั้นจะขึ้นกับชนิดของน้ำมันที่ใช้ทำอิมัลชันด้วย เช่น Thaiphanit et al. (2016) ศึกษาการเกิดอิมัลชันของโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมัน 2 ชนิด คือ น้ำมันมะกอก และน้ำมันดอกทานตะวัน พบว่าค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying activity index; EAI) ของอิมัลชันทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ 40 m^2/g ในขณะที่ค่าความเสถียรของอิมัลชัน (emulsifying stability index; ESI) มีความแตกต่างกันโดยอิมัลชันที่ใช้น้ำมันมะกอกมีค่า ESI = 120 นาที และอิมัลชันที่ใช้น้ำมันดอกทานตะวันมีค่า ESI = 15 นาที นอกจากนี้ Kunarayakul et al. (2018) ศึกษาสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมันปาล์มพบว่า EAI และ ESI มีค่า 52.46 m^2/g และ 53.41 min ตามลำดับ Rodsamarn and Sothornvit (2018) ศึกษาสมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองพบว่า EAI และ ESI มีค่า 38.54 m^2/g และ 17.23 min ตามลำดับ

สมบัติการเกิดโฟมคือความสามารถในการห่อหุ้มอากาศที่บริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว และคงรูปโฟมดังกล่าวไว้ได้ ซึ่งสมบัติการเกิดโฟมนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารกลุ่มเครื่องดื่ม มูส และ whipped toppings ได้ จากการศึกษาพบว่างานวิจัยเกี่ยวกับสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนจากมะพร้าวนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด Kunarayakul et al. (2018) ศึกษาสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนมะพร้าวพบว่า โปรตีนมะพร้าวมีค่า foaming capacity 6.86 % และมีค่าลดลงเมื่อทำการดัดแปรโปรตีนด้วยการทำดีแอมิเดชัน ส่วนค่า foaming stability ลดลงตามระยะเวลา และยังพบอีกว่าค่าความเสถียรของโฟมลดลงเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร นอกจากนี้ Rodsamarn and Sothornvit (2018) ยังรายงานค่า foaming capacity ของโปรตีนมะพร้าวซึ่งมีค่าเท่ากับ 50 % และค่า foaming stability เท่ากับ 17.5 %

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

หางกะทิจากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบสกัดเย็น (บริษัทน้ำมันมะพร้าวไทย จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร)

เอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG) “Amano” 500 (Amano Enzyme, Japan)

3.1.2 สารเคมี

sodium hydroxide	(A.R.)
hydrochloric acid	(A.R.)
sulfuric acid	(A.R.)
boric acid	(A.R.)
kjeldahl tablet	(A.R.)
methyl red	(A.R.)
methylene blue	(A.R.)
ethanol	(A.R.)
petroleum ether	(A.R.)
sodium di-hydrogen phosphate	(A.R.)
di-potassium hydrogen phosphate	(A.R.)
citric acid	(A.R.)
trichloroacetic acid (TCA)	(A.R.)
bovine serum albumin (99%)	(A.R.)
Tris-buffer saline (TBS)	(A.R.)
acetic acid	(A.R.)
sodium dodecyl sulfate (SDS)	(A.R.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

gel electrophoresis reagent (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

- LDS sample buffer
- reducing agent
- antioxidant agent
- protein marker (Seeblue plus 2 pre-stain)

simply blue safe stain (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

ammonia colorimetric assay kit II (Biovision Inc., Milpitas, CA)

DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)

vanillin ReagentPlus®, 99 % (Sigma-Aldrich Co.)

vanillin-d_3 (สังเคราะห์ตามวิธีของ Schneider and Rolando, 1992)

diethyl ether (99%) (A.R.)

methylene chloride (A.R.)

dimethyldichlorosilane (A.R.)

toluene (A.R.)

methanol (A.R.)

3.1.3 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)

pH meter (Mettler Toledo รุ่น Sevencompact, Switzerland)

refrigerate centrifuge (BECKMAN COUTER รุ่น Avanti J-E, USA)

refrigerate centrifuge (Mikro รุ่น 22R Hettich, Germany)

digester (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)

scrubber (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)

distillation Unit (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

soxhlet extractor (รุ่น Gerhardt)

freeze dryer (Heto Drywinner8 (SE-TM-034, Scientific Promotion, Co., Ltd., Denmark)

test sieve 20 Mesh (Endecotts, UK)

water bath (GFL รุ่น 1083, Germany)

water bath (Heto รุ่น OBNI8)

rotary evaporator (Buchi รุ่น R-114, Switzerland)

hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK)

dialysis tubing (SnakeSkin, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

microplate reader (ASYS รุ่น UVM340, Biochrom Ltd., UK)

incubator (Heraeus รุ่น B5042, Germany)

gel electrophoresis XCell SureLock (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

Bis-Tris pre-cast gels (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

microwave (LG รุ่น MC766YS, South Korea)

gel documentation and analysis software (รุ่น InGeniusL, SYNGENE, Synoptics Ltd., UK)

cooling pump (EYELA cool รุ่น ace CA-1111, Tokyo rikakikai Co., Ltd., Japan)

hot plate stirrer (IKA)

vortex mixer (Genie2 รุ่น G560E, Scientific industries, Inc., USA)

Amicon Ultra-4 centrifugal filters 4 mL-3K (Merck Milipore Ltd. Tullagreen, Carrigtwohill Co., Ireland)

autoclave (high pressure steam sterilizer รุ่น TOMY SX-700)

gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)

-GC system (Agilent technologies รุ่น 7890B, USA)

-MS (Agilent technologies รุ่น 7000D GC/MS Triple Quad, USA)

-ultra inert inlet liners splitless (Agilent technologies, USA)

2 mL glass vials (Target DP vials, Nationalscientific, USA)

2 ml amber vials/Teflon-lined storage caps (Nationalscientific, USA)

20 ml vials/Teflon-lined caps (USA)

sniff bottle (wash bottle FEP, Nalgene, USA)

Insert vials (300 µL Target polyspring insert conical, silanized, Langerwehe, Germany)

10 µL syringe (SGE Analytical Science, Australia)

PTFE stirring bar (cowie, UK)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

สกัดโปรตีนจากหางกะทิโดยดัดแปลงจากวิธีของ Kunarayakul et al. (2018) ทำโดยปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 1 N ให้เป็น 3.9 เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,900 xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างตะกอนซ้ำ 4 รอบ จากนั้นนำไป dialysis ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 M นำโปรตีนที่สกัดได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นสกัดไขมันออกด้วยวิธี soxhlet (AOAC, 2000) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) โดยใช้ conversion factor เป็น 6.25 (Thaiphanit et al., 2016) โดยสุดท้ายให้มีปริมาณโปรตีนอย่างน้อยร้อยละ 90 วัดปริมาณความชื้นของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้ (AOAC, 2000) ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh และเก็บรักษาตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวดัดแปร

ละลายโปรตีนมะพร้าวในซิเตรตฟอสเฟตบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 M (pH = 7) อัตราส่วน 1:3 กวนผสมตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วเติมเอนไซม์ PG ให้มีความเข้มข้น 36 U/g protein (Kunarayakul et al., 2018) กวนผสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °C และคงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บรักษาตัวอย่างโปรตีนที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.2.1 degree of deamidation (DD) (ตามวิธีของ Suppavorasatit et al. (2011) และ Kunarayakul et al. (2018))

นำส่วนใสของตัวอย่างมาวัดปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปลดปล่อยโดยใช้ ammonia colorimetric assay kit II (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.5) ค่า DD คำนวณจากปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างเทียบกับปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 N ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ย่อยอย่างสมบูรณ์)

3.2.2.2 degree of hydrolysis (DH) (ตามวิธีของ Suppavorasatit et al. (2011) และ Kunarayakul et al. (2018))

นำส่วนใสของตัวอย่างมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายโดยใช้ DC protein assay (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.6) ค่า DH คำนวณจากปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับในข้อ 3.2.2.1

3.2.3 molecular mass distribution

Molecular mass distribution ของโปรตีนศึกษาโดยการทำ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Kunarayakul et al. (2018) และใช้ Novex NuPAGE SDS-PAGE gel system (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., US) ละลายโปรตีนมะพร้าวในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมะพร้าว 100 ไมโครลิตร ผสมกับ LDS sample buffer 25 ไมโครลิตร และ reducing agent 10 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติม MES buffer 500 มิลลิลิตรและ antioxidant agent 500 ไมโครลิตรลงใน chamber ของเครื่อง XCell SureLockTM Mini-Cell Electrophoresis จากนั้นหยอดส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงได้ปริมาณ 15 ไมโครลิตรในช่องเจล Bis-Tris pre-cast gels โดยใช้ SeeBlue plus 2 pre-stain เป็น protein marker และนำไปผ่านกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ 30 mA เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง 35 นาที เมื่อครบเวลาล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในเครื่องไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุดเป็นเวลา 45 วินาทีและเทน้ำออก ล้างน้ำกลั่นซ้ำจำนวน 3 รอบ จากนั้นย้อมเจลด้วย Simple Blue Safe Stain นำเจลที่แช่สีย้อมไปเข้าไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุดเป็นเวลา 45 วินาที และแช่เจลทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีก่อนจะล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยโปรแกรม software GeneSnap version 6.8 (SynGene, UK)

3.2.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

ศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโดยวิธีดีแอมิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร โดยสารให้กลิ่นรสที่เลือกมาศึกษา ได้แก่วานิลลิน (vanillin) เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอร์นิลในโครงสร้าง (ดังแสดงในรูปที่ 2.3) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยทั่วไป และเป็นสารที่นิยมใช้ในการศึกษาด้านสมบัติการจับกลิ่นรส (Li et al., 2000; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012;

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Suppavorasatit et al., 2013) ทำให้สามารถเปรียบเทียบผลที่ได้กับงานวิจัยที่มีผู้ศึกษากับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ได้

3.2.4.1 การแยกและหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ (free [unbound] flavor compound)

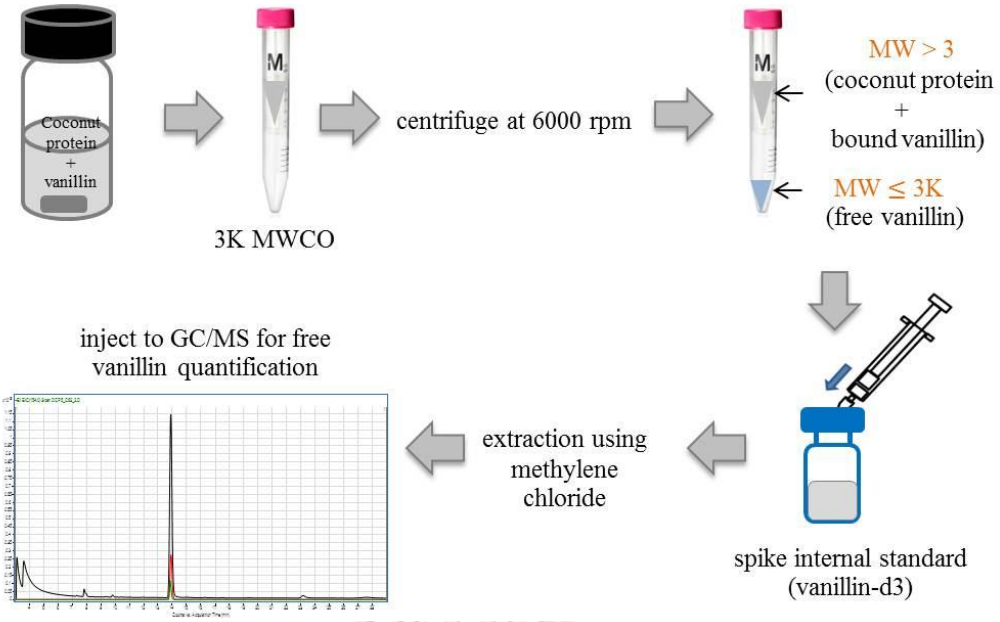
การแยกและหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ ดัดแปลงจากวิธีของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) แสดงในรูปที่ 3.1 โดยนำสารละลายผสมระหว่างโปรตีนและสารให้กลิ่นรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 3 มิลลิลิตร ใส่ใน Amicon Ultra-4 centrifugal filter tube ที่มี molecular weight cutoff เท่ากับ 3 K (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill Co., IRELAND) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (เช่น 5, 15, และ 25 °C) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง (permeate) 0.5 มิลลิลิตร มาเติม vanillin-d_3 (internal standard; i.s.) ที่มีความเข้มข้น 920 ppm ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปสกัดด้วย methylene chloride ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร นำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) และคำนวณหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระจากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.1

$$\text{mass of flavor compound} = \text{mass of i.s.} \times f_i \times \frac{\text{peak area of flavor compound}}{\text{peak area of i.s.}} \qquad (3.1)$$

เมื่อ f_i คือ MS response factor (แสดงวิธีในภาคผนวก จ.1)

i.s. คือ internal standard

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการแยกและหาปริมาณวานิลลินอิสระ
(ดัดแปลงมาจาก Suppavorasatit and Cadwallader (2012))

3.2.4.2 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS)

การวิเคราะห์ปริมาณวานิลลินอิสระ ตามวิธีของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ทำโดยฉีดตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในเครื่อง GC-MS (GC system (Agilent technologies รุ่น 7890B, USA); MS (Agilent technologies รุ่น 7000D GC/MS Triple Quad, USA)) โดยใช้ hot splitless mode (250 °C) ซึ่งต่อกับคอลัมน์ชนิด DB-WAX (30 m x 250 μm i.d. x 0.25 μm film thickness; J&W, Agilent, USA) ตั้งค่าโปรแกรมของ oven ให้เพิ่มอุณหภูมิจาก 150 °C ไป 220 °C ที่อัตรา 10 °C ต่อนาที โดยมี initial และ final holding time เป็น 2 และ 20 นาทีตามลำดับ สภาวะของ mass selective detector (MSD) เป็นดังนี้ อุณหภูมิของ transfer line คือ 250 °C ; ionization voltage คือ 70 eV; ช่วงของ mass (scan mode) คือ 35-400 amu; scan rate คือ 4.2 cycle/s.

