

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเคชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส

นางสาวสุพิชชา คุณารยกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FUNCTIONAL PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY ENZYMATIC  
DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE

Miss Supichcha Kunarayakul



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

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์               | สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยวิธีดี |
|                                 | แอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส                  |
| โดย                             | นางสาวสุพิชชา कुमारยกูล                                 |
| สาขาวิชา                        | เทคโนโลยีทางอาหาร                                       |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรรณสถิตย์                      |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรรณสถิตย์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรมหา คงเป็นสุข)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.วรรณมา ตูลยชัย)

สุพิชชา คุณารยกุล : สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (FUNCTIONAL PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY ENZYMATIc DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร.อินทาวุธ สรรพพรสถิตย์, 90 หน้า.

มะพร้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อบริโภคได้หลากหลาย เช่น กะทิ และน้ำมันมะพร้าว ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวจะนำกะทิมาแยกส่วนของน้ำมันออก และเหลือหางกะทิไว้ โดยพบว่าหางกะทิจะมีสัดส่วนของโปรตีนที่สูงขึ้นเนื่องจากการแยกส่วนของไขมันออกไปจึงสามารถนำส่วนของหางกะทินี้มาสกัดโปรตีนต่อได้ แต่โปรตีนที่สกัดได้มีมักข้อจำกัดในการนำไปใช้ เช่น มีความสามารถในการละลายในสภาวะกรดอ่อนต่ำ เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ protein-glutaminase (PG) และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกดัดแปร โดยสกัดโปรตีนจากหางกะทิที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนที่จุด isoelectric point (pH = 3.9) และหาสภาวะในการดัดแปรด้วย response surface methodology (RSM) โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมคือมีค่า degree of deamidation (DD) สูง (>30 %) และมีค่า degree of hydrolysis (DH) ต่ำ (<5 %) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยเอนไซม์ PG คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนเป็น 36 U/g protein, อุณหภูมิ 50°C และ pH = 7 เมื่อดัดแปรโปรตีนด้วยสภาวะดังกล่าวที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (15 min, 6 และ 12 h) เพื่อนำมาศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ได้แก่สมบัติการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และสมบัติการเกิดโฟม พบว่าสมบัติการละลายที่ pH = 3 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ (p<0.05) ในขณะที่ pH = 5 ไม่มีความแตกต่างกัน (p>0.05) ส่วน pH = 7 มีค่าลดลงในตัวอย่างที่ถูกดัดแปรเป็นเวลา 15 min และ 6 h เมื่อพิจารณาความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน พบว่าทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน (p>0.05) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม สำหรับสมบัติการเกิดอิมัลชัน พบว่าค่า emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปร 15 นาที มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 6 และ 12 h ไม่มีความแตกต่างกับตัวอย่างควบคุม (p>0.05) ค่า emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรทุกตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (p<0.05) และเมื่อพิจารณาสมบัติการเกิดโฟม พบว่าตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีค่า foaming capacity (FC) สูงขึ้น (p<0.05) แต่ foaming stability (FS) มีค่าลดลง (p<0.05) molecular weight distribution ของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้นและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรมีลักษณะคล้ายคลึงกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

# # 5772191023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: COCONUT PROTEIN / ENZYMATIC DEAMIDATION / PROTEIN GLUTAMINASE / RESPONSE SURFACE METHODOLOGY / FUNCTIONAL PROPERTIES

SUPICHCHA KUNARAYAKUL: FUNCTIONAL PROPERTIES OF COCONUT PROTEIN MODIFIED BY ENZYMATIC DEAMIDATION USING PROTEIN-GLUTAMINASE. ADVISOR: INTHAWOOT SUPPAVORASATIT, Ph.D., 90 pp.

Coconut is an economical crop that widely processed and used in many ways; for example, coconut milk and coconut oil. In order to produce coconut oil, the coconut milk is used as a raw material for oil extraction and coconut skimmilk is left behind as a by-product. Due to high protein content in coconut skimmilk, it has a potential for protein extraction. However, the extracted protein usually has limitation in used due to its low solubility in acidic condition. The objective of this study was to optimize of the enzymatic deamidation of coconut protein by protein-glutaminase (PG) and to study functional properties of deamidated coconut protein. The extraction of protein was performed by conventional isoelectric precipitation (pH 3.9). The modified condition was optimized by using response surface methodology (RSM). The optimization was performed based on the condition, which contained high degree of deamidation ( $DD > 30\%$ ) and low degree of hydrolysis ( $DH < 5\%$ ). It was found that the optimum condition were enzyme:substrate ratio (E/S) of 36 U/g protein, temperature of  $50^{\circ}\text{C}$  and pH of 7.0. The functional properties of deamidated coconut proteins (deamidation by PG for 15 min, 6 h, and 12 h) were determined, including solubility, water-and oil-holding capacity, emulsifying properties and foaming properties. In comparison to control sample (same condition as deamidated ones, but without PG), the solubility of deamidated coconut protein was improved at pH = 3.0 ( $p \leq 0.05$ ). At pH = 5.0, there was no difference in solubility among treatments ( $p > 0.05$ ). At pH = 7.0, the solubility of coconut proteins, which deamidated for 15 min and 6 h, were decreased ( $p \leq 0.05$ ). Water holding capacity and oil holding capacity were not different from control after deamidation by PG ( $p > 0.05$ ). Emulsifying activity index (EAI) of 15 min deamidated coconut protein was decreased ( $p \leq 0.05$ ) while EAIs of 6 and 12 h deamidated protein were not different from control ( $p > 0.05$ ). Emulsifying stability index (ESI) of all deamidated protein samples were increased ( $p \leq 0.05$ ). Foaming capacity (FC) was increased after deamidation by PG ( $p \leq 0.05$ ), while the foaming stability (FS) was decreased ( $p \leq 0.05$ ). From the results of molecular weight distribution, the small molecular proteins were increased during deamidation. And amino acid profile of deamidated coconut protein was similar to untreated coconut protein.

Department: Food Technology

Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนงานวิจัย “ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” วิสาหกิจชุมชนกลุ่ม 100 พันมะพร้าวไทย จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ที่ให้การสนับสนุนวัตถุดิบ และ Amano Enzyme, Japan ที่ให้การสนับสนุน เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่ให้แนวคิดงานวิจัย คำแนะนำทั้งในด้านวิชาการ และการประพุดิตินต่างๆ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานุวงศ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภา คงเป็นสุข และศาสตราจารย์ ดร.วรรณมาศ ตูลย์ธัญ ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังคำแนะนำ การตรวจสอบและแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวก การให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ ปรินญาเอก พี่น้องๆปรินญาโท และน้องๆปรินญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ น้ำใจและ กำลังใจ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ขอขอบคุณพี่น้อง ครอบครัวคุณารยกุล และครอบครัววีระเกตุ ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือทั้งทางร่างกาย และจิตใจ รวมถึงทุนทรัพย์ต่างๆ เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                             | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....                                | ฉ    |
| สารบัญ.....   | ช    |
| สารบัญตาราง.....                                    | ญ    |
| สารบัญภาพ .....                                     | ฎ    |
| บทที่ 1 บทนำ .....                                  | 1    |
| บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....                         | 2    |
| 2.1 มะพร้าว.....                                    | 2    |
| 2.1.2 โปรตีนจากมะพร้าว .....                        | 3    |
| 2.1.2.1 การสกัดโปรตีนมะพร้าว .....                  | 3    |
| 2.1.2.2 ลักษณะของโปรตีนมะพร้าว .....                | 4    |
| 2.2 โปรตีน .....                                    | 7    |
| 2.2.1 การดัดแปรโปรตีน .....                         | 9    |
| 2.2.1.1 ดีแอมิเดชัน.....                            | 9    |
| 2.2.1.2 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....             | 14   |
| 2.2.1.3 การเสียสภาพด้วยความร้อน.....                | 14   |
| 2.2.1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีน ..... | 15   |
| 2.2.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน.....               | 16   |
| 2.2.2.1 สมบัติการละลาย.....                         | 16   |
| 2.2.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน .....             | 18   |
| 2.2.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน.....                  | 20   |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.2.4 สมบัติการเกิดโฟม .....   | 22 |
| 2.2.2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว .....  | 22 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย .....  | 25 |
| 3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์ .....  | 25 |
| 3.1.1 วัตถุประสงค์ .....   | 25 |
| 3.1.2 สารเคมี.....   | 25 |
| 3.1.3 อุปกรณ์ .....  | 26 |
| 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....   | 27 |
| 3.2.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว .....  | 27 |
| 3.2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้<br>เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส..... | 28 |
| 3.2.2.1 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง .....                                    | 28 |
| 3.2.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเด<br>ชัน .....                             | 31 |
| 3.2.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว.....  | 32 |
| 3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจาก<br>มะพร้าว.....                           | 32 |
| 3.2.3.2 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว .....   | 33 |
| 3.2.3.2.1 สมบัติการละลายและ pH solubility profile .....  | 33 |
| 3.2.3.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน.....   | 34 |
| 3.2.3.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน .....  | 34 |
| 3.2.3.2.4 สมบัติการเกิดโฟม .....   | 35 |
| 3.2.3.2.5 Molecular weight distribution.....   | 36 |
| 3.2.3.2.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน .....   | 37 |



|   |    |
|---|----|
| บทที่ 4 ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง.....  | 38 |
| 4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว .....   | 38 |
| 4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันของโปรตีนมะพร้าวด้วยโปรตีนกลูตา<br>มีเนส ..... | 38 |
| 4.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง.....                    | 39 |
| 4.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชัน.....                 | 47 |
| 4.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว .....                                      | 48 |
| 4.3.1 สมบัติการละลาย.....   | 49 |
| 4.3.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน .....   | 53 |
| 4.3.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน.....  | 55 |
| 4.3.4 สมบัติการเกิดโฟม .....  | 57 |
| 4.3.5 Molecular weight distribution.....  | 59 |
| 4.3.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน .....  | 61 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....   | 64 |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง .....  | 64 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ .....  | 65 |
| รายการอ้างอิง .....   | 66 |
| ภาคผนวก.....  | 73 |
| ภาคผนวก ก .....   | 74 |
| ภาคผนวก ข .....   | 82 |
| ภาคผนวก ค .....   | 85 |
| ภาคผนวก ง.....  | 89 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....  | 90 |

