

ภาวะเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ *Vigna mungo* ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITION FOR PRODUCTION OF BLACK BEAN *Vigna*
mungo HYDROLYSATE WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะเหมาะที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่ว ดำ <i>Vigna mungo</i> ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
โดย	น.ส.นฤมล บำรุงศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิกันต์ กุ้งษ์ศักดิ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวณิช)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม)	

นฤมล บำรุงศาสตร์ : ภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ *Vigna mungo* ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน. (OPTIMAL CONDITION FOR PRODUCTION OF BLACK BEAN *Vigna mungo* HYDROLYSATE WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยโปรตีน และกระบวนการทำแห้งที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ผลการศึกษาการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] ที่ระดับความเข้มข้น 1-7 % (w/w) และระยะเวลาย่อย 60 - 1200 นาที ด้วยการใช้วิธีพ่นฝอยตอบสนองและการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง พบว่าภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นทำให้ไฮโดรไลเสตมีค่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ระดับการย่อยเป็นผลตอบสนองที่มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ โดยระดับการย่อยที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น ($p < 0.05$) การผลิตไฮโดรไลเสตทำให้เกิดสารประกอบ Maillard Reaction Products สมการของผลตอบสนองต่าง ๆ มีค่า p -value ของ Lack of fit อยู่ในช่วง 0.102 - 0.359 และมีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.8717 - 0.9557 การทำนายภาวะย่อยโปรตีนจากการกำหนดเกณฑ์ของผลตอบสนอง (ระดับการย่อย 75% และค่าผลตอบสนองตัวอื่น ๆ สูงสุด) พบว่าภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.09 % (w/w) และระยะเวลาย่อย 360 นาที เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง จากการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการพบว่าเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อน (% error) ของค่าผลตอบสนองที่ได้จากการทำนายแตกต่างจากค่าที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วง 0.54 - 27.46% เมื่อนำไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยในภาวะที่คัดเลือกมาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฝม-แมตที่อุณหภูมิ 60 °C พบว่าการทำแห้งแบบโฝม-แมตมีอัตราส่วนความชื้นลดลงและมีอัตราการอบแห้งสูงกว่าการทำแห้งแบบถาด เมื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายลักษณะการทำแห้งพบว่าแบบจำลองของ Weibull ให้ค่า r สูง และค่า MRS และ $RMSE$ ต่ำ เมื่อเทียบกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์อื่น ๆ ที่ใช้การนำแบบจำลองมาตรวจสอบการใช้ได้ของสมการพบว่า % error ของปริมาณความชื้นของไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทำนายแตกต่างจากค่าที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วง 0.44 - 6.05% เมื่อนำไฮโดรไลเสตมาทำแห้งด้วยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 °C พบว่าการทำแห้งที่มีระยะเวลา 380 - 450 นาที ทำให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 18 - 21% โดยน้ำหนักแห้ง การนำไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้ง 3 วิธี ช่างต้นในระยะเวลาที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสุดท้าย 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง มาวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ พบว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดทำให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ TCA-soluble peptides ความสามารถในการละลาย และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยวิธีอื่น ($p < 0.05$) ในขณะที่การทำแห้งด้วยสุญญากาศทำให้ไฮโดรไลเสตมีความสามารถด้าน DPPH radical scavenging activity สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยวิธีอื่น แต่มีความสามารถด้าน Metal-chelating และ Oxygen Radical Absorbance Capacity ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับการทำแห้งวิธีอื่น ($p > 0.05$)

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อ นิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5871975723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD:

Naruemol Bumrungsart : OPTIMAL CONDITION FOR PRODUCTION OF BLACK BEAN *Vigna mungo* HYDROLYSATE WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY. Advisor: Asst. Prof. KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D.

This research aimed to investigate optimal enzymatic hydrolysis condition and suitable drying process for high antioxidant activity—black bean hydrolysate processing. Enzymatic hydrolysis conditions, Flavourzyme® concentration of 1 - 7% by dried weigh of steamed beans and hydrolysis time of 60 - 1200 min, were optimized using response surface methodology with central composite design. The results showed that hydrolysis conditions with increasing enzyme concentration and hydrolysis time resulted in increasing in degree of hydrolysis (DH) value ($p < 0.05$). Increasing DH also resulted in increasing antioxidant activity due to the higher amount of free amino groups and released phenolic compounds in hydrolysate ($p < 0.05$). The multiple regression analysis of response models showed that p -value of Lack of fit and r^2 values were in the range of 0.102 - 0.359 and 0.8717 - 0.9557, respectively. Hydrolysis condition with Flavourzyme® concentration of 6.09% and hydrolysis time of 360 min was the optimal condition to yield high antioxidant activity—black bean hydrolysate at DH of 75%. Validation of response models showed that predicted values were different from observed values in the range of 0.54 - 27.46%. Three different drying methods (tray, foam-mat and vacuum drying) at 60°C were applied to dry black bean hydrolysate. Moisture ratio rate and drying rate in foam-mat drying was higher than those in tray drying. Six mathematic models were applied to describe the drying characteristic of tray and foam-mat dried bean hydrolysate. Model of Weibull was selected due to the highest r and lowest MRS and $RMSE$ values comparing with the values from other drying models. The validation of model showed that the difference between predicted and observed values of moisture content (MC) was in the range of 0.44 - 6.05%. Vacuum drying took 380 - 450 min to dry hydrolysate to 18 - 21% MC. Dried black bean hydrolysate sample, MC-18 and 21%, obtained from different drying methods were analyzed. The results showed that dried hydrolysate obtained from tray drying, at 21% MC, contained higher amount of total phenolic compounds, flavonoids, TCA-soluble peptides and higher antioxidant activity (DPPH radical scavenging, FRAP, Metal-chelating and Oxygen Radical Absorbance Capacity) compared to dried hydrolysate obtained from vacuum and foam-mat drying, respectively ($p < 0.05$).

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน มาตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิกันต์ กุ้พงษ์ศักดิ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม ที่ได้สละเวลามาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาชี้แนะแนวทาง และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ ตลอดงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคน สำหรับกำลังใจ และความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และญาติทุกท่าน สำหรับความรัก ความห่วงใย และกำลังใจ รวมทั้งให้การสนับสนุนและส่งเสริมให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นฤมล บำรุงศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ถั่วดำ	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วดำ.....	3
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดำ	4
2.2 ไพรตีนไฮโดรไลเสตและกระบวนการผลิต	6
2.2.1 ระดับการย่อย	7
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยไพรตีนด้วยเอนไซม์	8
2.3 การอบแห้ง.....	13
2.3.1 จลนพลศาสตร์การอบแห้ง	14
2.3.2 ชนิดของเครื่องอบแห้ง	18
2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสต	21
2.4.1 สมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย	21
2.4.2 สมบัติการต้านออกซิเดชัน	21
บทที่ 3 อุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	25

3.1	ศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง	28
3.1.1	การออกแบบแผนการทดลอง	28
3.1.2	การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของผลตอบสนอง	29
3.1.3	การสร้างสมการพหุคูณ	32
3.1.4	การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการ	32
3.2	ศึกษาวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆ ในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	33
3.2.1	ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งต่าง ๆ	33
3.2.3	ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน	36
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
4.1	ผลของภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง	40
4.1.1	ผลของภาวะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ต่อผลตอบสนองของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ	40
4.1.2	การสร้างสมการพหุคูณของผลตอบสนองและการวิเคราะห์ทางสถิติ	44
4.1.3	การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการ	48
4.2	ผลของวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆ ในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	50
4.2.1	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ	50
4.2.2	สมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน	59
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	70
5.1	สรุปผลการทดลอง	70

5.2 ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก รายละเอียดของเอนไซม์	80
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	82
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	93
ประวัติผู้เขียน.....	100



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดำ.....	4
2.2 สมบัติของวิตามินและเลกูมิน.....	6
3.1 การออกแบบแผนกการผลิตสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	29
4.1 ผลของภาวะการย่อยโปรตีนต่อระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาลของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	41
4.2 ผลของภาวะการย่อยโปรตีนต่อ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	44
4.3 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของผลตอบสนองสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยการย่อยในภาวะที่เหมาะสมที่สุด	49
4.4 ค่าคงที่ของไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส.....	51
4.5 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการทำแห้งไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ	53
4.6 ค่าสัมประสิทธิ์จากแบบจำลองต่าง ๆ ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	53
4.7 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณความชื้นในการทำแห้งไฮโดรไลเสตด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต.....	56
4.8 ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระจากการทำ trial and error ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ.....	57
4.9 ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน	60
4.10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และ TCA-soluble peptides ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน.....	61
4.11 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ORAC และ FRAP ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน....	67
4.12 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย METAL-CHELATING ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน.....	69

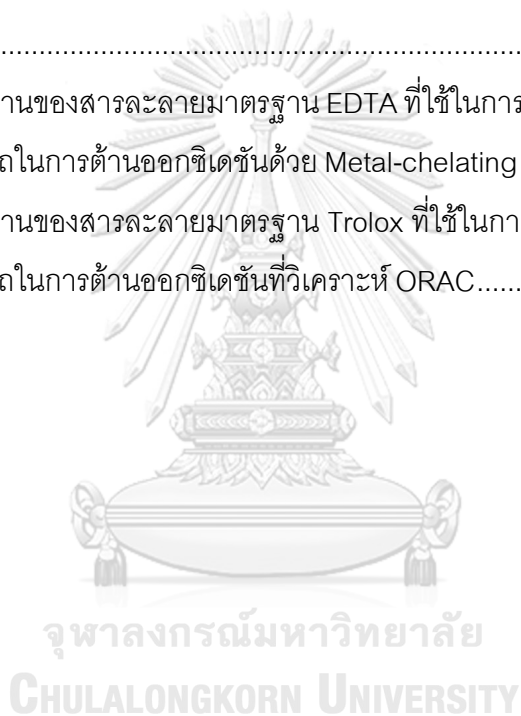
ตารางที่	หน้า
ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจาก ถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย.....	93
ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และ ระยะเวลาย่อย	94
ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดสีน้ำตาลของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย.....	94
ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้าน ออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย	95
ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้าน ออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power ของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย	96
ค.6 ตารางที่ Model Summary ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	96
ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณความชื้นของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	97
ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	97
ค.9 ตารางที่ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีน อลิกทั้งหมดของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	97
ค.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของไฮโดรไล เสต จากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	97

ตารางที่	หน้า
ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของ TCA-soluble peptides ของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	98
ค.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของสมบัติการละลายของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	98
ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	98
ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของ Oxygen Radical Absorbance Capacity ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	99
ค.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง	99
ค.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ที่วิเคราะห์ Metal-chelating ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง.....	99

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของใบเลี้ยงจากถั่วที่กำลังขยาย 5,400 เท่า.....	5
2.2 กราฟการอบแห้ง.....	15
2.3 กราฟอัตราการอบแห้ง.....	15
4.1 กราฟพื้นผิวผลตอบสนองของ (ก) ระดับการย่อย (ข) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ค) การเกิดสีน้ำตาล ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ (ง) DPPH radical scavenging activity และ (จ) FRAP สำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ.....	47
4.2 กราฟอัตราส่วนความชื้นของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต.....	51
4.3 กราฟอัตราการทำแห้งของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต.....	52
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการสมการกับอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการทดลองของไฮโดรไลเสตที่ (ก) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด และ (ข) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบฟอม-แมต.....	55
4.5 กราฟปริมาณความชื้นจากการทำ trial and error ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ.....	57
4.6 ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า ของผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ (ก) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) (ข) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบฟอม-แมต (ความชื้น 18% โดยน้ำหนักแห้ง) (ค) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบฟอม-แมต (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) (ง) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 18% โดยน้ำหนักแห้ง) และ (จ) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง)...	63

ภาพที่	หน้า
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	83
ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	84
ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วย FRAP	86
ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry	88
ข.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน EDTA ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วย Metal-chelating	90
ข.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC.....	92



บทที่ 1

บทนำ

ไฮโดรไลเสตจากพืชตระกูลถั่วเริ่มได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร ในการทำหน้าที่เป็นสารปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านสมบัติการละลาย การอุ้มน้ำ การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร นอกจากนี้ยังจัดเป็นสารโภชนเภสัชที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยส่วนใหญ่ไฮโดรไลเสตจากพืชจะผลิตจากถั่วเหลือง

ถั่วดำ (black bean) เป็นถั่วเมล็ดแห้งในสกุล *Vigna* ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสูง (โปรตีนเป็นองค์ประกอบถึง 23.58%) และมีไขมันต่ำ (1.25% โดยน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยังพบสารพฤกษเคมีที่มีสมบัติต้านออกซิเดชัน เช่น สารประกอบฟีนอลิก ถั่วดำจึงเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไฮโดรไลเสต

ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตได้จากการย่อยโปรตีนด้วยการตัดสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ โดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์จะใช้ภาวะที่ไม่รุนแรง และสามารถควบคุมระดับการย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงสามารถคัดเลือกภาวะที่ปรับปรุงสมบัติของโปรตีนได้ และยังทำให้ได้หมู่อะมิโนอิสระหรือหมู่ไซข้างของกรดอะมิโนที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันเผยออกด้านนอกของโครงสร้างโปรตีน นอกจากนี้การย่อยโปรตีนทำให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจาก protein-bound polyphenols และในระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีนจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดแล้วเกิดเป็นสารประกอบ Maillard Reaction Products (MRPs) ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันอีกด้วย ภาวะการผลิตไฮโดรไลเสตที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตให้มีสมบัติตามที่ต้องการ

การนำไฮโดรไลเสตไปใช้ประโยชน์เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นจะถูกทำให้อยู่ในรูปของผงแห้งเพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสต การทำแห้งที่เหมาะสมเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสต การทำแห้งแบบลมร้อนเป็นกระบวนการที่ทำงานง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ แต่พบข้อจำกัดในผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะชื้นเหนียวและมีปริมาณน้ำตาลสูง ทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำภายในอาหารขึ้นมาที่ผิวหน้าของอาหารข้างล่างจึงใช้ระยะเวลาทำแห้งนานขึ้นส่งผลให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังการทำแห้งต่ำ การลดข้อจำกัดดังกล่าวทำได้โดยการมีกระบวนการทำให้ของเหลวขึ้นฟิมก่อนนำไปทำแห้ง เช่น การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบฟิม-แมต โดยการทำให้ขึ้นฟิมเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของตัวอย่างใน

การสัมผัสกับอากาศร้อนทำให้อัตราการระเหยน้ำออกจากอาหารสูงขึ้นจึงใช้ระยะเวลาทำแห้งสั้นลง นอกจากนี้การมีกระบวนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยสุญญากาศ ซึ่งเป็นการทำแห้งในภาวะที่มีความดันต่ำกว่าความดันบรรยากาศจึงทำให้น้ำระเหยออกจากอาหารได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าภาวะที่มีความดันบรรยากาศ อาหารจะสัมผัสกับความร้อนในระยะเวลาสั้นจึงสามารถป้องกันการถูกทำลายของสารที่ไวต่อความร้อน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนด้วยวิธีพื้นผิวตบสนองและศึกษากระบวนการทำแห้งที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® และระยะเวลาย่อยที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตบสนองในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง
2. ศึกษาระยะเวลาการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมตด้วยวิธีจลนพลศาสตร์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การทำแห้ง และศึกษาระยะเวลาการทำแห้งด้วยสุญญากาศด้วยวิธี trial and error เพื่อให้ได้ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีความชื้นต่ำกว่า 21% โดยน้ำหนักแห้ง
3. ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 ถั่วดำ

พืชตระกูลถั่วเป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและราคาถูก โดยเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เหล็ก แร่ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จึงอาจใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ในกรณีที่ต้องการหลีกเลี่ยงการบริโภคเนื้อสัตว์

ถั่วดำเป็นพืชล้มลุกที่อยู่ในวงศ์ Leguminosae วงศ์ย่อย Faboideae สกุล *Vigna* สปีชีส์ *mungo* โดยการแบ่งกลุ่มของพืชตระกูลถั่ว นั้น ถั่วดำจัดอยู่ในกลุ่มถั่วเมล็ดแห้ง (grain legume) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีปริมาณโปรตีนสูง ไขมันต่ำ และสะสมพลังงานในรูปคาร์โบไฮเดรต ถั่วดำเป็นหนึ่งในกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งที่เกษตรกรไทยนิยมปลูก เนื่องจากสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี หรือปลูกทดแทนพืชชนิดอื่นได้ในช่วงที่เกิดภาวะแล้ง จึงจัดเป็นพืชเสริมรายได้ของเกษตรกรไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2535) โดยสำหรับในแง่ของการนำไปใช้ ถั่วดำเป็นแหล่งที่สำคัญของโปรตีนและสารพฤกษเคมีมากมายที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพจึงมีการพัฒนาการใช้ประโยชน์และส่งเสริมการส่งออกทางด้านสินค้าเกษตรแปรรูปไปยังประเทศต่าง ๆ มากขึ้น ถั่วดำจึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วดำ

นักวิทยาศาสตร์สันนิษฐานว่าถั่วดำมีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศอินเดีย หรือพม่า หลังจากนั้นได้แพร่กระจายไปยังเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ ตลอดจนจนถึงทวีปอเมริกา แอฟริกา และออสเตรเลีย โดยหลักฐานการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยยังไม่แน่ชัด บางรายงานระบุว่าพบการปลูกถั่วดำประมาณปี พ.ศ. 2500 และบางรายงานระบุว่าสมาคมผู้เพาะถั่วงอกและนำเข้าถั่วแห่งประเทศไทย (The Japan Sprouting Bean Importer Association, USBIA) เป็นผู้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วดำมาจากประเทศพม่าในปี พ.ศ. 2505 และส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกที่อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี เพื่อส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น ปัจจุบันได้กระจายการปลูกไปยังจังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร อุตรดิตถ์ นครสวรรค์ และลพบุรี (นันทวรรณ สโรบล, 2547) ในอดีตถั่วดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Phaseolus mungo* L. ต่อมา Wilczek R. และ Hepper ได้ศึกษาสายพันธุ์ของถั่วดำ โดยค้นพบว่าถั่วดำมีวิวัฒนาการมาจากถั่วสายพันธุ์ป่าในประเทศอินเดีย จึงได้มีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของถั่วดำ

เป็น *Vigna mungo* (L.) Hepper และมีชื่อสามัญ คือ black gram bean, black bean และ urd bean (Rachie and Roberts, 1974) โดยลักษณะของถั่วดำจัดเป็นพืชล้มลุก มีลำต้นตั้งตรงเป็นพุ่ม บางสายพันธุ์มีลำต้นแบบกึ่งเลื้อย ส่วนของลำต้นที่อยู่เหนือ โใบเลี้ยงจะค่อนข้างเป็นเหลี่ยม และมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ดอกของถั่วดำเป็นดอกสมบูรณ์เพศ โดยแต่ละดอกมี 5 กลีบ กลีบใหญ่ 1 กลีบ กลีบข้าง 2 กลีบ และกลีบหุ้มเกสร 2 กลีบ ซึ่งกลีบหุ้มเกสรจะมีลักษณะม้วนเป็นเกลียว ปลายลักษณะคล้ายปากแตร ฝักมีลักษณะเป็นทรงกระบอกยาว ฝักสั้นตรง เมื่อแก่อาจมีสีขาวนวล น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม หรือดำ สำหรับเมล็ดของถั่วดำมีสีดำและด้าน มีลักษณะค่อนข้างเป็นทรงกระบอก ปลายตัดเป็นเหลี่ยม มีตาสีขาวคล้ายรอยแผลเป็นเล็กน้อยอยู่ทางด้านเว้าของเมล็ดตัว (นันทวรรณ สโรบล, 2547)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดำ

พืชตระกูลถั่วจัดเป็นแหล่งของสารอาหารโปรตีนที่สำคัญและมีปริมาณสูงกว่าพืชชนิดอื่น โปรตีนจากพืชตระกูลถั่วจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ ในการเสริมสร้างการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย ถั่วดำเป็นหนึ่งในกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งที่มีคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสูง มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 18 - 24% โดยน้ำหนักแห้ง และยังเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากถึง 56.6 - 63.4 % โดยน้ำหนักแห้ง (Nwokolo and Smartt, 1996) องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดำแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดำ

องค์ประกอบทางเคมี	ถั่วดำ (กรัม/ 100 กรัม ถั่วดำ โดยน้ำหนักแห้ง)
โปรตีนหยาบ	21.57
ไขมัน	1.43
เถ้า	3.33
คาร์โบไฮเดรต	60.00
เยื่อใยหยาบ	5.40

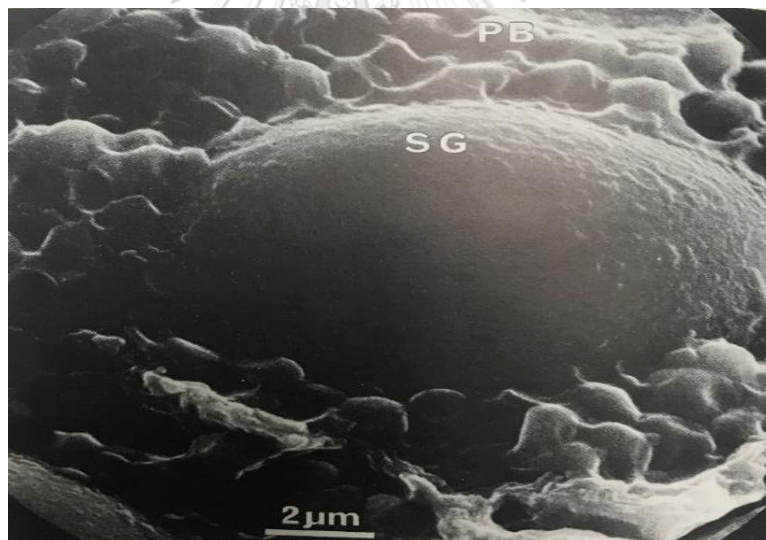
ดัดแปลงมาจาก: Salunkhe และ Kadam (1989)

นอกจากนี้ยังพบสารพิษเคมีที่มีสมบัติต้านออกซิเดชัน เช่น สารประกอบฟีนอลิก ในถั่วดำมากมายหลายชนิด เช่น กลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดโปรโตคาเทอจิก (protocatechuic acid) กรดวานิลลิก (vanillic acid) กรดคอลลอโรจินิก

(chlorogenic acid) กรดซิแนพิก (sinapic acid) เป็นต้น กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ได้แก่ ฟลาโวนอลส์ (flavonols) ฟลาแวนส์ (flavans) เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ล้วนมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการมีสมบัติเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ (Xu and Chang, 2009)

โปรตีนจากถั่ว

เมล็ดถั่วมีลักษณะโครงสร้างที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เปลือกนอก (hull) ใบเลี้ยง (cotyledon) และต้นอ่อน (hypocotyl) โปรตีนในเมล็ดถั่วดำจะถูกเก็บสะสมระหว่างการเจริญของเมล็ด ซึ่งจะกระจายอยู่บริเวณใบเลี้ยง โดยรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ในรูปของโปรตีนบอดี (protein bodies) ที่มีขนาด 1 - 5 ไมครอน มีส่วนของกลุ่มไขมันเรียกว่า spherosome กระจายรอบ protein body และมีเม็ดแป้ง (starch granule) ที่มีขนาด 25 - 40 ไมครอน แทรกตัวอยู่ระหว่าง protein body ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งแตกต่างกันตามชนิดของถั่ว (Mc Ewen et al., 1974; Van der Wilden et al., 1980) แสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของใบเลี้ยงจากถั่วที่กำลังขยาย 5,400 เท่า โดย PB คือ โปรตีนบอดี และ SG คือ เม็ดแป้ง
ที่มา: Pernollet และ Mossé (1983)

โปรตีนที่พบในเมล็ดถั่วเป็นโปรตีนกลุ่มอัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเทลิน โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนกลุ่มโกลบูลิน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ วิซิลิน (vicilin) หรือ 7S และ เลกูมิน (legumin) หรือ 11S ลักษณะของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติของวิซิลินและเลกูมิน

สมบัติ	วิซิลิน (7S)	เลกูมิน (11S)
ขนาดโปรตีน	200 ± 50 kDa	300 - 400 kDa
การละลายในสารละลายเกลือ	ละลายได้มากกว่า	ละลายได้น้อย
อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน	ที่อุณหภูมิต่ำกว่า	ที่อุณหภูมิสูงกว่า
ปริมาณไนโตรเจนและซัลเฟอร์	มีเสถียรภาพน้อยกว่า	มีเสถียรภาพดีกว่า
	ต่ำกว่า	สูงกว่า

ที่มา: Pernollet และ Mossé (1983)

อย่างไรก็ตามโปรตีนจากพืชตระกูลถั่วเป็นแหล่งโปรตีนจากธรรมชาติที่มักพบข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสม เช่น สมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย การกักเก็บน้ำ การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เป็นต้น จึงต้องนำมาผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผ่านการดัดแปรก่อน ซึ่งการดัดแปรโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงสมบัติของโปรตีนที่จะช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์ ผลิตรภัณฑ์ที่ได้จากการดัดแปรโปรตีนด้วยเอนไซม์ เรียกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต โดยใช้สำหรับการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร เช่น การใช้เป็นสารเพิ่มการละลายในอาหารเหลว (Clemente et al., 1999) สารเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Cumby et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการดัดแปรโปรตีนจากพืชตระกูลถั่วจัดเป็นสารโภชนเภสัช (nutraceutical) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพโดยใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

2.2 โปรตีนไฮโดรไลเสตและกระบวนการผลิต

โปรตีนไฮโดรไลเสต คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยการตัดสายพอลิเพปไทด์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระด้วยการใช้สารเคมีหรือ

เอนไซม์ เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย (Kristinsson and Rasco, 2000) โดยทั่วไปการผลิตไฮโดรไลเสตมี 2 วิธี ได้แก่

1. การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี เป็นการทำให้พันธะเพปไทด์แตกออกโดยการใช้น้ำ สารละลายกรดหรือเบส เป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดสามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว แต่ทำให้กรดอะมิโนบางชนิดถูกทำลาย เช่น กรดอะมิโน ทริปโตเฟนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยกระบวนการย่อยด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก จะทำในภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงจึงควบคุมระดับการย่อยโปรตีนได้ยาก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยมีคุณภาพต่ำ และอาจมีการตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หากย่อยในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา racemization ของกรดอะมิโน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก L-form ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปฏิกิริยา β -elimination ของกรดอะมิโนซีรีน และซิสเตอีน ทำให้เกิดสารประกอบ dehydroalanine ที่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ซึ่งทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และยังทำให้เกิดสารประกอบบางชนิดที่ก่อให้เกิดสารพิษในอาหาร

2. การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสเร่งการตัดพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูงจึงไม่ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก มีความสามารถย่อยโปรตีนได้ในภาวะที่ไม่รุนแรง โครงสร้างของกรดอะมิโนจึงไม่ถูกทำลาย และสามารถควบคุมระดับการย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์อาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) เช่น กรดอะมิโนไอโซลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน และวาเลอีนในสายเพปไทด์ (Kristinsson and Rasco, 2000)

2.2.1 ระดับการย่อย

ระดับการย่อยโปรตีน (degree of hydrolysis, DH) เป็นดัชนีที่ใช้อธิบายปฏิกิริยาการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ ค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนสามารถติดตามได้จากหลายวิธีขึ้นอยู่กับความสะดวก ความเหมาะสม ความเที่ยงตรงและระดับความละเอียดที่ต้องการ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารได้หลายวิธี เช่น

1. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน เป็นการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในไฮโดรไลเสตที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid (TCA) การวิเคราะห์

ทำได้หลายวิธี เช่น วิธีของ Kjeldhal การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของเพปไทด์ที่มีหมู่อะโรแมติก และการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400 - 700 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ free alpha-amino groups เป็นการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เพิ่มขึ้น โดยการใช้สารเคมี เช่น O-phthaldialdehyde (OPA), Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) และ ninhydrin เป็นต้น ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนแล้วเกิดเป็นสารประกอบที่มีสี แล้วติดตามจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม การวิเคราะห์ด้วย OPA ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีที่ติดตามได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Damodaran & Paraf, 1997) สำหรับการวิเคราะห์ด้วย TNBS จะสามารถทำปฏิกิริยากับ primary amino group แล้วเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีที่ติดตามจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Alder-Nissen, 1979) และการวิเคราะห์ด้วย ninhydrin เป็นปฏิกิริยาที่ทำกับหมู่อะมิโนแล้วได้สารประกอบที่มีสีติดตามได้จากค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3. การไตเตรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เรียกว่า pH-stat โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย การมีหมู่อะมิโนหลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้ pH ของไฮโดรไลสลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะเป็นค่าสัมพัทธ์

2.2.2. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

2.2.2.1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์โปรติเอสจัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีนด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เอนไซม์โปรติเอสสามารถจำแนกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ขึ้นกับลักษณะการจำแนก ดังนี้ (1) จำแนกตามแหล่งกำเนิด ได้แก่ เอนไซม์ จากจุลินทรีย์ จากสัตว์และจากพืช (2) จำแนกตามตำแหน่งการตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีน ได้แก่ เอกซีโซเพปติเดส (exopeptidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์จากด้านปลายของสายพอลิเพปไทด์ในโปรตีน และเอนโดเพปติเดส (endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในสายพอลิเพปไทด์ในโปรตีนจนกระทั่งได้เป็นเพปไทด์สายสั้น นอกจากนี้อุตสาหกรรมอาหารยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าที่ได้มาจากจุลินทรีย์

ในการย่อยโปรตีน ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสลายโปรตีนแตกต่างกัน หากภาวะที่ความเข้มข้นของซับสเตรต ค่าพีเอช อุณหภูมิและบัฟเฟอร์ที่ใช้คงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นส่งผลให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นระดับการย่อยโปรตีนจะคงที่

2.2.2.2 ภาวะการย่อย

เอนไซม์เป็นโปรตีน การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของระบบจะมีผลต่อประจุที่เกิดขึ้นบนโครงสร้างของโปรตีนจึงส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย เอนไซม์แต่ละชนิดจึงมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาให้มีความเร็วสูงสุดต่างกัน นอกจากนี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะผันแปรตามอุณหภูมิ อุณหภูมิจึงมีผลต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไป เอนไซม์จะสูญเสียแอกทิวิตีมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ระยะเวลาย่อยมีผลต่อการย่อยโปรตีน โดยในช่วงแรกของการย่อยโปรตีน เอนไซม์จะเข้าจับกับโปรตีนอย่างรวดเร็วจึงเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนอย่างรวดเร็ว จากนั้นเมื่อใช้เวลาย่อยมากขึ้นความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ (นิธิยา รัตนานพนธ์, 2557)

Betancur-Ancona และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด (Alcalase[®] และ/หรือ Flavourzyme[®]) ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนไอโซเลทจากถั่วลิมา โดยการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] และ/หรือ Flavourzyme[®] ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 25 mg อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 และแปรระยะเวลาย่อยเป็น 5 - 60 นาที พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] ในภาวะที่ใช้ระยะเวลาย่อย 5 หรือ 15 นาที ทำให้ไฮโดรไลเสตมีระดับการย่อยสูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] และการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] ทำให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณแพปไทด์และสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายที่ดีกว่า ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] ทำให้ไฮโดรไลเสตมีสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการเกิดโฟมที่ดีกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®]

Cumby และคณะ (2008) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ดคานอลาที่ย่อยด้วยโปรติเอสทางการค้าสองชนิด พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และ

ความสามารถในการขุ้มน้ำในระบบจำลองเนื้อสัตว์ได้สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ Alcalase[®] หรือย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่าง Flavourzyme[®] และ Alcalase[®] ($p \leq 0.05$)

Evangelho และคณะ (2016) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่มีเตรียมจากการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin[®] และ Alcalase[®] ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 1:20 (w:w) เป็นเวลา 120 นาที พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺⁺ ได้สูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ในขณะที่ย่อยด้วย pepsin[®] ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าการย่อยด้วย Alcalase[®] อย่างไรก็ตามการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย

Sangsukiam และ Duangmal (2017) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อย ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกของไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิเพาะงอก โดยผลิตไฮโดรไลเสตด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] ที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 3, 5 และ 7 % (w/v) จากการศึกษาพบว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวเพาะงอกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการย่อยสูงกว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิเพาะงอก ในขณะที่ไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิเพาะงอกมีปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสต จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิไม่เพาะงอก โดยไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิและถั่วเขียวเพาะงอกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเมื่อมีภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 7 % (w/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) ที่เตรียมจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ Alcalase[®] และ Flavourzyme[®] พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการคีเลตโลหะ (Metal-chelating) เพิ่มขึ้นเมื่อมีระดับการย่อยเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการย่อยในภาวะที่มีระดับการย่อยเดียวกัน พบว่าการย่อยด้วย Flavourzyme[®] ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการคีเลตโลหะสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วย Alcalase[®] และการย่อยในภาวะที่มีระดับการย่อย 25% โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme[®] มีความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ (reducing power) ได้สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®]

Li และคณะ (2007) พบว่าไฮโดรไลเสตจากคอลลาเจนหนังหมูที่มีการย่อยด้วย เอนไซม์โปรติเอสจาก bovine pancreas ผสมกับเอนไซม์โปรติเอสจาก *Streptomyces* และ เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus polymyxa* ในภาวะที่มีระดับการย่อย 55.32% มีฤทธิ์ ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity (87.18% DPPH radical scavenging activity) และวิธี Iron chelating (37.4%) สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่มีการย่อยด้วย เอนไซม์โปรติเอส จาก bovine pancreas ในภาวะที่มีระดับการย่อย 21.55% ซึ่งมีค่าฤทธิ์ต้าน ออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ Iron chelating 27.01% และ 16.5% ตามลำดับ

Sritongtae และคณะ (2017) ศึกษาภาวะการย่อยโปรตีนต่อการปลดปล่อยปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วเนาวนางแดงเพาะงอก การผลิตไฮโดรไลเสตทำด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่ความเข้มข้นของ เอนไซม์ 5 % (w/v) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีการแปรระยะเวลาย่อยเป็น 0 - 24 ชั่วโมง การเพิ่มระยะเวลาย่อยโปรตีนมีผลทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในไฮโดรไลเสตจากถั่วเนาวนางแดง ที่ผ่านการเพาะงอกและไม่ผ่านการเพาะงอกเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) การมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ เพิ่มขึ้นแสดงได้ถึงปริมาณการแตกออกของพันธะเปปไทด์ในโปรตีนมากขึ้น ซึ่งบ่งชี้ได้จากการมีค่า ระดับการย่อยที่เพิ่มสูงขึ้น การเพิ่มระยะเวลาย่อยยังทำให้ปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบ ฟีนอลิกในไฮโดรไลเสต จากถั่วที่ผ่านการเพาะงอกและไม่ผ่านการเพาะงอกเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ การผลิตในภาวะที่ใช้ระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง ทำให้ไฮโดรไลเสตจากถั่วที่ผ่านการ เพาะงอกมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP สูงกว่าไฮโดรไลเสต จากถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะงอก 1.51 และ 2.04 เท่า ตามลำดับ เนื่องจากไฮโดรไลเสตจากถั่วที่ผ่านการเพาะงอกมีปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิก และมีปริมาณหมู่อะมิโนสูงกว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วที่ไม่ผ่านการเพาะงอก

Wani และคณะ (2015) รายงานว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนไอโซเลท จากถั่วดำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ papain จากยางมะละกอ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 กรัม/10 กรัมโปรตีนไอโซเลท pH 8.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม และความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมันดีว่าโปรตีน ไอโซเลทจากถั่วดำที่ไม่ผ่านการย่อย โดยการย่อยในภาวะที่ทำให้มีระดับการย่อยอยู่ในช่วง 3.7 - 4.1% ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การดูดซับน้ำและ น้ำมัน และการเกิดโฟมดีกว่าการย่อยในภาวะที่มีระดับการย่อยอยู่ในช่วง 6.7 - 8.6%

Yust Mdel และคณะ (2012) รายงานว่าการย่อยโปรตีนไฮโดรไลต์จากถั่วลูกไก่ด้วยการใช้เอนไซม์ Alcalase® ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้โปรตีนไฮโดรไลต์มีระดับการย่อย 70% ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลต์มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ β -carotene bleaching, reducing power และ DPPH radical scavenging activity สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลต์ที่ไม่ผ่านการย่อย

การศึกษาภาวะการย่อยที่เหมาะสมนั้นทำได้หลายวิธี วิธีการของพื้นที่ตอบสนอง (Response Surface Methodology) เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการหาระดับของภาวะการย่อยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลต์ให้มีค่าระดับการย่อยที่เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นเครื่องมือทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการอธิบายการวิเคราะห์ทางสถิติในรูปแบบการออกแบบพื้นที่การตอบสนองรวมทั้งได้ใช้วิธีการของพื้นที่การตอบสนองเพื่อค้นหาระดับที่เหมาะสมของตัวแปรหลายตัวที่ศึกษาร่วมกัน

del Mar Contreras และคณะ (2011) ผลิตไฮโดรไลต์จากเวย์โปรตีนเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยศึกษาภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ thermolysin ที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองที่มีการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง โดยกำหนดตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท 0 - 0.1250 (w/w) อุณหภูมิ 22.3 - 94.7 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 2.5 - 24.4 ชั่วโมง ต่อตัวแปรตอบสนอง (ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ ORAC) พบว่าไฮโดรไลต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ thermolysin ในภาวะที่มีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท 0.10 (w/w) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นภาวะที่ทำให้ไฮโดรไลต์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (2.57 ไมโครโมล Trolox ต่อมิลลิกรัมโปรตีนไฮโดรไลต์) ได้สูงสุด

Sonklin และคณะ (2011) ศึกษาระยะเวลาการย่อยโปรตีนที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลต์จากกากถั่วเขียว โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ Bromelain® ที่แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ 0, 2, 6, 10, 14 และ 18 % (w/w) และระยะเวลาการย่อย 0.5, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าภาวะการย่อยที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 18 % (w/w) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นภาวะการย่อยที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลต์จากกากถั่วเขียวให้มีค่าระดับการย่อยและร้อยละการผลิตที่ดีที่สุด

Tavares และคณะ (2011) ศึกษาความเหมาะสมของภาวะการย่อยโปรตีนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลต์จากโปรตีนเข้มข้นจากเวย์สามชนิด (bovine whey protein concentrate

(WPC), alpha-lactalbumin (alpha-la) และ caseinomacropeptide (CMP)) ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองและการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสมกลาง การศึกษาภาวะย่อยด้วยเอนไซม์ cardosins ที่มีการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ (1.6, 3.0, 6.5, 10.0 และ 11.5 % (v/v)) และระยะเวลาย่อย (0, 1, 3.5, 6 และ 7 ชั่วโมง) ต่อบริการย่อยโปรตีนและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าการผลิตในภาวะย่อยที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 1.6 % (v/v) ระยะเวลาย่อย 7 ชั่วโมง เป็นภาวะการย่อยที่เหมาะสมที่ทำให้ไฮโดรไลเสตจาก WPC และ alpha-la มีระดับการย่อยสูงสุด 18 และ 9% ตามลำดับ และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC 0.96 และ 1.12 ไมโครโมล Trolox ต่อมิลลิกรัมโปรตีนไฮโดรไลเสต ตามลำดับ

Zhidong และคณะ (2013) ศึกษาความเหมาะสมของภาวะการย่อยโปรตีนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนไอโซเลทจากเวย์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองและออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken จากผลการศึกษาภาวะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ papain ในภาวะที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 - 3 % (w/w) อุณหภูมิ 35 - 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาย่อย 2 - 6 ชั่วโมง พบว่าสมการที่ใช้ในการทำนายภาวะการย่อยมีค่า p -value ของ Lack of fit 0.3947 และมีค่า r^2 0.9542 เมื่อนำมาทำนายภาวะการผลิตไฮโดรไลเสต พบว่าภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.22 % (w/w) อุณหภูมิ 45.70 องศาเซลเซียส และระยะเวลาย่อย 3.60 ชั่วโมง เป็นภาวะการย่อยโปรตีนที่เหมาะสมที่ทำให้ไฮโดรไลเสตมีความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP 31.36%

2.3 การอบแห้ง

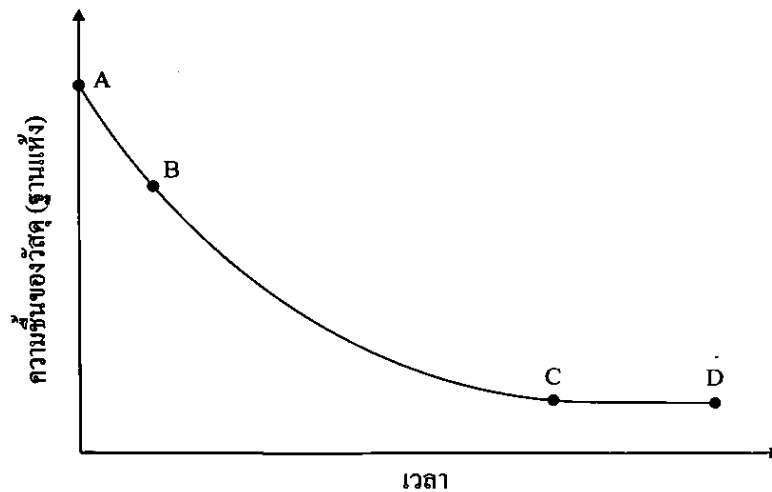
การอบแห้ง (Drying) เป็นกระบวนการแปรสภาพของเหลว ของเหลวกึ่งแข็งหรือแม้กระทั่งของแข็งให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในรูปของของแข็งที่มีความชื้นต่ำด้วยการระเหยน้ำหรือตัวทำละลายส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดออกไปจากวัสดุด้วยการให้ความร้อน วัตถุประสงค์หลักของการอบแห้ง คือ การยืดอายุการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลมาจากการลดความชื้น (น้ำ) ในผลิตภัณฑ์ที่ทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียไม่สามารถเจริญได้ และลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังลดน้ำหนักและปริมาณของอาหารทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ในขณะการอบแห้ง กลไกการเคลื่อนที่ของน้ำมายังผิวหน้าของวัสดุอาหารจะเกิดขึ้นเมื่อมีอากาศหรือลมร้อนพัดผ่านผิวหน้าอาหารที่เปียก ความร้อนจะถูกถ่ายเทไปยังผิวหน้าของอาหาร น้ำในอาหารจะระเหยออกมาด้วยความร้อนแฝงของการเกิดไอ ไอน้ำจึงแพร่ผ่านฟิล์มอากาศและถูกพัดพาไปโดยลมร้อน ส่งผลให้เกิดความ

แตกต่างของความดันไอที่ผิวหน้าและความดันไอด้านในของอาหาร อาหารชั้นด้านในจะมีความดันไอสูงและลดต่ำลงเมื่อชั้นอาหารเข้าใกล้อากาศแห้ง ความแตกต่างนี้ทำให้เกิดแรงดันเพื่อไล่น้ำออกจากอาหาร การเคลื่อนที่ของความชื้นในอาหารอาจเกิดขึ้นได้หลายกลไก เช่น กลไกการแพร่ของของเหลว และการแพร่ของไอ โครงสร้างของวัสดุอาหารที่นำมาทำแห้งย่อมเกิดการเปลี่ยนแปลงไปกับเวลาที่ใช้ในการทำแห้ง และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้อาจส่งผลกระทบต่อกลไกการเคลื่อนที่ของความชื้นในวัสดุอาหารด้วย กลไกการเคลื่อนที่ของความชื้นในวัสดุอาหารในระหว่างการทำแห้งไม่ได้มีผลมาจากกระบวนการทำแห้งเพียงอย่างเดียว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลเช่นกัน เช่น วิธีในการทำแห้ง โดยทั่วไปวิธีการทำแห้งที่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเหลวหรืออาหารเหลวกึ่งแข็ง ได้แก่ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (Auisakchaiyoung and Rojanakorn 2015; Gupta and Alam 2014; Sritongtae et al., 2017; Thuwapanichayanan et al., 2008) การทำแห้งด้วยสุญญากาศ (Naknaen et al., 2016) และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Caparino et al., 2012)

2.3.1 จลนพลศาสตร์การอบแห้ง

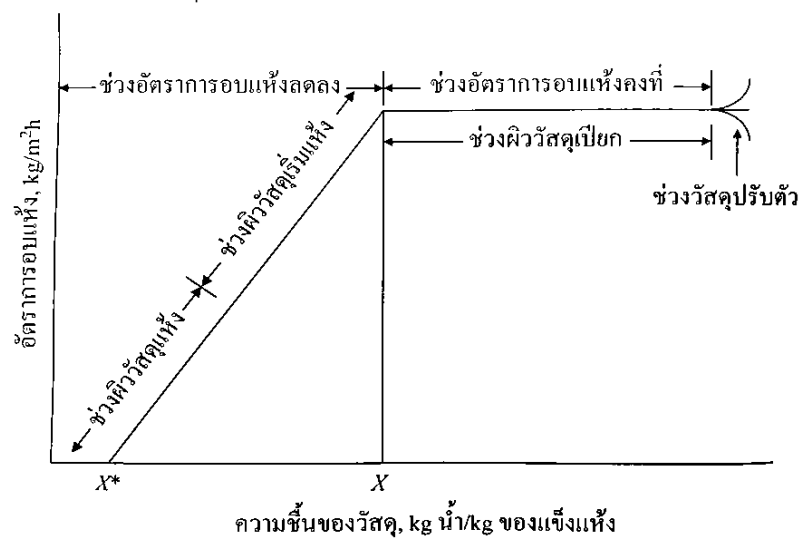
การศึกษาพฤติกรรมการอบแห้งของวัสดุใดวัสดุหนึ่งมักนำเสนอผลการศึกษาในรูปแบบของจลนพลศาสตร์การอบแห้ง (drying kinetics) ซึ่งหมายถึง ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงค่าความชื้นของวัสดุเมื่อเทียบกับเวลา ทั้งนี้หากพิจารณาการอบแห้งที่สภาวะใดสภาวะหนึ่ง (อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และความเร็วของตัวกลางการอบแห้งที่สัมพันธ์กับวัสดุคงที่) จะพบว่าในช่วงแรกของการอบแห้ง ความชื้นที่บริเวณผิวหน้าอาหาร (อาจจะระบุค่าได้ทั้งในฐานเปียกและฐานแห้ง อย่างไรก็ตามในทางการคำนวณใช้ความชื้นฐานเปียกมากกว่าฐานแห้ง เนื่องจากคำนวณค่าได้สะดวกและรวดเร็ว ในขณะที่ความชื้นฐานแห้งเหมาะสำหรับการคำนวณและการออกแบบมากกว่า เนื่องจากค่าฐานของความชื้นมีค่าคงที่ตลอดช่วงการอบแห้ง) จะระเหยออกไปอย่างรวดเร็วด้วยอัตราคงที่ และน้ำที่อยู่ภายในอาหารจะเคลื่อนที่ขึ้นมาทดแทนที่ผิวหน้าอาหารเมื่อเวลาที่ใช้ในการอบแห้งเพิ่มมากขึ้น (ช่วง AB ภาพที่ 2.2) หลังจากช่วงแรกของการทำแห้งผ่านไป อัตราการลดความชื้นจะค่อยๆ ลดลง เมื่อใช้เวลาในการทำแห้งนานขึ้น (ช่วง BC) จนกระทั่งความชื้นของวัสดุไม่เปลี่ยนแปลงหรือกระบวนการอบแห้งถึงจุดสิ้นสุด (จุด D) ที่ค่าความชื้นสมดุลที่สภาวะการอบแห้งนั้น ๆ ทั้งนี้วัสดุที่แตกต่างกันย่อมมีค่าความชื้นสมดุลที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าวัสดุนั้นจะเป็นชนิดเดียวกันก็ตาม เนื่องจากค่าความชื้นจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะการทำแห้ง ข้อมูลจลนพลศาสตร์การอบแห้งจึงมีความสำคัญทำให้สามารถระบุเวลาที่ใช้ในการอบแห้งอาหารให้ได้ ความชื้นตามที่ต้องการอันจะนำไปสู่ความสามารถในการออกแบบกระบวนการอบแห้งที่เหมาะสม

เมื่อนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงค่าความชื้นกับเวลามาคำนวณอัตราการอบแห้ง (drying rate) และแสดงความสัมพันธ์กับค่าปริมาณความชื้นซึ่ง เรียกว่า กราฟอัตราการอบแห้ง (drying rate curve) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.2 กราฟการอบแห้ง

ที่มา: สักกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา (2555)



ภาพที่ 2.3 กราฟอัตราการอบแห้ง

ที่มา: สักกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา (2555)

กราฟอัตราการอบแห้งแบ่งออกเป็น 2 ช่วงหลัก ๆ คือ ช่วงอัตราการอบแห้งคงที่ (ช่วง AB) และช่วงอัตราการอบแห้งลดลง (ช่วง BC) ช่วงอัตราการอบแห้งคงที่เป็นช่วงที่ผิวของวัสดุมีน้ำหล่อเลี้ยงอยู่ตลอดเวลาจึงทำให้อัตราการระเหยน้ำจากผิววัสดุขึ้นอยู่กับความต้านทานในการถ่ายเทความร้อนและมวลสารภายนอกวัสดุ เมื่อความชื้นของวัสดุลดลงจนถึงค่าความชื้น

วิกฤติ (critical moisture content) ผนวของวัสดุจะเริ่มไม่มีชั้นฟิล์มของน้ำหล่อเลี้ยงอยู่มากพอที่จะทำให้เกิดการระเหยของน้ำด้วยอัตราที่เท่ากับอัตราการระเหยของน้ำในช่วงอัตราการอบแห้งคงที่ ประกอบกับระยะทางที่น้ำต้องเคลื่อนที่จากภายในมายังผิววัสดุมีค่าเพิ่มขึ้นทำให้น้ำเคลื่อนที่มายังผิววัสดุไม่ทันต่อการระเหย อัตราการอบแห้งในช่วงนี้มีค่าลดลง จึงเรียกช่วงการอบแห้งช่วงนี้ว่า ช่วงอัตราการอบแห้งลดลง กระบวนการอบแห้งในช่วงนี้จึงขึ้นอยู่กับสภาวะในการอบแห้งและชนิดของวัสดุที่นำมาอบแห้งและแตกต่างจากการอบแห้งในช่วงอัตราการอบแห้งคงที่ซึ่งกระบวนการอบแห้งขึ้นอยู่กับสภาวะการอบแห้งเป็นส่วนใหญ่ ท้ายที่สุดความชื้นของวัสดุก็จะลดลงจนกระทั่งเข้าสู่สภาวะสมดุล (สีกกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา, 2555)

Kadam และคณะ (2012) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เกิดโฟมที่คงตัวและคุณภาพในการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตต่อคุณภาพทางเคมีของมะเขือเทศผง ผลการแปรชนิดและปริมาณของสารช่วยทำให้เกิดโฟม (CMC 0.25 - 1.00% โซ้ขาว 0.5 - 2.0% และนม 3 - 9%) ในขั้นตอนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งแบบโฟม-แมตที่มีการแปรคุณภาพในการทำแห้ง 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส ต่อปริมาณไลโคปีนและกรดแอสคอร์บิกของมะเขือเทศผง พบว่ากระบวนการทำให้เกิดโฟมโดยการใส่ CMC 1% แล้วนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมะเขือเทศผงที่ทำให้มีปริมาณไลโคปีนและกรดแอสคอร์บิกสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($p \leq 0.05$)

Naveen Kumar และคณะ (2016) ศึกษาการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของมะเขือเทศที่ผ่านการตีโฟม (foam pulp) และไม่ผ่านการตีโฟม (tomato pulp) ก่อนนำไปทำแห้งแบบถาด โดยนำมะเขือเทศมาต้มในน้ำเดือดและปอกเปลือกก่อนที่จะนำไปปั่นละเอียด แล้วนำมาขึ้นโฟมโดยใช้สารอัลบูมิน 4.5% ร่วมกับการตีโฟมเป็นเวลา 4.5 นาที หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของมะเขือเทศที่ไม่ผ่านการตีโฟมและผ่านการตีโฟม พบว่าอัตราส่วนความชื้นลดลงเมื่อระยะเวลาทำแห้งเพิ่มขึ้น โดยการทำให้มะเขือเทศที่มีกระบวนการขึ้นโฟมก่อนจะใช้ระยะเวลาทำแห้งสั้นกว่าการทำแห้งที่ไม่มีกระบวนการขึ้นโฟม ในขณะที่การทำแห้งที่ไม่มีกระบวนการขึ้นโฟมก่อนจะทำให้มะเขือเทศมีอัตราการอบแห้งสูงกว่าการทำแห้งที่มีกระบวนการขึ้นโฟมก่อน เมื่อนำข้อมูลมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Newton, Page, Henderson and Pabis, Logarithmic, Two term, Midilli และ Diffusion approach พบว่าสมการของแบบจำลอง Midilli มีค่า r สูงสุด และมีค่า RMSE และ chi-square

ต่ำสุด โดยสมการนี้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความชื้นกับระยะเวลาทำแห้งของมะเขือเทศได้ดีที่สุดของการทำแห้งทั้งสองอุณหภูมิ