3.2.4.3 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส (flavor binding equilibration time)

ตามวิธีของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 3 % (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH = 7.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืนเพื่อให้โปรตีนเกิดการ hydration อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมสารละลายวานิลลินให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดแก้วที่ผ่านการกำจัดความมีขั้ว (แสดงวิธีในภาคผนวก ง.1) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาที่ lined ด้วย teflon ให้สนิท นำไปบ่มและกวนผสมตลอดเวลาที่อุณหภูมิคงที่ (5, 15, และ 25 °C) ชักตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ (ตามวิธีในข้อ 3.2.4.1) พิจารณาเวลาที่จุดสมดุล ของแต่ละอุณหภูมิจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระกับเวลาที่อุณหภูมิคงที่นั้น ๆ โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ

3.2.4.4 การหาสมบัติในการจับกลิ่นรส (flavor binding properties)

หา binding properties ตามวิธีของ Li et al. (2000) และ Chobpattana et al. (2002) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 3 % (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH = 7.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืนเพื่อให้โปรตีนเกิดการ hydration อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมสารละลายวานิลลินให้มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดแก้วที่ผ่านการกำจัดความมีขั้ว (แสดงวิธีในภาคผนวก ง.1) ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาที่ lined ด้วย teflon ให้สนิท นำไปบ่มและกวนผสมที่อุณหภูมิคงที่แต่ละอุณหภูมิ (5, 15, และ 25 °C) จนถึงจุดสมดุล หาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระที่จุดสมดุล โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 2 ซ้ำ

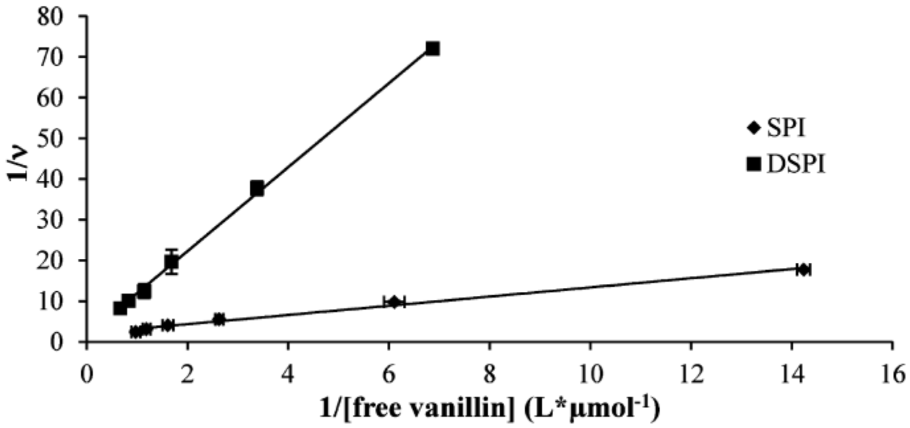
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำนวณหาปริมาณของพื้นที่ที่โปรตีนจับกับสารให้กลิ่นรส (number of binding site, n) และค่าคงที่ของการจับ (binding constant, K) จากกราฟ Klotz plot (แสดงตัวอย่างดังรูปที่ 3.2) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของจำนวนโมลของสารให้กลิ่นรสที่ถูกจับต่อจำนวนโมล ของโปรตีนทั้งหมด ($\frac{1}{\nu}$) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระ ($\frac{1}{[L]}$) โดยตัวอย่าง Klotz plot แสดงในสมการที่ 3.2

$$\frac{1}{\nu} = \frac{1}{n} + \frac{1}{Kn\,[L]} \qquad (3.2)$$

เมื่อ ν คือ จำนวนโมลของสารให้กลิ่นรสที่ถูกจับต่อจำนวนโมลของโปรตีนทั้งหมด

[L] คือ ความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระ



รูปที่ 3.2 ตัวอย่าง Klotz plot ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการดัดแปร (SPI) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (DSPI) ที่อุณหภูมิ 25 ℃

ที่มา : Suppavorasatit and Cadwallader (2012)

3.2.4.5 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic parameters)

คำนวณค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์จากค่าคงที่ของการจับกัน (K) ที่ได้ด้วยวิธีจากข้อ 3.2.4.4

3.2.4.5.1 ค่าพลังงานเสรีของการจับกัน (Gibb’s free energy of binding, ΔG°) คำนวณได้จากสมการที่ 3.3

$$\Delta G^{\circ} = -RT\ln K \qquad (3.3)$$

เมื่อ R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (1.9859 $calK^{-1}mol^{-1}$)

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (absolute temperature; Kelvin, K)

3.2.4.5.1 ค่าเอนทาลปีของการจับกัน (enthalphy of binding, ΔH^{o}) คำนวณได้จาก สมการ van’t Hoff ดังแสดงในสมการที่ 3.4

$$\Delta H^{o} = \frac{-R d\ln K}{d(1/T)} \qquad (3.4)$$

เมื่อ K คือ ค่าคงที่ในการจับกัน

3.2.4.5.2 ค่าเอนโทรปีของการจับกัน (entropy of binding, ΔS^{o}) คำนวณได้จาก สมการที่ 3.5

$$\Delta S^{o} = \frac{\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ}}{T} \qquad (3.5)$$

3.2.5 การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

ศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น (odor detection thresholds) ตามวิธีของ ASTM E697-04 (2004) โดยเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปร เตรียมตัวอย่างโดยละลายโปรตีนมะพร้าวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH = 7.0) ในขวดดมกลิ่น (sniff bottle) ที่ทำมาจาก teflon จากนั้นเติมสารให้กลิ่นรสวานิลลินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ความเข้มข้น (แสดงในภาคผนวก ฉ.1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนทดสอบทางประสาทสัมผัส ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ ในการทดสอบใช้ผู้ทดสอบจำนวน 27 คน (ชายและหญิงอายุระหว่าง 20-60 ปี) ซึ่งคัดเลือกผู้ทดสอบโดยพิจารณาจากผลการทดสอบเบื้องต้น โดยใช้การทดสอบแบบ 3-alternative forced choice (3-AFC) โดยผู้ทดสอบดมกลิ่นตัวอย่าง 6 ชุดที่มีความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสแตกต่างกัน ชุดละ 3 ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดตัวอย่างจะประกอบไปด้วยตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารให้กลิ่นลงไป (blank) 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีการเติมสารให้กลิ่นลงไป 1 ตัวอย่าง แล้วให้ผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างที่สามารถรับรู้กลิ่นได้เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น โดยลำดับการดม เริ่มจากชุดที่มีความเข้มข้นของสารให้กลิ่นต่ำไปสูง และทำการดมตัวอย่างทีละชุด จากนั้นคำนวณค่า best estimate threshold (BET) โดยคำนวณและแสดงค่าเป็นค่า BET ของกลุ่มผู้ทดสอบ (เฉลี่ยจากผู้ทดสอบแต่ละคน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 (IBM Corp., USA.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

การสกัดโปรตีนมะพร้าวมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 เนื่องจากต้องการให้โปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้มีปริมาณโปรตีนที่เข้มข้น จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริค (pH = 3.9) สกัดไขมันออกโดยใช้ petroleum ether เป็นตัวทำละลายและทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีค่าความชื้น ปริมาณโปรตีน และปริมาณไขมันเป็นร้อยละ 5.55, 92.97, และ 0.17 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยมีปริมาณผลผลิตโปรตีน yield ร้อยละ 2.96

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ

Constituents	Mean ± SD %(w/w)
Moisture	5.55 ± 0.27
Protein	92.97 ± 0.20
Fat	0.17 ± 0.02

ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวดัดแปร

การดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส ทำในสภาวะที่เหมาะสมเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดดีแอมิเดชันสูงและเกิดไฮโดรไลซิสต่ำ กล่าวคือมีค่า degree of deamidation (DD) สูง และมีค่า degree of hydrolysis (DH) ต่ำ โดยสภาวะดังกล่าวคือ E/S ratio เท่ากับ 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 °C และ pH เท่ากับ 7.0 ซึ่งเป็นสภาวะที่ได้จากการศึกษาโดย Kunarayakul et al. (2018) โดยใช้เวลาในการดัดแปร 1 ชั่วโมงพบว่ามีค่า DD และ DH ร้อยละ 36.12 และ 3.18 ตามลำดับ ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากการที่โปรตีนมะพร้าวที่สกัดมาดัดแปรนั้น ไม่ได้มีขั้นตอนการยับยั้งของเอนไซม์ดั้งเดิมภายในโปรตีนมะพร้าว จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปร (Panicker et al., 2009) และนอกจากนี้อาจเป็นเพราะมีเอนไซม์ที่เจือปนในเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG) ที่นำมาใช้

ในการศึกษา เนื่องจากเป็นเอนไซม์ทางการค้าจึงมีความเป็นไปได้ว่าจะมีโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) ตัวอื่นปนอยู่ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Suppavorasatit et al., 2011) ซึ่งค่า DD และ DH ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Kunarayakul et al. (2018) ซึ่งศึกษาการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวโดยแปรระยะเวลาในการดัดแปรตั้งแต่ 0-24 ชั่วโมง พบว่าค่าDD เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าประมาณร้อยละ 35 ภายในเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นจะ ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 54 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าค่า DH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาโดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3 ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 6 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ 15 นาที, 6, และ 12 ชั่วโมง โปรตีนมะพร้าวมีค่า DD ร้อยละ 32.21, 42.57, และ 49.61 ตามลำดับ และมีค่า DH ร้อยละ 2.50, 5.23, และ 5.58 ตามลำดับ

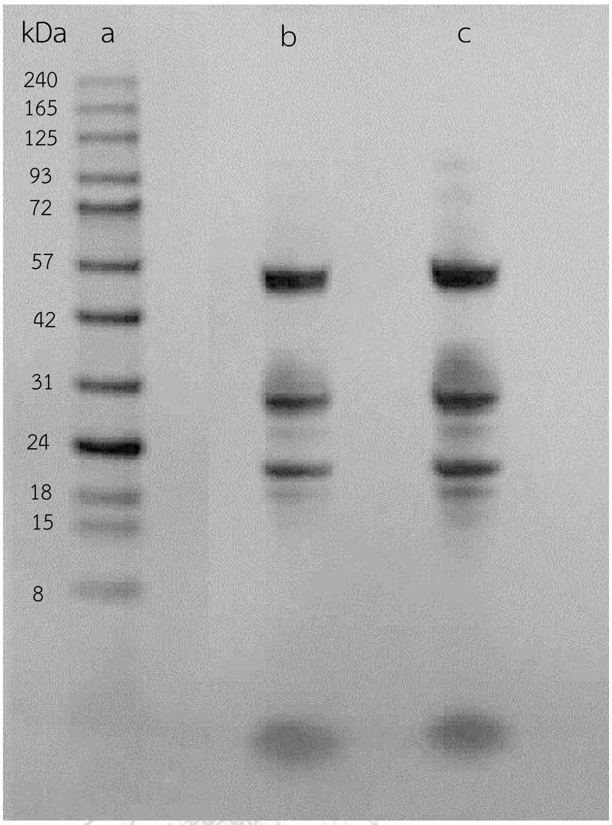
4.3 molecular mass distribution

จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าวโดยการทำ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 4.1 จากรูปแสดง protein marker (แถว a), แถบโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (แถว b) และแถบโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (แถว c) พบว่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรและโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยจะพบว่าโปรตีนในแถบน้ำหนักที่ต่ำกว่า 22 kDa ของตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปร (แถบ c) จะมีมากกว่าที่ปรากฏในตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (แถบ b) คือมีประมาณร้อยละ 12.68 และ 8.97 ตามลำดับ ซึ่งการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันนั้นไม่ควรเกิดแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการที่โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีปริมาณของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 22 kDa สูงกว่านั้นอาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการให้ความร้อนซึ่งจะเป็นการทำลาย อันตรกิริยาต่าง ๆ ภายในโมเลกุลโปรตีน โปรตีนจึงเกิดการคลายเกลียวและปลดปล่อยโปรตีนสายสั้น รวมถึงอาจเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเนื่องจากความร้อนซึ่งเป็นการทำลายพันธะเปปไทด์และได้เป็นโปรตีนสายสั้นเกิดขึ้น โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kunarayakul et al. (2018) ที่ศึกษาการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านและผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์ PG ที่ระยะเวลาการดัดแปรที่แตกต่างกัน พบว่ารูปแบบของแถบโปรตีนของโปรตีนทั้งสองชนิดคล้ายคลึงกัน แต่ความเข้มของแถบโปรตีนแตกต่างกันโดยโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรที่ระยะเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมงมีแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 22 kDa เท่ากับร้อยละ 17.11, 19.38, และ 22.09 ตามลำดับ

ซึ่งสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรที่มีแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 22 kDa เท่ากับร้อยละ 15.47

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจำนวนแถบโปรตีนของโปรตีนทั้งสองชนิด (แถบ b และ c) ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 18, 22, 30 และ 55 kDa ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเหล่านี้มาจากโปรตีนหลักในมะพร้าว ที่ประกอบไปด้วย โปรตีนกลุ่ม 11S (cocosin) และ 7S กลอบูลินโดยมีปริมาณร้อยละ 86 และ 14 ตามลำดับ โปรตีนจากมะพร้าวส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม 11S ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 326 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในการทำ SDS-PAGE ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 24, 34, และ 55 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 55 kDa เกิดจากการรวมตัวของแถบโปรตีนขนาด 24 และ 34 kDa (Garcia et al., 2005) และโปรตีนกลุ่ม 7S มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 156 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 16, 22 และ 24 kDa ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodsamran and Sothornvit (2018) ที่รายงานแถบโปรตีนหลักของโปรตีนจากมะพร้าวว่ามี 4 แถบได้แก่ขนาด 14, 18, 34, และ 52 kDa และของ DeMason and Sekhar (1990) ซึ่งรายงานว่าโปรตีนจากมะพร้าวจะแสดงแถบโปรตีนในช่วง 17 – 55 kDa (17, 20, 22, 25, 31, 34, และ 55 kDa)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.1 molecular mass distribution ของโปรตีนมะพร้าว

a: protein marker, b: untreated coconut protein (CP), c: deamidated coconut protein (DCP)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