## สารบัญตาราง

|  |    |
|--|----|
| ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนจากมะพร้าว .....  | 7  |
| ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ 20 ชนิด .....  | 8  |
| ตารางที่ 2.3 ความสามารถในการจับกับน้ำของกรดอะมิโน .....  | 19 |
| ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองในการศึกษาการตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (ค่าสมมติและค่าจริง).....                    | 29 |
| ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ .....   | 38 |
| ตารางที่ 4.2 ค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกตัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่สภาวะต่าง ๆ ..... | 40 |
| ตารางที่ 4.3 p-value ของปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH).....   | 42 |
| ตารางที่ 4.4 degree of deamidation และ degree of hydrolysis ของโปรตีนมะพร้าวที่ถูกตัดแปรที่ระยะเวลาต่าง ๆ สำหรับศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน.....     | 49 |
| ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 3.0 .....  | 51 |
| ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 5.0 .....  | 51 |
| ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 7.0 .....  | 52 |
| ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนจากมะพร้าว .....  | 55 |
| ตารางที่ 4.9 Foaming capacity (FC) ของโปรตีนจากมะพร้าว .....   | 58 |
| ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปร ...  | 62 |
| ตารางที่ ข.1 ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่เติมเพื่อให้สารละลายมี pH ต่าง ๆ.....  | 83 |
| ตารางที่ ง.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าว.....   | 89 |

## สารบัญภาพ

|  |    |
|--|----|
| รูปที่ 2.1 ภาพจำลองการตัดตามแนวยาวของผลมะพร้าว.....  | 2  |
| รูปที่ 2.2 ปริมาณการผลิตมะพร้าวทั่วโลกในปีพ.ศ. 2556 .....  | 3  |
| รูปที่ 2.3 การกระจายตัวของโปรตีน cocosin จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE .....   | 5  |
| รูปที่ 2.4 การกระจายตัวของโปรตีน 7S กลอบูลิน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE .....   | 6  |
| รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันของกลูตามีน .....  | 9  |
| รูปที่ 2.6 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส ...   | 13 |
| รูปที่ 2.7 specific activity ของโปรตีนกลูตามิเนสในสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ.....  | 14 |
| รูปที่ 2.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประจุสุทธิของโปรตีนกับ pH .....  | 17 |
| รูปที่ 2.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการละลายของโปรตีนกับ pH .....  | 18 |
| รูปที่ 2.10 การดักจับทางกายภาพ (physical entrapment) .....   | 20 |
| รูปที่ 2.11 การจัดเรียงตัวของอิมัลซีไฟเออร์ในรูปแบบต่าง ๆ.....   | 21 |
| รูปที่ 2.12 pH solubility profile ของโปรตีนมะพร้าว .....   | 23 |
| รูปที่ 2.13 Photomicrographs ของอิมัลชันจากโปรตีนมะพร้าวและน้ำมันข้าวโพด .....   | 24 |
| รูปที่ 4.1 surface plot จากสมการ degree of deamidation ( $E/S = 36 \text{ unit/g protein}$ ).....                                  | 44 |
| รูปที่ 4.2 contour plot จากสมการ degree of deamidation ( $E/S = 36 \text{ unit/g protein}$ ) .....                                 | 44 |
| รูปที่ 4.3 surface plot จากสมการ degree of hydrolysis ( $E/S = 36 \text{ unit/g protein}$ ).....                                   | 45 |
| รูปที่ 4.4 contour plot จากสมการ degree of hydrolysis ( $E/S = 36 \text{ unit/g protein}$ ) .....                                  | 46 |
| รูปที่ 4.5 overby contour plot จากสมการ degree of deamidation และ degree of hydrolysis ( $E/S = 36 \text{ unit/g protein}$ ) ..... | 47 |
| รูปที่ 4.6 degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา.....                 | 48 |
| รูปที่ 4.7 โครงสร้างประจุของกลูตามิกแอซิด.....   | 50 |
| รูปที่ 4.8 pH solubility profile ของโปรตีนจากมะพร้าว .....   | 53 |

รูปที่ 4.9 Emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนมะพร้าว ..... 56

รูปที่ 4.10 Emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีนมะพร้าว ..... 57

รูปที่ 4.11 Foaming stability (FS) ของโปรตีนจากมะพร้าว ..... 59

รูปที่ 4.12 Molecular weight distribution ของโปรตีนมะพร้าว ..... 61

รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมโมเนีย.....79

รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย.....81

รูปที่ ค.1 Chromatogram ของกรดอะมิโนมาตรฐาน.....86

รูปที่ ค.2 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร.....87

รูปที่ ค.3 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ 6 ชั่วโมง.....88



## บทที่ 1

### บทนำ

มะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก มีการปลูกแพร่หลายในประเทศเขตร้อน ในปีพ.ศ.2556 มีกำลังการผลิตมะพร้าวทั่วโลกประมาณ 62 ล้านตัน โดยประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตมะพร้าวอันดับที่ 9 ของโลก มีกำลังการผลิตอยู่ที่ 1 ล้านตัน ปริมาณการผลิตมะพร้าวในทั่วโลกมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น และมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นในประเทศไทยทั้งในกลุ่มผลิตภัณฑ์บริโภค เช่น น้ำมันมะพร้าว กะทิ และแป้งมะพร้าว หรือนำไปเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อุปโภค เช่น เครื่องสำอาง เป็นต้น (FAO, 2013; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559)

กระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวในปัจจุบัน มักเป็นการสกัดน้ำมันมะพร้าวแบบเย็นซึ่งจะทำให้เกิดของเสียคือ หางกะทิที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 3 % อยู่ด้วย จากการศึกษาพบว่าโปรตีนมะพร้าวเป็นโปรตีนจากพืชที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทุกชนิด ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำหางกะทิดังกล่าวมาสกัดโปรตีน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนจากมะพร้าวยังน้อย และโปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้มีข้อจำกัดในการใช้งานคือ สมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่อาจนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย การตัดแปรโปรตีนเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนซึ่งการทำดีเอมิเดชันเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมวิธีหนึ่ง ปฏิกริยาดีเอมิเดชันคือการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนจากหมู่เอไมด์เป็นหมู่คาร์บอกซิลซึ่งจะทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป การทำดีเอมิเดชันสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และการใช้เอนไซม์ (Kwon et al., 1996; Schwenke, 1997) การทำดีเอมิเดชันสามารถใช้เอนไซม์ได้หลายชนิดในการเร่งปฏิกริยา เช่น เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (protein-glutaminase, PG) โปรตีนกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียในดิน โปรตีนกลูตามิเนสสามารถเร่งให้เกิดปฏิกริยาดีเอมิเดชันได้ เอนไซม์ชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถเร่งปฏิกริยาดีเอมิเดชันกับกรดอะมิโนกลูตามีนในสายเปปไทด์เท่านั้น ไม่เกิดกับกลูตามีนอิสระ และมีปฏิกริยาข้างเคียง เช่น ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้ต่ำ นอกจากนี้โปรตีนกลูตามิเนสยังเป็นเอนไซม์ที่พื้ค้นพบทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำมาใช้ในการตัดแปรโปรตีนน้อยอีกด้วย (Yamaguchi et al., 2001) การตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยการทำดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน และทำให้โปรตีนจากมะพร้าวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

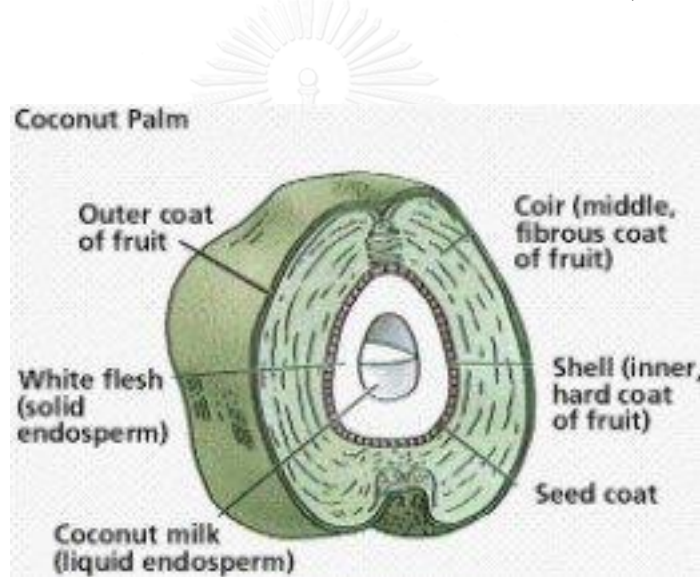
งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส และศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกตัดแปร

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 มะพร้าว

มะพร้าวหรือ *Cocos nucifera*, Linn. เป็นพืชในตระกูล *Palmaceae* ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ ปาล์ม จาก และตาล เป็นไม้ยืนต้นสูง มีผลที่สามารถบริโภคได้โดยมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือทรงรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-23 เซนติเมตร มีผิวเรียบ ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล ภายในมีชั้นที่เป็นเส้นใยอ่อนนุ่มและชั้นในที่แข็ง หรือ กะลา เนื้อมีสีขาวและมีของเหลวอยู่ภายใน รูปที่ 2.1 แสดงภาพจำลองการตัดตามแนวยาวของผลมะพร้าว (ปีตินันต์ อักษร, 2553)

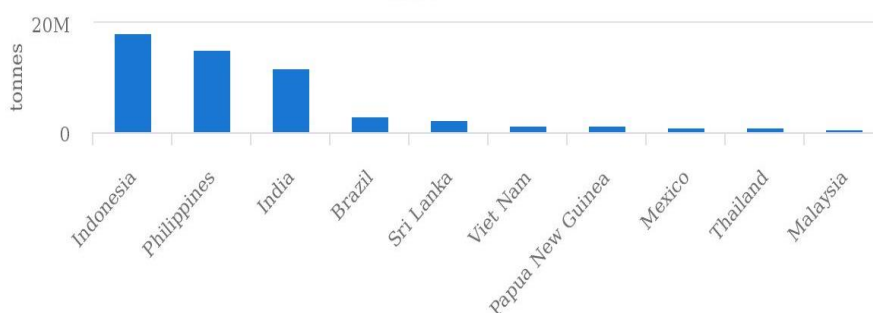


รูปที่ 2.1 ภาพจำลองการตัดตามแนวยาวของผลมะพร้าว

ที่มา: Pyngthyngs (2012)