Rajkumar และคณะ (2007) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทำให้เกิดโฟมและคุณลักษณะการอบแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตของมะม่วงพันธุ์ alphoso โดยนำเนื้อมะม่วงสุกมาปั่นละเอียด (mango pulp) แล้วนำมาขึ้นโฟมโดยการแปรชนิดและปริมาณของสารช่วยทำให้เกิดโฟม ได้แก่ โปรตีนถั่วเหลือง 0.25 - 1.5% glycerol mono stearate 0.5 - 3.0% และอัลบูมิน 2.5 - 15% ร่วมกับการใช้เมทิลเซลลูโลส 0.5% หลังจากนั้นทดลองบนภาตสแตนเลสที่มีการแปรความสูงของตัวอย่างภายในภาตอบเป็น 1, 2 และ 3 มิลลิเมตร ก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อนที่มีการแปรอุณหภูมิการทำแห้งเป็น 60, 65, 70 และ 75 องศาเซลเซียส โดยภาวะการขึ้นโฟมของ mango pulp ที่มีการใช้อัลบูมิน 10% ร่วมกับเมทิลเซลลูโลส 0.5% และมีความสูงของตัวอย่างภายในภาตอบ 1 มิลลิเมตร เป็นภาวะที่เหมาะสมในการขึ้นโฟมที่คงตัว เมื่อพิจารณาคุณลักษณะการอบแห้ง พบว่า mango pulp ที่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ ใช้ระยะเวลาการอบแห้งสั้นกว่ามะม่วงพัลพ์ที่ไม่ทำให้เกิดโฟม (ตัวอย่างควบคุม) โดย mango pulp ที่มีกระบวนการขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นภาวะการอบแห้งที่สามารถรักษาปริมาณเบต้าแคโรทีนและกรดแอสคอบิกไว้ได้มากที่สุด

Sritongtae และคณะ (2017) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อจลนพลศาสตร์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การอบแห้งแบบโฟม-แมตของไฮโดรไลเสตจากถั่วเนาวางแดงเพาะงอก โดยแปรอุณหภูมิการอบแห้งเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิมิมีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ต่อระยะเวลาการอบแห้ง โดยการเพิ่มอุณหภูมิการอบแห้งทำให้ระยะเวลาการอบแห้งลดลง ในขณะที่เดียวกันการอบแห้งไฮโดรไลเสตที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีอัตราการอบแห้งสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อนำข้อมูลมาสร้างสมการของแบบจำลอง Newton, Page, Henderson and Pabis, logarithmic, Midilli, two term, modified Henderson and Pabis, Wang and Singh และ Weibull distribution พบว่าสมการของ Page, Midilli และ Weibull distribution มีความเหมาะสมในการทำนายลักษณะการอบแห้งแบบโฟม-แมตของไฮโดรไลเสตจากถั่วเนาวางแดงที่ผ่านการเพาะงอกและไม่ผ่านการเพาะงอกเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้นตามที่ต้องการ

อย่างไรก็ตามการทำแห้งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการถ่ายเทความร้อนและมวลสารไปกับเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของอาหารดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ได้แก่

การหดตัว การเสียน้ำทำให้เซลล์อาหารหดตัวจากผิวนอก ส่วนที่แข็งจะคงสภาพได้ ส่วนที่อ่อนกว่าจะเว้าลงไป อาหารที่มีน้ำมากจะหดตัวบิดเบี้ยวมาก

การเปลี่ยนสี อาหารที่ผ่านการทำแห้งจะมีสีเข้มขึ้น เนื่องจากความร้อนหรือปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิดสีน้ำตาล อุณหภูมิและช่วงเวลาที่อาหารมีความชื้น 10 - 20% มีผลต่อความเข้มของสี

การเกิดชั้นแข็งขึ้นบนผิว (casehardened skin) อาหารที่มีน้ำตาลหรือเกลือที่มีความเข้มข้นสูงเป็นองค์ประกอบ อัตราการอบแห้งในช่วงแรกของกระบวนการจะเป็นการอบแห้งคงที่ตามปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อเริ่มเกิดมีชั้นแข็งขึ้นบนผิวของอาหาร น้ำจะไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากภายในอาหารได้ อัตราการอบแห้งจึงลดลงอย่างรวดเร็ว ความดันภายในอาหารจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งผิวของวัสดุไม่สามารถรับแรงดันที่เกิดขึ้นได้และเกิดเป็นรอยแตก น้ำที่อยู่ภายในอาหารจึงเคลื่อนที่ออกมาได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อัตราการอบแห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อย ๆ ลดลงเมื่อเข้าสู่สภาวะสมดุล

การเสียความสามารถในการคืนสภาพ อาหารแห้งบางชนิดต้องนำมาคืนสภาพแต่การคืนสภาพโดยการเติมน้ำจะได้ไม่เหมือนเดิม เพราะเซลล์อาหารเสียความยืดหยุ่นของผนังเซลล์และสตาร์ชและโปรตีนเสียความสามารถในการดูดน้ำ

2. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทางชีวเคมี ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งเป็นที่ต้องการและไม่เป็นที่ต้องการ ในกรณีของอาหารและวัสดุชีวภาพ การมีสภาวะในการอบแห้งที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณลักษณะหรือฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นที่ต้องการหรือไม่เป็นที่ต้องการเลยก็ได้

2.3.2 ชนิดของเครื่องอบแห้ง

เครื่องอบแห้งจำแนกออกเป็น 2 แบบ ตามวิธีการให้ความร้อนกับวัสดุ ได้แก่

1. เครื่องอบแห้งแบบให้ความร้อนโดยตรง (direct dryers) หรือเครื่องอบแห้งแบบพาความร้อน (convective dryers) วัสดุจะได้รับความร้อนโดยตรงจากตัวกลางการอบแห้งที่เคลื่อนที่ผ่านวัสดุที่ต้องการอบแห้ง โดยเครื่องอบแห้งชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรม ตัวอย่างเครื่องอบแห้งประเภทนี้ ได้แก่

เครื่องอบแห้งแบบถาด เครื่องอบแห้งแบบนี้อาจมีลักษณะเป็นตู้ซึ่งภายในจัดเรียงเป็นชั้นสำหรับใส่ถาดบรรจุวัสดุที่ต้องการอบแห้ง หรืออาจเป็นห้องอบแห้งที่สามารถเข็นรถเข็นซึ่งวางเรียงถาดใส่วัสดุเข้าไปได้ภายในห้องอบแห้งจะมีการติดตั้งพัดลมเพื่อหมุนเวียนอากาศร้อน เพื่อให้วัสดุได้รับความร้อนอย่างทั่วถึง จุดเด่นของเครื่องอบแห้งแบบนี้ คือ ความสามารถในการอบแห้งวัสดุได้หลากหลาย สามารถอบแห้งวัสดุที่มีรูปร่าง ขนาด หรือพฤติกรรมของการอบแห้งที่แตกต่างกันได้มาก เนื่องจากไม่มีข้อจำกัดในแง่ของเวลาที่ต้องใช้ในระหว่างการอบแห้ง สามารถปรับเปลี่ยนสภาวะการทำงานได้ง่ายและวัสดุไม่ต้องมีการเคลื่อนที่ในขณะที่ทำการอบแห้ง อย่างไรก็ตาม เครื่องอบแห้งแบบถาดก็มีข้อเสียในแง่ของเวลาที่ต้องใช้ในการลำเลียงวัสดุเข้าและออกจากเครื่องอบแห้ง และการอบแห้งด้วยเครื่องประเภทนี้จะต้องอบแห้งแบบเป็นกะเท่านั้น

2. เครื่องอบแห้งแบบให้ความร้อนโดยอ้อม (indirect dryers) หรือเครื่องอบแห้งแบบนำความร้อน (conductive dryers) เป็นเครื่องอบแห้งที่อาศัยหลักการของการนำความร้อนในการถ่ายเทความร้อนจากตัวกลางการให้ความร้อนไปยังวัสดุ โดยที่ตัวกลางการให้ความร้อนและวัสดุไม่ได้สัมผัสกันโดยตรง จึงเป็นการให้ความร้อนโดยทางอ้อมผ่านผนังซึ่งกั้นระหว่างตัวกลางการให้ความร้อน โดยทั่วไปมักอาศัยสุญญากาศในการดึงเอาความชื้นที่ระเหยจากวัสดุออกไปจากห้องอบแห้ง ตัวอย่างเครื่องอบแห้งประเภทนี้ ได้แก่

เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum dryers) เป็นเครื่องอบแห้งที่มีการใช้งานกันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสำหรับการอบแห้งวัสดุที่อาจเสื่อมสภาพได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง และอาจไม่ต้องการการอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำมาก วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับอาหารที่ไวต่อความร้อน เนื่องจากสามารถอบแห้งได้อย่างรวดเร็ว เกิดความเสียหายเนื่องจากความร้อนต่ำ เครื่องอบแห้งประเภทนี้ใช้เงินลงทุนและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูงและมีอัตราการผลิตต่ำ

Elavarasan และคณะ (2016) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาน้ำจืด (*Cirrhinus mrigala*) โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ papain แล้วนำมาทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบแช่เยือกแข็งต่อสมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาน้ำจืด การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาน้ำจืดมีปริมาณการเกิดสีน้ำตาล (browning intensity) ที่วัดจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ต่ำกว่าการทำแห้งแบบลมร้อน เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไมใช้เอนไซม์ขึ้นในระหว่างการทำแห้งแบบลมร้อน ค่าการละลายของไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งแบบลมร้อนและแบบแช่เยือกแข็งจะเกิดได้ดีเมื่อมี pH ต่ำกว่า 5 และ 7

ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากปลาน้ำจืดที่ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากัน พบว่าการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเสตจากปลาน้ำจืด ($p \leq 0.05$) ในขณะที่การทำแห้งแบบลมร้อนทำให้ไฮโดรไลเสตมีค่าความสามารถต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP สูงกว่าการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

Naknaen และคณะ (2016) ศึกษาผลของวิธีทำแห้งด้วยวิธีที่มีการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งแบบลมร้อน แบบสุญญากาศและแบบแช่เยือกแข็งต่อสมบัติทางกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายของกล้วยपुर (banana puree) โดยเปรียบเทียบกับวิธีที่ไม่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งแบบลมร้อน การพิจารณาผลของสมบัติทางกายภาพ พบว่าผงกล้วยपुरที่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มีค่า L^* และ a^* สูงกว่า และ b^* ต่ำกว่าผงกล้วยपुरที่ไม่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งแบบลมร้อน ซึ่งให้เห็นว่าการทำให้เกิดโฟมก่อนจะทำให้ผงกล้วยपुरสามารถลดการเกิดความเป็นสีน้ำตาลได้มากกว่าการไม่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้ง และผงกล้วยपुरที่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มีค่า bulk density และ hygroscopic สูงกว่าผงกล้วยपुरที่ไม่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งแบบลมร้อน ในขณะที่การพิจารณาสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย พบว่าผงกล้วยपुरที่ทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มีค่าการละลายสูงกว่าผงกล้วยपुरที่ไม่ทำให้เกิดโฟม

Mune และ Sogi (2016) ศึกษาผลของวิธีการทำแห้งแบบลมร้อนแบบสุญญากาศและแบบแช่เยือกแข็งต่อสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และการเกิดโฟมของโปรตีนเข้มข้นที่เตรียมจากถั่วพุ่มและถั่วหรั่ง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วหรั่งมีค่า surface hydrophobicity สูงกว่าการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบสุญญากาศ ในขณะที่การทำแห้งแบบลมร้อนทำให้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วพุ่มมีค่า surface hydrophobicity สูงที่สุดเมื่อพิจารณาสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วหรั่งมีค่าการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบสุญญากาศ แต่การทำแห้งแบบลมร้อนทำให้โปรตีนเข้มข้นจากถั่วพุ่มมีค่าการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงสุด หากพิจารณาสมบัติการเกิดโฟม การทำแห้งแบบลมร้อนทำให้โปรตีนเข้มข้นที่เตรียมจากถั่วหรั่งและถั่วพุ่มมีความสามารถในการเกิดโฟมสูงที่สุด

Nótin (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิการอบแห้งต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผลแบล็คเคอร์แรนที่ทำแห้งแบบสุญญากาศโดยแปรอุณหภูมิการอบแห้งเป็น 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิการอบแห้งส่งผล

ต่ออัตราการระเหยน้ำในแต่ละช่วงเวลาการทำแห้งและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยการทำแห้งด้วยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำให้แบล็คเคอร์แรนท์ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งด้วยลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสด

โปรตีนจากแหล่งธรรมชาติส่วนใหญ่มักมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสม จึงต้องนำมาผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผ่านการดัดแปรก่อน ซึ่งการปรับปรุงสมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนจะช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์

2.4.1 สมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน หมายถึง สมบัติทางกายภาพและเคมีที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนในอาหารระหว่างการแปรรูป การเก็บรักษา การเตรียมอาหาร และการบริโภค การผลิตไฮโดรไลเสดด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีน โดยสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพิจารณาในการนำไฮโดรไลเสดไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น สมบัติด้านการละลาย ซึ่งเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญในการนำไปใช้ในอาหาร โดยทั่วไปโปรตีนไม่เกิดการละลายอย่างแท้จริงเมื่ออยู่ในน้ำ เนื่องจากโปรตีนมีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงเกิดเป็นลักษณะของคอลลอยด์กระจายตัวในน้ำ ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับสมดุขของความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโมเลกุลโปรตีน ดังนั้นองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโมเลกุลโปรตีนจึงมีผลต่อความสามารถในการละลายโปรตีน อีกทั้งการละลายของโปรตีนยังขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับตัวทำละลาย โปรตีนกับโปรตีน และตัวทำละลายกับตัวทำละลายอีกด้วย นอกจากนี้ความสามารถในการละลายยังขึ้นอยู่กับค่า pH ค่า ionic strength อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้

2.4.2 สมบัติการต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่สามารถชะลอ ยับยั้ง หรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กลไกการต้านออกซิเดชันด้วยกันหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง การยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน อุณหภูมิ ชนิดของสารตั้งต้น รวมถึงชนิด และโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติในร่างกายนมนุษย์มีหลายชนิด ได้แก่ สารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส แคแทเลส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และสารต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินซี วิตามินเอ

คาโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ กลูตาไทโอน และกรดไลโปอิก โดยสารต้านออกซิเดชันแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 แหล่ง ได้แก่

สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เป็นสารประกอบพีนอลิกที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีที่พัฒนาจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ สารสังเคราะห์เหล่านี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค

สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เช่น สารประกอบพีนอลิก จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ พืช ผัก ผลไม้ เป็นต้น โดยโดยสารประกอบพีนอลิกมีโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันนี้เกาะอยู่บนวงเบนซีนมีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ด้วยกรทำให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็นที่ยอมรับว่ามีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ รวมไปถึงการต้านการก่อมะเร็ง โดยสารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

การดัดแปรโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์มีผลให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตที่ได้หลังจากการย่อยประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Betancur-Ancona et al., 2009; Sbroggio et al., 2016; Sritongtae et al., 2017) นอกจากนี้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตยังขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์อีกด้วย (Elias et al., 2008; Luna-Vital et al., 2015; Sarmadi and Ismail, 2010)

2.4.2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีนั้นมีกลไกวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างที่แตกต่างกัน วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

(1) กลไกการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen Transfer, HAT) ปฏิกิริยาเป็นแบบ Competitive reaction คือ มีการแย่งกันระหว่าง

สารต้านออกซิเดชันกับสารตั้งต้นในการเข้าจับกับอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่อาศัยหลักการนี้ ได้แก่ (1) Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลอิสระเพอร์ออกซิลที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่ออนุมูลอิสระเพอร์ออกซิลเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารฟลูออเรสเซินจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลง เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระเพอร์ออกซิล จึงไม่มีอนุมูลอิสระเพอร์ออกซิลเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารฟลูออเรสเซิน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่คงตัว การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ คือ มีความแปรปรวนสูง และอาจเกิดปฏิกิริยากับแสงได้ (2) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการกำจัด อนุมูลอิสระสังเคราะห์ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH เกิดปฏิกิริยารีดักชัน หรือได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันจะทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วงเข้มจางลงจนเป็นสีเหลือง สามารถติดตามความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัด คือ อนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง ปฏิกิริยาจึงเกิดได้ช้าทำให้ค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้สารปนเปื้อน หรือโลหะสามารถรีดิวซ์ อนุมูลอิสระ DPPH แล้วทำให้มีสีจางลงได้เช่นกัน (Lee et al., 2008)

(2) กลไกการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer, ET หรือ Single Electron Transfer, SET) เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้รับความนิยม วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอนกับสารออกซิแดนซ์ โดยสารออกซิแดนซ์สามารถดึงอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะภาพรีดอกซ์ของสารออกซิแดนซ์ การเปลี่ยนแปลงสถานะภาพรีดอกซ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีระหว่างรูปแบบรีดิวซ์และรูปแบบออกซิไดซ์ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่อาศัยหลักการนี้ เช่น Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน โดยสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) สามารถรีดิวซ์สารประกอบ Fe(III)-2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่มีสีให้

กลายเป็นสารประกอบ Fe(II)-TPTZ ที่มีสีน้ำเงิน สารประกอบเชิงซ้อนทั้งสองรูปแบบมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรแตกต่างกัน (Benzie and Strain, 1996)

Amza และคณะ (2013) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่และสมบัติการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเมล็ด gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin[®] ร่วมกับเอนไซม์ Trypsin[®] ในภาวะที่แปรระยะเวลาย่อย 5 - 180 นาที พบว่าเมื่อระยะเวลาย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลง ในขณะที่การย่อยโปรตีนในภาวะที่มีระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) การคีเลตโลหะ (Metal-chelating activity) และความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ (reducing power) เพิ่มสูงขึ้น

Evangelho และคณะ (2016) รายงานว่า การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนเข้มข้นจากถั่วดำด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสต่างชนิดกัน (Pepsin[®] และ Alcalase[®]) ในภาวะการย่อยเดียวกัน มีผลให้ขนาดโมเลกุลโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE แตกต่างกัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin[®] แสดงแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนเข้มข้นจากถั่วดำ พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin[®] ทำให้ไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity (45.15%) สูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ตามลำดับ ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (63.56%) สูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin[®]

บทที่ 3

อุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

รายละเอียดดังต่อไปนี้

วัตถุดิบ

ถั่วดำ (*Vigna mungo*) จากบริษัท ชุมสิน ฟู้ด อินดัสทรี จำกัด นนทบุรี ประเทศไทย
ซื้อในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึงสิงหาคม 2560 บรรจุลงในถุงพลาสติก High-Density Polyethylene (HDPE) แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

เอนไซม์

Alpha-amylase BAN[®] 480L 1,4-alpha-D-glucan glucono-hydrolase, EC 3.2.1.1) จากบริษัท Novozymes (Mülheim, Germany) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus amyloliquefaciens* มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงอุณหภูมิ 70 - 90 องศาเซลเซียส pH 6.7 - 7.0 และความจำเพาะของเอนไซม์ 480 KNU/g (Kilo Novo Units per gram) โดยใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ 1,4-alpha-glucosidic ในอะไมโลสและอะไมโลเพกติน รายละเอียดดังภาคผนวก ก.1

Flavourzyme[®] 500MG (EC 3.4.11.1) จากบริษัท Novozymes (Mülheim, Germany) เป็นเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่ได้จากเชื้อราชนิด *Aspergillus oryzae* มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.0 - 7.0 และความจำเพาะของเอนไซม์ 500 LAPU/g (Leucine Amino Peptidase Units per gram) โดยใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีน รายละเอียดดังภาคผนวก ก.2

สารเคมี

ชนิด Analytical Reagent grade (AR grade)

Acetic acid (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

Aluminium chloride hexahydrate (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma, Mülheim, Germany)

Boric acid (Carlo Erba, Val de Reuil, France)

Bovine serum albumin, 98% (Sigma, Mülheim, Germany)

Bromocresol green (Carlo Erba, Val de Reuil, France)

Calcium chloride (Univar, NSW, Australia)

Catechin (Sigma, Mülheim, Germany)

Copper (II) sulfate pentahydrate (Merck, Darmstadt, Germany)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Mülheim, Germany)

Fluorescein sodium salt (Sigma, Mülheim, Germany)

Folin-ciocalteu reagent (Sigma, Mülheim, Germany)

Gallic acid (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland)

Hydrochloric acid (J.T. Baker, PA)

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox) (Sigma, Mülheim, Germany)

Iron (II) chloride tetrahydrate (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

Iron (III) chloride hexahydrate (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

Methanol (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

Methyl red (Merck, Darmstadt, Germany)

Potassium sodium tartrate (Carlo Erba, Val de Reuil, France)

3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid monosodium salt hydrate (Ferrozine) (Sigma, Mülheim, Germany)

Selenium reagent mixture (Merck, Darmstadt, Germany)

Sodium acetate (Univar, NSW, Australia)

Sodium carbonate (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

di-Sodium hydrogen orthophosphate (Univar, NSW, Australia)

Sodium dihydrogen orthophosphate (Univar, NSW, Australia)

Sodium hydroxide (Univar, NSW, Australia)

Sodium nitrite (Univar, NSW, Australia)

Sulphuric acid 98% (Quality Reagent Chemical, Auckland, New Zealand)

Trichloroacetic acid (Carlo Erba, Val de Reuil, France)

2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Sigma, Mülheim, Germany)

2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma, Mülheim, Germany)

L-tyrosine (Univar, NSW, Australia)

ชนิด Food Grade

Carboxymethyl cellulose (CMC) (Chemipan, Bangkok, Thailand)

เครื่องมือ

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น BSA 310s, Bradford, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดหยาบ (Mettler Toledo รุ่น JS3002G, Columbus, OH)

เครื่องกวนสารละลาย (IKA® รุ่น C-MAG HS 7, Staufen, Germany)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (HERMLE Labortechnik GmbH, รุ่น Z 36 HK, Wehingen, Germany)

เครื่องผสมสารละลาย (Scientific Industries รุ่น Vortex-Genie 2, Bohemia, NY)

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

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (PerkinElmer รุ่น Lambda UV/VIS system, MA)

เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (AquaLab series 3 รุ่น TE, Pullman, WA)

เครื่องบดอาหาร (Kenwood รุ่น FPP230, Britain)

เครื่อง Hand mixer (Sharp รุ่น EMS-51, Bangkok, Thailand)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (GFL®, รุ่น GFL1092, Burgwedel, Germany)

ชุดเครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

- เครื่องย่อย (BUCHI รุ่น K-424, Flawil, Switzerland)

- เครื่องดักจับไอกรด (BUCHI รุ่น B-414, Flawil, Switzerland)

- เครื่องกลั่น (BUCHI รุ่น K-355, Flawil, Switzerland)

ตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ (Isotemp® รุ่น 282A, MA)

ตู้อบลมร้อน (BINDER รุ่น FED400, Bohemia, NY)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL, รุ่น JSM-6610LV, Tokyo, Japan)

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยการใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) โดยกำหนดตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย และติดตามค่าตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ ระดับการย่อย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.1.1 การออกแบบแผนการทดลอง

ตัวแปรอิสระที่กำหนดในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนจากถั่วดำด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองมี 2 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® (1 - 7% (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนึ่งสุก) และระยะเวลาย่อย (60 - 1200 นาที) ใช้การออกแบบแผนการทดลองแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design, CCD) ที่มีการกำหนดระดับของปัจจัย 5 ระดับ คือ $-\alpha$, -1, 0, 1, α ($\alpha = 1.414$) และกำหนดลำดับการทดลอง 9 ลำดับ คือ ค่าการทดลอง (2^2 Factorial points) 4 ลำดับ ค่าแนวแกน (Axial points) 4 ลำดับ และค่ากลาง (Center point) 1 ลำดับ ทำการทดลองผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามแผนการทดลองที่แสดงดังตารางที่ 3.1 โดยมีขั้นตอนการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำดังนี้

- นำเมล็ดถั่วดำมาคัดแยกสิ่งเจือปนและล้างด้วยน้ำประปา แล้วนำมาผ่านกระบวนการเตรียมขั้นต้น ประกอบด้วย การแช่และการนึ่ง นำเมล็ดถั่วดำแช่น้ำในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปนึ่งด้วยไอน้ำ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร

- ผสมถั่วดำนึ่งสุกบดละเอียดกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วน 1:2.5 (w/v) แล้วเติมเอนไซม์ alpha-amylase® 1 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนึ่งสุก นำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีการเขย่าแบบวงกลมในแนวราบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายตัวอย่างไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ alpha-amylase® ด้วยการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วลดอุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างลงถึง 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น

เติมเอนไซม์ Flavourzyme[®] ที่มีการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 1 - 7 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนึ่งสุก แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปย่อยโปรตีนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีการเขย่าแบบวงกลมในแนวราบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่มีการแปรระยะเวลาย่อย 60 - 1200 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างไปยังยังกิจกรรมของเอนไซม์ Flavourzyme[®] ด้วยการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที 15 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ คือ ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ตารางที่ 3.1 การออกแบบแผนการทดลองสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ลำดับ การทดลอง	ระดับของปัจจัย		ตัวแปรอิสระ	
	X1*	X2*	ความเข้มข้นของ Flavourzyme [®] (%w/w)	ระยะเวลาย่อย (นาที)
1	-1	-1	1.88	227
2	+1	-1	6.12	227
3	-1	+1	1.88	1033
4	+1	+1	6.12	1033
5	-1.414	0	1.00	630
6	+1.414	0	7.00	630
7	0	-1.414	4.00	60
8	0	+1.414	4.00	1200
9	0	0	4.00	630

* X1 และ X2 คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme[®] และระยะเวลาย่อย

3.1.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของผลตอบสนอง

นำไฮโดรไลเสตจากถั่วดำในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีดังนี้

3.1.2.1 ระดับการย่อย

วิเคราะห์ระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำโดยการติดตามปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นด้วย 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ตามวิธีของ Sangsukiam และ Duangmal (2017) ปิเปตสารละลายไฮโดรไลเสต 0.125 มิลลิลิตร ลงในหลอด

ทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายมาบ่มยังปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 คำนวณปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและระดับการย่อยดังสมการ 1 และ 2 ตามลำดับ แสดงผลปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นในหน่วยไมโครโมลต่อกรัมโปรตีน และร้อยละระดับการย่อย

$$\text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ} = \frac{\text{Absorbance}_{420\text{ nm}} \times \text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมด (ลิตร)}}{\epsilon \times 1 \text{ (เซนติเมตร)} \times \text{น้ำหนักโปรตีนในตัวอย่าง (กรัม)}} \times 10^6 \quad (1)$$

เมื่อ ปริมาตรสารละลายทั้งหมด คือ ปริมาตรไฮโดรไลเซตที่ใช้ (0.125 มิลลิลิตร) + ปริมาตรสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (2 มิลลิลิตร) + ปริมาตรสารละลาย TNBS (2 มิลลิลิตร) + ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (4 มิลลิลิตร) = 0.008125 ลิตร