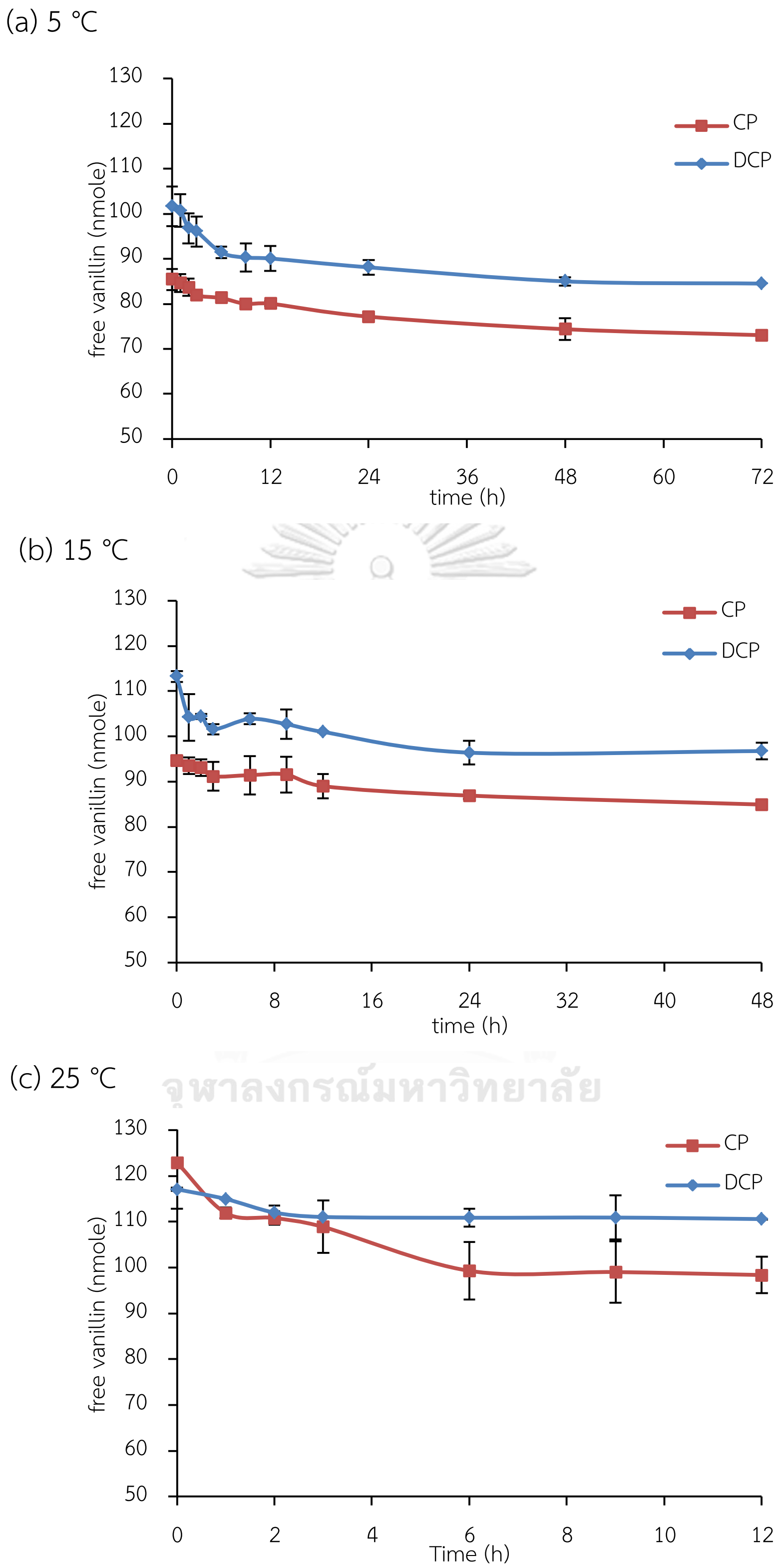
4.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

4.4.1 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส (flavor binding equilibration time)

การศึกษาสมบัติการจับกลิ่นรสโดยการใช้เทคนิค equilibrium dialysis นั้นจำเป็นต้องหาเวลาที่จุดสมดุลในการจับกลิ่นรสระหว่างโปรตีนกับสารให้กลิ่นรส ซึ่งจากการศึกษานี้หาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวานิลลินอิสระที่เหลือจากการเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (untreated coconut protein, CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (deamidated coconut protein, DCP) กับเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 5, 15, และ 25 °C (รูปที่ 4.2) โดยพิจารณาเวลาต่ำที่สุดที่ทำให้ปริมาณวานิลลินอิสระคงที่ พบว่าเวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 48, 24, และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ และเวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 48, 24,

และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าเวลาที่ทำให้ถึงจุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาทั้งของ CP และ DCP สั้นลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยา (reaction rate) จะเร็วขึ้น กล่าวคือการจับกันระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินจะเกิดได้เร็วขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจึงทำให้เข้าสู่จุดสมดุลได้เร็วขึ้น ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ที่ศึกษาหาเวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับวานิลลิน พบว่าเวลาที่จุดสมดุลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate; SPI) ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 48, 36, และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ และเวลาที่จุดสมดุลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (deamidated soy protein isolate; DSPI) ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 48, 24, และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2 เวลาที่จุดสมดุลในการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (untreated coconut protein, CP) และผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (deamidated coconut protein, DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C (a), 15°C (b), และ 25 °C (c).

ตารางที่ 4.2 เวลาที่จุดสมดุลของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C, 15°C, และ 25 °C

Coconut protein	T (°C)	Equilibration time (h)
CP	5	48
	15	24
	25	6
DCP	5	48
	15	24
	25	3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.2 สมบัติในการจับกลิ่นรส (flavor binding properties) ของโปรตีนมะพร้าว

การศึกษาสมบัติในการจับกลิ่นรสระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินทำโดยหาค่าตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ จำนวนพื้นที่ในการจับกับกลิ่นรส (binding site, n), ค่าคงที่ในการจับ (binding constant, K) และ ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall binding affinity, nK) ซึ่งค่าเหล่านี้คำนวณได้จากจุดตัดแกน y (1/n) และ ค่าความชัน (1/Kn) จากสมการเส้นตรงในตารางที่ 4.3 ซึ่งได้มาจากการสร้าง Klotz plot (รูปที่ 4.3) โดยทุกสมการเส้นตรงจาก Klotz plots ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) มากกว่า 0.99 ซึ่งหมายถึงสมการดังกล่าวสามารถอธิบายความแปรปรวนทั้งหมดได้มากกว่าร้อยละ 99 โดยค่า binding parameter ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 4.4 จากตารางที่ 4.4 พบว่าค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 0.81, 0.79, และ 1.48 ตามลำดับ ซึ่งที่ 25 °C พบว่ามีค่า n สูงที่สุดเมื่อเทียบกับที่ 5 และ 15 °C ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 0.81, 0.96, และ 1.58 ตามลำดับ ซึ่งค่า n ที่ได้จากการทดลองของทั้ง CP และ DCP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อพิจารณาค่า K ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแข็งแรงของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินและโปรตีนมะพร้าว พบว่าค่า K ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C (ตารางที่ 4.4) โดยค่า K ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 1221.89×10^4 M^{-1}, 1085.51×10^4 M^{-1}, และ 401.12×10^4 M^{-1} ตามลำดับ และค่า K ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น

988.47 x 10^4 M^{-1}, 556.23 x 10^4 M^{-1}, และ 276.03 x 10^4 M^{-1} ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนมะพร้าวทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรให้ผลเป็นแนวโน้มเดียวกัน คือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 5 ไป 25 °C ค่า n จะเพิ่มขึ้นและค่า K จะลดลง ซึ่งการอธิบายด้วยค่า n หรือ K เพียงอย่างเดียวอาจจะไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนที่แสดงความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall binding affinity) ของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนได้ ดังนั้นเพื่อให้สามารถอธิบายความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมได้ชัดเจนจึงพิจารณาค่า n และ K ร่วมกัน (Kühn et al., 2008; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ได้จาก Klotz plots (ตารางที่ 4.3) พบว่าค่า nK ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 985.36 x 10^4 M^{-1}, 853.61 x 10^4 M^{-1}, และ 586.54 x 10^4 M^{-1} ตามลำดับ และ ค่า nK ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น 803.23 x 10^4 M^{-1}, 534.04 x 10^4 M^{-1}, และ 434.98 x 10^4 M^{-1} ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่า nK ของทั้ง CP และ DCP ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 5 ไป 25 °C เช่นเดียวกับค่า K ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยที่อุณหภูมิ 5 °C มีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินและโปรตีนมะพร้าวมากที่สุดเมื่อเทียบกับที่ 15 และ 25 °C ทั้งนี้อาจเกิดจากที่อุณหภูมิต่ำ (5 °C) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ภายในโครงสร้างของโปรตีนอ่อนแอ ส่งผลให้หน่วยย่อยของโปรตีนเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ภายในโมเลกุลของโปรตีนเอง สายโซ่ของโปรตีนที่เกิดการคลายเกลียวจึงเผย hydrophobic binding sites ออกมาด้านนอกมากขึ้น เป็นผลทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสดังกล่าวเพิ่มขึ้นด้วย (Damodaran and Kinsella, 1981a; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) จากผลการศึกษาพบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Damodaran and Kinsella (1981a) ซึ่งศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองและสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิล พบว่าค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง 2-nonanone กับโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C (เพิ่มจาก 2.00 เป็น 4.00) และค่า K ของ 2-nonanone กับ SPI ลดลงจาก 2000 M^{-1} ที่ 5 °C เป็น 930 M^{-1} ที่ 25 °C ในทำนองเดียวกัน Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ยังรายการว่าค่า n ของการจับระหว่างมอลทอลกับ DSPI เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C โดยที่ 5, 15 และ 25 °C ค่า n ของ DSPI มีค่า 4.01, 4.13 และ 29.5 ตามลำดับ และค่า K ของการจับกันระหว่างมอลทอลและ DSPI ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 5 ไป 25 °C โดยที่ 5, 15, และ 25 °C ค่า K ของ SPI มีค่า 51.7 x 10^4 M^{-1}, 50.9 x 10^4 M^{-1}, และ 2.69 x 10^4 M^{-1} ตามลำดับ อย่างไรตามในการศึกษาเดียวกันนี้ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) รายงานค่า n และ K ของการจับกันระหว่างวานิลลินกับ SPI และ DSPI ในทางตรงกันข้ามกับผลการศึกษาที่ได้คือค่า n จะลดลงและค่า K จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C ซึ่งผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกันนี้อาจเกิดจากโปรตีนที่ใช้

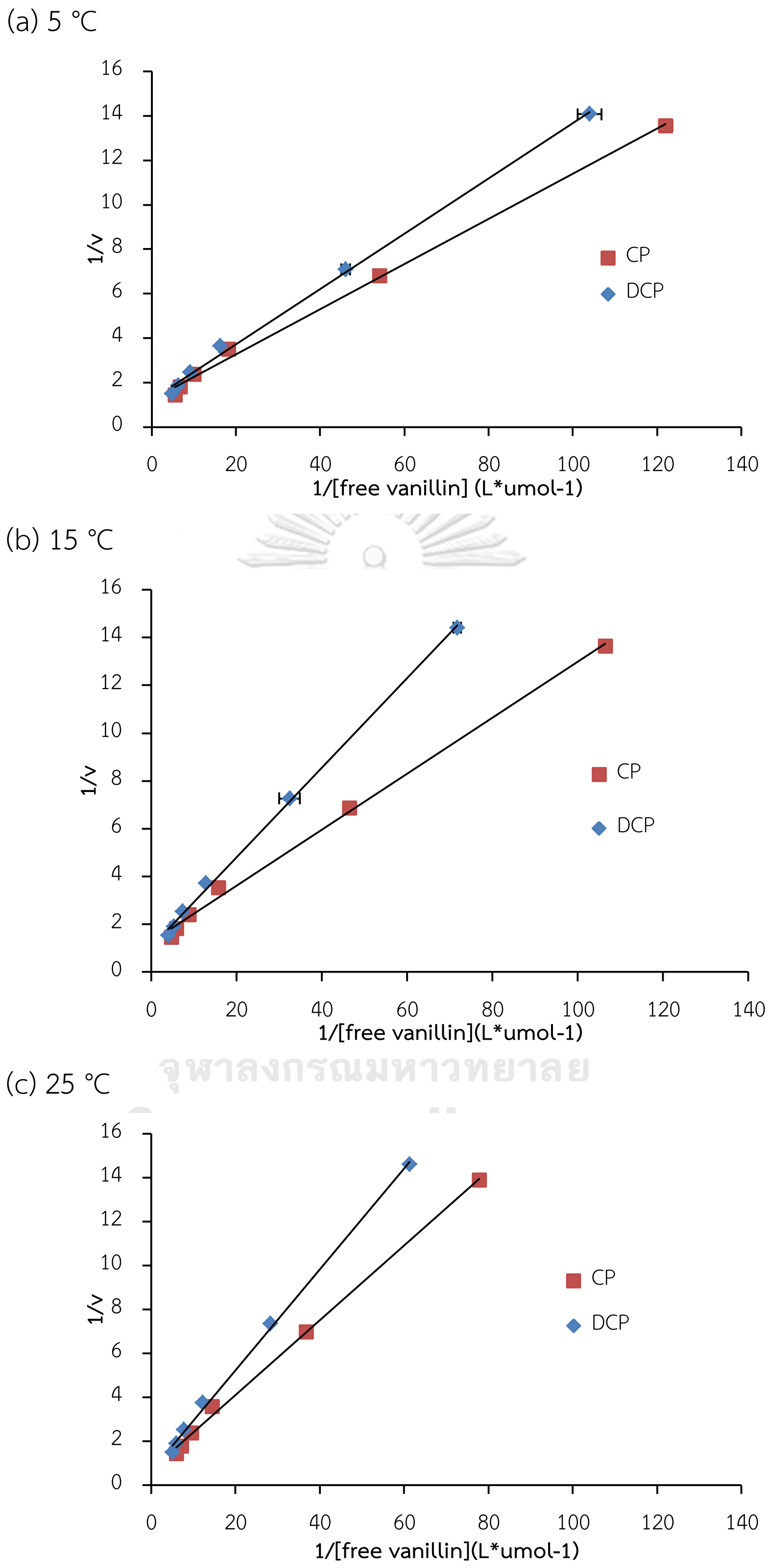
เป็นคนละชนิดกัน ซึ่งโปรตีนต่างชนิดกันจะมีกลไกในการเกิดอันตรกิริยากับสารให้กลิ่นรสที่แตกต่างกัน จึงทำให้ค่า n และ K มีค่าไม่ใกล้เคียงกันรวมถึงให้ผลที่ตรงกันข้ามได้