มะพร้าวถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกชนิดหนึ่ง มีกำลังการผลิตมะพร้าวทั่วโลก ประมาณ 62 ล้านตัน ในปีพ.ศ.2556 โดยประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตมะพร้าวอันดับที่ 9 ของโลก มีกำลังการผลิตอยู่ที่ 1 ล้านตันต่อปี ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ทั้งนี้ในอดีตประเทศไทยเคยเป็นผู้ผลิตมะพร้าวอันดับ 6 ของโลก เช่น ในปีพ.ศ. 2543 ที่ประเทศไทยมีกำลังการผลิตอยู่ที่ 1.8 ล้านตัน ปริมาณการผลิตมะพร้าวที่ลดลงเป็นผลมาจากปัญหาจากภัยทางธรรมชาติ เช่น ภัยแล้ง แมลงศัตรูพืช ระบาด ประกอบการขยายตัวของอุตสาหกรรมส่งผลให้เกษตรกรมีความสนใจที่จะปลูกมะพร้าวลดลง

แต่ปริมาณก็ยังเพียงพอให้นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อยู่ (FAO, 2013; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559)



รูปที่ 2.2 ปริมาณการผลิตมะพร้าวทั่วโลกในปีพ.ศ. 2556

ที่มา: FAO (2013)

ปัจจุบันมีการนำส่วนต่าง ๆ ของผลมะพร้าวไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารซึ่งได้นำส่วนของเนื้อมะพร้าวมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำมันมะพร้าว กะทิ และแป้งมะพร้าว เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ยา และเครื่องสำอางอีกด้วย (Thaiphanit and Anprung, 2013)

## 2.1.2 โพรตีนจากมะพร้าว

### 2.1.2.1 การสกัดโปรตีนมะพร้าว

ตั้งแต่ปีค.ศ. 1990 ได้มีการศึกษากระบวนการสกัดโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น Rasyid et al. (1992) ทดลองสกัดโปรตีนจากมะพร้าว 2 วิธี โดยวิธีแรกคือการนำหางกะทิที่ผ่านการแยกไขมันออกด้วยการปั่นเหวี่ยงมาแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นนำมาสกัดไขมันออกอีกครั้งด้วยการทำ soxhlet ด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็งอีกครั้ง จากนั้นนำมาปรับ pH เป็น 8.3 นำไปปั่นเหวี่ยง แล้วปรับเป็น 6.4 และ 4.8 ตามลำดับ จะได้ครีมโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 82.7-84.7% ซึ่งคิดเป็น 68% protein recovery กระบวนการสกัดโปรตีนอีกวิธีหนึ่งคือการปั่นเหวี่ยงที่ 16,000xg เพื่อแยกโปรตีนจากส่วนของหางกะทิ จากนั้นแยกส่วนของครีมที่ผ่านการแยกชั้นต้นด้วยการแช่เย็นเป็นเวลา 1 คืน พบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้มีปริมาณโปรตีน 94.0-94.4% และมี protein recovery 94%

Kwon et al. (1996) สกัดโปรตีนจากหางกะทิโดยใช้เทคนิค ultrafiltration โดยเลือกจากแผ่นกรองที่มี molecular weight cut-off (MWCO) 5,000 Da จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าตัวอย่างที่ได้มีปริมาณโปรตีน 51.8% ในทำนองเดียวกัน Onsaard et al. (2005) ใช้ ultrafiltration ที่ 10000 Da MWCO สกัดโปรตีนได้ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนเพียง 45.6% อย่างไรก็ตาม ในปี 2006 นักวิจัยกลุ่มนี้ได้ทดลองสกัดโปรตีนมะพร้าวอีกครั้งด้วยกระบวนการ 2 รูปแบบ โดยวิธีแรกเป็นการตกตะกอนโปรตีนจากมะพร้าวด้วยกรดอะซิติกที่ pH 3.9 แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียสเพื่อแยกส่วนไขมันออก จากนั้นล้างตัวอย่างซ้ำด้วยเฮกเซนเพื่อกำจัดไขมันที่หลงเหลือ ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งคิดเป็น 88.94% อีกวิธีหนึ่งเป็นการนำหางกะทิไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกไขมันออก ล้างตัวอย่างซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซนก่อนจะนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าได้ตัวอย่างที่ได้มีปริมาณโปรตีน 75.27% แต่ตัวอย่างโปรตีนที่ได้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตปนถึง 14.67% (Onsaard et al., 2006)

นอกจากกระบวนการสกัดจะมีผลแล้ว วัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ในการสกัดก็มีผลเช่นกัน เช่น Thaiphanit and Anprung (2013) ทดลองสกัดโปรตีนมะพร้าวจากกะทิสดและตัวอย่างหางกะทิจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของโปรตีน พบว่าตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากกะทิสดมีปริมาณโปรตีน 60.44% ในขณะที่ตัวอย่างที่สกัดจากหางกะทิจากอุตสาหกรรมมีปริมาณโปรตีนถึง 92.74% และในปี 2016 ได้สกัดโปรตีนซ้ำโดยใช้วัตถุดิบเป็นหางกะทิจากอุตสาหกรรมแห่งเดิมด้วยกระบวนการสกัดแบบเดียวกัน พบว่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่สกัดได้หลังการทำแห้งมีค่าเป็น 80.3% ทั้งนี้อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสกัดคือจำนวนรอบที่ใช้ในการสกัด และอาจจะต้องใช้สารเคมี เช่น เฮกเซน เพื่อลดปริมาณไขมันลง (Thaiphanit et al., 2016)

### 2.1.2.2 ลักษณะของโปรตีนมะพร้าว

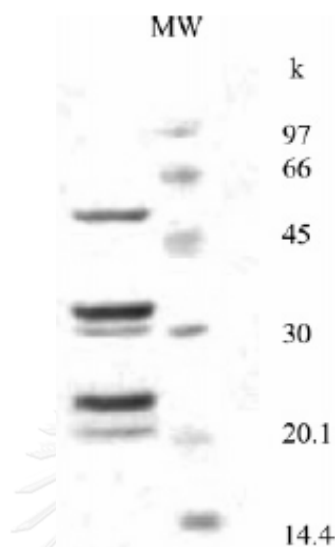
โปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดได้หลังจากการทำแห้งด้วยการทำเยือกแข็งจะมีสีขาวอมเหลือง มีกลิ่นกะทิจาง ๆ มีน้ำหนักเบา สีของโปรตีนมะพร้าวจะบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้

#### 2.1.2.2.1 Molecular weight distribution

โปรตีนมะพร้าวส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนชนิดกลอบูลินซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 7 และ 11S โปรตีนกลุ่ม 11S กลอบูลินมีประมาณ 80% ของโปรตีนในกลุ่มกลอบูลินทั้งหมดโดยมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า cocosin โปรตีนกลุ่มนี้มีขนาดโมเลกุลดั้งเดิมอยู่ที่ 326,000 kDa แต่มีหน่วยย่อย

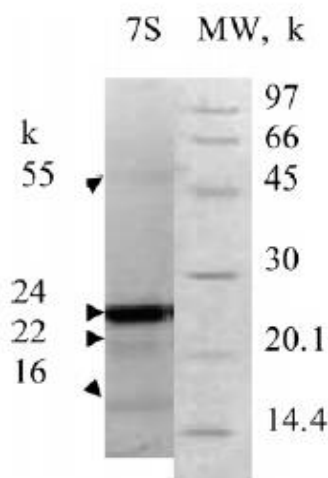


เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีขนาด 24, 34 และ 55 kDa ซึ่งจะปรากฏในเจลเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังรูปที่ 2.3 แลบบโพรตีนที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับโพรตีนกลุ่ม 11S กลอบูลินที่สกัดได้จากงา



รูปที่ 2.3 การกระจายตัวของโพรตีน cocosin จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE  
ที่มา: Garcia et al. (2005)

กลอบูลินอีกกลุ่มคือ 7S กลอบูลิน มีขนาดโมเลกุลทั้งหมด 156,000 kDa โดยมีหน่วยย่อยเป็นสายเปปไทด์ที่มีขนาด 16, 22 และ 24 kDa แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จะแสดงผลเป็นแลบบโพรตีนสี่แถบ คือ 16, 22, 24 และ 55 kDa ดังรูปที่ 2.5 (Kwon et al., 1996; Garcia et al., 2005)



รูปที่ 2.4 การกระจายตัวของโปรตีน 7S กลอบูลิน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

ที่มา: Garcia et al. (2005)

นอกจากนี้ จากงานวิจัยของ Kwon et al. (1996) ที่ได้ศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนมะพร้าวเกิดการเสียสภาพด้วยการใช้ differential scanning calorimetry (DSC) พบว่า อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของกลอบูลินในมะพร้าว (denaturation temperature,  $T_d$ ) คือ 82, 98 และ 112 องศาเซลเซียส

#### 2.1.2.2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

จากงานวิจัยของ Rasyid et al. (1992) พบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากมะพร้าวมีปริมาณกลูตามิกแอซิดสูง (17%) รองลงมาคืออาร์จินีน และแอสปาทิกแอซิดตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบ 9 ชนิด ซึ่งจากงานวิจัยของ Thaiphanit และ Anprung (2013) ได้ผลที่คล้ายคลึงกัน คือ มีปริมาณกลูตามิกแอซิด (21.67%) อาร์จินีน และแอสปาทิกแอซิดสูง ดังแสดงตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนจากมะพร้าว

| Essential Amino acid | g/100 g <sup>a</sup> | Nonessential Amino acid | g/100 g <sup>a</sup> |
|----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| Histidine            | 2.2925               | Alanine                 | 3.6468               |
| Isoleucine           | 2.0545               | Arginine                | 12.2219              |
| Leucine              | 4.7699               | Aspartic acid           | 8.6481               |
| Lysine               | 3.3476               | Cysteine                | 1.6299               |
| Methionine           | 1.5512               | Glutamic acid           | 21.6721              |
| Phenylalanine        | 4.3078               | Glycine                 | 3.9061               |
| Threonine            | 2.7611               | Proline                 | 3.3710               |
| Tryptophan           | 1.3807               | Serine                  | 4.1111               |
| Valine               | 3.3253               | Tyrosine                | 2.1073               |

<sup>a</sup> Average result from two independent samples.