ϵ คือ Molar extinction coefficient ($20300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

$$\text{DH} = \frac{L_t - L_o}{L_{\text{max}} - L_o} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ DH คือ ระดับการย่อยของไฮโดรไลเซต (%)

L_o คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดของไฮโดรไลเซตเริ่มต้น

L_t คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในระดับความเข้มข้นและใช้ระยะเวลาย่อยที่เวลาใด ๆ

L_{max} คือ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ภายใต้สภาวะ acid hydrolysis

3.1.2.2 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงวิธีของ Waterhouse (2005) ปีเปตสารละลายไฮโดรไลเซต

จากถั่วดำ 200 ไมโครลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ตามด้วยน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 2 นอร์มัล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 นาที ก่อนเติมสารละลายไซเตียมคาร์บอนेट อิมิตัว 1.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาคผนวก ข.1) และแสดงผลในหน่วยไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมถั่วดำ (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.1.2.3 การเกิดสีน้ำตาล

วิเคราะห์การเกิดสีน้ำตาลในระหว่างการเตรียมไฮโดรไลเสตจากถั่วดำซึ่งเกิดจาก Maillard reaction products (MRPs) ตามวิธีของ Wijewickreme Kitts และ Durance (1997) โดยนำสารละลายไฮโดรไลเสตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3.1.2.4 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันดังนี้

(1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity ตามวิธีของ Sritongtae และคณะ (2017) ปิเปตสารละลายไฮโดรไลเสต 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox (ภาคผนวก ข.2) และแสดงผลในหน่วยไมโครโมล Trolox ต่อกรัมถั่วดำ (โดยน้ำหนักแห้ง)

(2) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยดัดแปลงวิธีของ Benzie และ Strain (1996) ปิเปตสารละลาย FRAP 1900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปปมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตามด้วยสารละลายไฮโดรไลเสต 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox (ภาคผนวก ข.3) และแสดงผลในหน่วยไมโครโมล Trolox ต่อกรัมถั่วดำ (โดยน้ำหนักแห้ง)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS version 22 for Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL)

3.1.3 การสร้างสมการพหุคูณ

ทดลองผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามแบบแผนการทดลองที่กำหนดแล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีตามข้อ 3.1.2.1 - 3.1.2.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ด้วยโปรแกรม Minitab software version 17.1.0 (Minitab, Inc., State Collage, PA) ด้วยวิธีวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นแบบพหุคูณ (multiple regression analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนองต่าง ๆ ในรูปของสมการหรือแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบพหุคูณกำลังสอง (second-order polynomial model) และอธิบายความสัมพันธ์ในรูปของกราฟพื้นผิวผลตอบสนอง (response surface plots) ด้วยโปรแกรม Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease, Inc., MN)

3.1.4 การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการ

ตรวจสอบการใช้ได้ของสมการเพื่อตรวจสอบความเหมาะสมและความถูกต้องของสมการที่ใช้ในการทำนายค่าของตัวแปรอิสระที่สัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองต่าง ๆ โดยทดลองผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยภาวะย่อยที่เหมาะสม ซึ่งการคัดเลือกภาวะเหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยทำได้จากการใช้โปรแกรม Minitab ที่มีการกำหนดเกณฑ์ค่าผลตอบสนองต่าง ๆ โดยกำหนดให้ระดับการย่อยมีค่าอยู่ในช่วง 75 - 80% และกำหนดผลตอบสนองอื่น ๆ มีค่าสูงสุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผลิตได้มาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีตามข้อ 3.1.2.1 - 3.1.2.4 พิจารณาผลการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อน (%error) ระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายจากสมการกับค่าที่ได้จากการทดลองของผลตอบสนองต่าง ๆ

3.2 ศึกษาวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆ ในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

เตรียมไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยภาวะการย่อยที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 มาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันที่มีอุณหภูมิการทำแห้ง 60 องศาเซลเซียส ใช้ถาดอบเทพลอน โดยกำหนดให้ความสูงของสารละลาย 0.4 เซนติเมตร นำไฮโดรไลเสตมาทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ดังนี้ 1) การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด เทสารละลายไฮโดรไลเสตลงบนถาดอบเทพลอนก่อนนำเข้าตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่มีขนาดความจุ 400 ลิตร มีความเร็วลม 5 เมตรต่อวินาที 2) การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต วิธีนี้มีขั้นตอนการทำให้สารละลายไฮโดรไลเสตขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้ง เทสารละลายไฮโดรไลเสตลงในถ้วยตีโฟมแล้วเติมคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (CMC) 1 % (w/v) ซึ่งเป็นสารให้ความคงตัวลงไปขณะการตีโฟมด้วยเครื่อง Hand mixer ความเร็วระดับ 4 เป็นเวลา 60 วินาที จนโฟมเสถียร หลังจากนั้นเทลงบนถาดอบเทพลอนก่อนนำเข้าตู้อบแห้งแบบลมร้อน 3) การทำแห้งด้วยสุญญากาศ วิธีการทำแห้งนี้มีขั้นตอนการนำสารละลายไฮโดรไลเสตมาทำให้ขึ้นโฟมก่อนการนำไปทำแห้งเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต แล้วเทโฟมของไฮโดรไลเสตลงบนถาดอบเทพลอนก่อนนำเข้าตู้อบแห้งแบบสุญญากาศที่มีขนาดความจุ 42 ลิตร ค่าความดันสุญญากาศภายในตู้อบ 30 นิ้วปรอท

การทำแห้งไฮโดรไลเสตจากถั่วดำในแต่ละวิธีจะกำหนดจำนวนถาดภายในตู้อบเท่ากัน (6 ถาด) และทำแห้งด้วยภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้นสุดท้ายต่ำกว่า 21% โดยน้ำหนักแห้ง

3.2.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งต่าง ๆ

นำไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการเตรียมตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว มาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะเวลาทำแห้งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นต่ำกว่า 21% โดยน้ำหนักแห้ง มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

ศึกษาจลนพลศาสตร์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต

การศึกษาด้านจลนพลศาสตร์การทำแห้งของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ทำโดยบันทึกน้ำหนักของถาดอบตลอดช่วงการทำแห้งตั้งแต่เริ่มทำแห้งจนถาดอบมีน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดช่วงการทำแห้งในรูปของอัตราส่วนความชื้นดังสมการที่ 3 แล้วแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความชื้นกับเวลาในรูปของกราฟอัตราส่วนความชื้น นำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นตลอดช่วงการทำแห้งของไฮโดรไลเสตมาคำนวณ

อัตราการแห้ง (Drying rate) ดังสมการที่ 4 แล้วแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแห้งกับ อัตราส่วนความชื้นในรูปของกราฟอัตราการแห้ง (Drying rate curve)

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_i - M_e} \quad (3)$$

เมื่อ MR คือ อัตราส่วนความชื้น

M_t คือ ปริมาณความชื้นที่เวลาใด ๆ โดยน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

M_e คือ ปริมาณความชื้นสมดุล โดยน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

M_i คือ ปริมาณความชื้นเริ่มต้น โดยน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

$$\text{อัตราการแห้ง (กรัม/ชั่วโมง)} = k [\exp(-kt)] \times \text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)} \quad (4)$$

เมื่อ k คือ ค่าคงที่การแห้ง (1/ชั่วโมง) ได้จากค่าความชันของสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(MR)$ และระยะเวลาการแห้ง (1/ชั่วโมง)

t คือ ระยะเวลาการแห้ง (ชั่วโมง)

นำข้อมูลอัตราส่วนความชื้นตลอดช่วงการแห้งมาสร้างสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การแห้ง (Thin-layer drying mathematic model) เพื่อใช้ทำนายลักษณะการแห้งไฮโดรไลเสต แบบจำลองทางคณิตศาสตร์การแห้งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) semi-theoretical model derived from Newton's law of cooling ในการศึกษาใช้แบบจำลองของ Lewis (Newton) และ Page 2) semi-theoretical model derived from Fick's second law of diffusion ในการศึกษาใช้แบบจำลองของ Henderson and Pabis และ Midilli 3) Empirical model ในการศึกษาใช้แบบจำลองของ Weibull distribution และ Wang and Singh นำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การแห้งทั้งสามกลุ่มมาทำนายลักษณะการแห้ง โดยทำนายหาระยะเวลาการแห้งผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตให้มีความชื้นตามที่กำหนด

นำสมการของแบบจำลองต่าง ๆ ของวิธีการแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมตมาตรวจสอบการใช้ได้ของสมการ โดยแบ่งการตรวจสอบออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ 1) เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากสมการ ($MR_{\text{Predicted}}$) กับค่าอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการทดลอง (MR_{Exp}) ทำแห้งไฮโดรไลเสตด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต แล้วบันทึกน้ำหนักของถาดอบตลอดช่วงการแห้งตั้งแต่เริ่มทำแห้งจนถาดอบมีน้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาอัตราส่วนความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดช่วงการแห้ง แสดงผลในรูปของกราฟ

ความสัมพันธ์ระหว่าง MR_{Exp} และ $MR_{Predicted}$ พิจารณาผลการตรวจสอบจากค่า coefficient determination (r^2) และการเรียงตัวของข้อมูลบนกราฟ 2) เปรียบเทียบค่าปริมาณความชื้นที่ได้จากสมการ ($MC_{Predicted}$) กับค่าปริมาณความชื้นที่ได้จากการทดลอง (MC_{Exp}) กำหนดความชื้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์คำนวณหาระยะเวลาทำแห้งจากสมการการทำแห้ง ทำแห้งไฮโดรไลเสตตามระยะเวลาทำแห้งที่คำนวณได้จากสมการ วิเคราะห์ปริมาณความชื้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ตาม AOAC (2016) ดังภาคผนวก ข.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พิจารณาผลการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนระหว่าง $MC_{Predicted}$ และ MC_{Exp}

ศึกษาระยะเวลาทำแห้งที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยสุญญากาศด้วยวิธี trial and error

การทำแห้งด้วยสุญญากาศจะมีขั้นตอนการทำให้สารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำขึ้นโคมก่อนนำไปทำแห้งเช่นเดียวกับทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโคม-แมต แล้วนำเข้าตู้อบแห้งแบบสุญญากาศที่มีค่าความดันสุญญากาศ 30 นิ้วปรอท ด้วยเครื่องมือที่ไม่สามารถบันทึกน้ำหนักของถาดอบในระหว่างการทำแห้งที่ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการคำนวณหาระยะเวลาในการทำแห้งไฮโดรไลเสตให้มีความชื้นตามต้องการได้ จึงใช้วิธี trial and error ในการหาระยะเวลาทำแห้งที่เหมาะสมของการทำแห้งด้วยสุญญากาศเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตมีความชื้นตามที่ต้องการ โดยกำหนดระยะเวลาในการทำแห้งด้วยสุญญากาศ ดังนี้ 270 300 320 340 360 380 400 420 435 และ 450 นาที เมื่อทำแห้งจนครบกำหนดเวลา นำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2016) (ดังภาคผนวก ข.4) แล้วแสดงผลในรูปของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง

3.2.2 การผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งต่าง ๆ และการบรรจุ

ทำแห้งไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยวิธีการทำแห้ง 3 วิธี ช่างต้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสุดท้าย 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง เก็บผงไฮโดรไลเสตลงในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ลามิเนตขนาด 7 x 5 นิ้ว แล้วเก็บในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบด หลังจากนั้นเก็บผงไฮโดรไลเสตลงในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ลามิเนต และซีลปิดปากถุงด้วยเครื่องซีลแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในโถดูดความชื้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ

3.2.3 ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

3.2.3.1 สมบัติทางเคมีกายภาพ

3.2.3.1.1 โครงสร้างระดับจุลภาค

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มาวิเคราะห์ภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope and Energy Dispersive X-ray Spectrometer, SEM) ที่กำลังขยาย 50 เท่า ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าในการส่งอิเล็กตรอน 15 กิโลโวลต์ (JEOL, รุ่น JSM-6610LV, Japan)

3.2.3.1.2 ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระ

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2016) แสดงดังภาคผนวก ข.4 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระซึ่งนำหนักผงไฮโดรไลเสตประมาณ 1 กรัม ในภาชนะพลาสติกสำหรับวัดปริมาณน้ำอิสระ เกลี่ยตัวอย่างให้สม่ำเสมอ ปิดฝาและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ก่อนนำมาวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (AquaLab series 3 รุ่น TE, WA)

3.2.3.1.3 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 (สารละลายไฮโดรไลเสตที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.1.2.2 และแสดงผลในหน่วยไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.1.4 ฟลาโวนอยด์

เตรียมสารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามในข้อ 3.2.3.1.3 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ตามวิธีของ Zhishen และคณะ (1999) และแสดงผลในหน่วยไมโครกรัมแคทีชินต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.1.5 TCA-soluble peptides

เตรียมสารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามในข้อ 3.2.3.1.3 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ TCA-soluble peptides ของผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ตามวิธีของ Sritongtae และคณะ (2017) ละลายผงไฮโดรไลเสต 3 กรัม ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็นที่มีความเข้มข้น 5 % (w/v) 27 มิลลิลิตร กวนสารละลายต่อเนื่องบน stirrer

เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปวางในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) คำนวณปริมาณ TCA-soluble peptides จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน และแสดงผลในหน่วยกรัมไทโรซีนต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.2 สมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ โดยดัดแปลงวิธีจาก Adebowale และ Lawal (2003) ละลายผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ 1.0000 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 10 มิลลิลิตร แล้วกวนสารละลายด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใสด้านบนมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) ดังภาคผนวก ข.5 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2016) ดังภาคผนวก ข.6 จากนั้นคำนวณหาความสามารถในการละลายตามสมการที่ 5

$$\text{การละลาย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส (กรัม)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100 \quad (5)$$

3.2.3.3 สมบัติการต้านออกซิเดชัน

3.2.3.3.1 DPPH radical scavenging activity

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วย 3 วิธีข้างต้นมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 (สารละลายไฮโดรไลเสตมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ก่อนนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

นำสารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ตามการวิเคราะห์ในข้อ 3.1.2.4 คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity แสดงผลในหน่วยไมโครโมล Trolox ต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.3.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามในข้อ 3.2.3.3.1 แล้วนำมาวิเคราะห์ FRAP ตามการวิเคราะห์ในข้อ 3.1.2.4 คำนวณความสามารถในการต้าน

ออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP แสดงผลในหน่วยไมโครโมล Trolox ต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.3.3 Metal-chelating activity

เตรียมสารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำตามในข้อ 3.2.3.3.1 แล้วนำมาวิเคราะห์ Metal-chelating activity โดยดัดแปลงวิธีของ Jamdar และคณะ (2010) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 0.05 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.85 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์โรซีน (Ferrozine) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating activity จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน EDTA (ภาคผนวก ข.7) แสดงผลในหน่วยไมโครโมล EDTA ต่อกรัมผงไฮโดรไลเสต (โดยน้ำหนักแห้ง)

3.2.3.3.4 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำให้แห้งด้วย 3 วิธีข้างต้น มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (สารละลายไฮโดรไลเสตมีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิเคราะห์ ORAC โดยดัดแปลงวิธีของ Alashi และคณะ (2014) ปิเปตสารละลายไฮโดรไลเสต 20 ไมโครลิตร ลงใน sterilin[®] 96-well microplate นำเข้าเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (microplate fluorescence reader) ที่กำหนดอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลายฟลูออเรสซิน (Fluorescein) ที่ความเข้มข้น 4.19×10^{-3} ไมโครโมล ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยระบบ orbital แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ก่อนให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลาย 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมล ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยระบบ orbital แล้วอ่านค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (relative fluorescence intensity) ที่เปลี่ยนแปลงไปทุก 1 นาที โดยใช้ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ใช้ในการปลดปล่อย (emission wavelength) 530 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC จากพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างลบกับพื้นที่ใต้กราฟของ blank แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox (ภาคผนวก ข.8)

ข้อ 3.2.3.3.1 - 3.2.3.3.4 ทำการทดลอง 3 ชั้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS version 22 for Windows[®] (SPSS Inc., Chicago, IL)



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของภาวะเหมาะสมที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

4.1.1 ผลของภาวะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ต่อผลตอบสนองของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ผลการวิเคราะห์ผลตอบสนองต่าง ๆ (ระดับการย่อย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power) ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่แปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® 1 - 7 % และระยะเวลาย่อย 60 - 1200 นาที แสดงดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.1) ซึ่งให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาย่อย และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ($p \leq 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นทำให้ค่าระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำเพิ่มขึ้น มีค่าอยู่ในช่วง 27.57 - 92.60 % โดยการผลิตด้วยการย่อยในภาวะที่ลำดับการทดลองที่ 4, 6, 8 และ 9 ทำให้ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีระดับการย่อยสูงสุดอยู่ในช่วง 70.65 - 92.60 % ($p > 0.05$) เนื่องจากการมีกิจกรรมของเอนไซม์ Flavourzyme® ที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ในสายพอลิเพปไทด์เพิ่มมากขึ้น โดยการแตกออกของพันธะเพปไทด์ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ค่าระดับการย่อยติดตามจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น ณ เวลาใด ๆ กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดของไฮโดรไลเสต ความแตกต่างของสายพันธุ์ถั่วที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรไลเสตอาจส่งผลต่อความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ที่แตกต่างกันด้วยผลการทดลองของงานวิจัยนี้มีค่าระดับการย่อยสูงกว่าค่าระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 7 % (w/w) เวลา 360 นาที ซึ่งรายงานค่าระดับการย่อยของไฮโดรไลเสต จากถั่วเขียวและถั่วอะชูกิ 68.88 และ 17.14% ตามลำดับ (Sangsukiam and Duangmal, 2017)

ในระหว่างการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ทำหน้าที่ตัดพันธะเพปไทด์ในสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนให้กลายเป็นเพปไทด์สายสั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอันตรกิริยาไฮโดรฟอบิกของ protein-bound polyphenols ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อย

สารประกอบฟีนอลิกออกจากโครงสร้างโปรตีน ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.2) ซึ่งให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาย่อย และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไฮโดรไลเสต ($p \leq 0.05$) โดยการผลิตไฮโดรไลเสตในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกจากโครงสร้างโปรตีนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น ซึ่งการตัดพันธะเพปไทด์มีผลต่อตำแหน่งและระยะห่างระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและหมู่อะมิโนในสายพอลิเพปไทด์หรือเพปไทด์ ส่งผลให้อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนลดลง จึงเกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกที่ซ่อนอยู่ในโครงสร้างโปรตีน ทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไฮโดรไลเสตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มระยะเวลาย่อยส่งผลต่อการเพิ่มการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกในไฮโดรไลเสตเช่นกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Garcia-Mora et al., 2015) ที่รายงานว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วป็นโตที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase[®] เข้มข้น 2 % มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเมื่อมีระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นมากกว่า 120 นาที

ตารางที่ 4.1 ผลของภาวะการย่อยโปรตีนต่อระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาลของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ลำดับการทดลอง*	ระดับการย่อย (%)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE g ⁻¹ black bean, db.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร
1	33.92 ^{de} ± 0.75	1.01 ^{abc} ± 0.21	0.49 ^c ± 0.01
2	70.65 ^c ± 7.78	1.60 ^{abc} ± 0.41	0.59 ^b ± 0.00
3	71.40 ^{bc} ± 1.58	1.38 ^{abc} ± 0.24	0.45 ^{cd} ± 0.05
4	92.60 ^a ± 2.05	1.76 ^{ab} ± 0.43	0.41 ^{cd} ± 0.05
5	47.94 ^d ± 1.64	0.85 ^c ± 0.30	0.36 ^d ± 0.00
6	91.96 ^a ± 6.15	1.90 ^a ± 0.39	0.38 ^d ± 0.00
7	27.57 ^e ± 0.33	0.96 ^{bc} ± 0.20	0.67 ^a ± 0.02
8	82.56 ^{ab} ± 0.49	1.73 ^{abc} ± 0.28	0.48 ^c ± 0.01
9	75.83 ^{abc} ± 2.53	1.51 ^{abc} ± 0.29	0.44 ^{cd} ± 0.00

*ลำดับการทดลอง 1 - 9 อธิบายไว้ดังตารางที่ 3.1

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

ในระหว่างการย่อยโปรตีน อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ ชนิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด แล้วเกิดผลิตภัณฑ์ (Maillard Reaction Products, MRPs) ในไฮโดรไลเสต การเกิดสีน้ำตาลในไฮโดรไลเสตจากถั่วดำติดตามได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.3) ซึ่งให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® ระยะเวลาย่อย และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ($p \leq 0.05$) การมีภาวะย่อยในช่วงอุณหภูมิ 50 - 70 องศาเซลเซียส และ pH ของสารละลายเป็น 6 เอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มาจากกระบวนการย่อยแบ่งด้วยเอนไซม์อะไมเลสในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทั้งนี้ขั้นตอนการย่อยแบ่งทำเพื่อป้องกันการเกิดเจลที่จะไปขัดขวางกระบวนการย่อยโปรตีน ในขณะที่หมู่อะมิโนอิสระของกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยโปรตีน นอกจากนี้การมี pH ของสารละลายในกระบวนการผลิตสูงกว่าค่า pi ของเปปไทด์หรือโปรตีนนั้น มีผลให้สารละลายนั้นเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ดี ซึ่งโปรตีนของถั่วดำมีค่า pi อยู่ในช่วง pH 4 - 5 กระบวนการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีภาวะที่เอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด อาจส่งผลให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่มีสมบัติการต้านออกซิเดชันลดลง เนื่องจากกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ MRPs ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระหว่างการผลิตไฮโดรไลเสตจากผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกุ้งมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันและมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Zha et al., 2015)

กระบวนการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเปปไทด์สายสั้น กรดอะมิโนอิสระ สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการปลดปล่อยออกจาก protein-bound polyphenols และยังทำให้ได้ MRPs จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระหว่างการย่อยโปรตีน องค์ประกอบเหล่านี้ล้วนมีสมบัติการต้านออกซิเดชัน จึงนำผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านี้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ผลการวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity (ตารางที่ 4.2) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.4) ซึ่งให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาย่อยและอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ($p \leq 0.05$) การย่อยโปรตีนด้วย

เอนไซม์ Flavourzyme® ความเข้มข้น 1 - 7 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนึ่งสุก และมียุทธะเวลาย่อย 60 - 1200 นาที ทำให้ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีค่า DPPH radical scavenging activity อยู่ในช่วง 119.91 - 125.08 $\mu\text{mol Trolox}$ ต่อกกรัมถั่วดำ โดยน้ำหนักแห้ง การมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการมีกิจกรรมของเอนไซม์มากขึ้นทำให้ความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ในสายพอลิเพปไทด์มากขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยมีปริมาณเพปไทด์สายสั้นและรีดิวซิงเอเจนต์ อิสระที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น Ye และคณะ (2018) รายงานว่าการมีเพปไทด์สายสั้นเพิ่มขึ้นทำให้ไฮโดรไลเสตจากเมล็ดแครอท (carrot seed) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® มีความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามตามชนิดและลำดับของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์มีผลต่อการแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยกรดอะมิโนที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันจะเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ไซข้างเป็นวงอะโรมาติก เช่น ทริปโทแฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน หรือกรดอะมิโนที่มีหมู่ไซข้างเป็น nucleophilic-sulfur เช่น ซิสเทอีนและเมไทโอนีน (Luna-Vital et al., 2015; Sarmadi and Ismail, 2010) การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำให้การเปลี่ยนแปลงอันตรกิริยาไฮโดรฟอบิกที่มีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกจากโครงสร้างโปรตีน และยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ MRPs ขึ้นในระหว่างการย่อย องค์ประกอบเหล่านี้ที่เกิดขึ้นในไฮโดรไลเสตสามารถแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิพิดออกซิเดชันด้วยการให้ไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Rice-Evans et al., 1997)

ผลการวิเคราะห์ FRAP (ตารางที่ 4.2) และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.5) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ยุทธะเวลาย่อย และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และยุทธะเวลาย่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ($p \leq 0.05$) การย่อยโปรตีนในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์และยุทธะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นทำให้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP ของไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 1.06 - 1.46 $\mu\text{mol Trolox}$ ต่อกกรัมถั่วดำ โดยน้ำหนักแห้ง การย่อยโปรตีนในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์และยุทธะเวลาย่อยเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ในสายพอลิเพปไทด์เพิ่มมากขึ้น บ่งชี้ได้จากการมีค่าระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้น (27.57 - 92.60 %) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยมีปริมาณเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้การย่อยโปรตีนทำให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ MRPs ขึ้นในระหว่างการย่อย ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ในไฮโดรไลเสตมี

สมบัติในการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ได้ ค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยที่วิเคราะห์ FRAP จึงเพิ่มขึ้น

ค่าระดับการย่อยโปรตีนจึงเป็นผลตอบสนองที่สำคัญที่ส่งผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sbroggio และคณะ (2016) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลืองบด (okara) ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] มีความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP เพิ่มขึ้น ในช่วง 9.5 - 18.5 % และ 168.0 - 360.3 $\mu\text{mol/L}$ Trolox ตามลำดับ เมื่อมีค่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้น ในช่วง 1.45 - 5.8 %

ตารางที่ 4.2 ผลของภาวะการย่อยโปรตีนต่อ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ลำดับ การทดลอง*	ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ black bean, db.)	
	DPPH radical scavenging activity	FRAP
1	123.77 ^a \pm 1.33	1.06 ^d \pm 0.18
2	124.42 ^a \pm 0.10	1.28 ^{bc} \pm 0.30
3	124.34 ^a \pm 0.15	1.30 ^{ab} \pm 0.17
4	124.40 ^a \pm 0.12	1.36 ^{ab} \pm 0.38
5	119.91 ^b \pm 0.12	1.06 ^d \pm 0.18
6	125.06 ^a \pm 0.23	1.42 ^a \pm 0.37
7	120.59 ^b \pm 2.64	1.19 ^{cd} \pm 0.21
8	125.08 ^a \pm 0.28	1.46 ^a \pm 0.44
9	124.50 ^a \pm 1.10	1.29 ^{bc} \pm 0.32

*ลำดับการทดลอง 1 - 9 อธิบายไว้ดังตารางที่ 3.1

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

4.1.2 การสร้างสมการพหุคูณของผลตอบสนองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) (ตารางที่ ค.1 - ค.5) ด้วยการใช้การถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression analysis) ของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย) กับ