เมื่อพิจารณาในส่วนของค่า nK พบว่าค่า nK ของ CP สูงกว่าของ DCP ที่ทุกอุณหภูมิแสดงให้เห็นว่าการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG) ส่งผลต่อการจับกับสารให้กลิ่นรสวานิลลินอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่โปรตีนมะพร้าวถูกดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์ PG สามารถลดความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับสารให้กลิ่นรสกลุ่มที่มีหมู่คาร์บอนิลได้ เนื่องจากการดัดแปรโปรตีนดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนหมู่เอไมด์ในกลูตามีนให้เป็นกรดกลูตามิก ซึ่งการสูญเสียหมู่เอไมด์ทำให้ความสามารถในการที่จะเกิดพันธะโควาเลนต์หรือการเกิดชิฟฟ์เบส (Schiff base) กับหมู่คาร์บอนิลของวานิลลินลดลง ส่งผลให้โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรมีความสามารถในการจับกับวานิลลินลดลงด้วย และอาจเป็นไปได้ว่าการจับกันระหว่าง DCP และวานิลลิน อาจเกิดผ่านพันธะไฮโดรเจน หรือเกิดจากอันตรกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจง ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ซึ่งศึกษาผลของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองโดยเอนไซม์ PG ต่อสมบัติการจับกลิ่นรสโดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis เช่นเดียวกัน พบว่าความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของวานิลลินกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรมีค่าลดลง โดยพบว่าความสามารถในการจับของวานิลลินกับ SPI ที่อุณหภูมิ 5, 15, และ 25 °C สูงกว่าการจับของวานิลลินกับ DSPI ถึงประมาณ 7 - 9 เท่า นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้จากการใช้เครื่องมือนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาโดยใช้วิธีทางประสาทสัมผัส ซึ่ง Suppavorasatit et al. (2013) ได้ศึกษาผลของการดัดแปรโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดย PG ต่อสมบัติการจับกลิ่นรสของนมถั่วเหลือง พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้ได้ (odor detection threshold) ของวานิลลินและมอลทอลในนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรมีค่าลดลงประมาณ 5 และ 3 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร ซึ่งหมายถึงความสามารถในการจับกลิ่นรสของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรลดลง

ตารางที่ 4.3 สมการเส้นตรงจาก Klotz plot ในการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP)

protein	T (°C)	replication 1		replication 2	
		equation	r^2	equation	r^2
CP	5	y = 0.1003x + 1.2897	0.9963	y = 0.1027 + 1.1892	0.9972
	15	y = 0.1170x + 1.2525	0.9969	y = 0.1173 + 1.2909	0.9963
	25	y = 0.1718x + 0.6217	0.9978	y = 0.1692x + 0.7451	0.9973
DCP	5	y = 0.1271x + 1.2271	0.9973	y = 0.1220x + 1.2340	0.9973
	15	y = 0.1843x + 1.0383	0.9980	y = 0.1903x + 1.0449	0.9971
	25	y = 0.2290x + 0.6552	0.9983	y = 0.2308x + 0.6138	0.9977

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.3 Klotz plot ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (DCP) ที่อุณหภูมิ 5 °C (a), 15°C (b) และ 25 °C (c)

ตารางที่ 4.4 Binding parameter ของการจับกันของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP)

parameter	T (°C)	CP	DCP
n	5	0.81 ± 0.05 b A	0.81 ± 0.00 c A
	15	0.79 ± 0.02 b B	0.96 ± 0.00 b A
	25	1.48 ± 0.19 a A	1.58 ± 0.07 a A
K (x 10^4) (M^{-1})	5	1221.89 ± 90.44 a A	988.47 ± 32.54 a A
	15	1085.51 ± 21.21 a A	556.23 ± 10.11 b B
	25	401.12 ± 55.50 b A	276.03 ± 14.26 c A
nK (x 10^4) (M^{-1})	5	985.36 ± 16.47 a A	803.23 ± 23.26 a B
	15	853.61 ± 1.55 b A	534.04 ± 12.10 b B
	25	586.54 ± 6.32 c A	434.93 ± 2.41 c B

a, b, c ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

A,B ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.4.3 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic parameters)

ค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าค่าพลังงานอิสระที่ใช้ในการจับกัน (Gibb's free energy of binding, $\Delta G°$) ของวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ โดยค่า $\Delta G°$ ของวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น -9.01, -9.27, และ -9.00 kcal mol^{-1} ตามลำดับ และกับ DCP ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น -8.90, -8.88, และ -8.78 kcal mol^{-1} ตามลำดับ แสดงว่าเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous) โดยค่า $\Delta G°$ ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่รายงานของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012) ที่รายงานค่า $\Delta G°$ ของวานิลลินกับ SPI ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น -5.99, -7.21, และ -8.54 kcal mol^{-1} ตามลำดับ และกับ DSPI ที่ 5, 15, และ 25 °C เป็น -6.69, -6.84, และ -7.09 kcal mol^{-1} ตามลำดับ

ค่าเอนทาลปีของการจับกัน (enthalphy of binding, $\Delta H°$) เป็นค่าที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่เกิดขึ้นภายในระบบ ซึ่งสามารถใช้บ่งบอกว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบดูดหรือคายความร้อน หากค่า $\Delta H°$ เป็นลบหมายถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบคายความร้อน (exothermic) และ $\Delta H°$ เป็นบวกหมายถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบดูดความร้อน (endothermic) จากผล

การศึกษานี้ พบว่าค่า ΔH° ของวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ (-9.19 และ -10.59 kcal mol^{-1} ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า อันตรกิริยาระหว่าง CP และ DCP กับวานิลลินเป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน นอกจากนี้ค่าเอนโทรปีของการจับกัน (entropy of binding, ΔS°) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความไม่เป็นระเบียบ (randomness) ของระบบ ใช้บอกทิศทางของการเกิดปฏิกิริยา พบว่าค่า ΔS° ของวานิลลินกับโปรตีนทั้งสองมีค่าเป็นลบด้วยเช่นกัน ซึ่งจากข้อมูลของค่า ΔH° และ ΔS° นี้สามารถใช้ในการระบุประเภทหรือชนิดของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ (Wang and Li, 2011) Ross and Subramanian (1981) จำแนกเครื่องหมายของตัวแปรอุณหพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาแต่ละประเภทของโปรตีนไว้ว่าค่า $\Delta H^\circ > 0$ ร่วมกับค่า $\Delta S^\circ > 0$ สามารถระบุว่าเกิดอันตรกิริยา hydrophobic ถ้าค่า $\Delta H^\circ <$ ร่วมกับ $\Delta S^\circ < 0$ หมายถึงการเกิดแรง van der Waals หรือ พันธะไฮโดรเจน และถ้าค่า $\Delta H^\circ \approx 0$ ร่วมกับ $\Delta S^\circ > 0$ จะเป็นการเกิดอันตรกิริยาแบบ electrostatic ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าค่า ΔH° และ ΔS° ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งหมายความว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีโอกาสที่จะเกิดจากแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน (Ross and Subramanian, 1981; Ross and Rekharsky, 1996; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) และการเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนด้วยเอนทาลปี (enthalpy driven process) (Ross and Subramanian, 1981; Ross and Rekharsky, 1996; Li et al., 2000; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) และเมื่อพิจารณาการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าวานิลลินสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนชนิดต่าง ๆ จากแรง van der Waals หรือ พันธะไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกับที่เกิดกับโปรตีนมะพร้าว เช่นการศึกษาของ Li et al. (2000) ที่ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน whey และ casein กับ วานิลลินพบว่าค่าเอนทาลปี (ΔH) และเอนโทรปี (ΔS) ของการจับของวานิลลินกับโปรตีน whey (-8495.76 และ -15.01 cal/mol) และ casein (-1264.20 และ -32.70 cal/mol) ซึ่งก็เป็นการขับเคลื่อนด้วยเอนทาลปี

ตารางที่ 4.5 ค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ของการจับของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP)

parameter	T (°C)	CP	DCP
ΔG° (kcal mol^{-1})	5	-9.01 ± 0.04 a A	-8.90 ± 0.01 b A
	15	-9.27 ± 0.01 b B	-8.88 ± 0.01 b A
	25	-9.00 ± 008 a A	-8.78 ± 0.03 a A
ΔH° (kcal mol^{-1})	5-25	-9.19 ± 1.75 A	-10.59 ± 0.29 A
ΔS° (cal K^{-1} mol^{-1})	5 ns	-33.03 ± 6.30	-38.07 ± 1.05
	15 ns	-31.88 ± 6.08	-36.75 ± 1.01
	25 ns	-30.81 ± 5.88	-35.52 ± 0.98

a, b ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

A,B ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ตัวเลขในคอลัมน์และแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.5 การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนด้วยวิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เปรียบเทียบและยืนยันข้อมูลจากการศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสด้วยวิธีการใช้เครื่องมือ เนื่องจากการทดสอบโดยการใช้เครื่องมือเพียงอย่างเดียวนั้นจะไม่สามารถวัดผลกระทบที่เกิดจากการรับรู้กลิ่นรสได้โดยตรง ในการทดลองนี้ใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น (odor detection thresholds) ตามวิธีของ ASTM E697-04 (2004) เพื่อศึกษาผลของการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนสต่อสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าว โดยแสดงผลการทดสอบเป็นค่า best estimate threshold (BET) ของกลุ่มผู้ทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งค่า BET คำนวณมาจากค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของความเข้มข้นของวานิลลินในชุดการทดสอบสุดท้ายที่ผู้ทดสอบตอบผิดกับความเข้มข้นในชุดการทดสอบถัดไปที่สูงกว่าที่ผู้ทดสอบตอบถูกต้อง (แสดงวิธีในภาคผนวก ฉ.3) โดยค่า BET ใช้สำหรับแสดงผลของความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มผู้ทดสอบ (เฉลี่ยจากผู้ทดสอบแต่ละคน) จากผลการทดลองพบว่าค่า BET ของวานิลลินในตัวอย่าง CP

เป็น 33.17 ppm ซึ่งสูงกว่าในตัวอย่าง DCP ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.11 ppm แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรลดลงประมาณ 2 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suppavorasatit et al. (2013) ที่พบว่าค่า BET ของวานิลลินในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปร (1.80 ppm) ลดลงประมาณ 5 เท่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร (9.61 ppm) อย่างไรก็ตามค่า BET ที่ได้จากการทดลองนี้ไม่ใกล้เคียงกับค่า BET ที่รายงานในการศึกษาของ Suppavorasatit et al. (2013) เนื่องจากโปรตีนที่ใช้ทดสอบเป็นคนละชนิดกัน และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับวานิลลิน เมื่อมีการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์ PG จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกจากการเกิด hydrophobic interaction หรือ covalent bond เป็นพันธะที่อ่อนลงคือ แรง van der Waals หรือ พันธะไฮโดรเจน (Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) จึงทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของน้ำนมถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรลดลงมากถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับน้ำนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการดัดแปร ในขณะที่การเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวทั้งก่อนและหลังการดัดแปรไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกในการจับโดยมีโอกาสที่จะเกิดจากแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรลดลงเพียง 2 เท่า และเมื่อพิจารณาผลการทดสอบสมบัติด้านการจับกลิ่นรสด้วยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกับผลการทดสอบโดยการใช้เครื่องมือพบว่ามีความสอดคล้องกัน โดยความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (nK) ที่ 25 °C ของ DCP (276.03×10^4 M^{-1}) ลดลงประมาณ 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับ CP (401.12×10^4 M^{-1}) (ตารางที่ 4.4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.6 ค่า group best estimate thresholds (BET) ของวานิลลินในโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) (n=27)

coconut protein	BET (µg/ml) ± SD
CP	33.17 ± 4.63
DCP	14.11 ± 3.27

การดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์ PG มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวกับสารให้กลิ่นรสวานิลลิน โดยสามารถลดความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวลงประมาณ 1.5 เท่าสำหรับการศึกษาโดยการใช้เครื่องมือ และลดลงประมาณ 2 เท่าสำหรับการศึกษาโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส ข้อมูลทางอุณหพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าวทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรด้วยดีแอมิเดชัน มีโอกาสที่จะเกิดจากแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน และการเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนด้วยเอนทาลปี จากผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม โดยสามารถนำโปรตีนมะพร้าวไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ทั้งในแง่ของการผลิตเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น เครื่องดื่มโปรตีนมะพร้าว หรือใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทอิมัลชัน ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการเกิดการจางลงของกลิ่นรส (flavor fade) ในเรื่องของการทำให้โปรไฟล์ของกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลงในผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนสูงลงได้ โดยเฉพาะอาหารที่มีการเติมกลิ่นรสกลุ่มที่มีคาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบ เช่นวานิลลิน นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารโปรตีนสูง โดยสามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวมาคำนวณเพื่อหาปริมาณสารให้กลิ่นรสที่เหมาะสมที่จะเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าว อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้เหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารที่เป็นของเหลว สำหรับอาหารประเภทที่มีความชื้นต่ำอาจจะให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันออกไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าว

โปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้จากหางกะทิด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 92.97 และเมื่อผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนส (PG) ที่สภาวะที่เหมาะสม คือ E/S ratio เท่ากับ 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 °C และ pH เท่ากับ 7.0 โดยใช้เวลาในการดัดแปร 1 ชั่วโมง พบว่ามีค่า degree of deamidation และ ค่า degree of hydrolysis เท่ากับร้อยละ 36.12 และ 3.18 ตามลำดับ

2. การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

- ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall binding affinity, nK) ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชัน (DCP) กับวานิลลินลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของทั้ง CP และ DCP กับวานิลลินลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C

- อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous, $-\Delta G^\circ$) อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีโอกาสที่จะเกิดจากแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน (ΔH° และ $\Delta S^\circ < 0$) และการเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนด้วยเอนทาลปี (enthalpy driven process)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. การประเมินทางประสาทสัมผัส

ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของวานิลลินที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น (odor detection thresholds) ในตัวอย่าง DCP (14.11 ppm) ต่ำกว่าในตัวอย่าง CP (33.17 ppm) ประมาณ 2 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวกับสารให้กลิ่นรสกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่มเอสเทอร์ แอลกอฮอล์ หรือไดซัลไฟด์ เป็นต้น และควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าว เช่น ความยาวของสายโซ่ของสารให้กลิ่นรส, pH, Ionic strength และการให้ความร้อน เป็นต้น

2. ควรมีการใช้เทคนิคทางสเปคโทรสโคปีในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการเกิดอันตรกิริยาเช่น fluorescene spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และ fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy เป็นต้น เพื่อใช้ในการอธิบายกลไกการเกิดอันตรกิริยาได้ชัดเจนมากขึ้น เช่น ให้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งที่เกิดอันตรกิริยา ตรวจสอบอันตรกิริยาภายในโมเลกุล และอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง. (2556). โปรตีนจากมะพร้าว. *วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์*. 8: 9-18.