ที่มา: Thaiphanit and Anprung (2013)

## 2.2 โปรตีน

โปรตีนเป็นสารประกอบของโมเลกุลขนาดใหญ่โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน และอาจพบซัลเฟอร์ในบางครั้ง หน่วยย่อยของโปรตีนหรือกรดอะมิโนจึงเกิดจากการรวมตัวของสารข้างต้นนี้ โดยมีโครงสร้างหลักเป็นเป็นหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ต่อกันที่คาร์บอนในตำแหน่งแอลฟา และมีหมู่ฟังก์ชันหรือหมู่โซ่ข้าง (-R) ที่แตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโน กรดอะมิโนจึงมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น H<sub>2</sub>N-CH(R)-COOH ในธรรมชาติจะพบกรดอะมิโน 20 ชนิดดังแสดงตารางที่ 2.2 ซึ่งเมื่อแบ่งตามหมู่โซ่ข้างแล้วจะแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม (Yada, 2004) ได้แก่

1. Acidic ประกอบด้วยแอสปาดิกแอซิด และกลูตามิกแอซิด
2. Basic ประกอบด้วยอาร์จินีน, ฮิสติดีน และไลซีน
3. Aliphatic ประกอบด้วย อะลานีน, ไอโซลิวซีน, ลิวซีน และวาลีน
4. Aromatic ประกอบด้วยฟีนิลอะลานีน, ไทโรซีน และทริปโตแฟน
5. Polar ประกอบด้วย เซอรีน และทรีโอนีน
6. Thiol-containing ประกอบด้วย ซิสเตอีน และเมตไทโอนีน
7. Amide ประกอบด้วย แอสปาราจिन และกลูตามีน
8. กลุ่มพิเศษที่มีการจับของหมู่โซ่ข้างที่แตกต่างจากกรดอะมิโนตัวอื่น ได้แก่ ไกลซีน และ

โพรลีน

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ 20 ชนิด

| Amino acid    |     |   | Mass   | Side chain type           |
|---------------|-----|---|--------|---------------------------|
| Alanine       | Ala | A | 71.09  | aliphatic hydrocarbon     |
| Arginine      | Arg | R | 156.19 | basic $\delta$ -guanidyl  |
| Aspartic acid | Asp | D | 114.11 | acidic $\beta$ -carboxyl  |
| Asparagine    | Asn | N | 115.09 | acid amide                |
| Cysteine      | Cys | C | 103.15 | thiol                     |
| Glutamic acid | Glu | E | 129.12 | acidic $\gamma$ -carboxyl |
| Glutamine     | Gln | Q | 128.14 | acid amide                |
| Glycine       | Gly | G | 57.05  | hydrogen                  |
| Histidine     | His | H | 137.14 | basic imidazole           |
| Isoleucine    | Ile | I | 113.16 | aliphatic hydrocarbon     |
| Leucine       | Leu | L | 113.16 | aliphatic hydrocarbon     |
| Lysine        | Lys | K | 128.17 | basic $\epsilon$ -amino   |
| Methionine    | Met | M | 131.19 | thio-ether                |
| Phenylalanine | Phe | F | 147.18 | aromatic phenyl           |
| Proline       | Pro | P | 97.12  | heterocyclic imino        |
| Serine        | Ser | S | 87.08  | polar hydroxyl            |
| Threonine     | Thr | T | 101.11 | polar hydroxyl            |
| Tryptophan    | Trp | W | 186.12 | aromatic indole           |
| Tyrosine      | Tyr | Y | 163.18 | aromatic phenol           |
| Valine        | Val | V | 99.14  | aliphatic hydrocarbon     |

ที่มา: Yada (2004)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดอะมิโนจะเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเปปไทด์ในตำแหน่งของกลุ่มคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวแรกกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนตัวที่สอง และมีชื่อเรียกตามจำนวนพันธะเปปไทด์ เช่น เปปไทด์ คือกรดอะมิโนสองตัวต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ 1 พันธะ ไตเปปไทด์ คือกรดอะมิโนสามตัวต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์สองพันธะ และโพลีเปปไทด์เกิดจากกรดอะมิโนหลายตัวต่อกันเป็นสายยาว กรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นสายยาวจะทำให้เกิดอันตรกิริยาต่าง ๆ ทั้งภายในสารและภายนอกสาย จนเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโครงสร้างระดับต่าง ๆ (นิสานารถ กระแสร์ชล, 2540) ดังนี้

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโครงสร้างที่มีกรดอะมิโนองค์ประกอบ กรดอะมิโนจะเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เกิดจากสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนเกิดการขดเป็นเกลียวแบบแอลฟาเฮลิกซ์หรือเบตาชีตและยึดเหนี่ยวด้วยพันธะไฮโดรเจน

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้างของสายโพลีเปปไทด์ที่ขดพับและจับกันแน่นเป็นก้อนกลมด้วยอันตรกิริยาต่าง ๆ
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากสายโพลีเปปไทด์มากกว่าหนึ่งสายรวมตัวกัน

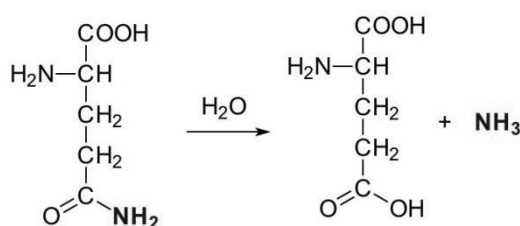
ชนิดของกรดอะมิโน การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนและโครงสร้างในระดับต่าง ๆ ส่งผลถึงสมบัติของของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดอิมัลชัน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการนำโปรตีนไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะปรับปรุงโครงสร้าง การจัดเรียงตัว และการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเพื่อให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปและมีความเหมาะสมกับการนำไปใช้มากยิ่งขึ้น (Yada, 2004)

## 2.2.1 การดัดแปรโปรตีน

การดัดแปรโปรตีนเป็นอีกหนึ่งวิธีในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยการดัดแปรโปรตีนทำได้หลายวิธี เช่น การตัดสายโปรตีนด้วยการทำไฮโดรไลซิส การทำให้โปรตีนเสียสภาพ เช่น การใช้ความร้อน และการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน เช่น ดีแอมิเดชัน (deamidation) และ ซักซินิเลชัน (succinylation) เป็นต้น

### 2.2.1.1 ดีแอมิเดชัน

ดีแอมิเดชันเป็นกระบวนการดัดแปรโปรตีนวิธีหนึ่งด้วยวิธีการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนจากหมู่เอไมด์เป็นหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีนที่ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป โดยกรดอะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้จะต้องมีหมู่เอไมด์ซึ่งได้แก่ แอสปาราจिन (Asn) และกลูตามีน (Gln) โดยจะปลดปล่อยแอมโมเนียตามรูปที่ 2.6 ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปลดปล่อยมานี้ถือเป็นตัวบ่งชี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของดีแอมิเดชันได้ (Hamada, 1992)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันของกลูตามีน  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Hamada (1992)

การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันสามารถทำได้ทั้งการวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และการใช้เอนไซม์

#### 2.2.1.1.1 ดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีทางกายภาพ

สำหรับวิธีทางกายภาพนั้นทำได้หลากหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การใช้ความดัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Metwalli and Van Boekel (1998) ที่ได้ทดลองตัดแปรโปรตีนเคซีนจากนมด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้ความร้อน 110 และ 145 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0-120 นาที พบว่า เป็นวิธีที่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเป็นจำนวนมาก เมื่อตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนที่ปลดปล่อยออกมา พบว่ามีเพียง 10-15% ที่เป็นแอมโมเนียที่คาดว่าจะเกิดจากปฏิกิริยาแอมิเดชัน

#### 2.2.1.1.3 ดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีทางเคมี

การตัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันอีกวิธีหนึ่งที่มีความนิยมคือวิธีทางเคมี เช่นการใช้กรด และการใช้ด่าง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปฏิกิริยาดีแอมิเดชันมีหลายประการ เช่น ชนิดของกรดที่ใช้ เป็นต้น ซึ่งกรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซिटริก กรดซัคซินิก และกรดมาลิก Liao et al. (2010) ศึกษาการตัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีด้วยกรดซัคซินิกและกรดซिटริก พบว่า ในช่วง 10 นาทีแรกของการทำปฏิกิริยา กรดซัคซินิกสามารถเร่งให้เกิดดีแอมิเดชันได้เร็วกว่ากรดซिटริก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที ค่า degree of deamidation (DD) ของโปรตีนที่ใช้กรดทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่า DD มากกว่า 50% นอกจากนี้ Lei et al. (2015) ศึกษาการใช้กรดซिटริกและกรดมาลิกในการตัดแปรกลูเตลินจาก *Akebia trifoliata* ผลปรากฏว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ตัดแปรด้วยกรดซिटริกมีค่า DD มากกว่า 55% ซึ่งสูงกว่าการตัดแปรด้วยกรดมาลิกอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นจากการตัดแปรด้วยกรดซिटริกมีค่าสูงกว่ากรดมาลิกด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลจากการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการตัดแปรกลูเตลินจากข้าวบาร์เลย์ พบว่า DD มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของด่าง และระยะเวลาการตัดแปรเพิ่มขึ้น โดยมีค่า DD เท่ากับ 43% เมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 M ตัดแปรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Zhao et al., 2011)

อย่างไรก็ตามการตัดแปรด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมีมีข้อเสียคือทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นต้น รวมทั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นค่อนข้างรุนแรง และไม่มี ความจำเพาะกับสารตั้งต้น การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันด้วยการใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ

### 2.2.1.1.3 ดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ที่สามารถใช้ในการตัดแปรโปรตีนด้วยปฏิกิริยาดีแอมิเดชันมีหลายชนิดซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะและมีปฏิกิริยาข้างเคียงแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์สำหรับตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันได้แก่ โปรติเอส เปปติโดกลูตามิเนส ทรานส์กลูตามิเนส และโปรตีนกลูตามิเนส เป็นต้น

#### 2.2.1.1.3.1 โปรติเอส (protease)

เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสมีหลายชนิด เช่น ปาเปน ทริปซิน และโคโมทริปซิน ซึ่งในสภาวะกรดหรือกลาง ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากการเร่งโดยเอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่ในสภาวะต่าง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดได้น้อยมาก ในขณะที่เดียวกันจะสามารถเกิดปฏิกิริยาชนิดอื่นแทน เช่น ดีแอมิเดชัน Kato et al. (1987) ศึกษาการเกิดดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสข้างต้นในสภาวะต่าง พบว่าเอนไซม์ปาเปน และโคโมทริปซินสามารถเร่งการเกิดดีแอมิเดชันได้ในช่วง pH 10.0 และช่วงอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยมี DD ไม่เกิน 20% และ degree of hydrolysis (DH) ไม่เกิน 10% ส่วนเอนไซม์ทริปซินสามารถเร่งปฏิกิริยาดีแอมิเดชันได้ในช่วง pH เดียวกัน แต่ DD และ DH มีค่าไม่เกิน 5%