ผลตอบสนองต่าง ๆ (ระดับการย่อย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP) พบว่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กับระดับการย่อย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ($p \leq 0.05$) นำผลการวิเคราะห์การถดถอยของการทดลองมาสร้างสมการหรือแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีรูปแบบของสมการเป็นแบบพหุนามกำลังสอง (second-order polynomial model) ซึ่งใช้สำหรับการทำนายค่าของตัวแปรอิสระที่มีความสัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองต่าง ๆ ตามที่ต้องการ สมการของผลตอบสนองต่าง ๆ แสดงดังข้างล่างนี้

$$Y_1 = -28.48 + 16.45 X_1 + 0.1458 X_2 - 0.875 X_1^2 - 0.000071 X_2^2 - 0.00372 X_1 X_2$$

$$r^2 = 0.9957$$

$$Y_2 = -0.009 + 0.299 X_1 + 0.001881 X_2 - 0.0113 X_1^2 - 0.000001 X_2^2 - 0.000069 X_1 X_2$$

$$r^2 = 0.8717$$

$$Y_3 = 0.5166 + 0.0776 X_1 - 0.000631 X_2 - 0.00622 X_1^2 - 0.000032 X_1 X_2$$

$$r^2 = 0.9358$$

$$Y_4 = 77.62 + 0.515 X_1 + 0.00896 X_2 - 0.0283 X_1^2 - 0.000007 X_2^2 - 0.000724 X_1 X_2$$

$$r^2 = 0.7760$$

$$Y_5 = 0.7967 + 0.1682 X_1 + 0.000759 X_2 - 0.01581 X_1^2 - 0.000013 X_1 X_2$$

$$r^2 = 0.7793$$

เมื่อ X_1 และ X_2 คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® และระยะเวลาย่อย

Y_{1-5} คือ ระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ตามลำดับ

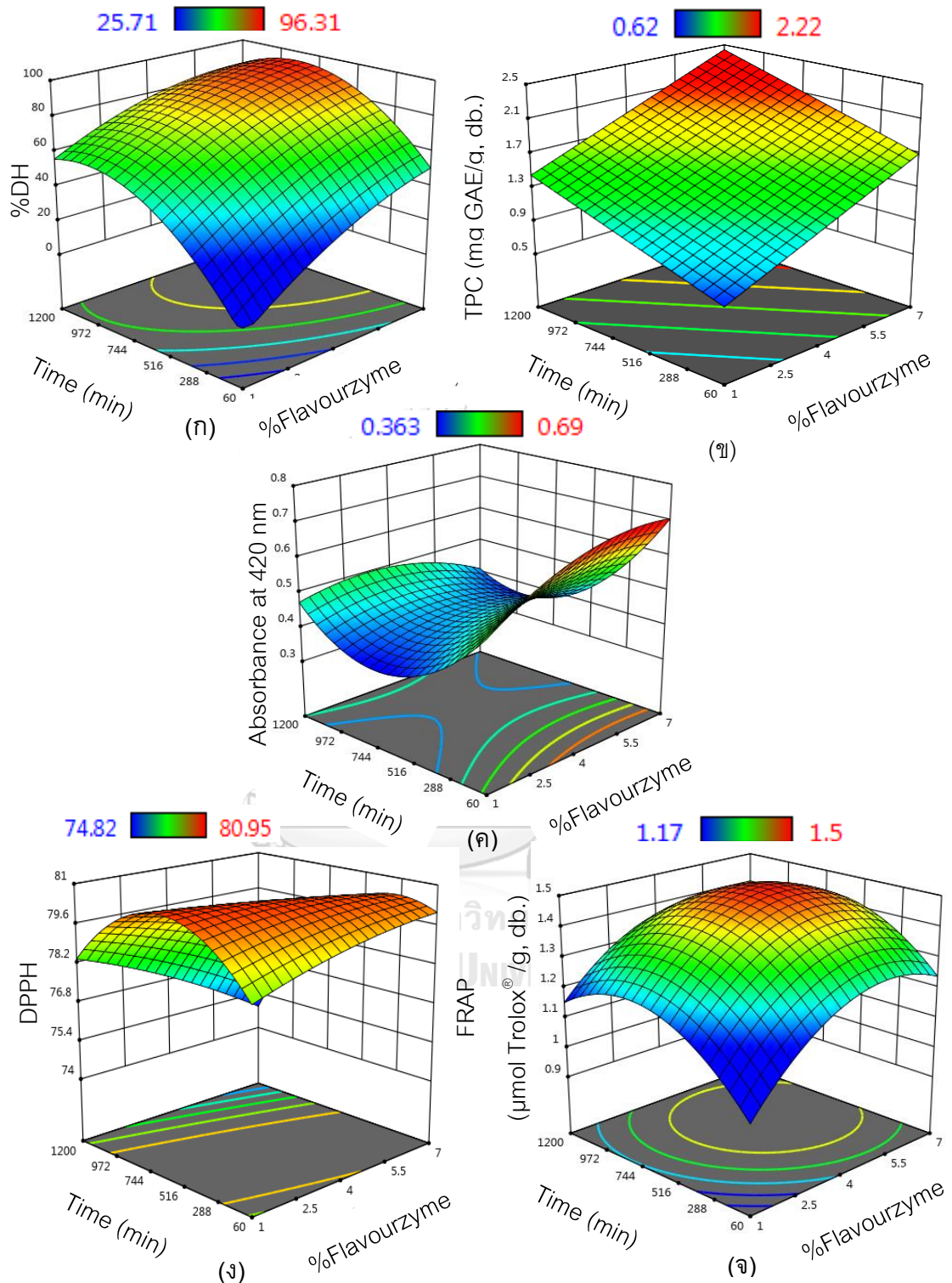
r^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination)

ผลการพิจารณาความเหมาะสมของข้อมูลการทดลองต่อการสร้างสมการการทำนายของผลตอบสนองต่าง ๆ (ตารางที่ ค.1 - ค.5) พบว่าค่า p -value ของ Lack of fit มีค่าอยู่ในช่วง 0.102 - 0.359 ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าการทดลองมีข้อมูลที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการสร้างสมการการทำนายของผลตอบสนองต่าง ๆ เมื่อพิจารณาความเหมาะสมของสมการที่ใช้ในการทำนายค่าของตัวแปรอิสระให้มีความสัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองต่าง ๆ (ตารางที่ ค.6)

พบว่าสมการการทำนายของผลตอบสนอง (ระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาล) มีค่า coefficient of determination (r^2) อยู่ในช่วง 0.8717 - 0.9557 อธิบายได้ว่าสมการมีความเหมาะสมในการทำนาย 87.17 - 95.57% ในขณะที่สมการการทำนายของความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging activity และ FRAP) มีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.7760 - 0.7793 อธิบายได้ว่าสมการมีความเหมาะสมในการทำนาย 77.60 - 77.93% Joglekar และ May (1991) รายงานว่าสมการที่มีความเหมาะสมในการทำนายค่าของตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาที่สัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองควรมีค่า r^2 มากกว่า 0.80 โดย ค่า r^2 ของสมการการทำนายของ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ที่ต่ำนี้ อาจเนื่องมาจากการเกิดความแปรปรวนที่มีผลมาจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีน Wani และคณะ (2017) รายงานว่าสมการการทำนายของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่า r^2 0.4799 และ 0.8057 ตามลำดับ

สมการการทำนายของผลตอบสนอง (ระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาล และความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP) จึงมีความเหมาะสมในการอธิบายความสัมพันธ์และทำนายค่าของตัวแปรอิสระให้มีความสัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองที่ต้องการ

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยต่อค่าผลตอบสนองต่าง ๆ (ระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน) แสดงได้ในภาพกราฟพื้นผิวผลตอบสนองแบบสามมิติ (three-dimensional (3D) response surface plots) ดังภาพที่ 4.1 การพิจารณากราฟพื้นผิวของผลตอบสนองต่าง ๆ พบว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลให้ไฮโดรไลเซตมีค่าระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลให้ไฮโดรไลเซตมีค่าระดับการย่อย ความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP สูงสุดอยู่ในเขตพื้นที่ของการทดลอง ในขณะที่การพิจารณากราฟพื้นผิวของสารประกอบฟีนอลิก พบว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลให้ไฮโดรไลเซตมีสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดอยู่นอกเขตพื้นที่ของการทดลอง นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีผลให้ไฮโดรไลเซตมีค่าการเกิดสีน้ำตาลสูงสุดอยู่ในลักษณะที่เป็นแบบอานม้า



ภาพที่ 4.1 กราฟพื้นผิวผลตอบสนองของ (ก) ระดับการย่อย (ข) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ค) การเกิดสีน้ำตาล ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ (ง) DPPH radical scavenging activity และ (จ) FRAP สำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

4.1.3 การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการ

นำสมการการทำนายของผลตอบสนองที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยแบบพหุคูณมา ตรวจสอบความเหมาะสมของสมการที่ใช้ในการทำนายค่าของตัวแปรอิสระที่สัมพันธ์กับ ผลตอบสนอง เพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงและความถูกต้องของสมการการทำนาย โดยผลิต ไฮโดรไลสได้จากถั่วดำด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะการย่อยที่เหมาะสม 2 ภาวะ ได้แก่ ภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.03 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนึ่งสุก ระยะเวลาย่อย 360 นาที และภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.09 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้ง ของถั่วดำนึ่งสุก ระยะเวลาย่อย 395 นาที แล้วพิจารณาผลการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำนายจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อน (%error) ระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายกับ ค่าที่ได้จากการทดลองของผลตอบสนอง

การคัดเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่เหมาะสมทำได้จากการพิจารณาผลการทดลอง การผลิตในภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นมีผลให้ไฮโดรไลสได้จาก ถั่วดำมีค่าระดับการย่อย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถต้าน DPPH radical scavenging activity และ FRAP เพิ่มขึ้น โดยการผลิตในภาวะย่อยที่ทำให้ไฮโดรไลส ได้มีค่าระดับการย่อยสูงกว่า 80 % ขึ้นไป จะทำให้ไฮโดรไลสได้มีค่าผลตอบสนอง ตัวอื่น ๆ สูงสุด งานวิจัยของ Li และคณะ (2007) รายงานว่าการผลิตไฮโดรไลสได้จากคอลลาเจนจากหนัง หมูด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสร่วมกันหลายชนิดในภาวะการย่อยที่ทำให้มีระดับการย่อย ต่ำกว่า 85% มีผลให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลสมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง งานวิจัยนี้ จึงกำหนดให้ระดับการย่อยเป็นผลตอบสนองหลักในการคัดเลือกภาวะการย่อยที่เหมาะสม โดย กำหนดภาวะการย่อยที่ทำให้ไฮโดรไลสได้จากถั่วดำมีค่าระดับการย่อย 75 - 80% และมีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การเกิดสีน้ำตาล และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP สูงสุด เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกภาวะย่อยที่ เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรไลสได้จากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

ผลการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำนายของผลตอบสนองต่าง ๆ (ตารางที่ 4.3) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อน (%error) ของระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และการเกิดสีน้ำตาลมีค่าอยู่ในช่วง 0.54 - 3.48% และ %error ของความสามารถ ในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 11.23 - 27.46% โดย %error ของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงนี้ เนื่องมาจาก การเกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยและสารประกอบอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการต้าน

ออกซิเดชัน ถึงแม้การผลิตไฮโดรไลเซตด้วยการใช้เอนไซม์ที่มีการกำหนดภาวะย่อยเดียวกัน กิจกรรมของเอนไซม์ที่ไปตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายพอลิเพปไทด์อาจตัดในตำแหน่งที่แตกต่าง กัน ทำให้กรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์สายสั้นที่เกิดขึ้นมีชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่าง กัน เป็นผลให้การแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตแตกต่างกัน โดยผลตอบสนอง หลักที่ได้จากการผลิตไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ ได้แก่ ระดับการย่อย สารประกอบฟีนอลิก และการ เกิดสีน้ำตาลมี %error (0.54 - 3.48%) ต่ำกว่า %error (3.02 - 6.38%) ของงานวิจัยที่ศึกษาความ เหมาะสมของภาวะการผลิตกรดซัคซินิกด้วยจุลินทรีย์ (Zhang et al., 2012)

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของผลตอบสนองสำหรับการผลิตไฮโดรไลเซตจาก ถั่วดำด้วยการย่อยในภาวะที่เหมาะสมที่สุด

ความเข้มข้นของ Flavourzyme % (w/w)	ระยะเวลาย่อย (นาที)	ผลตอบสนอง	ค่าที่ได้จาก การทำนาย	ค่าที่ได้จาก การทดลอง	%error
6.09	360	%DH	74.71	76.91 ± 1.56	2.94
		TPC	1.82	1.76 ± 0.03	3.30
		MRPs	0.52	0.51 ± 0.06	1.96
		DPPH	125.13	111.08 ± 0.31	11.23
		FRAP	1.42	1.03 ± 0.03	27.46
6.03	395	%DH	76.55	79.22 ± 0.94	3.48
		TPC	1.85	1.84 ± 0.05	0.54
		MRPs	0.51	0.50 ± 0.02	1.96
		DPPH	125.12	109.80 ± 1.25	12.24
		FRAP	1.43	1.13 ± 0.05	20.98

ดังนั้นสมการของผลตอบสนองต่าง ๆ จึงมีความเหมาะสมในการทำนายภาวะการย่อย โปรตีนสำหรับการผลิตไฮโดรไลเซตจากถั่วดำให้มีสมบัติตามที่ต้องการได้ จึงคัดเลือกภาวะที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® 6.09 % (w/w) โดยน้ำหนักแห้งของถั่วดำนี้สูง และมี ระยะเวลาย่อย 360 นาที ในการผลิตไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

4.2 ผลของวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆ ในการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

4.2.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ

ผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำจากภาวะที่คัดเลือกได้ แล้วนำมาทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยการทำแห้ง 3 วิธี ได้แก่ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศ เพื่อศึกษาระยะเวลาทำแห้งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นต่ำกว่า 21% โดยน้ำหนักแห้ง

จลนพลศาสตร์และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการทำแห้งไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต

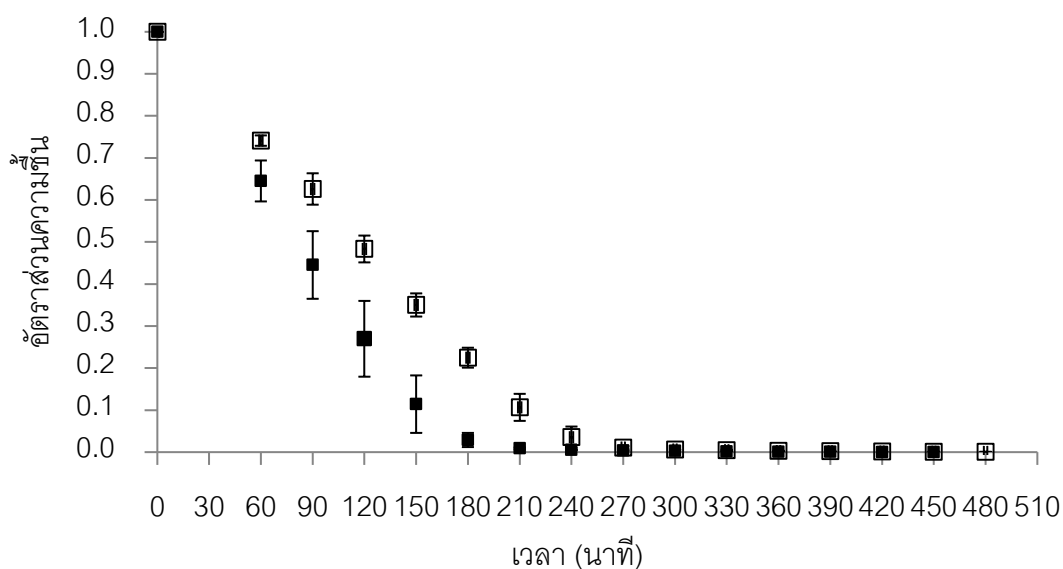
เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดช่วงเวลากการทำแห้งแล้วแสดงผลในรูปของกราฟการทำแห้ง (Drying curve) พบว่าเมื่อระยะเวลาการทำแห้งเพิ่มมากขึ้น ไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมตมีการลดลงของปริมาณความชื้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จากนั้นค่อย ๆ ลดลงจนมีปริมาณความชื้นสุดท้ายคงที่ หากพิจารณาการเปรียบเทียบการลดลงของปริมาณความชื้นของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองวิธีจากกราฟการทำแห้งที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความชื้นกับเวลา (ภาพที่ 4.2) พบว่า ไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตมีการลดลงของอัตราส่วนความชื้นมากกว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด เนื่องจากไฮโดรไลเสตที่นำมาทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตจะมีการขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้ง จึงทำให้ลักษณะของไฮโดรไลเสตมีความเป็นรูพรุน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของน้ำมาที่ผิวหน้าของตัวอย่างและการระเหยของน้ำออกจากผิวหน้าเกิดขึ้นได้มากกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด

ลักษณะกราฟอัตราส่วนความชื้นของไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองวิธีมีลักษณะแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential) เมื่อนำข้อมูลอัตราส่วนความชื้นกับระยะเวลาทำแห้งของทั้งสองวิธีมาหาค่าคงที่ของการทำแห้ง (ค่า k) ซึ่งเป็นค่าความชันของสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(MR)$ กับระยะเวลาในการทำแห้ง พบว่า ไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตมีค่าคงที่ของการทำแห้งสูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด เมื่อนำข้อมูลอัตราส่วนความชื้นและค่าคงที่ของการทำแห้ง (ตารางที่ 4.4) ของทั้งสองวิธีมาคำนวณอัตราการทำแห้ง (ภาพที่ 4.3) พบว่าค่าคงที่ของการทำแห้งแปรผันตามอัตราการทำแห้งที่แสดงอยู่ในรูปอัตราการทำแห้งกับอัตราส่วนความชื้น โดยไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตมีอัตราการทำแห้งสูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วย

ลมร้อนแบบภาค แสดงให้เห็นว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนที่มีกระบวนการขึ้นโพนก่อน (การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโพน-แมต) มีอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำและมีอัตราการระเหยน้ำออกจากผิวน้ำตัวอย่างได้มากกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนที่ไม่มีกระบวนการขึ้นโพน (การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาค)

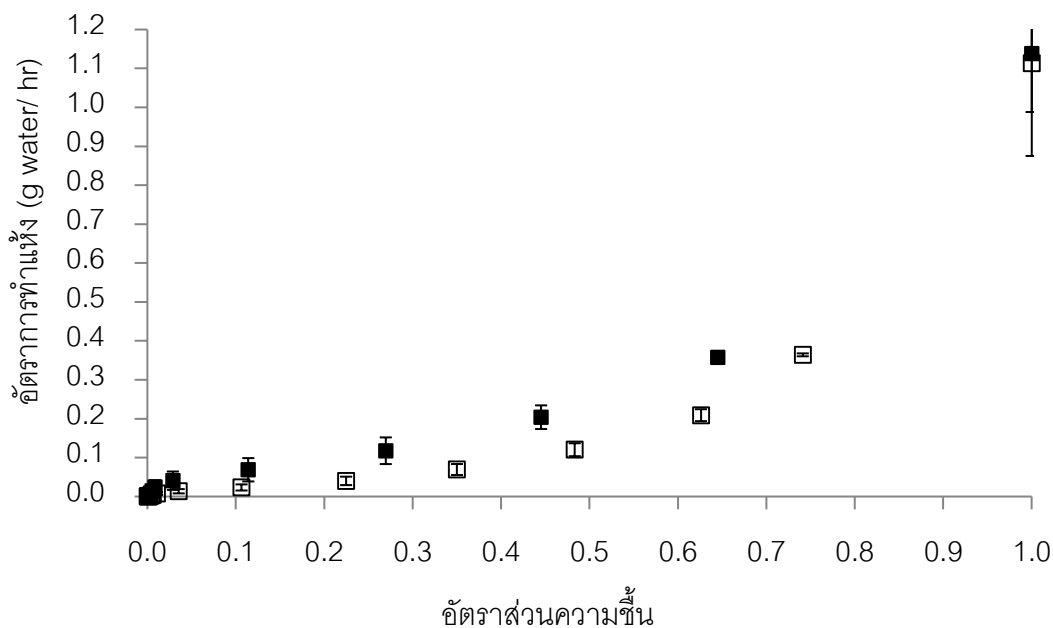
ตารางที่ 4.4 ค่าคงที่ของไฮโดรไลเซตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาคและแบบโพน-แมตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

วิธีการทำแห้ง	ค่าคงที่ k (h^{-1})	r^2
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาค	1.1148	0.9665
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโพน-แมต	1.2866	0.9722



ภาพที่ 4.2 กราฟอัตราส่วนความชื้นของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาคและแบบโพน-แมต

□ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาค ■ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโพน-แมต



ภาพที่ 4.3 กราฟอัตราการทำแห้งของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยด้วยลมร้อนแบบถาด และแบบโฝม-แมต

□ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด ■ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฝม-แมต

เมื่อนำข้อมูลอัตราส่วนความชื้นตลอดช่วงเวลาทำแห้งของการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฝม-แมตมาสร้างสมการการทำแห้งจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 6 แบบจำลอง (ตารางที่ 4.5) และเมื่อพิจารณาสมการการทำแห้งทั้งหมด (ตารางที่ 4.6) พบว่าสมการของแบบจำลอง Weibull ของการทำแห้งทั้งสองวิธีมีค่า correlation coefficient (r) สูง และมีค่า Mean Residual Least Square (MRS) และ Root Mean Square Error ($RMSE$) ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสมการอื่น ๆ ของแบบจำลองในกลุ่ม (1) Semi-theoretical model derived from Newton's law of cooling (2) Semi-theoretical model derived from Fick's second law of diffusion และ (3) Empirical model จึงคัดเลือกสมการการทำแห้งของแบบจำลอง Weibull ไปใช้ในการทำนายระยะเวลาทำแห้งไฮโดรไลเสตด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฝม-แมตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสุดท้ายตามที่ต้องการ ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sritongtae และคณะ (2017) ที่รายงานว่าสมการของแบบจำลอง Weibull มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายคุณลักษณะการทำแห้งแบบโฝม-แมตของไฮโดรไลเสตจากถั่วนี้้วนางแดงเพาะงอกและไม่เพาะงอก

ตารางที่ 4.5 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการทำแห้งไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

กลุ่ม	แบบจำลอง	สมการของแบบจำลอง
Semi-theoretical model derived from Newton's law of cooling	Lewis (Newton)	$MR = \exp(-kt)$
	Page	$MR = \exp(-kt^n)$
Semi-theoretical model derived from Fick's second law of diffusion	Henderson and Pabis	$MR = a \exp(-kt)$
	Midilli	$MR = a \exp(-kt^n) + bt$
Empirical model	Weibull distribution	$MR = a - b \exp(-kt^n)$
	Wang and Singh	$MR = 1 + at + b(t^2)$

เมื่อ MR คือ อัตราส่วนความชื้น k คือ ค่าคงที่ของการทำแห้ง (h^{-1}) a, b, n คือ ค่าคงที่ของแบบจำลอง และ t คือ เวลาการทำแห้ง (ชั่วโมง)

ที่มา: Erbay และ Icier (2010)

ตารางที่ 4.6 ค่าสัมประสิทธิ์จากแบบจำลองต่าง ๆ ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

การทำแห้ง	แบบจำลอง	ค่าสัมประสิทธิ์				r	MRS	$RMSE$
		a	b	k	n			
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด	Newton			0.4950		0.9803	0.0055	0.0720
	Page			0.2420	1.7505	0.9972	0.0006	0.0239
ไฟม-เมต	Henderson & Pabis	1.0950		0.7127		0.9780	0.0048	0.0673
	Midilli	0.9785	-0.0007	0.2257	1.7934	0.9922	0.0005	0.0217
ไฟม-เมต	Weibull	-0.0070	-0.9862	0.2264	1.7790	0.9974	0.0005	0.0214
	Wang & Singh	-0.3221	0.0244			0.9872	0.0024	0.0478
ไฟม-เมต	Newton			0.6862		0.9830	0.0040	0.0609
	Page			0.4048	1.7948	0.9981	0.0002	0.0119
ไฟม-เมต	Henderson & Pabis	1.0589		0.5284		0.9819	0.0037	0.0587
	Midilli	1.0318	-0.0055	0.6552	1.0129	0.9831	0.0031	0.0538
ไฟม-เมต	Weibull	-0.0023	-0.9970	0.3999	1.7962	0.9992	0.0001	0.0117
	Wang & Singh	-0.4100	0.0388			0.9779	0.0043	0.0636

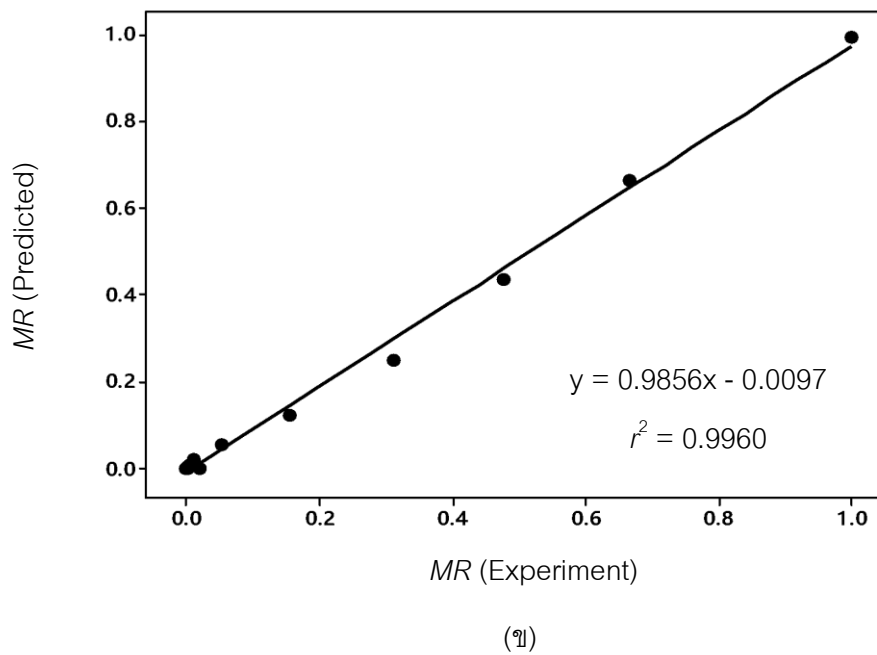
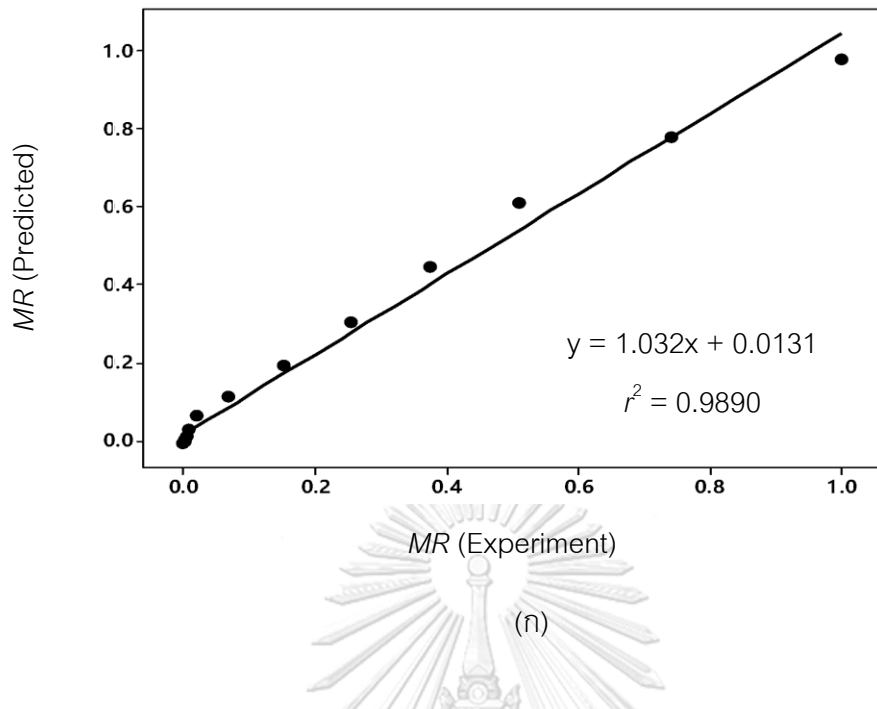
เมื่อ a, b, n คือ ค่าสัมประสิทธิ์ในแบบจำลอง k คือ ค่าคงที่ในการทำแห้ง (h^{-1}) r คือ correlation coefficient MRS คือ Mean Residual Least Square และ $RMSE$ คือ Root Mean Square Error

การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำแห้ง

คัดเลือกสมการการทำแห้งของแบบจำลอง Weibull ของการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต มาตรวจสอบการใช้ได้ของสมการเพื่อตรวจสอบความเหมาะสมและความถูกต้องของสมการที่ใช้สำหรับการทำนายระยะเวลาทำแห้งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสุดท้ายตามที่ต้องการ โดยแบ่งการตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำแห้งออกเป็น 2 กรณี ได้แก่

1) การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำแห้งโดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการทำนายจากสมการ ($MR_{\text{Predicted}}$) กับค่าอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการคำนวณจากการทดลอง (MR_{Exp}) แล้วพิจารณาผลการตรวจสอบจากค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (r^2) จากการพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $MR_{\text{Predicted}}$ และ MR_{Exp} ของการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอมแมต (ภาพที่ 4.4) พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $MR_{\text{Predicted}}$ กับค่า MR_{Exp} ของไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมตสามารถอธิบายความสัมพันธ์ด้วยค่า r^2 0.9890 และ 0.9960 ตามลำดับ โดยสมการของแบบจำลอง Weibull สามารถทำนายค่า $MR_{\text{Predicted}}$ ได้ใกล้เคียงกับค่า MR_{Exp} ของไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต 98.90% และ 99.60% ตามลำดับ

2) การตรวจสอบการใช้ได้ของสมการการทำแห้งโดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าปริมาณความชื้นที่ได้จากการทำนายจากสมการ ($MC_{\text{Predicted}}$) กับค่าปริมาณความชื้นที่ได้จากการคำนวณจากการทดลอง (MC_{Exp}) โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะกำหนดปริมาณความชื้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ประมาณ 18 - 21% โดยน้ำหนักแห้ง อ้างอิงตามเกณฑ์การทำแห้งอาหารในกลุ่มอาหารที่มีความชื้นต่ำ (James et al., 2005) ในการนำมาทำนายระยะเวลาทำแห้งจากสมการการทำแห้ง พิจารณาผลการตรวจสอบจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อน (%error) ของ $MC_{\text{Predicted}}$ และ MC_{Exp} ผลการพิจารณาการคำนวณ %error ของไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต (ตารางที่ 4.7) พบว่า %error ของไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมตอยู่ในช่วง 0 - 5.5%



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการสมการกับอัตราส่วนความชื้นที่ได้จากการทดลองของไฮโดรไลเซตที่ (ก) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด และ (ข) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณความชื้นในการทำแห้งไฮโดรไลเสตด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต

วิธีการทำแห้ง	ระยะเวลา ทำแห้ง (นาทีก)	%ปริมาณความชื้น (โดยน้ำหนักแห้ง)		%error	ปริมาณ น้ำอิสระ
		จากการทำนาย	จากการทดลอง		
การทำแห้ง ด้วยลมร้อน	390	25.00	25.11	0.44	0.539 ± 0.002
แบบถาด	411	23.00	24.23	5.35	0.469 ± 0.002
การทำแห้ง ด้วยลมร้อน	453	21.00	21.89	4.24	0.426 ± 0.001
แบบฟอม-แมต	304	23.00	23.79	3.43	0.447 ± 0.002
แบบฟอม-แมต	315	21.00	21.21	1.00	0.413 ± 0.001
	370	18.00	19.09	6.05	0.412 ± 0.001

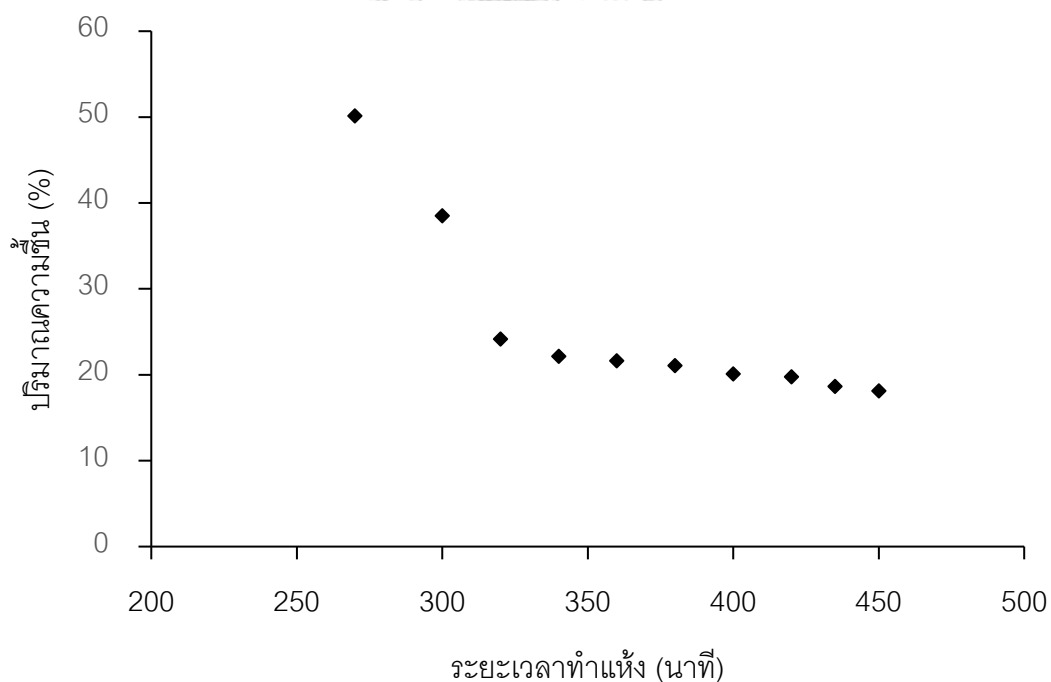
ผลการศึกษาระยะเวลาทำแห้งที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยสุญญากาศด้วยวิธี trial and error

ผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำแล้วนำมาผ่านกระบวนการขึ้นฟอมก่อนนำมาแห้งด้วยสุญญากาศในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดันภายในเครื่อง 30 นิ้วปรอท เพื่อศึกษาระยะเวลาในการทำแห้งด้วยสุญญากาศที่ทำให้ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีปริมาณความชื้นสุดท้ายต่ำกว่า 21% โดยน้ำหนักแห้ง

จากการพิจารณาปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระที่ได้จากการทำ trial and error ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.5) พบว่าการทำแห้งในภาวะที่มีระยะเวลาทำแห้งเพิ่มขึ้น ทำให้ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำมีปริมาณความชื้น และปริมาณน้ำอิสระลดลง ($p \leq 0.05$) โดยการทำแห้งในภาวะที่มีระยะเวลา 380 และ 450 นาที ทำให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเป็น 21.06 และ 18.13% และมีปริมาณน้ำอิสระ 0.419 และ 0.413 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระจากการทำ trial and error ของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ

ระยะเวลาทำแห้ง (นาทีก)	ปริมาณความชื้น (%)	ปริมาณน้ำอิสระ
270	50.15 ± 0.88	0.560 ± 0.03
300	38.51 ± 0.67	0.459 ± 0.02
320	24.17 ± 0.53	0.449 ± 0.00
340	22.16 ± 0.13	0.444 ± 0.02
360	21.65 ± 0.46	0.423 ± 0.01
380	21.06 ± 0.14	0.419 ± 0.00
400	20.10 ± 0.20	0.414 ± 0.01
420	19.77 ± 0.09	0.414 ± 0.02
435	18.66 ± 0.18	0.413 ± 0.00
450	18.13 ± 0.01	0.413 ± 0.01



ภาพที่ 4.5 กราฟปริมาณความชื้นจากการทำ trial and error ของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ

เมื่อเปรียบเทียบภาวะการทำแห้งของวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศที่ทำให้ไฮโดรไลเซตจากถั่วดำมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเท่ากัน พบว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดใช้ระยะเวลาในการทำแห้ง 453 นาที ซึ่งมากกว่าการทำแห้งด้วยสุญญากาศ (380 นาที) และการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (315 นาที) เมื่อทำแห้งในภาวะที่ทำให้ไฮโดรไลเซตมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเป็น 21% โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตใช้ระยะเวลาทำแห้ง (370 นาที) สั้นกว่าการทำแห้งด้วยสุญญากาศ (450 นาที) เมื่อทำแห้งในภาวะที่ทำให้ไฮโดรไลเซตมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเป็น 18% โดยน้ำหนักแห้ง

การทำแห้งไฮโดรไลเซตจนมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเท่ากัน กระบวนการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต จะใช้ระยะเวลาในการทำแห้งสั้นกว่ากระบวนการทำแห้งด้วยสุญญากาศ อาจเนื่องมาจากการทำแห้งด้วยลมร้อนเป็นกระบวนการทำแห้งวัสดุอาหารในตู้อบลมร้อนซึ่งใช้อากาศร้อนเป็นตัวกลางในการให้ความร้อน วัสดุอาหารจึงได้รับความร้อนโดยตรงจากตัวกลางการทำแห้งที่เคลื่อนที่ผ่านวัสดุอาหาร นอกจากนี้ตู้อบลมร้อนมีการติดตั้งพัดลมเพื่อหมุนเวียนอากาศร้อนภายในตู้อบแห้งจึงทำให้วัสดุอาหารได้รับความร้อนอย่างทั่วถึงไม่ว่าจะอยู่บริเวณใดของตู้อบแห้ง ในขณะที่การทำแห้งด้วยสุญญากาศเป็นกระบวนการทำแห้งที่ให้ความร้อนโดยทางอ้อมผ่านผนังซึ่งกั้นระหว่างตัวกลางให้ความร้อนกับวัสดุ วัสดุอาหารจะไม่สัมผัสกับตัวกลางให้ความร้อนโดยตรง แต่อาศัยสุญญากาศในการดึงเอาความชื้นออกไปวัสดุอาหาร (สั๊กมัน เทพหัสดิน ณ อยุธยา, 2555) การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตจึงอาจใช้ระยะเวลาทำแห้งเร็วกว่าการทำแห้งด้วยสุญญากาศ

นอกจากนี้ไฮโดรไลเซตที่นำมาผ่านกระบวนการขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้ง (การเกิดโฟมเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอากาศร้อน โฟมของไฮโดรไลเซตจะได้สัมผัสกับอากาศร้อนโดยตรง) อากาศร้อนจะหมุนเวียนพาความชื้นออกจากผิวของไฮโดรไลเซตตลอดเวลา จึงใช้ระยะเวลาในการทำแห้งที่เร็วกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งที่ไม่มีกระบวนการขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งจะทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำจากภายในตัวอย่างมาระเหยที่ผิวหน้าช้าลงเมื่ออากาศร้อนภายในตู้อบแห้งหมุนเวียนตลอดเวลาส่งผลให้เกิดการระเหยน้ำที่ผิวหน้าจนตัวอย่างเกิดการแข็งแข็ง (case hardening) จึงใช้เวลานานในการลดปริมาณความชื้นในตัวอย่างให้ได้ต่ำที่สุด

4.2.2 สมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

4.2.2.1 ผลของวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

ผลิตผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำด้วยวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศด้วยภาวะการทำแห้งที่ทำให้ไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 18 - 21 % โดยน้ำหนักแห้ง แล้วเก็บผงไฮโดรไลเสตลงในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ขนาด 7 x 5 นิ้ว วางในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปบดให้ละเอียด หลังจากนั้นบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์และซีลปิดปากถุงด้วยเครื่องซีลแบบสุญญากาศเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ

ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระ

ผลการพิจารณาปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.9) พบว่าการทำแห้งที่มีกระบวนการทำให้สารละลายไฮโดรไลเสตจากถั่วดำกลายเป็นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อน และทำแห้งด้วยสุญญากาศสามารถลดความชื้นของผลิตภัณฑ์ได้ต่ำถึง 18% โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การทำแห้งที่ไม่มีกระบวนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อนสามารถลดความชื้นของผลิตภัณฑ์ได้เพียง 21% โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้อาจมาจากวิธีการทำแห้งที่มีการทำให้ไฮโดรไลเสตขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้ง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของตัวอย่างในการสัมผัสกับอากาศร้อนมากขึ้น ทำให้เกิดการเร่งการเคลื่อนที่ของน้ำภายในอาหารมาที่ผิวหน้าได้มากขึ้น (Hardy and Jideani, 2017) นอกจากนี้การทำแห้งที่ไม่มีกระบวนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อน อาจทำให้ไฮโดรไลเสตเกิด case hardening ขึ้นในช่วงท้ายของการทำแห้ง มีผลให้เกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของน้ำภายในตัวอย่างมาที่ผิวหน้า การระเหยน้ำออกจากตัวอย่างจึงทำได้ยากขึ้น ไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดจึงมีปริมาณความชื้นสูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยวิธีอื่น (Ernster et al., 1991) รายงานว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่ผ่านการทำแห้งควรมีปริมาณความชื้นสุดท้ายประมาณ 2 - 8% และสามารถมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นได้ถึง 20% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร จากการพิจารณาปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำหลังการทำแห้ง (ตารางที่ 4.9) พบว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศมีปริมาณน้ำอิสระอยู่ในช่วง 0.412 - 0.417 ค่าปริมาณน้ำอิสระที่เหลืออยู่ในไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ นี้อยู่ในเกณฑ์การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง

ตารางที่ 4.9 ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

วิธีการทำแห้ง	ระยะเวลาทำแห้ง (นาที)	%ปริมาณความชื้น (โดยน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณน้ำอิสระ
การทำแห้งด้วยลมร้อน แบบถาด	453	21.14 ^a ± 0.00	0.427 ^a ± 0.001
การทำแห้งด้วยลมร้อน แบบโฟม-แมต	370	18.35 ^b ± 0.58	0.412 ^b ± 0.001
การทำแห้งด้วย สุญญากาศ	450	21.20 ^a ± 0.00	0.414 ^{ab} ± 0.001
	380	18.15 ^b ± 0.01	0.412 ^b ± 0.001
	380	21.05 ^a ± 0.14	0.413 ^{ab} ± 0.003

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

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน (ตารางที่ 4.10) ซึ่งให้เห็นว่าการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำจากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ ค.9 - ค.10) พบว่าไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยสุญญากาศ และการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต ($p \leq 0.05$) โดยมีการทดลองในทำนองเดียวกัน เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ของไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ จนมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 21% โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของไฮโดรไลเสตในการสัมผัสกับความร้อนมากขึ้น ทำให้มีอัตราการถ่ายเทความร้อนระหว่างตัวอย่างกับอากาศร้อนในตู้อบแห้งมาก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ไวต่อความร้อน จึงทำให้ไฮโดรไลเสตที่นำมาขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อน (การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต) และทำแห้งด้วยสุญญากาศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ต่ำกว่าไฮโดรไลเสตที่ไม่มีกรขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อน การพิจารณาวิธีการทำแห้งไฮโดรไลเสตด้วยวิธีต่าง ๆ จนมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเป็น 18% พบว่าไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่า

ไฮโดรไลเซสที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต เป็นผลมาจากการทำแห้งด้วยสุญญากาศเป็นการทำในภาวะที่มีความดันต่ำเป็นสุญญากาศ จึงสามารถระเหยน้ำในตัวอย่างจนมีปริมาณความชื้นตามที่กำหนดได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่า การทำแห้งด้วยสุญญากาศจึงสามารถรักษาสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ไว้ได้มากกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต

ปริมาณ TCA - soluble peptides

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ TCA - soluble peptides (ตารางที่ 4.10) ชี้ให้เห็นว่าการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ TCA - soluble peptides ของไฮโดรไลเซสจากถั่วดำ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.11) พบว่าไฮโดรไลเซส (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) ที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาดมีปริมาณ TCA - soluble peptides สูงกว่าไฮโดรไลเซสที่ผ่านการทำแห้งด้วยสุญญากาศและการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศมีขั้นตอนการทำให้ไฮโดรไลเซสขึ้นเป็นโฟมก่อน แรงกลจากการตีทำให้เกิดการรวมตัวกันของสายเพปไทด์แล้วเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ ที่สามารถกักเก็บอากาศไว้ได้ เป็นผลให้ไฮโดรไลเซสที่มีขั้นตอนการขึ้นโฟม มีปริมาณ TCA-soluble peptides น้อยกว่าไฮโดรไลเซสที่ไม่มีกระบวนการขึ้นโฟม

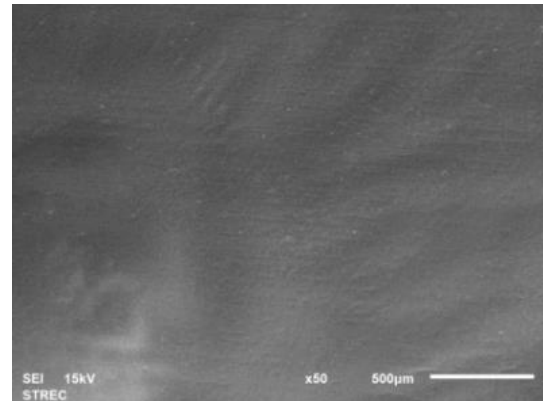
ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และ TCA-soluble peptides ของไฮโดรไลเซสจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

วิธีการทำแห้ง	% ปริมาณความชื้น	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE g ⁻¹ dried sample, db)	ฟลาโวนอยด์ (mg catechin g ⁻¹ dried sample, db)	TCA-soluble peptides (g tyrosine g ⁻¹ dried sample, db)
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบภาด	21	19.08 ^a ± 0.08	0.67 ^a ± 0.04	3.83 ^a ± 0.01
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต	18	15.96 ^c ± 0.05	0.49 ^b ± 0.05	3.06 ^e ± 0.01
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	21	13.14 ^e ± 0.07	0.21 ^c ± 0.06	3.21 ^c ± 0.01
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	18	16.68 ^b ± 0.09	0.56 ^{ab} ± 0.05	3.14 ^d ± 0.00
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	21	14.71 ^d ± 0.05	0.24 ^c ± 0.06	3.49 ^b ± 0.02

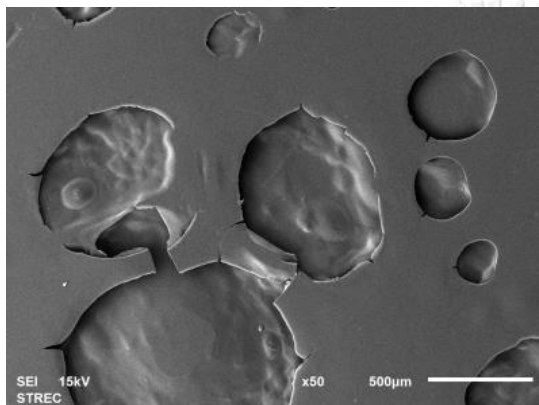
*a,b,c.....ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

โครงสร้างระดับจุลภาค

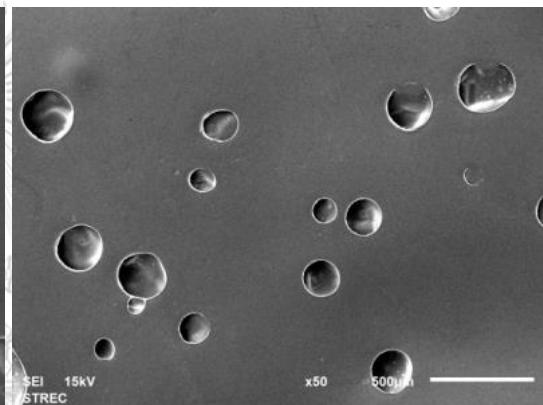
นำผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ มาวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวในระดับจุลภาคของไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า (ภาพที่ 4.6) พบว่าวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันมีผลทำให้ลักษณะพื้นผิวของไฮโดรไลเสตหลังการทำแห้งแตกต่างกัน โดยภาพถ่ายของไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตและทำแห้งด้วยสุญญากาศมีลักษณะพื้นผิวที่มีความเป็นรูพรุนเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะพื้นผิวของไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด เนื่องจากการเกิดฟองอากาศเล็ก ๆ ที่ถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มบาง ๆ จากของเหลวในขั้นตอนการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้ง ส่งผลให้ไฮโดรไลเสตหลังการทำแห้งมีลักษณะพื้นผิวที่มีความเป็นรูพรุน ความเป็นรูพรุนที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารละลายยังคงเป็นโฟมที่คงตัวตลอดการอบแห้ง ไฮโดรไลเสตที่ขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 18%) มีลักษณะพื้นผิวที่มีขนาดของความเป็นรูพรุนเล็กกว่า แต่มีความสม่ำเสมอมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสตที่นำไปขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (ความชื้น 18%) เนื่องจากการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ อาศัยหลักการของการนำความร้อนในการถ่ายเทความร้อนจากตัวกลางให้ความร้อนไปยังตัวอย่าง ทำให้ตัวกลางการให้ความร้อนของเครื่องทำแห้งไม่ได้สัมผัสกับตัวอย่างโดยตรง ส่งผลให้โครงสร้างฟองอากาศที่เกิดขึ้นถูกทำลายน้อยกว่าการทำแห้งด้วยลมร้อน นอกจากนี้การลดความดันภายในตู้อบแห้งลงจนเป็นสุญญากาศ จะทำให้ความชื้นที่แทรกตัวอยู่ระหว่างฟองอากาศสามารถระเหยออกได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าความดันบรรยากาศปกติ โครงสร้างของโฟมจึงถูกทำลายได้น้อยลง ในขณะที่ไฮโดรไลเสตที่นำไปขึ้นโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 21%) มีลักษณะพื้นผิวที่คล้ายกับการยุบตัวของโครงสร้างโฟม เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสตที่ขึ้นโฟมก่อนทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตที่มีลักษณะมีรูพรุนของฟองอากาศในโครงสร้าง เนื่องจากไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการดูดความชื้นจากบรรยากาศได้ดี การดูดความชื้นของไฮโดรไลเสตจะทำให้โครงสร้างโฟมไม่แข็งแรง เกิดการยุบตัวลง นอกจากนี้ขนาดของความเป็นรูพรุนของไฮโดรไลเสตยังขึ้นอยู่กับภาวะการทำแห้งด้วย เมื่อพิจารณาภาพถ่ายของไฮโดรไลเสตที่มีขั้นตอนการขึ้นโฟมก่อนทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟมแมตพบว่าไฮโดรไลเสต (ความชื้น 18%) มีขนาดของความเป็นรูพรุนใหญ่กว่าไฮโดรไลเสต (ความชื้น 21%) เนื่องจากการทำแห้งที่ใช้ระยะเวลาสั้น ทำให้อากาศร้อนพาความชื้นที่อยู่ล้อมรอบโครงสร้างโฟมออกไปมากขึ้น ผนังของโฟมจึงบางลงจนอาจทำให้แตกรวมเป็นกลุ่มเดียวกัน จึงมองเห็นภาพลักษณะพื้นผิวของไฮโดรไลเสตมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่า



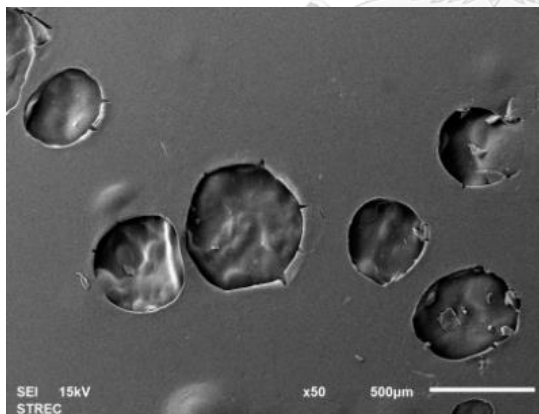
(ก)



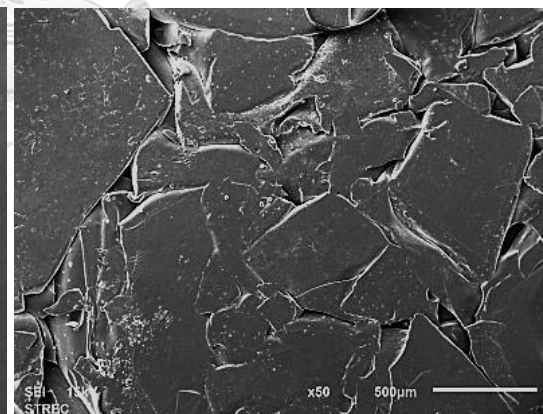
(ข)



(ค)



(ง)

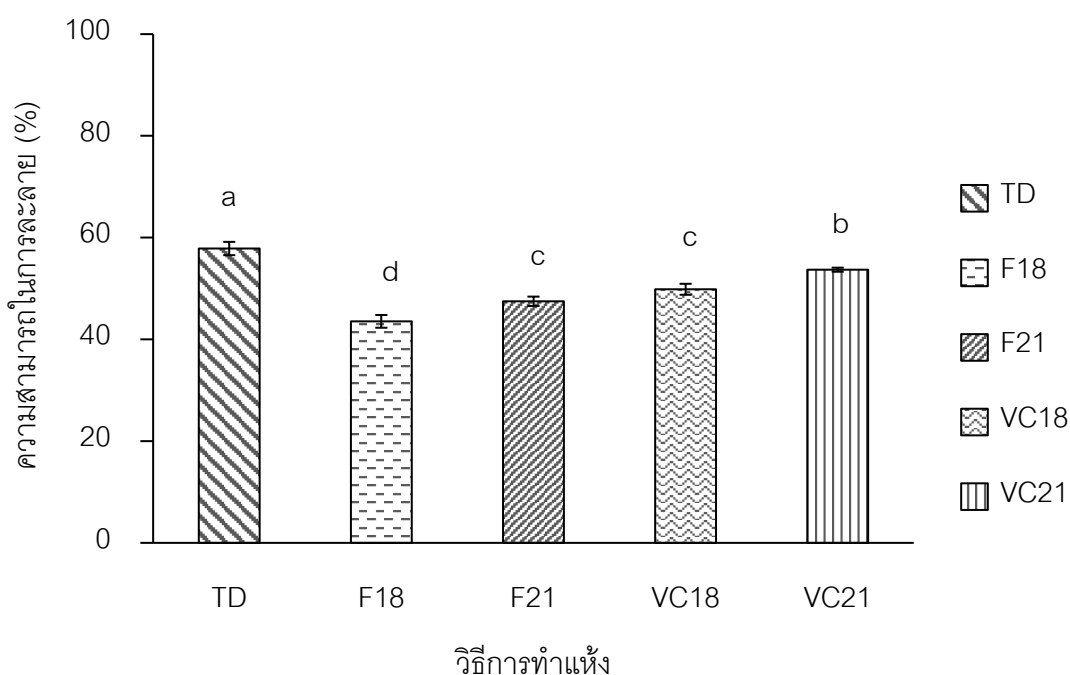


(จ)