ภาษาอังกฤษ

Anklam, E., Gaglione, S., Müller, A. (1997). Oxidation behaviour of vanillin in dairy products. *Food Chemistry*. 60(1). 43-51.

AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis* (17th ed.). Washington DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.

ASTM. (2004). Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits. *ASTM E697–04*. 1–7.

Burova, T. V., Grinberg, N. V., Grinberg, V. Y., Tolstoguzov, V. B. (2003). Binding of odorants to individual proteins and their mixtures. Effects of protein denaturation and association. A plasticized globule state. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 213: 235-244.

Carr, H. J., Plumb, G. W., Parker, M. L., Lambert, N. (1990). Characterisation and crystallization of an 11S seed storage globulin from coconut (*Cocos nucifera*). *Food Chemistry*. 38: 11-20.

Chobpattana, W., Jeon, I. J., Smith, J. S., Loughin, T. M. (2002). Mechanisms of interaction between vanillin and milk proteins in model systems. *Journal of Food Science*. 67: 973-977.

Damodaran, S., Kinsella, J. E. (1980). Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *Journal of Agricultural and Food Chemisry*. 28: 567-571.

Damodaran, S., Kinsella, J. E. (1981a). Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemisry*. 29: 1249-1253.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Damodaran, S., Kinsella, J. E. (1981b). Interaction of carbonyls with soy protein: conformational effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29: 1253-1257.

DebMandal, M., Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 241-247.

DeMason, D. A., Sekhar, K. N. C. (1990). Electrophoretic characterization and immunological localization of coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm storage proteins. *Botanical Gazette (Chicago).* 151: 302-313.

Dumont, J. P., Land, D. G. (1986). Binding of diacetyl by pea proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34: 1041-1045.

Dufour, E., Haertlé, T. (1990). Binding affinities of beta-ionone and related flavor compounds to beta-lactoglobulin: effects of chemical modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemisry.* 38: 1691-1695.

Fabre, M., Aubry, V., Guichard, E. (2002). Comparison of different methods: static and dynamic headspace and solid-phase microextraction for the measurement of interactions between milk proteins and flavor compounds with an application to emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 1497–1501.

Flores, M., Gianelli, M. P., Pe´rez-Juan, M., Toldra, F. (2007). Headspace concentration of selected dry-cured aroma compounds in model systems as affected by curing agents. *Food Chemistry*. 102: 488–493.

Gallage, N. J., MØller, B. L. (2015). Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its *De Novo* biosynthesis in the vanillin orchid. *Molecular Plant.* 8: 40-57.

Garcia, R. N., Arocena, R. V., Laurena, A. C., Tecson-Mendoza, E. M. (2005). 11S and 7S globulins of coconut (*Cocos nucifera* L.) : purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1734-1739.

Gkionakis, G. A., Taylor, K. D. A., Ahmad, J., Heliopoulos, G. (2007). The binding of the flavour of lactones by soya protein, amino acids and casein. *International Journal of Food Science & Technology.* 42: 165-174.

Gu, Y. S., Matsumura, Y., Yamaguchi, S., Mori, T. (2001). Action of protein-glutaminase on α-lactalbumin in the native and molten globule states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49: 5999-6005.

Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*. 18: 49-70.

Guichard, E., Langourieux, S. (2000). Interactions between β-lactoglobulin and flavor compounds. *Food Chemistry.* 71: 301-308.

Hamada, J. S. (1992). Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 40(5): 719-723.

Hamada, J. S. (1994). Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 34: 283-292.

Heng, L., Koningsveld, G. A. V., Gruppen, H., Boekel, M. A. J. S. V., Vincken, J. P., Roozen, J. P., Voragen, A. G. J. (2004). Protein-flavour interactions in relation to development of novel protein foods. *Trends in Food Science and Technology.* 15: 217-224.

Jiang, Z. -Q., Strohm, T. S., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*. 64: 126-132.

Jouenne, E., Crouzet, J. (2000). Effect of pH on retention of aroma compounds by β-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48: 1273-1277.

Kühn, J., Considine, T., Singh, H. (2006). Interactions of milk proteins and volatile flavor compounds: Implications in the development of protein foods. *Journal of Food Science* 71: R72-R82.

Kühn, J., Considine, T., Singh, H. (2008). Binding of flavor compounds and whey protein isolate as affected by heat and high pressure treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56: 10218-10224.

Kühn, J., Considine, T., Zhu, X. Q., Singh, H. (2007). Binding of 2-nonanone and milk proteins in aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3599-3604.

Kunarayakul, S., Thaiphanit, S., Anprung, P., Suppavorasatit, S. (2018). Optimization of coconut protein deamidation using protein-glutaminase and its effect on solubility, emulsification, and foaming properties of the proteins. *Food Hydrocolloids*. 79: 197-207.

Kwon, K., Park, K. H., Rhee, K. C. (1996). Fractionation and characterization of proteins from coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 741-745.

Li, Z., Grün, I. U., Fernando, L. N. (2000). Interaction of vanillin with soy and dairy proteins in aqueous model system: A thermodynamic study. *Journal of Food Science*. 65: 997-1001.

Liu, X., Powers, J. R., Swanson, B. G., Hill, H. H., Clark, S. (2005). High hydrostatic pressure affects flavor-binding properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*. 70: 581-585.

Liu, Y., Li, X., Zhou, X., Yu, J., Wang, F., Wang, J. (2011). Effects of glutaminase deamination on the structure and solubility of rice glutelin. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 2205-2210.

Lozano, P. R. (2009). Investigation of single and multiple binding interactions between volatile flavor compounds and soy proteins under controlled relative humidity by inverse gas chromatography (IGC). Degree of Doctor of Philosophy in Food Science and Human Nutrition. Graduate College of the University of Illinois, Urbana-Champaign.

Lv, T., Wang, Y., Pan, D., Cao, J., Zhang, X., Sun, Y., Chen, Y., Liu, Y. (2017). Effect of trypsin treatments on the structure and binding capacity of volatile compounds of myosin. *Food Chemistry* 214: 710-716.

Lübke, M., Guichard, E., Tromelin, A., Le Quéré, J. L. (2002). Nuclear magnetic resonance spectroscopic study of β-lactoglobulin interactions with two flavor compounds, γ-decalactone and β-Ionone. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 50: 7094-7099.

Malcolmson, L. J., McDaniel, M. R., Hoehn, E. (1987). Flavor protein interactions in a formulated soup containing flavored soy protein. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 20: 229-235.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Meynier, A., Rampon, V., Dalgalarrondo, M., Genot, C. (2004). Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. *International Dairy Journal.* 14: 681-690.

Mikheeva, L. M., Grinberg, N. V., Grinberg, V. Ya., Tolstoguzov, V. B. (1998). Effect of thermal denaturation on vanillin binding to some food proteins. *Nahrung*. 42: 185-186.

Miwa, N., Yokoyama, K., Wakabayashi, H., Nio, N. (2010). Effect of deamidation by protein-glutaminase on physiochemical and functional properties of skim milk. *International Dairy Journal*. 20: 393-399.

Muresan, S., Bent, A. V. D., de Wolf, F. A. (2001). Interaction of beta-lactoglobulin with small hydrophobic ligands as monitored by fluorometry and equilibrium dialysis: nonlinear quenching effects related to protein-protein association. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 49: 2609-2618.

Naik, A., Raghavendar, S. N., Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Production of coconut wet processing waste and its characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167: 1290-1302.

Ng, P. K. W., Hoehn, E., Bushuk, W. (1989). Sensory evaluation of binding of vanillin by fababean proteins. *Journal of Food Science*. 54(2): 324-326.

O'Keefe, S. F., Resurreccion, A. P., Wilson, L. A., Murphy, P. A. (1991). Temperature effect on binding of volatile flavor compounds to soy protein in aqueous model systems. *Journal of Food Science*. 56: 802-806.

Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigam, S., McClements, D. J. (2006). Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Research International*. 39: 78-86.

O'Neill, T. E., Kinsella, J. E. (1987). Binding of alkanone flavors to β-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35: 770-774.

O'Neill, T. E., Kinsella, J. E. (1988). Effect of heat treatment and modification on conformation and flavor binding by β-lactoglubulin. *Journal of Food Science.* 53: 906-909.

Östling, S., Virtama, P. (1946). A modified preparation of the universal buffer described by Teorell and Stenhagen. *Acta Physiologica Scandinavica.* 11(4): 289-293.

Panicker, L. M., Usha, R., Roy, S., Mandal, C. (2009). Purification and characterization of a serine protease (CESP) from mature coconut endosperm. *BMC Research Notes*. 2: 81-90.

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. (2007). Effect of ionic strength of different salts on the binding of volatile compounds to porcine soluble protein extracts in model systems. *Food Research International*. 40: 687–693.

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. (2008). Effect of pork meat proteins on the binding of volatile compounds. *Food Chemistry.* 108: 1226-1233.

Poll, L., Flink, J. M. (1984). Aroma analysis of apple juice: Influence of salt addition on headspace volatile composition as measured by gas chromatography and corresponding sensory evaluations. *Food Chemistry.* 13: 193-207.

Rasyid, F., Manullang, M., Hansen, P. M. T. (1992). Isolation and characterization of coconut protein. *Food Hydrocolloids*. 6: 301-314.

Remya, S., Chikku, A., Renjith, R. S., Arunima, S., Rajamohan, T. (2013). Coconut kernel protein in diet protects the heart by beneficially modulating endothelial nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alpha, and nuclear factor-kappaB expressions in experimental myocardial infraction. *Journal of Food and Drug Analysis.* 21(3): 325-331.

Rodsamarn, P., Sothornvit, R. (2018). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*. 241: 364-371.

Ross, P. D., Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 20: 3096-3102.

Ross, P. D., Rekharsky, M. V. (1996). Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. *Biophysical Journal*. 71: 2144-2154.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Salil, G., Nevin, K. G., Rajamohan, T. (2011). Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in alloxan treated rats. *Chemico-Biological Interactions*. 189: 107-111.

Salil, G., Rajamohan, T. (2001). Hypolipidemic and antiperoxidative effect of coconut protein in hypercholesterolemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology.* 39: 1028-1034.

Schneider, S., Rolando, C. (1992). One step synthesis of vanillin d_3 (4-hydroxy-3-(methoxy d_3)-benzaldehyde). *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 31: 489-492.

Semenova, M. G., Antipova, A. S., Misharina, T. A., Golovnya, R. V. (2002). Binding of aroma compounds with legumin. I. Binding of hexyl acetate with 11S globulin depending on the protein molecular state in aqueous medium. *Food Hydrocolloids.* 16: 565-571.

Stevenson, R. J., Chen, X. D., Mills, O. E. (1996). Modern analyses and binding studies of flavor volatiles with particular reference to dairy protein products. *Food Research International*. 29: 265-290.

Suppavorasatit, I., Cadwallader, K. R. (2010). Flavor-Soy protein interactions. In K. R. Cadwallader and S. K. C. Chang (eds.). Chemistry, texture, and flavor of soy. pp. 339-359. American Chemical Society. Washington, DC.

Suppavorasatit, I., Cadwallader, K. R. (2012). Effect of enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase on the flavor-binding properties of the protein under aqueous conditions. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 60: 7817-7823.

Suppavorasatit, I., De Mejia, E. G., Cadwallader, K. R. (2011). Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(21): 11621-11628.

Suppavorasatit, I., Lee, S. Y., Cadwallader, K. R. (2013). Effect of enzymatic protein deamidation on protein solubility and flavor binding properties of soymilk. *Journal of Food Science*. 78: C1-C7.

Tan, Y., Siebert, K. J. (2008). Modeling bovine serum albumin binding of flavor compounds (alcohols, aldehydes, esters, and ketones) as a function of molecular properties. *Journal of Food Science*. 73: S56-S63.

Thaiphanit, S., Anprung, P. (2013). Enzymatic modification of coconut protein I: its bioactive compounds and effect on pH-solubility profile of modified protein. *Thai Journal of Agricultural Science.* 44(2 Suppl.): 397-400.

Thaiphanit, S., Anprung, P. (2014). Increasing the utilization of coconut (*Cocos nucifera* L.) wet processing waste: physicochemical and functional properties of coconut protein power. *In The proceeding of the 1 st joint ACS AGFD-ACS ICSCT symposium on agricultural and food chemistry; 2014 March 4-5, Bangkok, Thailand*. 207-215.

Thaiphanit, S., Schleining, G., Anprung, P. (2016). Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. 60: 252-264.

Tsutsumi, H., Nishikawa, M., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2003). Adsorption and stability of suxamethonium and its major hydrolysis product succinylmonocholine using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Health Science*. 49(4): 285-291.

Walton, N. J., Mayer, M. J., Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*. 63: 505-515.