#### 2.2.1.1.3.2 เปปติโดกลูตามิเนส (peptidoglutaminase)

เปปติโดกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันได้ในกลูตามีนและแอสปาราจินซึ่งอยู่ในสายเปปไทด์สั้น ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการตัดแปรตัวอย่างที่ผ่านการตัดสายโปรตีนมาแล้ว Hamada (1992) ศึกษาความเป็นไปได้ดังกล่าวในตัวอย่างโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อนเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย ผลปรากฏว่า DD ของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อน มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย

#### 2.2.1.1.3.3 ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase)

เอนไซม์ที่ได้รับความนิยมใช้ในการตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันมากที่สุดคือเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส แต่เอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งการเกิดการจับกันระหว่างกลูตามีนและหมู่อะมิโนบางกลุ่มได้ด้วยเช่นกัน Motoki et al. (1986) ศึกษาการเกิดดีแอมิเดชันในเคซีนโดย

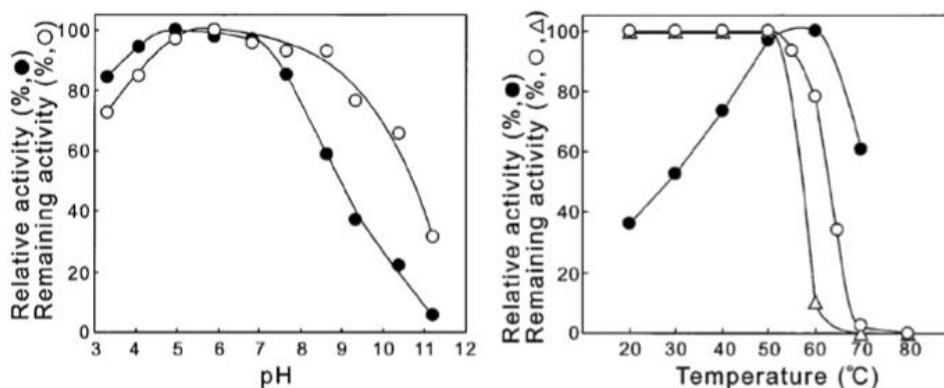
ควบคุมไม่ให้เกิดการจับกันของกลูตามีนกับหมู่อะมิโน ทางคณะผู้วิจัยได้ใช้กระบวนการ citraconylation เพื่อจับกับหมู่อะมิโนอิสระที่สามารถจับกับกลูตามีนได้ Agyare et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการดัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีโดยใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส พบว่า ความสามารถในการละลายในช่วง pH = 4.0 – 7.0 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำการดัดแปรโปรตีนเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และยังมีการศึกษาการดัดแปรโปรตีนจากถั่วเหลืองโดย Babiker (2000) ซึ่งได้ดัดแปรโดยใช้เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและโฟมของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปร มีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

#### 2.2.1.1.3.4 โปรตีนกลูตามิเนส (PG)

โปรตีนกลูตามิเนส (EC 3.5.1) เป็นเอนไซม์ที่มีการค้นพบในปี 2000 จากแบคทีเรีย *Chryseobacterium proteolyticum* ที่พบในดิน (Yamaguchi and Yokoe, 2000) ซึ่ง Scheuplein et al. (2007) ศึกษาถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อตัวนี้เพื่อป้องกันความปลอดภัยของเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส โดยได้ศึกษาด้านความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ ความเป็นพิษของเอนไซม์ที่มีต่อหนูในระยะเวลา 90 วัน และโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ พบว่า *C. proteolyticum* มีความสามารถในการก่อโรคต่ำ ไม่ส่งผลกระทบต่ออวัยวะ เลือด การขับถ่ายและน้ำหนักของหนูทดลองเมื่อได้รับเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณไม่เกิน 2,500 mg/น้ำหนักตัว/วัน ทางอาหาร และไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ในการดัดแปรโปรตีนในอาหาร ซึ่งปัจจุบันเอนไซม์ชนิดนี้ได้ผ่านการรับรองจาก USFDA ว่ามีความปลอดภัยในการนำมาใช้ generally recognized as safe (GRAS) (US FDA, 2008)

โปรตีนกลูตามิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันในกลูตามีนที่อยู่ในสายโปรตีนได้ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับกลูตามีนอิสระ แอสปาราจีน และเอไมด์ตัวอื่น ๆ เอนไซม์ชนิดนี้มีค่า pI = 10.0 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kDa จากงานวิจัยของ Yamaguchi et al. (2001) ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของโปรตีนกลูตามิเนสในช่วง pH และช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือระหว่าง 5-7 และช่วงอุณหภูมิคือ 50-60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 5-9 และช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (แสดงในรูปที่ 2.7)





รูปที่ 2.6 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส  
 ซ้าย: pH; ●: relative activity เทียบกับที่ pH 5.0, ○: remaining activity เทียบกับตอนเริ่มต้น  
 ขวา: อุณหภูมิ; ●: relative activity เทียบกับที่อุณหภูมิ 60°C, ○: remaining activity ที่  
 ระยะเวลา 10 นาที และ △: remaining activity ที่ระยะเวลา 60 นาที

ที่มา: Yamaguchi et al. (2001)

นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีแอมิเดชันของโปรตีนกลูตามิเนสยัง  
 ขึ้นกับชนิดของสารตั้งต้นอีกด้วย โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในโปรตีนกลุ่มเคซีนและโปรตีนสายยาว  
 มากกว่าสายสั้นดังแสดงในรูปที่ 2.8 (Yamaguchi et al., 2001)

| Protein substrate  | Specific activity<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{a}}$ ) |
|--|--|
| $\alpha$ -Casein, bovine milk                            | 19.12 $\pm$ 0.51   |
| $\beta$ -Casein, bovine milk                             | 18.11 $\pm$ 0.15   |
| $\alpha$ -Lactalbumin, bovine milk                       | 0.836 $\pm$ 0.009  |
| $\beta$ -Lactoglobulin, bovine milk                      | 0.728 $\pm$ 0.001  |
| Serum albumin, bovine                                    | 0.009 $\pm$ 0.001  |
| Ovalbumin, chicken egg                                   | 0.005 $\pm$ 0.002  |
| Gluten, wheat <sup>b</sup>                               | 7.200 $\pm$ 0.333  |
| Gliadin, wheat <sup>b</sup>                              | 5.473 $\pm$ 0.017  |
| Zein, corn <sup>b</sup>                                  | 0.655 $\pm$ 0.176  |
| Soy protein isolate                                      | 1.170 $\pm$ 0.064  |
| Collagen, Type I,<br>bovine Achilles tendon <sup>b</sup> | 0.177 $\pm$ 0.017  |
| Gelatin, Type B, bovine skin                             | 0.696 $\pm$ 0.100  |
| Muscle acetone powder,<br>chicken breast <sup>b</sup>    | 0.210 $\pm$ 0.034  |
| Myoglobin, horse skeletal muscle                         | 0.014 $\pm$ 0.001  |
| Actin, bovine muscle                                     | 0.450 $\pm$ 0.022  |
| RNase A, bovine pancreas                                 | 2.912 $\pm$ 0.367  |
| $\alpha$ -Chymotrypsinogen A,<br>bovine pancreas         | 0.650 $\pm$ 0.118  |
| Aprotinin, bovine lung                                   | 0.224 $\pm$ 0.064  |

<sup>a</sup> Assays were carried out in triplicate. <sup>b</sup> A suspension of proteins in the reaction mixture was used.

รูปที่ 2.7 specific activity ของโปรตีนกลูตามิเนสในสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Yamaguchi et al. (2001)

### 2.2.1.2 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นอีกปฏิกิริยาที่มีสำคัญในโปรตีนเนื่องจากส่งผลถึงคุณภาพของโปรตีนนั้น ๆ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้เกิดการทำให้การทำให้พันธะเปปไทด์ในโครงสร้างระดับปฐมภูมิ โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของโปรตีนในระดับอื่น ๆ จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน ซึ่งส่งผลให้สมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสสามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาชนิดนี้ได้ เช่น การตัดแปรโปรตีนจากถั่วโดยใช้โปรติเอสจะทำให้ความสามารถในการละลายและความสามารถในการเกิดอิมัลชันดีขึ้น แต่ความเสถียรในการเกิดอิมัลชันลดลง เป็นต้น (ทัพพสารใจแก้ว, 2556; Thaiphantit and Anprung, 2016)

### 2.2.1.3 การเสถียรภาพด้วยความร้อน

ความร้อนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลถึงคุณภาพของโปรตีนเนื่องจากความร้อนสามารถทำลายอันตรกิริยาภายในและภายนอกโมเลกุลของโครงสร้างโปรตีนในระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงและจัดเรียงตัวใหม่ โครงสร้างของโปรตีนจะเปิดเผยพื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำ

และปลดปล่อยโปรตีนสายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่ถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างตติยภูมิ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจึงเปลี่ยนแปลงไป เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดโฟม และความหนืดของสารละลายโปรตีน (Boye et al., 1997)

#### 2.2.1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีน

ในการตัดแปรโปรตีนจะมีปัจจัยที่ส่งผลถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาอยู่หลายปัจจัยขึ้นกับวิธีการตัดแปร เช่น การตัดแปรโดยใช้กรดจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาเกิดปฏิกิริยา เป็นต้น การตัดแปรโดยใช้เอนไซม์จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน อุณหภูมิ pH และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อทุกวิธีการตัดแปร คือ ชนิดและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ในการตัดแปร

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนจึงจำเป็นต้องวางแผนการทดลองที่เหมาะสม วิธีผิวตอบสนอง (response surface methodology) และวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) เป็นทางเลือกหนึ่ง โดยวิธีนี้จะเป็นการสร้างพื้นผิวสามมิติที่ทำนายผลจากทดลองที่สภาวะต่าง ๆ ได้อย่างครอบคลุม พื้นผิวแบบสามมิติจะวาดจากสมการที่ได้จากผลการทดลอง โดยมีลักษณะเป็นสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (สมการที่ 2.1) หรือสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (สมการที่ 2.2) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544)

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.1)$$

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^{n-1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.2)$$

เมื่อ  $x_i$  คือ ปัจจัยที่หนึ่ง

$x_j$  คือ ปัจจัยที่สอง

$\beta_0$  คือ จุดตัดหรือค่าคงที่

$\beta_i$  คือ ผลเชิงเส้นตรง

$\beta_{ii}$  คือ ผลเชิงเส้นโค้ง

$\beta_{ij}$  คือ ผลเชิงของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของตัวแปร

$\varepsilon$  คือ เทอมของความคลาดเคลื่อนสุ่ม

วิธีหิวตบสนอง เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมทั้งในงานวิจัยในอาหารและอุตสาหกรรมประเภทอื่น โดยใช้ในการหาสภาวะการทดลองด้วยเอนไซม์เช่น การหาสภาวะการตัดแปรแลคโตสด้วยเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ปัจจัยที่ใช้ศึกษามีทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และ pH และการหาสภาวะในการสกัดคอลลาเจนจากเปลือกไข่ที่มีปัจจัย 4 ปัจจัย ได้เป็นแผนการทดลอง 30 ตำแหน่งที่ครอบคลุมช่วงที่ศึกษา (Das et al., 2015; Mohammadi et al., 2016)

จากงานวิจัยในอดีตบ่งชี้ถึงช่วงการทำงานของเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส แต่ในตัวอย่างโปรตีนแต่ละชนิดมีช่วงการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์แตกต่างกัน เช่น  $\alpha$ -lactalbumin มีความเหมาะสมในสภาวะ pH = 7.0 และอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างนมพร่องมันเนยจะมีความเหมาะสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และในโปรตีนกลูเตนจากข้าวสาลี สภาวะที่เหมาะสมคือ pH = 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามในโปรตีนบางชนิดอาจจะใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในเกิดดีเอมิเดชัน เช่น การเติมเอทานอลในการตัดแปรโปรตีน  $\alpha$ -zein จากข้าวโพด การใช้วิธีหิวตบสนองจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาการตัดแปรโปรตีนโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (Gu et al., 2001; Yong et al., 2004; Yong et al., 2006; Miwa et al., 2010)

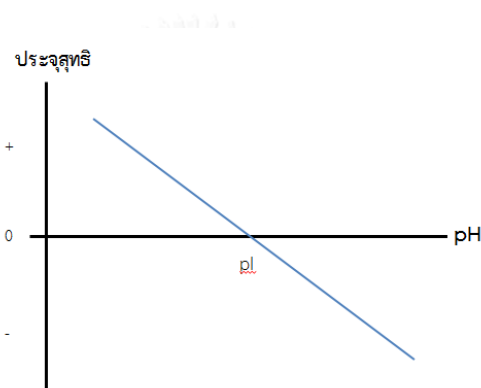
## 2.2.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ คือสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการอู่น้ำและน้ำมัน สมบัติการเกิดอิมัลชัน และ สมบัติการเกิดโฟม สมบัติเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกัน เช่น ถ้าความสามารถในการละลายต่ำ สมบัติในการเกิดอิมัลชันจะต่ำด้วยเช่นกัน เป็นต้น ทำให้การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมีความซับซ้อน อย่างไรก็ตาม สมบัติเชิงหน้าที่บางประการที่มีค่าต่ำไม่ได้แปลว่าเป็นสมบัติที่ไม่ดี เพราะผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างจะมีความต้องการสมบัติเชิงหน้าที่ที่แตกต่างกันด้วย

### 2.2.2.1 สมบัติการละลาย

ในการนำโปรตีนไปใช้ในผลิตภัณฑ์ ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากโปรตีนที่สามารถละลายได้ดีจะสามารถนำไปใช้ได้ง่ายและหลากหลาย นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นสมบัติที่สำคัญเนื่องจากส่งผลถึงสมบัติเชิงหน้าที่อื่น ๆ เช่น สมบัติการเกิดอิมัลชัน สมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการละลายของ

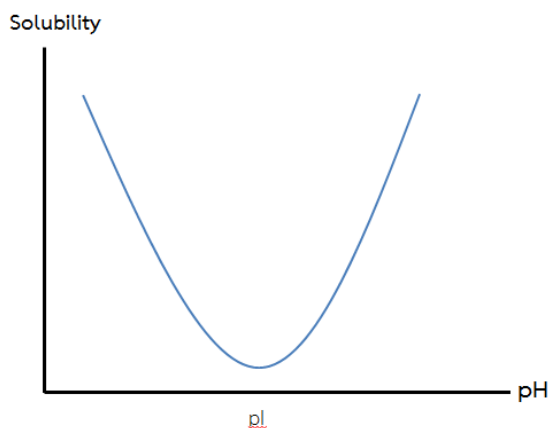
โปรตีนมีหลายประการ เช่น ชนิดของโปรตีนซึ่งมีความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุล ชนิดและการจัดเรียงตัวของโปรตีน และสถานะของสารละลาย เช่น ความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ionic strength ชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย การละลายของโปรตีนจะเกิดจากการที่โปรตีนสร้างอันตรกิริยากับน้ำ โดยจะมีอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องอยู่สองชนิด คือ hydrophobic interaction อันตรกิริยาชนิดนี้จะเกิดระหว่างโปรตีนและโปรตีน ทำให้โปรตีนสามารถสร้างอันตรกิริยากับน้ำได้น้อยลง ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงลดลงเมื่ออันตรกิริยาชนิดนี้เพิ่ม และ ionic interaction ซึ่งจะเป็นอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำ เมื่ออันตรกิริยาชนิดนี้เพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Sikorski, 2006; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 2.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประจุสุทธิของโปรตีนกับ pH

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sikorski (2006)

โปรตีนแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงของประจุขึ้นกับ pH ในสถานะที่ประจุสุทธิของโปรตีน 0 จะถือเป็น isoelectric point (pI) ดังรูปที่ 2.9 นอกจากนี้ที่ pI ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะมีค่าน้อยที่สุดดังรูปที่ 2.10 ความสามารถในการละลายที่ต่ำที่ pI เป็นผลมาจากการที่โปรตีนมีประจุสุทธิเป็น 0 ค่า electrostatic repulsion จึงมีค่าน้อยมาก โปรตีนจึงเกิดการรวมตัวกันเนื่องจากเกิด hydrophobic interaction ได้ดี ในขณะที่เดียวกันโปรตีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้น้อย ความสามารถในการละลายจึงลดลง (Damodaran et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม ค่า pI ยังคงขึ้นกับชนิดโปรตีน เช่น Yong et al. (2006) ศึกษาการดัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีด้วยการทำดีแอมิเดชัน พบว่า ความสามารถในการละลายของกลูเตนมีค่าลดลงที่ pH = 3.0 และมีค่าเพิ่มขึ้นที่ pH = 5.0 และ 7.0 ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของ pI ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการละลายของโปรตีนกับ pH  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Sikorski (2006)

#### 2.2.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

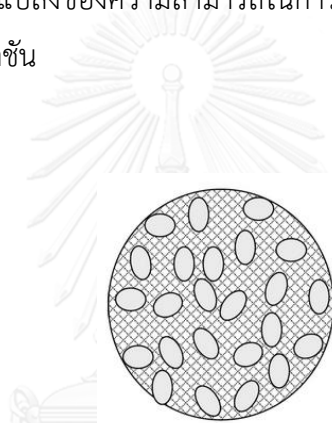
ความสามารถในการอุ้มน้ำจะส่งผลถึงเนื้อสัมผัสของอาหาร เช่น ทำให้อาหารมีความฉ่ำน้ำ และสามารถกักเก็บน้ำเมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ ไปได้ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำคือชนิด ขนาด และความมีขั้วของโปรตีนที่ส่งผลถึงการเกิดอันตรกิริยากับน้ำ จากงานวิจัยในโปรตีนจากคาโนลา พบว่าเมื่อโปรตีนมีขนาดที่เล็กลงจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้มากขึ้น เนื่องจากเปปไทด์สายสั้นจะมีพื้นที่ที่ชอบน้ำมากกว่าเปปไทด์สายยาว นอกจากนี้ชนิดของโปรตีนมีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำเช่นเดียวกัน จากตารางที่ 2.3 แสดงถึงความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับน้ำของกรดอะมิโนแต่ละชนิด พบว่ากรดอะมิโนในโครงสร้างที่มีประจุจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีกว่า โดยถ้าสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีจะสามารถอุ้มน้ำได้ดีเช่นกัน (Damodaran et al., 2007; Cumby et al., 2008)

ตารางที่ 2.3 ความสามารถในการจับกับน้ำของกรดอะมิโน

| Amino acid residue | Binding capacity<br>(moles H <sub>2</sub> O/mole residue) |
|--------------------|---|
| Polar              |   |
| Asn                | 2   |
| Gin                | 2   |
| Pro                | 3   |
| Ser,The            | 2   |
| Trp                | 2   |
| Asp (unionized)    | 2   |
| Glu (unionized)    | 2   |
| Tyr                | 3   |
| Arg (unionized)    | 3   |
| Lys (unionized)    | 4   |
| Ionic              |   |
| Asp <sup>-</sup>   | 6   |
| Glu <sup>-</sup>   | 7   |
| Tyr <sup>-</sup>   | 7   |
| Arg <sup>+</sup>   | 3   |
| His <sup>+</sup>   | 4   |
| Lys <sup>+</sup>   | 4   |
| Nonpolar           |   |
| Ala                | 1   |
| Gly                | 1   |
| Phe                | 0   |
| Val,Ile,Leu,Met    | 1   |

ที่มา: Damodaran et al. (2007)

ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของโปรตีนจะส่งผลถึงเนื้อสัมผัสเช่นกัน โดยส่งผลถึงความเนียนของผลิตภัณฑ์ ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำมันมีลักษณะคล้ายคลึงกับความสามารถในการอุ้มน้ำ คือ ขนาด และความมีขี้ของโปรตีน แต่ปัจจัยที่มีผลกับความสามารถในการอุ้มน้ำมันมากที่สุดคือความสามารถในการดักจับกับน้ำมันทางกายภาพ (physical entrapment) ซึ่งได้แสดงในรูปที่ 2.11 การดักจับน้ำมันทางกายภาพคือการตรึงน้ำมันโดยไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวอย่างกับน้ำมัน เช่น การตรึงไว้ที่ช่องว่างระหว่างตัวอย่าง ดังนั้นความหนาแน่นรวม (bulk density) จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งส่งผลถึงสมบัตินี้ เนื่องจากความหนาแน่นรวมจะบ่งชี้ถึงพื้นที่หรือช่องว่าง (void) ที่สามารถดักจับน้ำมันทางกายภาพได้ Mirmoghtadaie et al. (2009) ทำการทดลองตัดแปรโปรตีนจาก okara ด้วยการทำให้แอมิเดชัน พบว่าความสามารถในการอุ้มน้ำมันเพิ่มขึ้น โดยเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการดักจับน้ำมันทางกายภาพที่เพิ่มมากขึ้น มากกว่าผลจากการทำให้แอมิเดชัน



รูปที่ 2.10 การดักจับทางกายภาพ (physical entrapment)