ภาพที่ 4.6 ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 50 เท่า ของผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ (ก) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) (ข) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (ความชื้น 18% โดยน้ำหนักแห้ง) (ค) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) (ง) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 18% โดยน้ำหนักแห้ง) และ (จ) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง)

4.2.2.2 ผลของวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ

สมบัติการละลายเป็นสมบัติที่มีความสำคัญในการเลือกไฮโดรไลเซตไปประยุกต์ใช้ในอาหารชนิดต่าง ๆ เนื่องจากความสามารถในการละลายของโปรตีนมีอิทธิพลต่อสมบัติด้านอื่นของอาหาร หากโปรตีนละลายได้น้อยหรือมีอันตรกิริยากับโมเลกุลน้ำต่ำจะมีผลต่อการจำกัดการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร



ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการละลายของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ เมื่อไฮโดรไลเซตที่ (TD) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด (ความชื้น 21%) (F18) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (ความชื้น 18%) (F21) ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต (ความชื้น 21%) (VC18) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 18%) และ (VC21) ทำแห้งด้วยสุญญากาศ (ความชื้น 21%)

จากการพิจารณาผลของวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการละลายของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ pH 6 (ภาพที่ 4.7) และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.12) พบว่าไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยลมร้อน (ความชื้น 21% โดยน้ำหนักแห้ง) มีความสามารถในการละลายสูงกว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศและทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการทำแห้งด้วยสุญญากาศและการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตมีขั้นตอนการทำให้ไฮโดรไลเซตขึ้นเป็นโฟมที่คงตัวด้วยการใช้ CMC เป็นสาร

ให้ความคงตัว โดย CMC เป็นพอลิแซ็กคาไรด์กัมชนิดประจุลบที่สามารถเกิด electrostatic interaction กับโปรตีนได้ เมื่อสารละลายมีค่า pH (pH = 6) สูงกว่าค่า pI (pH 4 - 5) ของโปรตีน แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต (Azarikia and Abbasi, 2016) เมื่อนำมาทำแห้งทำให้ไฮโดรไลเซตที่มีขั้นตอนการขึ้นโฟมละลายน้ำได้ดีกว่าไฮโดรไลเซตที่ไม่มีขั้นตอนการขึ้นโฟม Liu และคณะ (2010) รายงานว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนไอโซเลทจากถั่วกับพอลิแซ็กคาไรด์กัมชนิดกัมอะราบิกมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มี pH ต่ำเป็นกรด

4.2.2.3 ผลของวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ

ผลิตผงไฮโดรไลเซตจากถั่วดำด้วยวิธีการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และการทำแห้งด้วยสุญญากาศในภาวะการทำแห้งที่ทำให้ไฮโดรไลเซตมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีวิเคราะห์ที่หลากหลายผ่านกลไกต่าง ๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่เป็นผลมาจากการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity, Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) แสดงดังตารางที่ 4.11 และ Metal-chelating แสดงดังตารางที่ 4.12

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity (ตารางที่ 4.11) พบว่าวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.13) พบว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity สูงกว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต และทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด ($p \leq 0.05$) การพิจารณาวิธีการทำแห้งที่ทำในภาวะที่ทำให้ไฮโดรไลเซตมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 18% โดยน้ำหนักแห้ง พบว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity สูงกว่า

ไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต เป็นผลมาจากการทำแห้งด้วยสุญญากาศจะทำให้ไฮโดรไลเซตที่มีความดันต่ำเป็นสุญญากาศ การระเหยของน้ำที่ผิวของไฮโดรไลเซตจึงทำได้ในภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าความดันบรรยากาศ ทำให้ไฮโดรไลเซตสัมผัสกับความร้อนในระยะเวลาที่สั้น จึงสามารถรักษาสารประกอบที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระของ DPPH ได้มากกว่าการทำแห้งด้วยวิธีอื่น

Kayacan และคณะ (2018) รายงานผลของการทำแห้งด้วยสุญญากาศ และทำแห้งด้วยลมร้อนต่อปริมาณสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเกสรดอกไม้ที่ได้จากผึ้ง (bee pollen) โดย bee pollen ที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์สูงกว่า bee pollen ที่ทำแห้งด้วยลมร้อน อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของ bee pollen ที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศไม่แตกต่างจาก bee pollen ที่ทำแห้งด้วยลมร้อน ($p > 0.05$) นอกจากนี้การพิจารณาวิธีการทำแห้งที่ทำในภาวะที่ทำให้ไฮโดรไลเซตมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 21% โดยน้ำหนักแห้ง พบว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity สูงกว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ และการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต เนื่องจากการนำไฮโดรไลเซตที่มีลักษณะชื้นหนืดและมีปริมาณน้ำตาลสูงมาทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด ทำให้น้ำภายในไฮโดรไลเซตเคลื่อนที่มาที่ผิวหน้าได้ช้า การทำแห้งด้วยวิธีนี้จึงใช้ระยะเวลาในการระเหยน้ำออกจากไฮโดรไลเซตนาน ตัวอย่างจึงสัมผัสกับความร้อนนานขึ้น อาจส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ในระหว่างการทำแห้ง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ DPPH ได้ (Echavarria et al., 2012)

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารที่มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเพอร์ออกซิลสังเคราะห์ ซึ่งติดตามจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร Fluorescent ที่เปลี่ยนแปลงไป ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC (ตารางที่ 4.11) ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย ORAC ของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

(ตารางที่ ค.14) พบว่าไฮโดรไลเซสที่ผ่านการทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับไฮโดรไลเซสที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดและแบบฟอม-แมต ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซสที่ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งทั้งสามวิธีมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระสังเคราะห์เพอร์ออกซิลในระบบที่สร้างขึ้นจาก AAPH ได้ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ORAC และ FRAP ของไฮโดรไลเซสจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

วิธีการทำแห้ง	%ปริมาณ ความชื้น	ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ dried sample, db.)		
		DPPH radical scavenging activity	ORAC ^{ns}	FRAP
การทำแห้งด้วย ลมร้อนแบบถาด	21	$13.37^c \pm 0.08$	274.88 ± 33.40	$20.99^a \pm 0.06$
การทำแห้งด้วยลม ร้อนแบบฟอม-แมต	18	$13.67^b \pm 0.04$	252.92 ± 26.88	$17.42^c \pm 0.06$
การทำแห้งด้วย สุญญากาศ	21	$12.22^e \pm 0.01$	229.29 ± 22.61	$15.61^e \pm 0.08$
การทำแห้งด้วย	18	$14.17^a \pm 0.06$	263.49 ± 26.99	$18.28^b \pm 0.08$
สุญญากาศ	21	$12.48^d \pm 0.07$	275.38 ± 40.38	$16.11^d \pm 0.05$

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

ns ข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.11) ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP ของไฮโดรไลเซสจากถั่วดำ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.15) พบว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดทำให้ไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย FRAP สูงกว่าการทำแห้งด้วยสุญญากาศและการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบฟอม-แมต ($p \leq 0.05$) โดยมีผลการทดลองในทำนองเดียวกันเมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP ของไฮโดรไลเซสที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ จนมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 21% โดยน้ำหนักแห้ง

ทั้งนี้ไฮโดรไลเซสที่มีลักษณะขุ่นหนืดและมีปริมาณน้ำตาลสูงเมื่อนำมาทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด มีผลให้การเคลื่อนที่ของน้ำภายในไฮโดรไลเซสขึ้นมาที่ผิวหน้าช้า จึงทำให้ไฮโดรไลเซสใช้ระยะเวลาในการทำแห้งนาน อาจส่งผลให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในระหว่างการทำแห้ง โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีสมบัติในการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ได้ โดย Oh และคณะ (2013) รายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซส จากโปรตีนเข้มข้นจากเวย์มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ เมื่อพิจารณาวิธีการทำแห้งที่ทำแห้งด้วยภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้นสุดท้าย 18% โดยน้ำหนักแห้ง พบว่าไฮโดรไลเซสที่ผ่านการทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ FRAP สูงกว่าไฮโดรไลเซสที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการทำแห้งด้วยสุญญากาศเป็นการทำแห้งในภาวะที่มีความดันต่ำกว่าความดันบรรยากาศ จึงใช้ระยะเวลาในการระเหยน้ำออกจนผลิตภัณฑ์มีความชื้นตามที่กำหนดสั้นกว่ากระบวนการทำแห้งด้วยวิธีอื่น ผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งด้วยวิธีนี้จึงสัมผัสกับความร้อนในระยะเวลาสั้น จึงสามารถรักษาสารสำคัญที่ไวต่อความร้อนที่มีสมบัติในการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีหมู่ไซข้างเป็นวงอะโรแมติก (ทริปโทเฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน) และสารประกอบฟีนอลิก (กรดแกลลิก กรดวานิลิก และกรดคลอโรจีนิก) ไว้ได้มากกว่าวิธีการทำแห้งอื่น

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ของ Naknaen และคณะ (2016) ที่รายงานว่าการทำแห้งที่แตกต่างกันส่งผลให้กล้วยฝงอบแห้งมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันแตกต่างกัน โดยกล้วยที่มีการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยสุญญากาศมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP สูงกว่ากล้วยที่มีการทำให้เกิดโฟมก่อนนำไปทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.12) ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการทำแห้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating ของไฮโดรไลเซสจากถั่วดำ การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดทำให้ไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating สูงกว่าไฮโดรไลเซสที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ และทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากการทำแห้งด้วยสุญญากาศ และการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตมีขั้นตอนการขึ้นโฟม ไฮโดรไลเซสจึงมีโครงสร้างที่มีความ

เป็นรูปพุนและมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับความร้อนเพิ่มมากขึ้น ทำให้สูญเสียสารสำคัญที่ไวต่อความร้อนมากขึ้น เช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรแมติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ หมู่ฟังก์ชันที่เกาะอยู่บนวงเบนซีนมีความสามารถในการคีเลตโลหะที่มีประจุบวกได้ (Wang et al., 2009) จึงทำให้ไฮโดรไลเซตที่ผ่านการขึ้นโฟมก่อนการทำแห้งจะมีความสามารถในการคีเลตโลหะ Fe^{2+} น้อยกว่าไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการขึ้นโฟมก่อนการทำแห้ง อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ ค.16) พบว่าการทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดทำให้ไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating สูงกว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศ และทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมตไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดมีความสามารถในการคีเลต Fe^{2+} ในระบบไม่แตกต่างจากไฮโดรไลเซตที่ทำแห้งด้วยวิธีอื่น

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วย Metal-chelating ของไฮโดรไลเซตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างกัน

วิธีการทำแห้ง	%ปริมาณความชื้น	Metal-chelating ^{ns} ($\mu\text{M EDTA g}^{-1}$ dried sample, db.)
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด	21	11.54 ± 0.04
การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโฟม-แมต	18	10.48 ± 0.17
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	21	10.65 ± 1.10
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	18	11.19 ± 0.06
การทำแห้งด้วยสุญญากาศ	21	11.28 ± 0.04

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

ns ข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® และระยะเวลาย่อยที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มค่าระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ การเพิ่มค่าระดับการย่อยส่งผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity และ FRAP ของไฮโดรไลเสต ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและสารประกอบฟีนอลิกที่ปลดปล่อยออกจาก protein-bound polyphenols เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) สมการของผลตอบสนองต่าง ๆ มีความเหมาะสมในการทำนายค่าของตัวแปรอิสระให้มีความสัมพันธ์กับค่าผลตอบสนองที่ต้องการ 87.17 - 95.57% ภาวะการผลิตที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ 6.09 % (w/w) และระยะเวลาย่อย 360 นาที เป็นภาวะเหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายจากสมการสำหรับการผลิตไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง โดยค่าผลตอบสนองที่ได้จากการทำนายจากสมการมีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วง 0.54 - 27.46%

นำไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ผลิตในภาวะที่คัดเลือกได้มาผ่านการทำแห้งด้วยวิธีทำแห้ง 3 วิธีที่อุณหภูมิ 60°C จนทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดทำให้ไฮโดรไลเสต (21% โดยน้ำหนักแห้ง) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ TCA-soluble peptides ความสามารถในการละลาย และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging activity FRAP Metal-chelating และ ORAC) สูงกว่าไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งด้วยสุญญากาศและทำแห้งด้วยลมร้อนแบบโพน-แมต ($p \leq 0.05$) การทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาดในภาวะที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และระยะเวลาทำแห้ง 453 นาที เป็นวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผงไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าระดับการย่อยเป็นผลตอบสนองที่สำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ดังนั้นควรทำการศึกษาชนิดของกรดอะมิโน ชนิดและลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของไฮโดรไลเสต เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

บรรณานุกรม

- นันทวรรณ สโรบล. (2547). ยกร่างแผนยุทธศาสตร์ถั่วเขียวปี 2547-2551. การประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 9.
- นิตยา รัตนานนท์. (2557). เคมีอาหาร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- สั๊กมณ เทพหัสดิน ณ อยุธยา. (2535). การอบแห้งอาหารและวัสดุชีวภาพ. กรุงเทพฯ: ท้อป.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2535). การศึกษาภาวะการผลิตและการตลาดถั่วเขียวรอบทศวรรษ. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Adebowale, K. O., & Lawal, O. S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 83(2), 237-246.
- Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500-506.
- Alder-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., & Zhou, H. M. (2013). Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *International Food Research Journal*, 20(5), 2081-2090.
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytic Chemists International*. Gaithersburg, Md: AOAC International.
- Auisakchaiyoung, T., & Rojanakorn, T. (2015). Effect of foam-mat drying conditions on quality of dried Gac fruit (*Momordica cochinchinensis*) aril. *International Food Research Journal*, 22(5), 2025-2031.
- Azarikia, F., & Abbasi, S. (2016). Mechanism of soluble complex formation of milk proteins with native gums (tragacanth and Persian gum). *Food Hydrocolloids*, 59, 35-44.

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76.
- Betancur-Ancona, D., Peraza-Mercado, G., Moguel-Ordonez, Y., & Fuertes-Blanco, S. (2009). Physicochemical characterization of Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformes*) fibrous residues. *Food Chemistry*, 84(2), 287-295.
- Caparino, O., Tang, J., Nindo, C., Sablani, S., Powers, J., & Fellman, J. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 135-148.
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 67(3), 269-274.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144-148.
- Damodaran, S., & Paraf, A. (1997). *Food Protein and Their Applications*. NY: Marcel Dekker.
- del Mar Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 9-15.
- Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2012). Melanoidins Formed by Maillard Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 203-223.
- Elavarasan, K., Shamasundar, B. A., Badii, F., & Howell, N. (2016). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Food Chemistry*, 206, 210-216.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.

- Erbay, Z., & Icier, F. (2010). A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling, and Experimental Results. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 441-464.
- Ernster, J. H., Palos, R., & Calif, V. (1991). Hydrolyzed soy protein and process for preparing soy protein. *US Patent No. 5,077,06*.
- Evangelho, J. A. D., Berrios, J. J., Pinto, V. Z., Dias, A. R. G., Vanier, N. L., & Zavareze, E. D. R. (2016). Antioxidant activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36, 23-27.
- Garcia-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319-332.
- Gupta, K., & Alam, M. (2014). Modeling of thin layer drying kinetics of grape juice concentrate and quality assessment of developed grape leather. *Agricultural Engineering International*, 16(2), 196-207.
- Hardy, Z., & Jideani, V. A. (2017). Foam-mat Drying Technology: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2560-2572.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178-184.
- James, M. J., Martin, J. L., & David, A. G. (2005). *Modern Food Microbiology*: Springer US.
- Joglekar, A. M., & May, A. T. (1991). Product Excellence through Experimental Design. *Cereal Foods World*, 32, 211-230.
- Kadam, D. M., Wilson, R. A., Kaur, S., & Manisha. (2012). Influence of Foam Mat Drying on Quality of Tomato Powder. *International Journal of Food Properties*, 15(1), 211-220.

- Kayacan, S., Sagdic, O., & Doymaz, I. (2018). Effects of hot-air and vacuum drying on drying kinetics, bioactive compounds and color of bee pollen. *Food Measure*, 12(2), 1274-1283.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides Leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102:1317-1327.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81.
- Lee, S. T., Panter, K. E., Pfister, J. A., Gardner, D. R., & Welch, K. D. (2008). The effect of body condition on serum concentrations of two teratogenic alkaloids (anagryrine and ammodendrine) from lupines (*Lupinus* species) that cause crooked calf disease. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 86(10), 2771-2778.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102(4), 1135-1143.
- Liu, S., Elmer, C., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate-gum Arabic complexes. *Food Research International*, 43(2), 489-495.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76, 39-50.
- Mc Ewen, T. J., Dronzek, B. L., & Bushuk, W. (1974). A scanning electron microscope study of faba bean seed. *Cereal Chemistry*, 51, 750-757.

- Mune, M. A. M., & Sogi, D. S. (2016). Emulsifying and Foaming Properties of Protein Concentrates Prepared from Cowpea and Bambara Bean Using Different Drying Methods. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 371-384.
- Naknaen, P., Charoenthaikij, P., & Kerdsup, P. (2016). Physicochemical Properties and Nutritional Compositions of Foamed Banana Powders (Pisang Awak, *Musa sapientum* L.) Dehydrated by Various Drying Methods. *Walailak Journal of Science and Technology*, 13(3), 177-191.
- Naveen Kumar, M., Edukondalu, L., Ambedkar, M., & Srinvas, Y. (2016). A Comparative Study on Drying Kinetics of Tomato Pulp and Tomato Foam. *International Journal of Agriculture Sciences*, 8(33), 1693-1696.
- Nótin, B. (2011). Changes of phenolic compounds in black currant during vacuum drying process. *Acta alimentaria*, 40, 120-129.
- Nwokolo, E., & Smartt, J. (1996). Food and Feed from Legumes and Oilseeds.
- Oh, N. S., Lee, H. A., Lee, J. Y., Joung, J. Y., Lee, K. B., Kim, Y., & Kim, S. H. (2013). The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4899-4911.
- Pernollet, J. C., & Mossé, J. (1983). *Structure and location of legume and cereal seed storage protein*. London: Academic Press.
- Rachie, K. O., & Roberts, L. M. (1974). Grain Legumes of the Lowland Tropics. In N. C. Brady (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 26, pp. 1-132): Academic Press.
- Rajkumar, P., Kailappan, R., Viswanathan, R., Raghavan, G. S. V., & Ratti, C. (2007). Foam Mat Drying of Alphonso Mango Pulp. *Drying Technology*, 25(2), 357-365.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Salunkhe, D. K., & Kadam, S. S. (1989). *Handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology, and utilization*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Sangsukiam, T., & Duangmal, K. (2017). A comparative study of physico-chemical properties and antioxidant activity of freeze-dried mung bean (*Vigna radiata*) and

- adzuki bean (*Vigna angularis*) sprout hydrolysate powders. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 1971-1982.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G. d., Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36, 375-381.
- Sonklin, C., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2011). Physicochemical and Flavor Characteristics of Flavoring Agent from Mungbean Protein Hydrolyzed by Bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8475-8483.
- Sritongtae, B., Morgan, M. R. A., & Duangmal, K. (2017). Drying kinetics, physico-chemical properties, antioxidant activity and phenolic composition of foam-mat dried germinated rice bean (*Vigna umbellata*) hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 1710-1721.
- Sritongtae, B., Sangsukiam, T., Morgan, M. R. A., & Duangmal, K. (2017). Effect of acid pretreatment and the germination period on the composition and antioxidant activity of rice bean (*Vigna umbellata*). *Food Chemistry*, 227, 280-288.
- Tavares, T. G., Monteiro, K. M., Possenti, A., Pintado, M. E., Carvalho, J. E., & Malcata, F. X. (2011). Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, 21(12), 934-939.
- Thuwapanichayanan, R., Prachayawarakorn, S., & Soponronnarit, S. (2008). Drying characteristics and quality of banana foam mat. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 573-583.
- Van der Wilden, W., Herman, E. M., & Chrispeels, M. J. (1980). Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(1), 428-432.

- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 848-854.
- Wani, S. M., Jan, N., Wani, T. A., Ahmad, M., Masoodi, F. A., & Gani, A. (2017). Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 119-126.
- Waterhouse, A. L. (2005). Polyphenolics. In R. E. Wrolstad, E. A. Terry, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith, & P. Sporns (Eds.), *Handbook of Food Analytical Chemistry* (pp. 461–470). London: John Wiley and Sons.
- Wijewickreme, A. N., Kitts, D. D., & Durance, T. D. (1997). Reaction Conditions Influence the Elementary Composition and Metal Chelating Affinity of Nondialyzable Model Maillard Reaction Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4577-4583.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2009). Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4754-4764.
- Ye, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J., & Cai, T. (2018). Preparation and Characterization of Antioxidant Peptides from Carrot Seed Protein. *Journal of Food Quality*, 2018, 9.
- Yust Mdel, M., Millan-Linares, M. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millan, F., & Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1994-2001.

- Zha, F., Wei, B., Chen, S., Dong, S., Zeng, M., & Liu, Z. (2015). The Maillard reaction of a shrimp by-product protein hydrolysate: chemical changes and inhibiting effects of reactive oxygen species in human HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 6(6), 1919-1927.
- Zhang, Y. J., Li, Q., Zhang, Y. X., Wang, D., & Xing, J. M. (2012). Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(2), 103-110.
- Zhidong, L., Benheng, G., Xuezhong, C., Zhenmin, L., Yun, D., Hongliang, H., & Wen, R. (2013). Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 52, 53-65.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

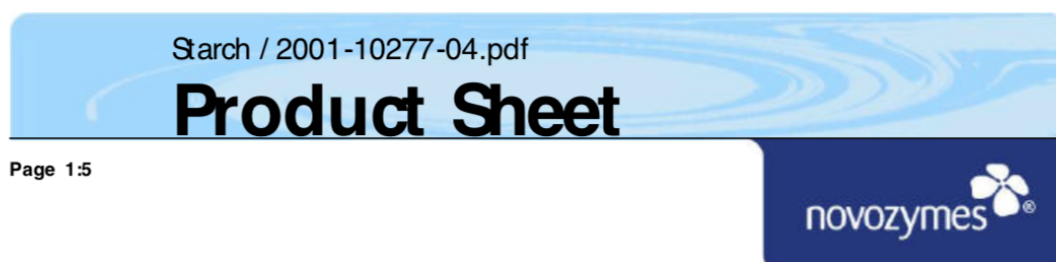


ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
รายละเอียดของเอนไซม์

ก.1 เอนไซม์ Alpha-amylase BAN[®] 480L



BAN[®] 480 L

Description

BAN 480 L - Bacterial Amylase Novo - is an alpha-amylase produced by submerged fermentation of a selected strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. The systematic name is 1,4-alpha-D-glucan glucono-hydrolase (EC 3.2.1.1).

Product Properties

Appearance

BAN 480 L is a brown liquid with a density of approx. 1.2 g/ml.

Product types

BAN 480 L is available with a standard strength of 480 KNU/g. See the Analytical Method for further information.

Food-grade status

BAN 480 L complies with FAO/WHO JECFA and FCC recommended purity specifications.

Standard Packaging

See the standard Packaging List for more packaging information.

Application

BAN 480 L is an endo-amylase. It hydrolyzes 1,4-alpha-glucosidic linkages in amylose and amylopectin at random, which results in a rapid reduction of the viscosity of gelatinized starch. The breakdown products are dextrans of differing chain lengths, and oligosaccharides. BAN 480 L is a conventional alpha-amylase operating in the relatively high temperature range of 70-90°C (158-194°F).

ก.2 เอนไซม์ Flavourzyme® 500MG

Special Food / 2001-08282-04.pdf

Product Sheet

Page 1:3

**Flavourzyme™****Description**

Flavourzyme is a fungal protease/peptidase complex produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae* which has not been genetically modified, and it contains both endoprotease and exopeptidase activities.

The optimal pH for the enzyme complex is in the range of 5.0-7.0. The optimal pH for the exopeptidase is approx. 7.0, as determined by application trials. The optimal pH for debittering is also approx. 7.0.

The optimal temperature for the enzyme complex as well as for the exopeptidase is around 50°C (122°F).

Product Properties**Product Type**

Flavourzyme is available as Flavourzyme 500 L, a liquid product, and Flavourzyme 500 MG, a brown, free-flowing, non-dusting microgranulate granulated on NaCl. The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength.

Activity

Flavourzyme is standardized in Leucine Amino Peptidase Units per gram (LAPU/g).

Flavourzyme 500 MG.....Declared activity: 500 LAPU/g

Flavourzyme 500 L.....Declared activity: 500 LAPU/g

One LAPU is the amount of enzyme which hydrolyzes 1 µmol of L-leucine-p-nitroanilide per minute. See the Analytical Method for further information.

Solubility

Flavourzyme 500 MG and Flavourzyme 500 L are both readily soluble in water.

Food-grade status

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes issued by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC).