Wang, C., Li, Y. (2011). Study on the binding of propiconazole to protein by molecular modeling and a multispectroscopic method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59: 8507-8512.

Wang, K., Arntfield, S. D. (2014). Binding of carbonyl flavours to canola, pea and wheat proteins using GC/MS approach. *Food Chemistry.* 157: 364-372.

Wang, K., Arntfield, S. D. (2015a). Binding of selected volatile flavour mixture to salt-extracted canola and pea proteins and effect of heat treatment on flavour binding. *Food Hydrocolloids.* 43: 410-417.

Wang, K., Arntfield, S. D. (2015b). Effect of salts and pH on selected ketone flavours binding to salt-extracted pea proteins: The role of non-covalent forces. *Food Research International*. 77: 1-9.

Wang, K., Arntfield, S. D. (2016a). Modification of interactions between selected volatile flavour compounds and salt-extracted pea protein isolates using chemical and enzymatic approaches. *Food Hydrocolloids.* 61: 567-577.

Wang, K., Arntfield, S. D. (2016b). Probing the molecular forces involved in binding of selected volatile flavor compounds to salt-extracted pea proteins. *Food Chemistry.* 211: 235-242.

Weerawatanakorn, M., Wu, J. -C., Pan, M. -H., Ho, C. -T. (2015). Reactivity and stability of selected flavor compounds. *Journal of Food and Drug Analysis*. 23: 176-190.

Yamaguchi, S., Jeenes, D. J., Archer, D. B. (2001). Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminyl residues in proteins. *European Journal of Biochemistry.* 268: 1410-1421.

Yamaguchi, S., Yokoe, M. (2000). A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(8): 3337-3343.

Yang, J., Powers, J. R., Clark, S., Dunker, A. K., Swanson, B. G. (2003). Ligand and flavor binding functional properties of β-lactoglobulin in the molten globule state induced by high pressure. *Journal of Food Science.* 68: 444-452.

Yong, Y. H., Yamaguchi, S., Gu, Y. S., Mori, T., Matsumura, Y. (2004). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α-zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 7094-7100.

Zhou, A., Boatright, W. L., Johnson, L. A., Reuber, M. (2002). Binding properties of 2-pentyl pyridine to soy protein as measured by solid phase microextraction. *Journal of Food Science*. 67: 142-145.

Zhou, Q., Cadwallader, K. R. (2004). Inverse gas chromatographic method for measurement of interactions between soy protein isolate and selected flavor compounds under controlled relative humidity. *Journal of Agricultural and Food Chemisry*. 52: 6271-6277.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Zhou, Q., Cadwallader, K. R. (2006) Effect of flavor compound chemical structure and environmental relative humidity on the binding of volatile flavor compounds to dehydrated soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1838–1843.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตามวิธีของ AOAC (2000))

<u>อุปกรณ์</u>

1. ถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
3. ตู้อบไฟฟ้าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK))
4. โถดูดความชื้น (desiccator) พร้อมสารดูดความชื้น (silica gel)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. นำถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาปิดไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกจากตู้อบและทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักของถ้วยอลูเนียมและจดบันทึกน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม (ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่ผ่านการอบแห้งและเย็นแล้ว

3. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4. นำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างออกจากตู้อบและทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก

5.อบซ้ำครั้งละ 30 นาที เอาออกตามขั้นตอนที่ 4 จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่

6.คำนวณปริมาณความชื้นในตัวอย่างจากสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(W1\text{-}W2) \times 100}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะก่อนอบ (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังอบ (กรัม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (ตามวิธีของ AOAC (2000))

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. digester (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)
3. scrubber (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)
4. distillation Unit (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98%
2. Kjeldahl tablet
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 35 % (w/v)
4. กรดบอริก ความเข้มข้น 4% % (w/v)
5. อินดิเคเตอร์

-เตรียมโดยละลาย methyl red ปริมาณ 0.125 กรัม และ methylene blue ปริมาณ 0.0825 กรัม ใน 90 % ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

6. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 M

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

ขั้นตอนที่ 1 การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1.0 กรัม (ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในหลอดย่อย จากนั้นเติม Kjeldahl tablet 1 เม็ด และ 98 % กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย จากนั้นเติม Kjeldahl tablet 1 เม็ด และ 98 % กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

3. ต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีนที่มีการควบคุมอุณหภูมิการย่อย ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใส สีฟ้าอมเขียว (ใช้เวลาประมาณ 90 นาที)

4. ปิดเตาย่อยและนำออกจากเครื่องย่อย และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนที่ 2 การกลั่น

1. จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิทซ์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายบอริกความเข้มข้น 4 % (w/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายของอุปกรณ์ควบแน่นแช่ในสารละลาย ตั้งค่าเครื่องโดยการกำหนดปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 % (w/v) ที่ใช้ในการกลั่นเท่ากับ 90 มิลลิลิตร และเวลาในการกลั่นเท่ากับ 7 นาที

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยโปรตีนหลอดละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องกลั่น และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 % (w/v) ตามปริมาตรที่กำหนดไว้ เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกินพอซึ่งสังเกตได้จากสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำ

4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 200 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 3 การไตเตรท

1. นำสารละลายที่กลั่นได้ (สารละลายสีเขียว) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M จนถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ต้องการ ดังสมการ

$$\text{\% Nitrogen} = \frac{(Vs - Vb) \times N \times 14 \times 100}{Wt.sample \times 1000}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อ Vs คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

3. คำนวณปริมาณโปรตีนโดย

ปริมาณโปรตีน = % Nitrogen x 6.25

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี soxhlet (ตามวิธีของ AOAC (2000))

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. thimble
3. ตู้อบไฟฟ้าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK))
4. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus; Gerhardt)
5. กระดาษกรอง Whatman No.1
6. โถดูดความชื้น (desiccator)
7. rotary evaporator (Buchi รุ่น R-114, Switzerland)

<u>สารเคมี</u>

1.ปิโตรเลียมอีเทอร์

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้งแล้วประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วใส่ลงใน thimble

2. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัดที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน และต่อเข้ากับชุดสกัดโดยใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง

3. ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้โดยใช้ rotary evaporator

4. อบตัวอย่างไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ในขวดสกัดที่อุณหภูมิ 100 ± 2 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

5. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสมการ

$$\text{ปริมาณไขมัน} = \frac{Wo \times 100}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

Wo คือ น้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก.4 การกำจัดไขมันออกจากโปรตีนมะพร้าวสกัด (ดัดแปลงจากวิธีของ Rasyid et al. (1992) และ AOAC (2000))

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. thimble
3. ตู้อบไฟฟ้าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK))
4. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus; Gerhardt)
5. สำลี
6. โถดูดความชื้น (desiccator)
7. ตู้ดูดควัน (fume hood; BossTech)

<u>สารเคมี</u>

1.ปิโตรเลียมอีเทอร์

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวประมาณ 6 กรัม ใส่ลงใน thimble และใช้สำลีที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้วปิดด้านบนบางๆ

2. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัด และต่อเข้ากับชุดสกัดโดยใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง

3. วาง thimble ที่บรรจุตัวอย่างอยู่ไว้ในตู้ดูดควัน เพื่อระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออก จนตัวอย่างแห้ง

4. นำตัวอย่างออกจาก thimble ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม แล้วอบที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

5. เก็บรักษาตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้วไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก.5 การวิเคราะห์ degree of deamidation ตามวิธีของ Suppavorasatit et al. (2011) และ Kunarayakul et al. (2018) (โดยใช้ ammonia colorimetric assay kit II)

อุปกรณ์

1. 96 well microtiter plate
2. incubator (Heraeus รุ่น B5042, Germany)
3. microplate reader (ASYS รุ่น UVM340, Biochrom Ltd., UK)

สารเคมี

1.ammonia colorimetric assay kit II (Biovision Inc., Milpitas, CA) ประกอบด้วย

- สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์มาตรฐาน
- reagent A
- reagent B

2. น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดยเจือจางสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์มาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย 990 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ลงใน 96 well microtiter plate ในปริมาณ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสารละลายในแต่ละหลุมเป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย จะได้ความเข้มข้นเป็น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 nmol/หลุม

2. ใส่ตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงใน 96 well microtiter plate และปรับปริมาตรภายในหลุมให้เป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย

3. เติม reagent A ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

4. เติม reagent B ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

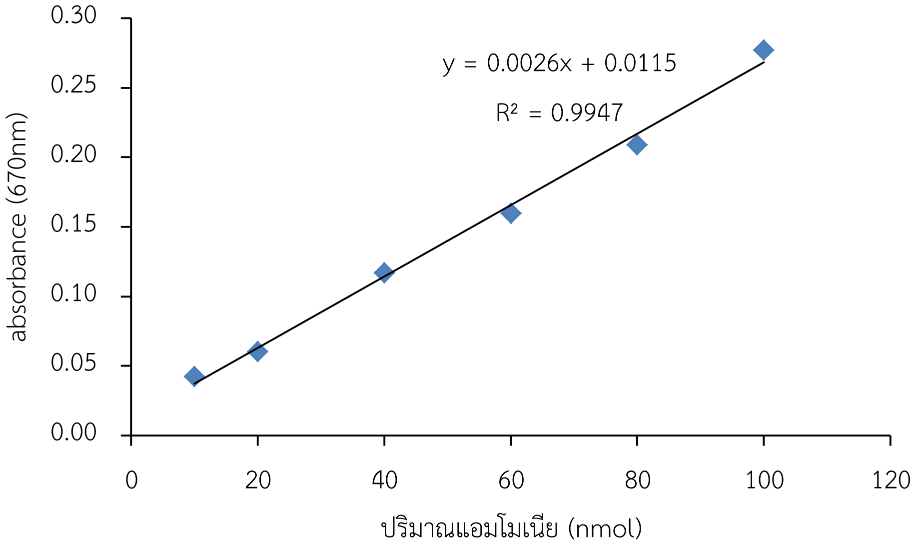
5. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร

6. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์มาตรฐาน และคำนวณปริมาณแอมโมเนียของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. ค่า degree of deamidation (DD, %) คำนวณจากปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างเทียบกับปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2 N ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ย่อยอย่างสมบูรณ์)

<u>กราฟมาตรฐาน</u>



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมโมเนีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก.6 การวิเคราะห์ degree of hydrolysis ตามวิธีของ Suppavorasatit et al. (2011) และ Kunarayakul et al. (2018) (โดยใช้ DC protein assay)

<u>อุปกรณ์</u>

1. 96 well microtiter plate
2. microplate reader (ASYS รุ่น UVM340, Biochrom Ltd., UK)

<u>สารเคมี</u>

1. DC Protein Assay (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ประกอบด้วย
   - bovine serum albumin (BSA)

- reagent A (alkaline copper tartrate solution)
- reagent B (Folin reagent)

2. Tris-buffer saline (TBS)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยละลาย BSA 15 มิลลิกรัม ในสารละลาย TBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเจือจางสารละลาย BSA ทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 1200, 900, 600, 300, 100, 30, 10, และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใส่สารละลาย BSA และตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตรลงใน 96 well microtiter plate

3. เติม reagent A ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

4. เติม reagent B ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

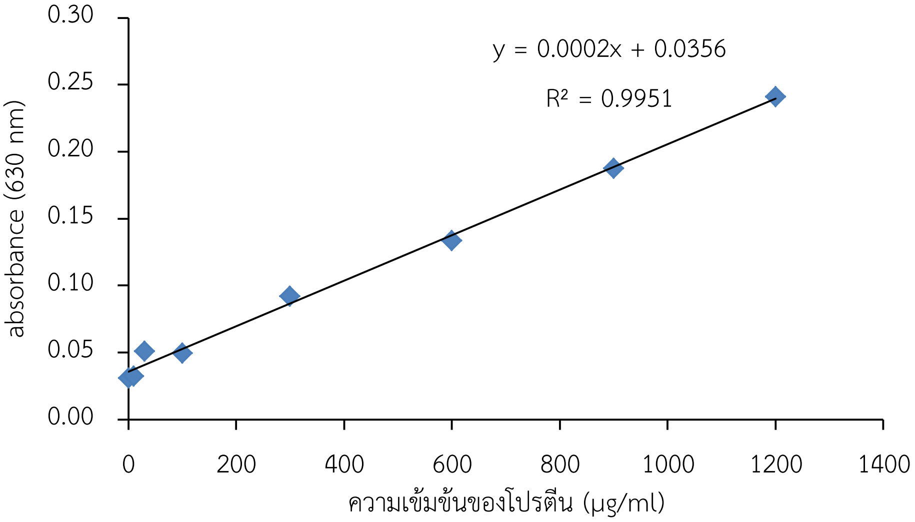
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเติม reagent B

6. สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลาย BSA และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ละลายของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

7. ค่า degree of hydrolysis (DH, %) คำนวณจากปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2 N ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ย่อยอย่างสมบูรณ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>กราฟมาตรฐาน</u>



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข
การเตรียมบัฟเฟอร์

ข.1 Citrate-phosphate-borate buffer pH = 7.0 (ดัดแปลงจาก Östling และ Virtama (1946))

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซิตริก
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
3. กรดบอริก
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N
5. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 N
6. น้ำกลั่น

<u>วิธีการเตรียม</u>

1. เตรียม buffer stock โดยการชั่ง ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.709 กรัม กรดซิตริก 6.935 กรัม และกรดบอริก 3.135 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 243 มิลลิลิตร

2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3. ผสม buffer stock ปริมาตร 20 มิลลิลิตรกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 33.51 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.0, ความเข้มข้น 0.05 M)

<u>สารเคมี</u>

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. น้ำกลั่นปราศจากกลิ่น (odorless distilled water)

- เตรียมโดยนำน้ำกลั่นไปต้มในภาชนะเปิดให้น้ำระเหยออกไปหนึ่งในสามส่วนของปริมาตรเริ่มต้น

<u>วิธีการเตรียม</u>

1. ชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.7090 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากกลิ่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร
2. ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.8045 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากกลิ่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร
3. ผสมสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 615 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 385 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ pH = 7.0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

molecular mass distribution

สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล

ตารางที่ ค.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าว

น้ำหนักโมกุล (kDa)	untreated coconut protein (%)	deamidated coconut protein (%)
55	31.34	29.38
30	36.12	36.10
24	4.63	5.19
22	17.50	16.90
18	6.95	8.58
16	2.02	4.10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง
การเตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้ว

ง.1 การกำจัดความมีขั้วบนผิวแก้ว (silanization) (ทำตามวิธีของ Tsutsumi et al. (2003))

<u>สารเคมี</u>

1. dimethyldichlorosilane
2. โทลูอีน
3. เมทานอล

<u>วิธีการเตรียม</u>

1. เตรียมสารละลาย dimethyldichlorosilane ความเข้มข้น 10 % (v/v) ในโทลูอีน โดยผสมสารละลายไดเมทิลไดคลอโรไซเลนปริมาตร 100 มิลลิลิตรกับสารละลายโทลูอีนปริมาตร 900 มิลลิลิตร

2. แช่เครื่องแก้วในสารละลาย dimethyldichlorosilane ความเข้มข้น 10 % (v/v) เป็นเวลา 30 นาที

3. นำเครื่องแก้วกลั้วด้วยเมทานอล

4. นำเครื่องแก้วมาล้างด้วยน้ำกลั่น

5. นำเครื่องแก้วไปอบที่อุณหภูมิ 190 °C เป็นเวลา 90 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ง.2 การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (sterilization)

<u>อุปกรณ์</u>

1. autoclave (high pressure steam sterilizer รุ่น TOMY SX-700)

<u>วิธีการเตรียม</u>

1. นำขวดแก้วที่ใช้สำหรับทำอันตรกิริยาและทิป ไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

2. นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก จ

การหา response factor ของวานิลลินและดิวเทอเรียมวานิลลิน (vanillin-d_3)

จ.1 วิธีเตรียมสารมาตรฐาน ตามวิธีของ Suppavorasatit and Cadwallader (2012)

1. เตรียม stock วานิลลิน โดยการชั่งวานิลลิน 10.5 มิลลิกรัมแล้วละลายในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้วานิลลินความเข้มข้น 1050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียม stock vanillin-d_3 โดยการชั่ง vanillin-d_3 4.6 มิลลิกรัมแล้วละลายในเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ vanillin-d_3 ความเข้มข้น 920 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ผสมสารละลายในข้อที่ 1 และ 2 เข้าด้วยกันที่อัตราส่วนต่าง ๆ ทั้งหมด 7 อัตราส่วน ได้แก่ 1:20, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 10:1, และ 20:1 และปรับปริมาตรของแต่ละอัตราส่วนด้วย diethyl ether ให้เป็น 1.0 มิลลิลิตร

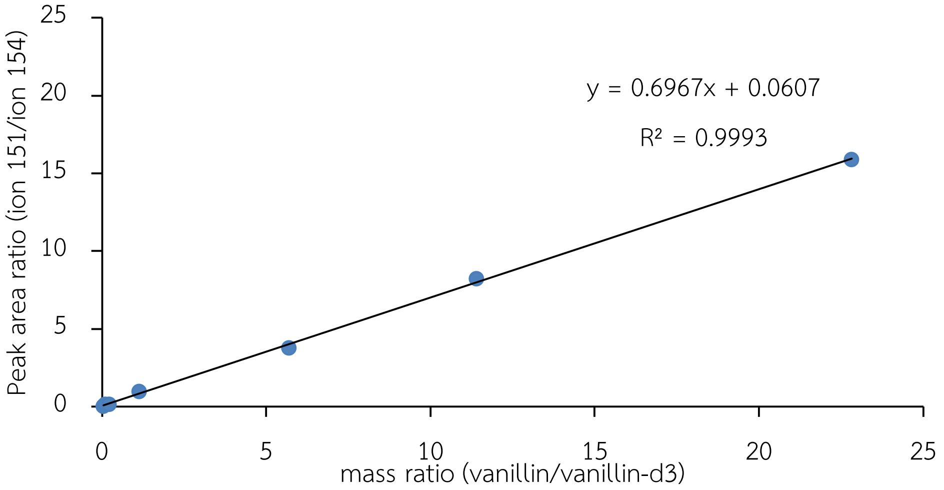
4. วิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายผสมระหว่างวานิลลินกับดิวเทอเรียมวานิลลินด้วยเครื่องมือ GC-MS

5. สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ (peak area ratio) และอัตราส่วนของมวลของวานิลลินต่อดิวเทอเรียมวานิลลิน (mass ratio) และคำนวณค่า response factor จากค่าความชันของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>กราฟมาตรฐาน</u>

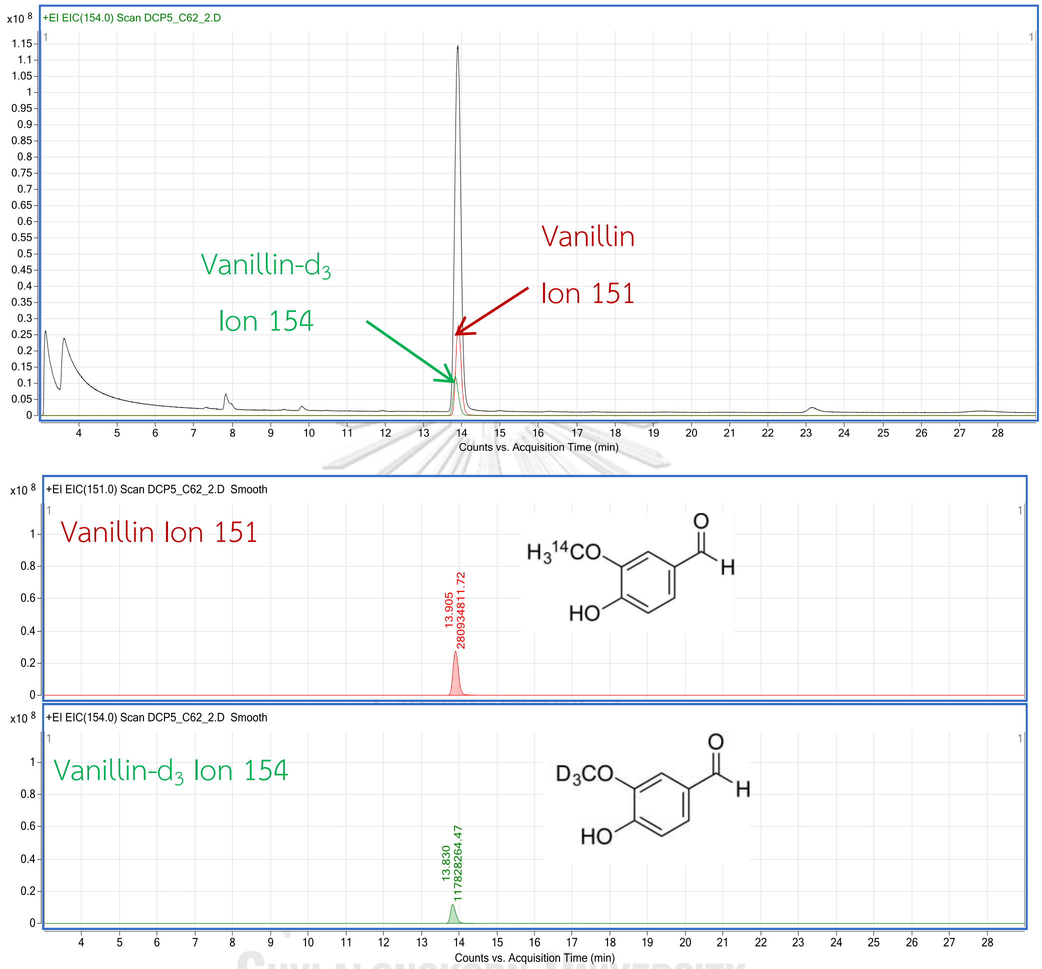
Response factor = 1/slope = 1.44



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของ vanillin vs vanillin-d_3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จ.2 ตัวอย่าง chromatogram



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ จ.2 โครมาโตแกรมของ vanillin และ vanillin-d_3

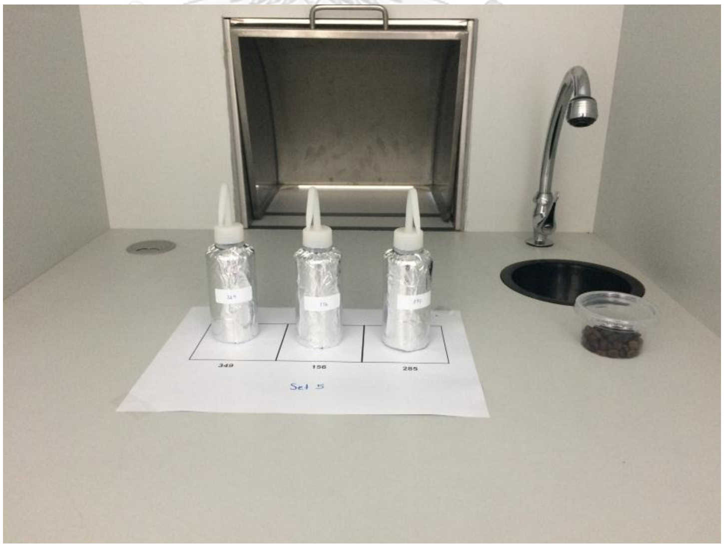
ภาคผนวก ฉ
การประเมินทางประสาทสัมผัส

ฉ.1 ความเข้มข้นของวานิลลินที่ใช้ในการทดสอบ ตามวิธีของ Suppavorasatit et al. (2013)

ตารางที่ ฉ.1 ความเข้มข้นสุดท้ายของวานิลลินในตัวอย่างทดสอบสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น

Coconut protein	Concentration (µg/mL)					
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6
	x/27	x/9	x/3	x[a]	3x	9x
Untreated Coconut Protein (CP)	1.667	5.000	15.00	45.00	135.0	405.0
Deamidated Coconut Protein (DCP)	1.667	5.000	15.00	45.00	135.0	405.0

[a]Concentrations were based on the literature (Suppavorasatit et al., 2013) and preliminary testing



รูปที่ ฉ.1 ชุดตัวอย่างทดสอบสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น

ฉ.2 วิธีการคัดเลือกผู้ทดสอบ

1. การคัดกรองผู้เข้าร่วมวิจัย
ทำการคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยโดยใช้แบบสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มประชากร

รหัสผู้ทดสอบ.............................
วันที่ทดสอบ................................

แบบสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มประชากร

แบบสอบถามนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่องสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรโดยดีแอมิเดชันด้วยโปรตีนกลูทามิเนส คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบบสอบถามนี้ใช้ในการคัดกรองกลุ่มผู้ทดสอบ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่านที่กรุณาให้ความร่วมมือตอบแบบสอบถามมา ณ โอกาสนี้

คำชี้แจง โปรดทำเครื่องหมาย ✓ลงในช่อง ☐ ที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมและตรงกับความคิดเห็นของท่าน หรือกรอกข้อมูลตามความเป็นจริงลงในช่องว่าง

ท่านมีความยินดีที่จะเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยนี้หรือไม่

☐ **ยินดี** ☐ **ไม่ยินดี**

1. อายุ: .... ปี
2. ท่านมีโรคประจำตัวเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจหรือไม่

☐ ไม่มี ☐ มี โปรดระบุ...

3. ท่านสามารถรับประทานเครื่องดื่มโปรตีน (เช่น นม) ที่มีการแต่ง**กลิ่นวานิลลา** ได้หรือไม่ (แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ให้รับประทาน)

☐ ไม่ได้ ☐ ได้

4. ท่านสามารถเข้าร่วม **การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่นวานิลลาในสารละลายโปรตีนมะพร้าว** ได้หรือไม่หากท่านได้ผ่านการคัดกรอง

☐ ไม่ได้ ☐ ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. เกณฑ์การคัดเข้าร่วมวิจัย

2.1 ผู้ทดสอบเพศชายหรือหญิง ที่มีอายุตั้งแต่ 20-60 ปี

2.2 เป็นอาจารย์, นิสิตระดับปริญญาตรี โทหรือเอก และ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 สามารถแยกแยะความแตกต่างกลิ่นได้ โดยพิจารณาจากผลการทดสอบเบื้องต้นในข้อ 3 โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการคัดเลือกจะต้องตอบถูกติดต่อกันอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น

2.4 มีสุขภาพดี และไม่มีโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ

2.5 มีความยินดีที่จะเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

3. การทดสอบดมกลิ่นเบื้องต้น

รหัสผู้ทดสอบ............................