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu ดัดแปลงวิธีของ Waterhouse (2005)

สารเคมี

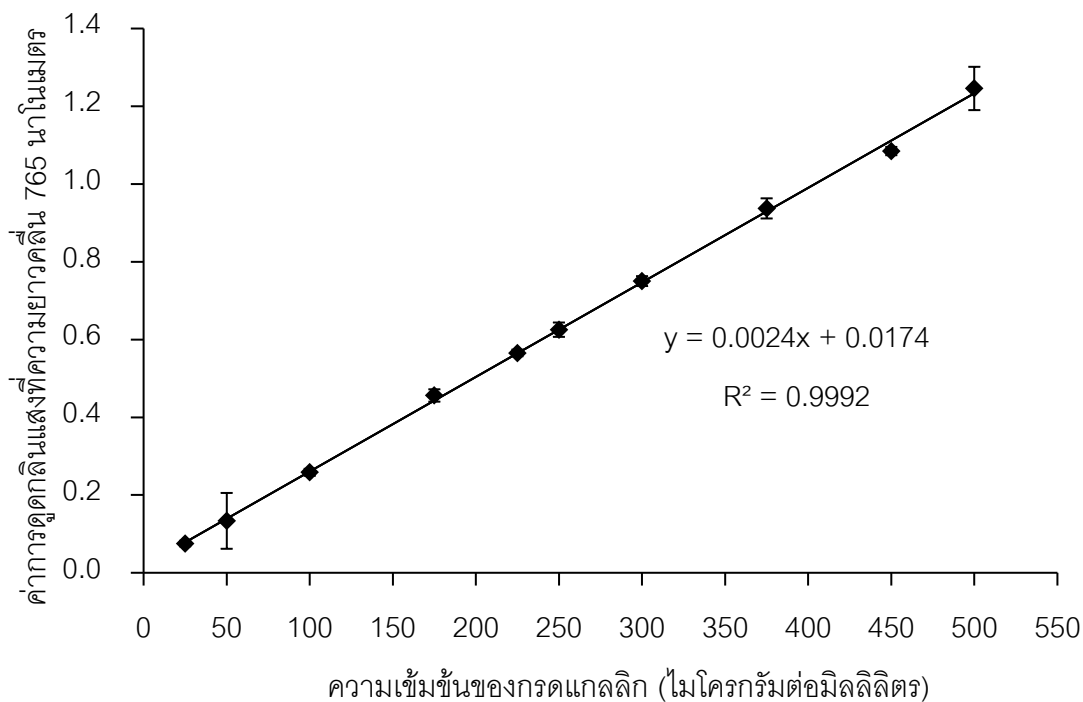
1. เมทานอล
2. โซเดียมคาร์บอเนต
3. Folin-Ciocalteu reagent
4. กรดแกลลิก (Gallic acid)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 200 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

1. ละลายกรดแกลลิก 0.5 กรัม ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกปริมาตร 0.5, 1.0, 2.0, 3.5, 4.5, 5.0, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายกรดแกลลิกที่ได้จะมีความเข้มข้น 25, 50, 100, 175, 225, 250, 300, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
3. ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกในแต่ละความเข้มข้น 200 ไมโครลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์)
4. ปิเปตน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 2 นอร์มัล 500 ไมโครลิตร ตามลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 นาที
5. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสง แสดงดังภาพที่ ข.1



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.2 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ตามวิธีของ Sritongtae และคณะ (2017)

สารเคมี

1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
2. เมทานอล
3. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox)

การเตรียมสารละลาย

เตรียมสารละลาย DPPH 0.15 มิลลิโมลาร์ ละลาย DPPH 0.008 กรัม ในเมทานอล ความเข้มข้น 80% แล้วปรับสารละลายทั้งหมดด้วยเมทานอลเป็น 50 มิลลิลิตร

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox

1. ละลาย Trolox ในเมทานอล โดยสารละลาย Trolox มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครโมลต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

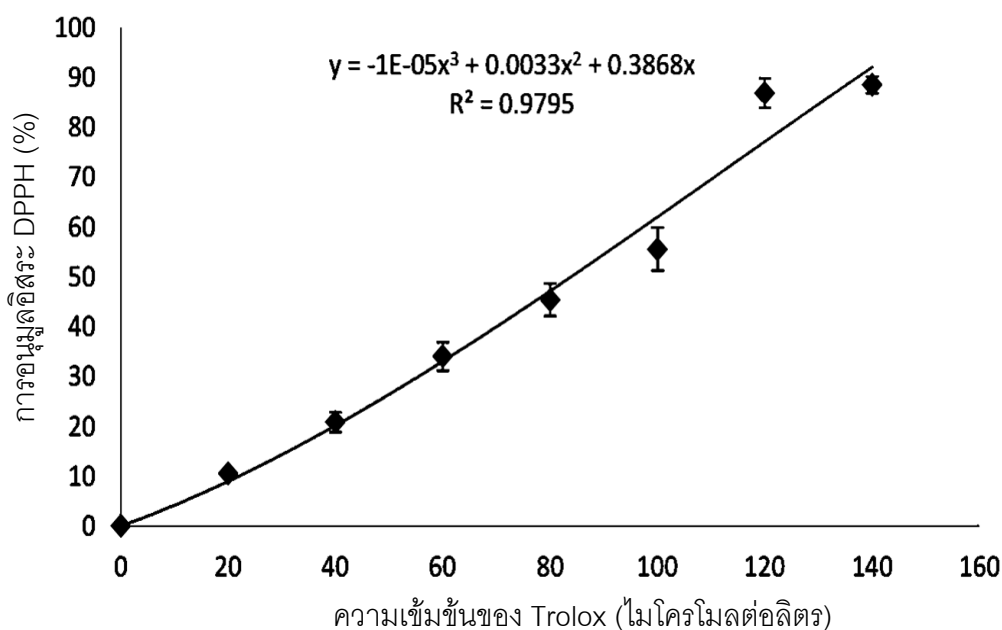
2. ปิเปตสารละลาย Trolox ในแต่ละความเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณ DPPH radical scavenging activity (%) ดังสมการที่ 1 แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Trolox และค่า %DPPH inhibition (ภาพที่ ข.2)

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Trolox



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.3 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ FRAP โดยดัดแปลงวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

สารเคมี

1. กรดอะซีติก

2. โซเดียมอะซีเตต
3. เพอริกคลอไรด์
4. กรดไฮโดรคลอริก
5. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ละลายโซเดียมอะซีเตต 40.824 กรัม ในน้ำ 700 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ของสารละลายเป็น 3.6 ด้วยกรดอะซีติกเข้มข้น 99.8% แล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายเพอริกคลอไรด์ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ละลายเพอริกคลอไรด์ 0.3244 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็น 10 มิลลิลิตร

5. สารละลาย FRAP (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตต 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเพอริกคลอไรด์ 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย TPTZ 2.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

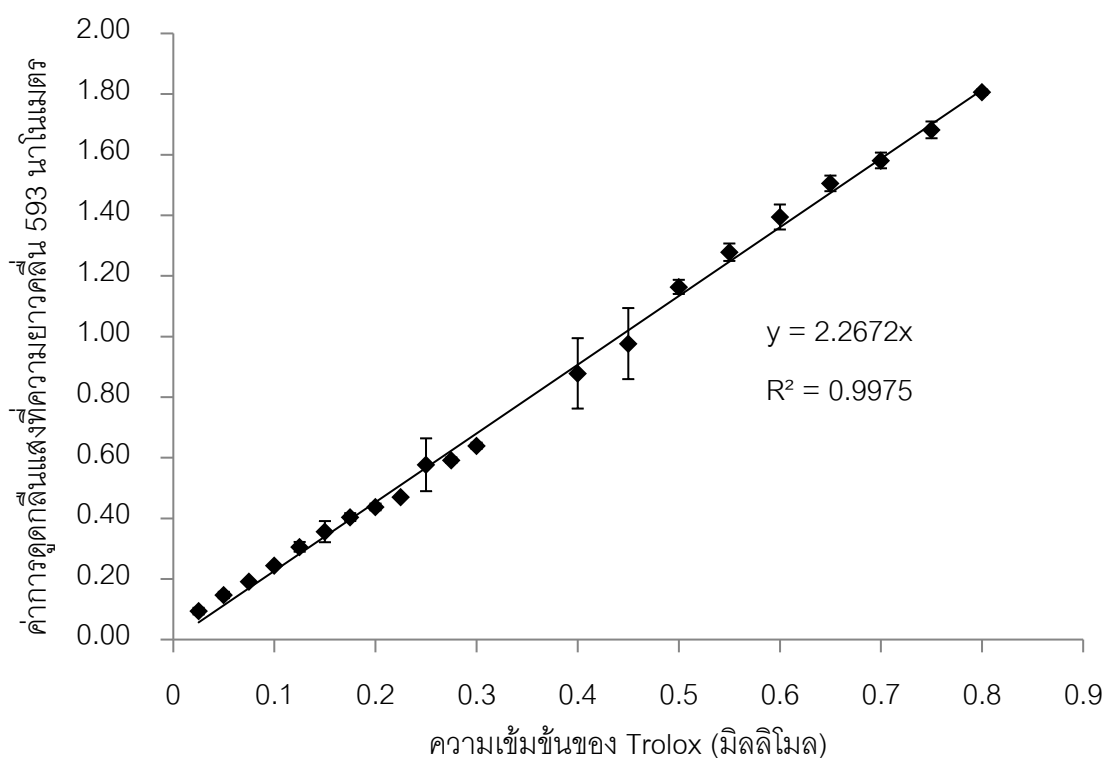
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox

1. ละลาย Trolox 0.025 กรัม ในเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย Trolox ปริมาตร 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 และ 3.00 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร สารละลาย Trolox มีความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 และ 3.00 มิลลิโมล ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ FRAP

3. ปิเปตสารละลาย FRAP 1900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox ในแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร ตามลงไป ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Trolox และค่าการดูดกลืนแสง แสดงดังภาพที่ ข.3



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วย FRAP

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2016)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนัก 2 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมเยื่อสำหรับหาความชื้นที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน
2. นำตัวอย่างเข้าอบแห้งในตู้อบลมร้อน โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 105 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่
3. นำตัวอย่างออกจากตู้อบและทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ทำการทดลองซ้ำ 2 และ 3 จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่
4. คำนวณหาปริมาณความชื้นโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}} \times 100$$

ข.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์
2. โซเดียมคาร์บอเนต
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต
4. คอปเปอร์ซัลเฟต
5. Folin-Ciocalteu reagent
6. Bovine serum albumin (BSA)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายรีเอเจนต์ A สารละลายผสมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

2. สารละลายรีเอเจนต์ B สารละลายผสมของคอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 0.5% ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเข้มข้น 1% ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายรีเอเจนต์ C (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ผสมรีเอเจนต์ A และรีเอเจนต์ B อัตราส่วน 1:50

4. สารละลาย D (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ผสม Folin-Ciocalteu reagent กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่ที่ไม่มีแสง

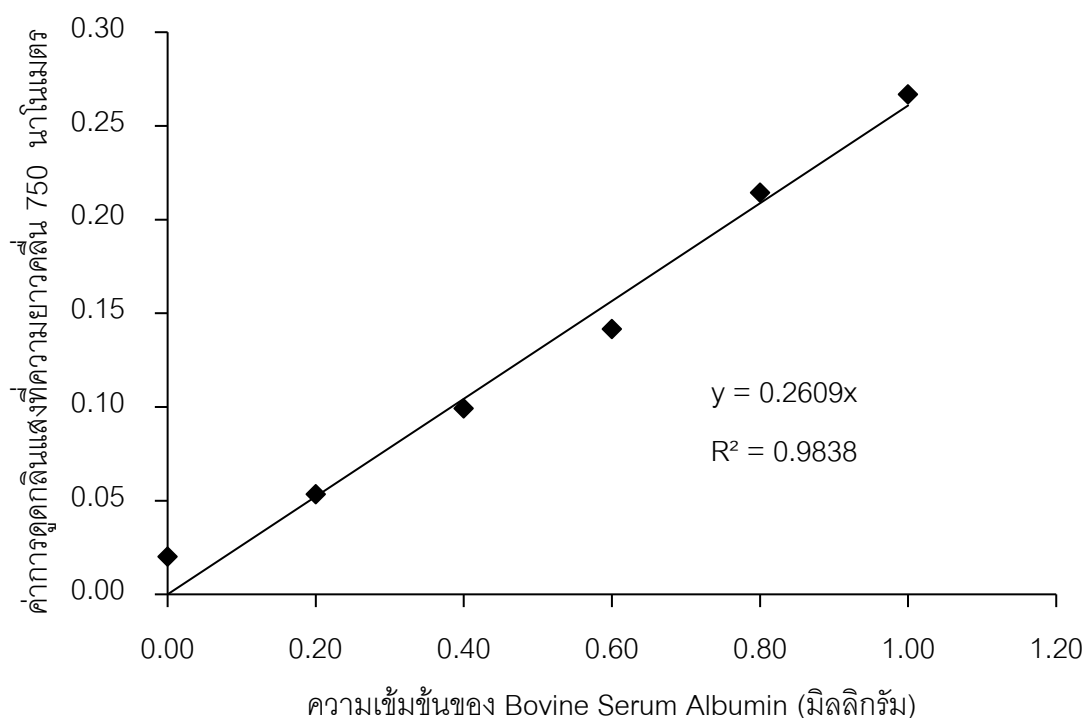
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

1. ละลาย BSA 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร (สารละลาย BSA มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร)

2. ปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร สารละลาย BSA มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3. ปิเปตสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้น 200 ไมโครลิตร ลงใน Eppendorf

4. ปิเปตสารละลาย C 1 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย D 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารมาตรฐาน) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ดังภาพที่ ข.4



ภาพที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry

ข.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ AOAC (2016)

สารเคมี

1. สารเร่งปฏิกิริยา (selenium reagent mixture)
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98%
3. อินดิเคเตอร์ (methyl red ผสมกับ bromocresol green)
4. กรดบอริกความเข้มข้น 4 % (w/v)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 35%
6. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1.000 กรัม ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 41 ก่อนใส่ในหลอดย่อย (Kjeldahl flask)
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา (selenium reagent mixture) 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยในเครื่องย่อยโปรตีนจนกระทั่งได้สารละลายสีน้ำตาลใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)
4. เทกรดบอริกความเข้มข้น 4 % (w/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และหยด indicator (ผสม methyl red 20 มิลลิกรัม และ bromocresol green 100 มิลลิกรัม ใน ethanol 100 มิลลิลิตร) ตามลงไปประมาณ 2 - 3 หยด แล้วนำมาเก็บสารที่ได้จากชุดกลั่น โดยให้ปลายท่อจากเครื่องกลั่นจุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริกตลอดเวลา
5. นำสารละลายที่ย่อยได้ใส่ในเครื่องกลั่นเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน โดยตั้งค่าเครื่องที่ภาวะการใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35% ปริมาตร 60 มิลลิลิตร (หรือจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ) และตั้งเวลาในการกลั่น 6 นาที ให้ได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร เครื่องจะทำการกลั่นจนสารละลายกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียว
6. ล้างส่วนปลายท่อที่จุ่มในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (ทำ blank ทุกครั้งที่วิเคราะห์) และคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{(B-A) \times M \times 14.007 \times 100}{1000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)}}$$

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

เมื่อ A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

M คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (โมลาร์)

ข.7 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating activity

Metal-chelating activity โดยดัดแปลงวิธีของ Jamdar และคณะ (2010)

สารเคมี

1. เพอร์ริสคัลอไรด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
2. เพอร์โรซีน ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์
3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

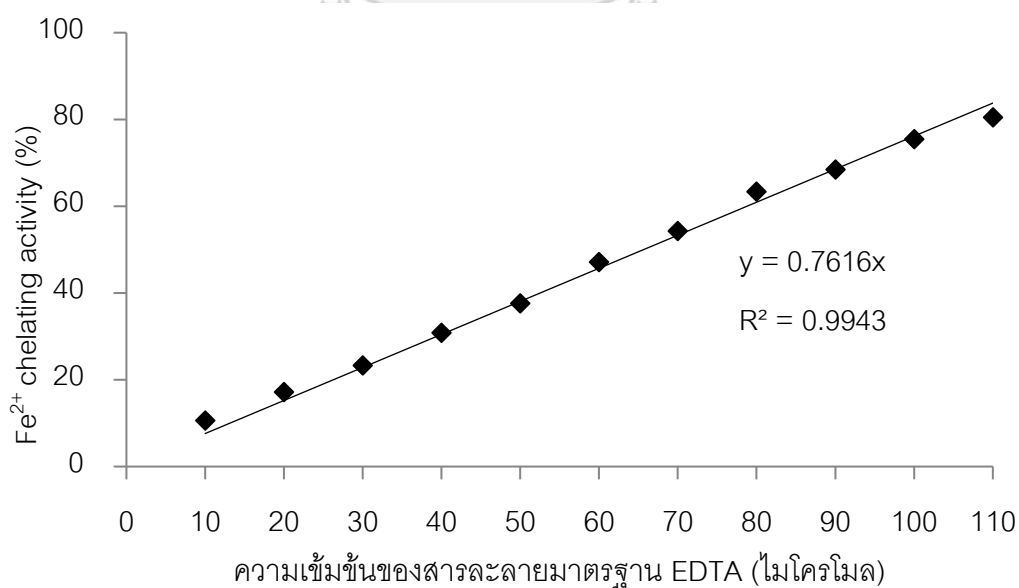
การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลาย EDTA ในแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลายเพอร์ริสคัลอไรด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 0.05 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.85 มิลลิลิตร และสารละลายเพอร์โรซีน (Ferozine) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณ %Fe²⁺ chelating activity ดังสมการที่ 2 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน EDTA ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EDTA และ %Fe²⁺ chelating activity ภาพที่ ข.5

$$\text{Fe}^{2+} \text{ chelating activity (\%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (2)$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย control (blank)

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย EDTA



ภาพที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน EDTA ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วย Metal-chelating

ข.8 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

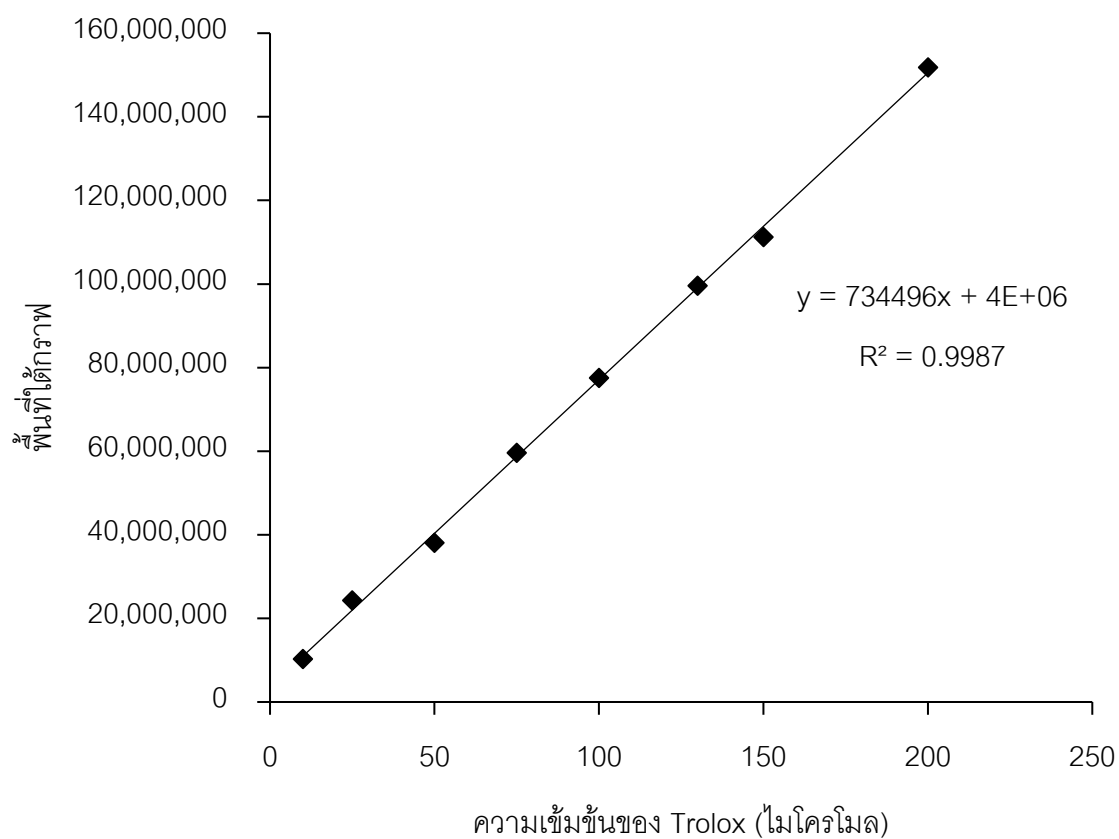
วิเคราะห์ ORAC โดยดัดแปลงวิธีของ Alashi และคณะ (2014)

สารเคมี

1. ฟลูออเรสซิน (Fluorescein)
2. 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)
3. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox)

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลาย Trolox 20 ไมโครลิตร ลงใน sterilin[®] 96-well microplate นำเข้าเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่กำหนดคุณสมบัติเป็น 37 องศาเซลเซียส
2. กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลายฟลูออเรสซินความเข้มข้น 4.19×10^{-3} ไมโครโมล ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยระบบ orbital แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
3. ก่อนให้ป้อนภายในเครื่องเติมสารละลาย AAPH ความเข้มข้น 150 มิลลิโมล ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยระบบ orbital
4. อ่านค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (relative fluorescence intensity) ที่เปลี่ยนแปลงไปทุก 1 นาที โดยใช้ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการปลดปล่อย (emission wavelength) 530 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC จากพื้นที่ใต้กราฟของสารละลาย Trolox ลบกับพื้นที่ใต้กราฟของ blank แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox แสดงดังภาพที่ ข.6



ภาพที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ ORAC

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของระดับการย่อยของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย

Source of variance	df	Sum of Square	Mean Square	F	<i>p</i>
Model	5	12980.10	2596.03	90.71	0.000
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1)	1	5452.50	5452.50	190.52	0.000
ระยะเวลาย่อย (X_2)	1	6588.40	6588.37	230.21	0.000
X_1X_1	1	133.20	133.16	4.65	0.043
X_2X_2	1	1126.40	1126.41	39.36	0.000
X_1X_2	1	114.70	114.69	4.01	0.058
Residual	21	601.00	28.62		
Lack of fit	3	171.70	57.23	2.40	0.102
Pure error	18	429.30	23.85		
Total	26	13581.10			

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย

Source of variance	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
Model	5	4.71	0.94	28.54	0.000
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1)	1	2.94	2.94	89.17	0.000
ระยะเวลาย่อย (X_2)	1	1.68	1.68	50.92	0.000
X_1X_1	1	0.02	0.02	0.67	0.422
X_2X_2	1	0.12	0.12	3.77	0.066
X_1X_2	1	0.04	0.04	1.21	0.284
Residual	21	0.69	0.03		
Lack of fit	3	0.17	0.06	2.02	0.148
Pure error	18	0.52	0.03		
Total	26	5.40			

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดสีน้ำตาลของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย

Source of variance	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
Model	5	0.241	0.048	61.25	0.000
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1)	1	0.006	0.006	8.13	0.010
ระยะเวลาย่อย (X_2)	1	0.100	0.100	127.12	0.000
X_1X_1	1	0.007	0.007	8.55	0.008
X_2X_2	1	0.050	0.050	63.89	0.000
X_1X_2	1	0.008	0.008	10.67	0.004
Residual	21	0.017	0.001		
Lack of fit	3	0.003	0.001	1.51	0.245
Pure error	18	0.013	0.001		
Total	26	0.258			

ตารางที่ ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย

Source of variance	df	Sum of Square	Mean Square	F	<i>p</i>
Model	5	46.32	9.26	14.55	0.000
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (X_1)	1	3.05	3.05	4.79	0.040
ระยะเวลาย่อย (X_2)	1	20.99	20.99	32.96	0.000
X_1X_1	1	0.14	0.14	0.22	0.644
X_2X_2	1	10.10	10.10	15.85	0.001
X_1X_2	1	4.34	4.34	6.81	0.016
Residual	21	13.37	0.64		
Lack of fit	3	2.14	0.71	1.14	0.359
Pure error	18	11.23	0.62		
Total	26	59.69			

ตารางที่ ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย

Source of variance	df	Sum of Square	Mean Square	F	<i>p</i>
Model	5	0.210	0.042	14.83	0.000
ความเข้มของเอนไซม์ (X_1)	1	0.121	0.121	42.82	0.000
ระยะเวลาย่อย (X_2)	1	0.037	0.037	12.89	0.002
X_1X_1	1	0.044	0.044	15.36	0.001
X_2X_2	1	0.053	0.053	18.58	0.000
X_1X_2	1	0.001	0.001	0.50	0.489
Residual	21	0.060	0.003		
Lack of fit	3	0.018	0.006	2.55	0.088
Pure error	18	0.042	0.002		
Total	26	0.270			

ตารางที่ ค.6 Model Summary ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ

Model	<i>r</i> -Square	Adjusted <i>r</i> -Square	Standard error of the Estimate
ระดับการย่อย	0.9557	0.9452	5.3496
สารประกอบฟีนอลิก	0.8717	0.8412	0.1816
การเกิดสีน้ำตาล	0.9358	0.9205	0.0281
DPPH radical scavenging activity	0.7760	0.7226	0.7980
Ferric reducing antioxidant power	0.7793	0.7267	0.0532

ตารางที่ ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณความชื้นของไฮโดรไลเสตจาก ถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	36.267	9.067	136.000	0.000
Error	10	0.667	0.067		
Total	14	36.933			

ตารางที่ ค.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณน้ำอิสระของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำ ที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	0.000	0.000	4.972	0.018
Error	10	0.000	0.000		
Total	14	0.000			

ตารางที่ ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของ ไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	59.234	14.809	3011.375	0.000
Error	10	0.049	0.005		
Total	14	59.284			

ตารางที่ ค.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของไฮโดรไลเสต จากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	0.499	0.125	45.273	0.000
Error	10	0.028	0.003		
Total	14	0.527			

ตารางที่ ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของ TCA-soluble peptides ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	1.177	0.294	2101.310	0.000
Error	10	0.001	0.000		
Total	14	1.178			

ตารางที่ ค.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของสมบัติการละลายของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	367.525	91.881	94.038	0.000
Error	10	9.771	0.977		
Total	14	377.296			

ตารางที่ ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	7.943	1.986	800.705	0.000
Error	10	0.025	0.002		
Total	14	7.968			

ตารางที่ ค.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของ Oxygen radical absorbance capacity ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	4380.104	1095.026	1.163	0.383
Error	10	9415.451	941.545		
Total	14	13795.555			

ตารางที่ ค.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	54.318	13.579	1566.469	0.000
Error	10	0.087	0.009		
Total	14	54.404			

ตารางที่ ค.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ Metal-chelating ของไฮโดรไลเสตจากถั่วดำที่ทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ในภาวะที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 18 และ 21% โดยน้ำหนักแห้ง

Source of variation	df	Sum of Square	Mean Square	F	p
วิธีการทำแห้ง	4	2.390	0.598	2.396	0.120
Error	10	2.494	0.249		
Total	14	4.885			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนฤมล บำรุงศาสตร์
วัน เดือน ปี เกิด	5 ตุลาคม 2535
สถานที่เกิด	ชลบุรี
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา เมื่อปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	12 บางแสนสาย 3 ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20130
ผลงานตีพิมพ์	Bumrungsart N. and Duangmal, K. 2019. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Condition for Producing Black Gram Bean (Vigna mungo) Hydrolysate with High Antioxidant Activity. Food and Applied Bioscience Journal. 7(Special Issue on Agriculture and Agro-Industry): 105-117.