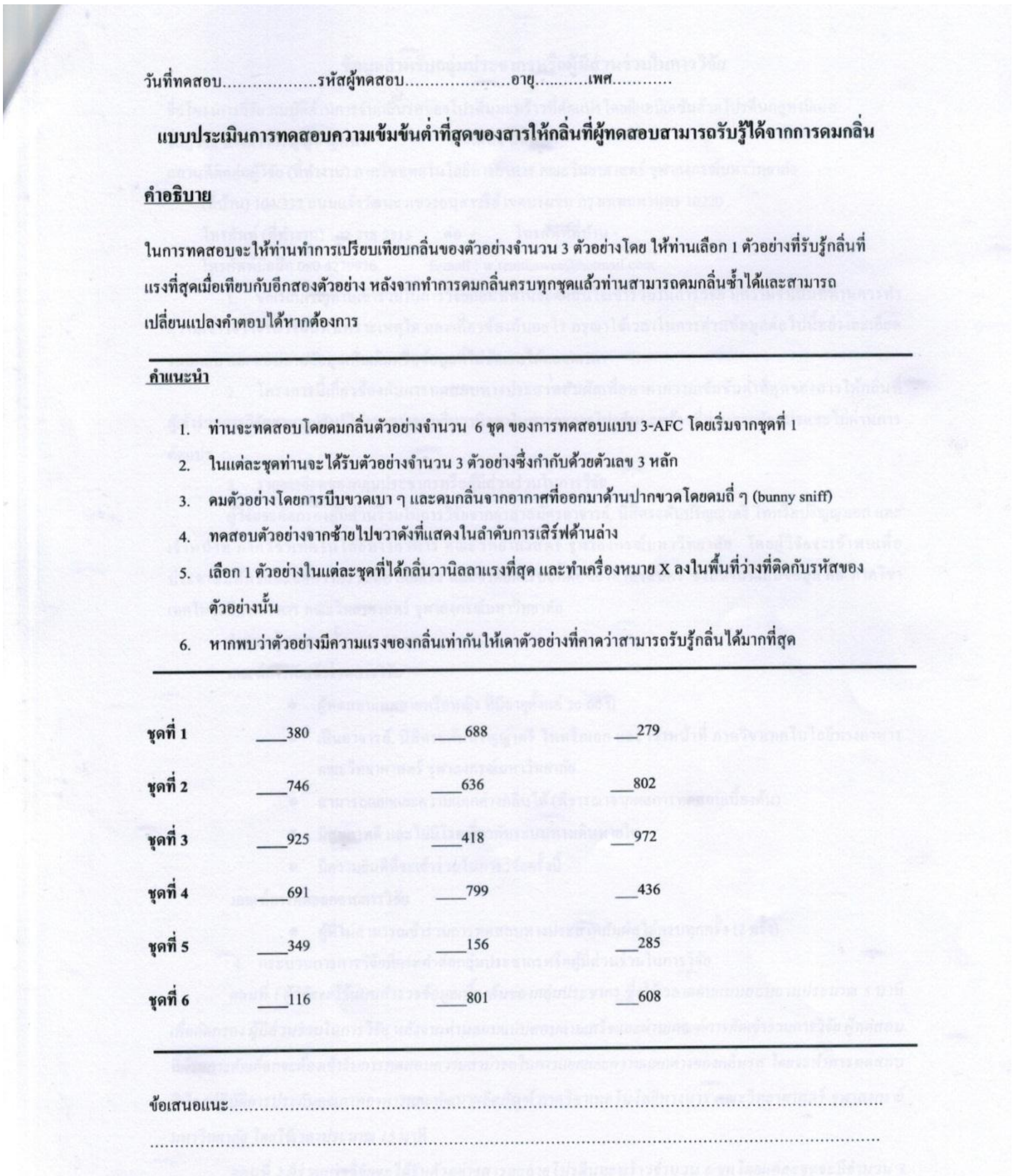
วันที่ทดสอบ................................

คำอธิบาย ให้ท่านดมกลิ่นของตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่าง และทำเครื่องหมาย “X” ลงในช่องว่างของตัวอย่างที่ท่านสามารถรับรู้กลิ่นวานิลลาได้แรงกว่า

ชุดที่ 1	☐	133	☐	612
ชุดที่ 2	☐	221	☐	809
ชุดที่ 3	☐	626	☐	740
ชุดที่ 4	☐	913	☐	691
ชุดที่ 5	☐	706	☐	378

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ฉ.2 แบบประเมินการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น



วันที่ทดสอบ..................รหัสผู้ทดสอบ....................อายุ..........เพศ............

แบบประเมินการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น

คำอธิบาย

ในการทดสอบจะให้ท่านทำการเปรียบเทียบกลิ่นของตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างโดย ให้ท่านเลือก 1 ตัวอย่างที่รับรู้กลิ่นที่แรงที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองตัวอย่าง หลังจากทำการดมกลิ่นครบทุกชุดแล้วท่านสามารถดมกลิ่นซ้ำได้และสามารถเปลี่ยนแปลงคำตอบได้หากต้องการ

คำแนะนำ

1. ท่านจะทดสอบโดยดมกลิ่นตัวอย่างจำนวน 6 ชุด ของการทดสอบแบบ 3-AFC โดยเริ่มจากชุดที่ 1
2. ในแต่ละชุดท่านจะได้รับตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างซึ่งกำกับด้วยตัวเลข 3 หลัก
3. ดมตัวอย่างโดยการบีบขวดเบา ๆ และดมกลิ่นจากอากาศที่ออกมาด้านปากขวดโดยดมถี่ ๆ (bunny sniff)
4. ทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวาดังที่แสดงในลำดับการเสิร์ฟด้านล่าง
5. เลือก 1 ตัวอย่างในแต่ละชุดที่ได้กลิ่นวานิลลาแรงที่สุด และทำเครื่องหมาย X ลงในพื้นที่ว่างที่ติดกับรหัสของตัวอย่างนั้น
6. หากพบว่าตัวอย่างมีความแรงของกลิ่นเท่ากันให้เดาตัวอย่างที่คาดว่าสามารถรับรู้กลิ่นได้มากที่สุด

ชุดที่ 1	____380	____688	____279
ชุดที่ 2	____746	____636	____802
ชุดที่ 3	____925	____418	____972
ชุดที่ 4	____691	____799	____436
ชุดที่ 5	____349	____156	____285
ชุดที่ 6	____116	____801	____608

ข้อเสนอแนะ...

....

รูปที่ ฉ.2 แบบประเมินการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น

ฉ.3 การคำนวณค่า best estimate threshold (BET)

Panelists	Concentration (ug/ml)						Best-Estimate Threshold (BET)	
	set1	set2	set3	set4	set5	set6	Value	log10 of value
	1.667	5	15	45	135	405		
1	+	+	0	+	+	+	25.98	1.41
2	0	0	0	0	+	+	77.94	1.89
3	0	0	0	+	+	+	25.98	1.41
4	0	0	0	0	+	+	77.94	1.89
5	0	+	+	+	+	+	2.89	0.46
6	0	+	0	+	+	+	25.98	1.41
7	+	+	+	+	+	+	1.67	0.22
8	0	+	0	+	+	+	25.98	1.41
9	+	0	+	+	+	+	8.66	0.94
10	0	0	+	+	+	+	8.66	0.94
11	+	+	+	+	+	+	1.67	0.22
12	0	0	+	+	+	+	8.66	0.94
13	0	0	0	0	+	+	77.94	1.89
14	0	+	0	0	+	+	77.94	1.89
15	0	+	+	+	+	+	2.89	0.46
16	0	0	0	+	+	+	25.98	1.41
17	0	+	0	+	+	+	25.98	1.41
18	+	+	0	+	+	+	25.98	1.41
19	0	0	+	+	+	+	8.66	0.94
20	0	+	+	+	+	+	2.89	0.46
21	0	0	+	+	+	+	8.66	0.94
22	0	+	+	+	+	+	2.89	0.46
23	0	0	0	+	+	+	25.98	1.41
24	0	0	0	+	+	+	25.98	1.41
25	0	+	0	+	+	+	25.98	1.41
26	0	0	0	+	+	+	25.98	1.41
27	0	0	+	+	+	+	8.66	0.94
							Σlog10	31.04
							log10BET	1.15
							log10SD	0.51
							BET	14.11
							SD	3.27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ ฉ.3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของกลุ่มผู้ทดสอบสำหรับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยดีแอมิเดชัน (DCP) “0” หมายถึงผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างทดสอบในชุดการทดสอบผิด “+”หมายถึงผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างทดสอบในชุดการทดสอบถูกต้อง (n=27)

ตัวอย่างการคำนวณค่า BET

ผู้ทดสอบที่ 1 BET = $\sqrt{15 \times 45}$ = 25.98

$\log_{10}25.98$ = 1.41

ผู้ทดสอบที่ 2 BET = $\sqrt{45 \times 135}$ = 77.94

$\log_{10}77.94$ = 1.89

(คำนวณด้วยวิธีที่แสดงข้างต้นกับผู้ทดสอบทั้งหมด)

BET = 14.11 µg/ml

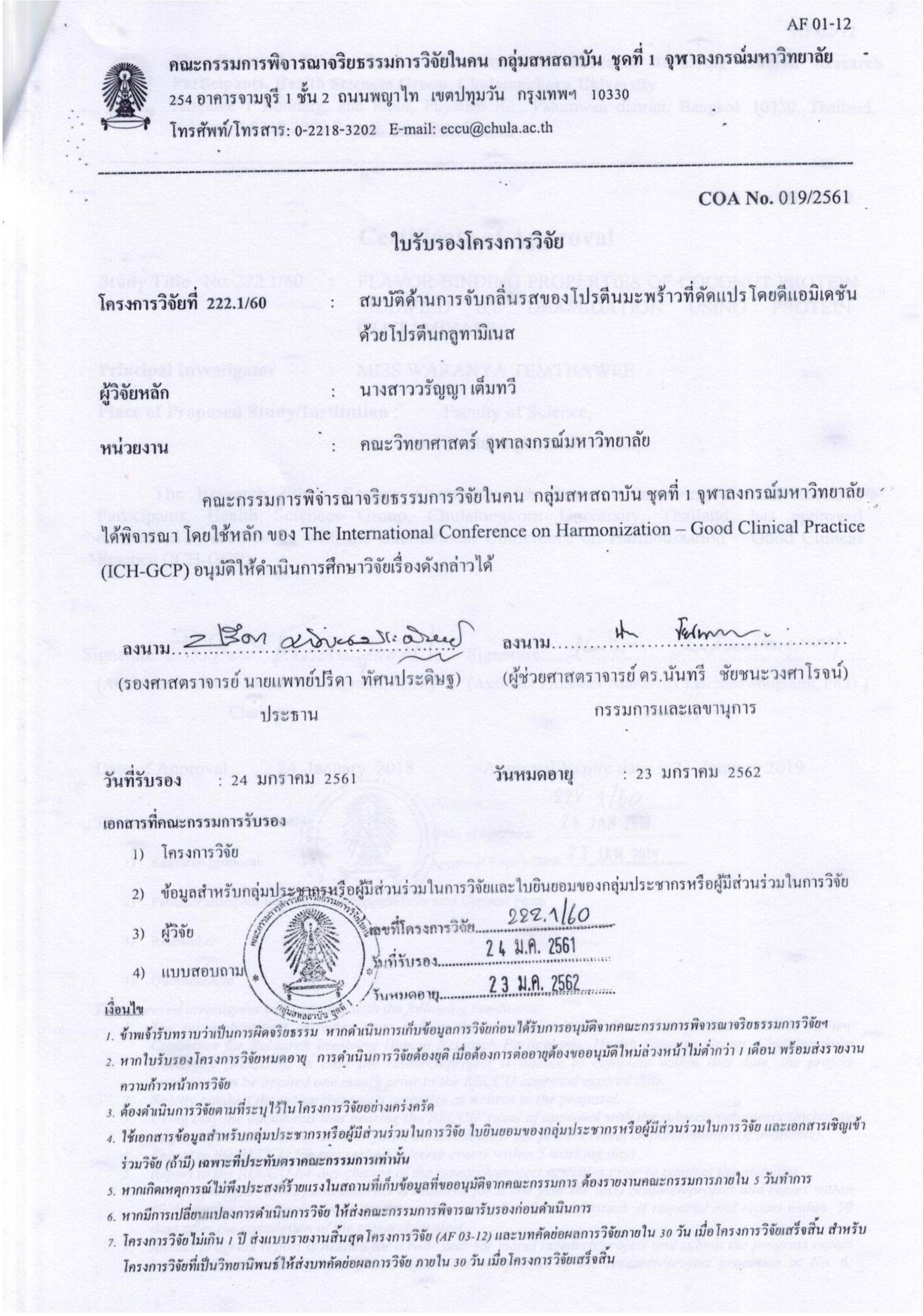
$\log_{10}BET$ = 1.15

log SD = 0.51

ดังนั้นค่า BET ของกลุ่มผู้ทดสอบสำหรับตัวอย่าง DCP เท่ากับ 14.11 ± 3.27 µg/ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ฉ.4 ใบรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น



AF 01-12

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 อาคารจามจุรี 1 ชั้น 2 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์/โทรสาร: 0-2218-3202 E-mail: eccu@chula.ac.th

COA No. 019/2561

ใบรับรองโครงการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 222.1/60 : สมบัติด้านการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรโดยดีแอมิเดชันด้วยโปรตีนกลูทามิเนส

ผู้วิจัยหลัก : นางสาววรัญญา เต็มทวี

หน่วยงาน : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณา โดยใช้หลัก ของ The International Conference on Harmonization – Good Clinical Practice (ICH-GCP) อนุมัติให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องดังกล่าวได้

ลงนาม..
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปรีดา ทัศนประดิษฐ)
ประธาน

ลงนาม..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)
กรรมการและเลขานุการ

วันที่รับรอง : 24 มกราคม 2561 **วันหมดอายุ** : 23 มกราคม 2562

เอกสารที่คณะกรรมการรับรอง

1) โครงการวิจัย
2) ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยและใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
3) ผู้วิจัย
4) แบบสอบถาม

เลขที่โครงการวิจัย 222.1/60
วันที่รับรอง 24 ม.ค. 2561
วันหมดอายุ 23 ม.ค. 2562

<u>เงื่อนไข</u>

1. *ข้าพเจ้ารับทราบว่าเป็นการผิดจริยธรรม หากดำเนินการเก็บข้อมูลการวิจัยก่อนได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยฯ*
2. *หากใบรับรองโครงการวิจัยหมดอายุ การดำเนินการวิจัยต้องยุติ เมื่อต้องการต่ออายุต้องขออนุมัติใหม่ล่วงหน้าไม่ต่ำกว่า 1 เดือน พร้อมส่งรายงานความก้าวหน้าการวิจัย*
3. *ต้องดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด*
4. *ใช้เอกสารข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย ใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัย (ถ้ามี) เฉพาะที่ประทับตราคณะกรรมการเท่านั้น*
5. *หากเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงในสถานที่เก็บข้อมูลที่ขออนุมัติจากคณะกรรมการ ต้องรายงานคณะกรรมการภายใน 5 วันทำการ*
6. *หากมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินการวิจัย ให้ส่งคณะกรรมการพิจารณารับรองก่อนดำเนินการ*
7. *โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่งแบบรายงานสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 03-12) และบทคัดย่อผลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น สำหรับโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ให้ส่งบทคัดย่อผลการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น*

รูปที่ ฉ.4 ใบรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนสำหรับการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรัญญา เต็มทวี เกิดวันที่ 5 เมษายน 2535 ภูมิลำเนาจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1 สาขาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2558

นางสาววรัญญา เต็มทวี ได้นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในหัวข้อ ผลของการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูทามิเนสต่อสมบัติการจับกับวานิลลิน ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 29-30 มีนาคม พ.ศ. 2561

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University