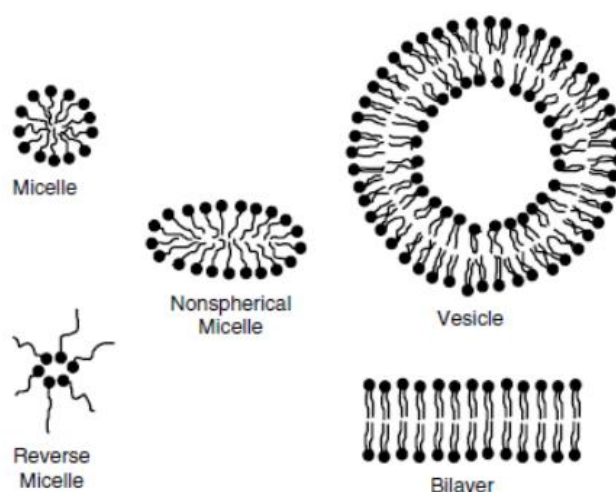
ที่มา: Nedovic et al. (2001)

### 2.2.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นอิมัลชันทำให้สมบัติการเกิดอิมัลชันมีความสำคัญมากขึ้น สมบัติการเกิดอิมัลชันคือความสามารถของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในระบบอิมัลชันเพื่อให้อิมัลชันเกิดความเสถียร โปรตีนสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้เนื่องจากมีลักษณะเป็น amphiphilic คือประกอบไปด้วยบริเวณที่ชอบและไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถจัดโครงสร้างในลักษณะชั้นฟิล์มที่ครอบคลุมสารหนึ่งได้ ดังรูปที่ 2.12 อย่างไรก็ตาม การเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ โดยเฉพาะชนิดของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงความชอบและไม่ชอบน้ำ รวมถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอีกด้วย ชั้นฟิล์มของโปรตีนเกิดจากอันตรกิริยาสองกลุ่ม คือ hydrophobic interaction และ ionic interaction โดย hydrophobic interaction



จะเกิดในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ หากเกิดอันตรกิริยานี้มากเกินไปจะทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน ซึ่งจะ  
ทำให้ชั้นฟิล์มไม่สมบูรณ์ แต่ถ้ามีค่า electrostatic repulsion ที่มากเกินไป หรือเกิด ionic  
interaction ได้ดี จะทำให้โปรตีนเกิดการผลักกันจนเกิดเป็นชั้นฟิล์มที่บางและไม่เสถียร จึง  
จำเป็นต้องสร้างความสมดุลระหว่างอันตรกิริยาทั้งสองซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่า hydrophilic-  
lipophilic balance (HLB) ค่า HLB จะบ่งชี้ถึงอัตราส่วนของพื้นที่ที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของ  
อิมัลซิไฟเออร์ชนิดนั้น ๆ ทำให้สามารถเลือกใช้อิมัลซิไฟเออร์ที่เหมาะสมกับระบบอิมัลชันนั้น ๆ  
(Pearce and Kinsella, 1978; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 2.11 การจัดเรียงตัวของอิมัลซิไฟเออร์ในรูปแบบต่าง ๆ  
ที่มา: McClements (2015)

สมบัติการเกิดอิมัลชันจะพิจารณาจากความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion capacity, EC) ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying activity index, EAI) และ ความเสถียรของอิมัลชัน (emulsifying stability index, ESI)

Lei et al. (2015) ศึกษาผลของการตัดแปรงกลูเตลินที่สกัดจากเมล็ด *Akebia trifoliata* var. *australis* ด้วยวิธีดีเอมิเดชัน พบว่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรงด้วยกรดมาลิกมีค่าเพิ่มขึ้นใน สภาวะกรด แต่มีค่าลดลงในสภาวะต่าง ในขณะที่กลูเตลินที่ผ่านการตัดแปรงด้วยกรดซิตริกมีค่า EAI เพิ่มขึ้นทั้งในช่วงกรดและต่าง เมื่อพิจารณาค่า ESI ปรากฏว่าการตัดแปรงด้วยวิธีดีเอมิเดชันทำให้ ความเสถียรของอิมัลชันลดลงโดยเฉพาะเมื่อตัดแปรงด้วยกรดซิตริก

#### 2.2.2.4 สมบัติการเกิดโฟม

สมบัติการเกิดโฟมจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับสมบัติการเกิดอิมัลชัน โดยสมบัติการเกิดโฟมคือความสามารถในการห่อหุ้มอากาศที่บริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว และคงรูปโฟมดังกล่าวไว้ได้ ในขณะที่อิมัลชันคือการสร้างชั้นฟิล์มห่อหุ้มของเหลว แต่อย่างไรก็ตาม สมบัติการเกิดโฟมจะมีอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด คือ hydrophobic interaction และ ionic interaction เช่นเดียวกัน โดย hydrophobic interaction จะทำให้เกิดการสร้างชั้นฟิล์มที่ดีซึ่งถือเป็นการเพิ่มความสามารถในการเกิดโฟม ในขณะที่ hydrophobic interaction จะทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและโปรตีนซึ่งเป็นการเพิ่มความเหนียวของฟิล์มและทำให้โฟมที่เกิดขึ้นมีความเสถียร ทำให้ชนิดและการจัดเรียงตัวของโปรตีนเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดโฟม นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีนยังเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลถึงสมบัติการเกิดโฟมเนื่องจากโปรตีนที่ละลายได้ดีจะทำให้ความเหนียวของชั้นฟิล์มเพิ่มขึ้น โฟมที่ได้จึงมีความเสถียร (ศุภกรจิตต์ เอี่ยมนเรพร, 2551; Damodaran et al., 2007)

สมบัติการเกิดโฟมจะพิจารณาจากความสามารถในการเกิดโฟม (foaming capacity, FC) และความเสถียรของโฟมที่เกิดขึ้น (foaming stability, FS) การดัดแปรโปรตีนส่งผลต่อสมบัติการเกิดโฟม เช่น การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธีดีเอมิเดชันจะทำให้ FC มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ความเสถียรของโฟมมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Suppavorasatit et al., 2011)

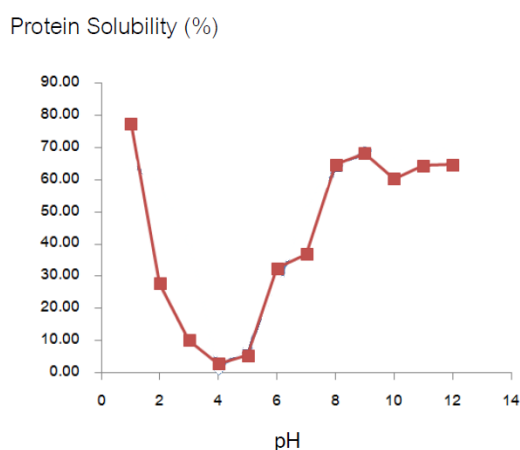
#### 2.2.2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนมะพร้าวอย่างจำกัด โดยมีการศึกษาถึงสมบัติเชิงหน้าที่แค่บางประการ เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับน้ำและน้ำมัน และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น

##### 2.2.2.5.1 ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวจะขึ้นกับวิธีการสกัดโปรตีน แต่ pH ประมาณ 4.0 จะเป็นสภาวะที่โปรตีนสามารถละลายได้น้อยที่สุด ซึ่งถือเป็น pI ของโปรตีนมะพร้าว Onsaard et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดวิธีที่ต่างต่างกัน คือ การสกัดด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด และการสกัดโปรตีนด้วยการใช้ความร้อนและความเย็น (freeze-warm cycle) พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 7.0 ที่สกัดด้วยการใช้ความร้อนและความเย็นสูงกว่า (45 %) การสกัดด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด (20%) นอกจากนี้ Thaiphanit and Anprung (2013) ได้ทำการสกัด

โปรตีนมะพร้าวด้วยการตกตะกอนด้วยกรดเช่นเดียวกัน พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่เปลี่ยนแปลงไปตาม pH เป็นดังรูปที่ 2.13 โดยมีความสามารถในการละลายต่ำในช่วง pH = 3.0-7.0 และสามารถละลายได้ดีต่ำที่สุดที่ pH = 4.0 หรือที่ pI



รูปที่ 2.12 pH solubility profile ของโปรตีนมะพร้าว  
ที่มา: Thaiphanit and Anprung (2013)

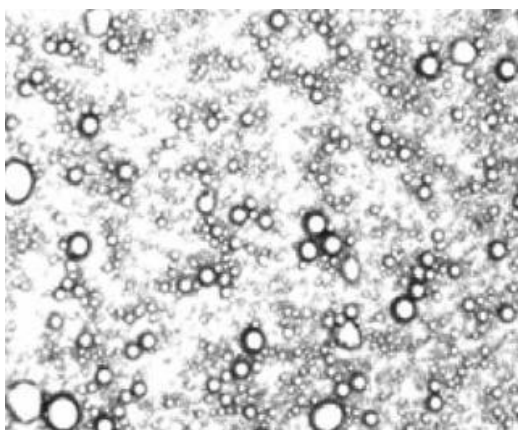
#### 2.2.2.5.2 ความสามารถในการจับกับน้ำและน้ำมัน

ความสามารถในการจับกับน้ำและน้ำมันของโปรตีนมะพร้าวได้มีการศึกษาโดย Kwon et al. (1996) ซึ่งได้สกัดโปรตีนมะพร้าวโดยใช้เทคนิค ultrafiltration จากเนื้อมะพร้าวที่ผลิตขึ้นจากห้องทดลอง (CPC-L) และจากอุตสาหกรรม (CPC-C) พบว่า ความสามารถในการจับกับน้ำของโปรตีนมะพร้าวจากเนื้อมะพร้าวทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่าง ในขณะที่ความสามารถในการจับกับน้ำมันของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากเนื้อมะพร้าวในห้องทดลองมีค่าน้อยกว่าจากอุตสาหกรรม

#### 2.2.2.5.3 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน

อิมัลชันที่เกิดจากการใช้โปรตีนมะพร้าวเป็นอิมัลซิไฟเออร์มักเป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) โดยความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับชนิดของน้ำมันที่ใช้ทำอิมัลชันด้วย เช่น Thaiphanit and Anprung (2016) ได้ศึกษาการเกิดอิมัลชันของโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมัน 2 ชนิด คือ น้ำมันมะกอก และน้ำมันดอกทานตะวัน พบว่าค่า EAI ของอิมัลชันทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ  $40 \text{ m}^2/\text{g}$  ในขณะที่ค่า ESI มีความแตกต่างกัน โดย

อิมัลชันที่ใช้น้ำมันมะกอกมีค่า ESI = 120 min และอิมัลชันที่ใช้น้ำมันดอกทานตะวันมีค่า ESI = 15 min นอกจากนี้ Onsaard et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการทำอิมัลชันจากโปรตีนมะพร้าวโดยใช้ น้ำมันข้าวโพด พบว่าอิมัลชันที่เกิดมีลักษณะดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 Photomicrographs ของอิมัลชันจากโปรตีนมะพร้าวและน้ำมันข้าวโพด  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Onsaard et al. (2006)



### บทที่ 3

## อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

##### 3.1.1 วัสดุดิบ

หางกะทิจากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบสกัดเย็น (วิสาหกิจชุมชนกลุ่ม 100 พันมะพร้าวไทย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์)

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

น้ำมันปาล์ม ตรามรกต (บริษัท มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด)

##### 3.1.2 สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) (A.R.)

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) (A.R.)

กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) (A.R.)

กรดบอริก (boric acid) (A.R.)

Kjeldahl tablet (A.R.)

Methyl red (A.R.)

Methylene blue (A.R.)

เอทานอล (ethanol) (A.R.)

ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) (A.R.)

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium di-hydrogen phosphate) (A.R.)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphate) (A.R.)

|   |        |
|---|--------|
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium di-hydrogen phosphate)            | (A.R.) |
| กรดซิตริก (citric acid)   | (A.R.) |
| Trichloroacetic acid (TCA)  | (A.R.) |
| Bovine serum albumin (99%)  | (A.R.) |
| Tris-buffer saline (TBS)  | (A.R.) |
| กรดอะซิติก (acetic acid)  | (A.R.) |
| โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate)   | (A.R.) |
| sodium dodecyl sulfate (SDS)  | (A.R.) |
| Gel electrophoresis reagent (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., US) |        |
| - LDS sample buffer   |        |
| - Reducing agent  |        |
| - MES buffer  |        |
| - Antioxidant agent   |        |
| - Protein marker (Seeblue plus 2 pre-stain)                             |        |
| Simply blue safe stain (Thermo Fisher Scientific, Inc., US)             |        |
| Ammonia colorimetric assay kit II (Biovision Inc., Milpitas, CA)        |        |
| DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)              |        |

### 3.1.3 อุปกรณ์

|  |
|--|
| เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S, Switzerland)   |
| Refrigerate centrifuge (Hermle รุ่น Z36HK, Germany)      |
| pH meter (Mettler Toledo รุ่น Sevencompact, Switzerland) |
| Digester (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)                 |

Scrubber (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)

Distillation Unit (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

Freeze dryer (Heto Drywinner, Thermo Fisher Scientific, Inc., US)

Test sieve 20 Mesh (Endecotts, UK)

Water bath (GFL รุ่น 1083, Germany)

Hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK)

Dialysis tubing (SnakeSkin, Thermo Fisher Scientific, Inc., US)

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

Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc. รุ่น 20 GENESYS, US)

Homogenizer ชนิด high shear disperser (Ystral รุ่น X10/25 , Germany)

Incubator (Heraeus รุ่น B5042, Germany)

Gel electrophoresis XCell SureLock (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., US)

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

Microwave (LG รุ่น MC766YS, South Korea)

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

### 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.2.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

การสกัดโปรตีนจากมะพร้าวดัดแปลงจากวิธีของ Thaiphanit and Anprung (2013) โดยสกัดโปรตีนจากหางกะทิโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N ที่ pH ของโปรตีนมะพร้าว (pH = 3.9) แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,900xg เป็นระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 150 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH = 3.9 และปั่นเหวี่ยงซ้ำทั้งหมด 4 รอบ หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Kjeldahl (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.2) โดยใช้ conversion factor เป็น 6.25 (AOAC, 2000) โปรตีนที่ได้จะต้องมีปริมาณโปรตีนเป็น

องค์ประกอบไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงถือว่าเป็น protein concentrate จากนั้นทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีนและไขมัน (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.1-ก.3) บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 Mesh จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในถุงบรรจุแบบที่บดแสงจนกว่าจะทำการศึกษาในขั้นถัดไป

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส

3.2.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง

ศึกษาสภาวะการตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส โดยจำลองสภาวะที่ตัดแปรโปรตีนจากถั่วเหลือง (Suppavorasatit et al., 2011) และใช้วิธีผิวตอบสนองโดยวางแผนการทดลองแบบ CCD มีปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน (E/S ratio) ในช่วงระหว่าง 5-50 unit/g protein อุณหภูมิระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 5-9 ดังแสดงในตารางที่ 3.1



ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองในการศึกษาการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้ เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (ค่าสมมติและค่าจริง)

| Design point | code  |       |       | actual value                   |                      |     |
|--------------|-------|-------|-------|--------------------------------|----------------------|-----|
|              | $x_1$ | $x_2$ | $x_3$ | E/S ratio<br>(unit/ g protein) | T<br>( $^{\circ}$ C) | pH  |
| 1            | -1    | -1    | -1    | 14                             | 44                   | 5.8 |
| 2            | 1     | -1    | -1    | 41                             | 44                   | 5.8 |
| 3            | -1    | 1     | -1    | 14                             | 56                   | 5.8 |
| 4            | 1     | 1     | -1    | 41                             | 56                   | 5.8 |
| 5            | -1    | -1    | 1     | 14                             | 44                   | 8.2 |
| 6            | 1     | -1    | 1     | 41                             | 44                   | 8.2 |
| 7            | -1    | 1     | 1     | 14                             | 56                   | 8.2 |
| 8            | 1     | 1     | 1     | 41                             | 56                   | 8.2 |
| 9            | -1.68 | 0     | 0     | 5                              | 50                   | 7   |
| 10           | 1.68  | 0     | 0     | 50                             | 50                   | 7   |
| 11           | 0     | -1.68 | 0     | 22.5                           | 40                   | 7   |
| 12           | 0     | 1.68  | 0     | 22.5                           | 60                   | 7   |
| 13           | 0     | 0     | -1.68 | 22.5                           | 50                   | 5   |
| 14           | 0     | 0     | 1.68  | 22.5                           | 50                   | 9   |
| 15           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |
| 16           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |
| 17           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |
| 18           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |
| 19           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |
| 20           | 0     | 0     | 0     | 22.5                           | 50                   | 7   |

ทำการตัดแปรโดยละลายโปรตีนมะพร้าวความเข้มข้น 10 mg/ml ใน 0.01 M citrate-phosphate-borate buffer (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ข) จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสในอัตราส่วนต่าง ๆ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาใน water bath เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส แล้วคงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างโปรตีนตัดแปรที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย trichloroacetic acid ความเข้มข้น 0.4 M ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

#### 3.2.2.1.1 Degree of deamidation (ตัดแปลงวิธีจาก Suppavorasatit et al. (2011))

นำส่วนใสของตัวอย่างมาวัดปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปลดปล่อย โดยใช้ ammonia colorimetric assay kit II (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.4) ค่า degree of deamidation (DD, %) คำนวณจากปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างเทียบกับปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2 N ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ย่อยอย่างสมบูรณ์)

#### 3.2.2.1.2 Degree of hydrolysis (ตัดแปลงจากวิธีของ Cabra et al. (2007))

นำส่วนใสของตัวอย่างมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลาย โดยใช้ DC protein assay (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.5) ค่า degree of hydrolysis (DH, %) คำนวณจากปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับในข้อ 3.2.2.1.1

นำข้อมูลมาขึ้นเป็นสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง โดยตัวแปรต้นคือ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน อุณหภูมิ และ pH ตัวแปรตามคือ ค่า DD และ DH ดังสมการที่ 3.1

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.1)$$

|       |              |  |
|-------|--------------|--|
| เมื่อ | $\hat{y}$    | คือ ตัวแปรตาม (DD และ DH)  |
|       | $x_{i,j}$    | คือ ตัวแปรต้น (อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน อุณหภูมิ และ pH) |
|       | $\beta_0$    | คือ ค่าคงที่   |
|       | $\beta_i$    | คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น                                 |
|       | $\beta_{ii}$ | คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง                                 |
|       | $\beta_{ij}$ | คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง          |

การทำนายสมการถดถอยเชิงเส้นโค้งที่ได้ คำนวณโดยใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์ SPSS Statistics software version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) และจากสมการที่ได้นำมาสร้าง surface และ contour plot โดยใช้โปรแกรม Statistica software version 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมทำโดยเลือกสภาวะที่มีค่า DD สูง และค่า DH ต่ำ

การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ทำการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวในสภาวะต่าง ๆ จำนวน 6 สภาวะ แล้ววิเคราะห์ค่า DD และ DH ของตัวอย่าง จากนั้นพิจารณาค่า DD และ DH จากการทดลองเทียบกับค่าที่ได้จากสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง ด้วยแผนการทดลองแบบ completely randomized designs (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 3.2.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชัน

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2.2.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยโปรตีนกลูตามิเนสคือ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนเป็น 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH = 7.0 จึงนำสภาวะดังกล่าวมาศึกษาผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนตัดแปร โดยแปรเวลาในช่วง 0-24 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีดังนี้

#### 3.2.2.2.1 Degree of deamidation

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.1

### 3.2.2.2.2 Degree of hydrolysis

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.2

### 3.2.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

#### 3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

ละลายโปรตีนมะพร้าวใน 0.01 M citrate-phosphate-borate buffer pH = 7.0 ความเข้มข้น 200 mg/ml และเติมโปรตีนกลูตามิเนสในอัตราส่วน 36 unit/g protein นำไปทำปฏิกิริยาใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมง และระหว่างทำปฏิกิริยาคนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ตัวอย่างควบคุมคือโปรตีนจากมะพร้าวที่ละลายใน 0.01 M citrate-phosphate-borate buffer pH = 7.0 ความเข้มข้น 200 mg/ml และแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (ไม่มีการเติมโปรตีนกลูตามิเนส)

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่ระยะเวลาต่าง ๆ และตัวอย่างควบคุมดังนี้

#### 3.2.3.1.1 Degree of deamidation

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.1

#### 3.2.3.1.2 Degree of hydrolysis

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.2

นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปผ่านการ dialysis โดยใช้ dialysis membrane (SnakeSkin, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) ขนาดรูผ่าน 3.5K MWCO ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 M ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 Mesh และบรรจุในถุงแบบทึบแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (โสภิษฐา มีนมณี และ อภิษฎา รัตนนุกรม, 2557)

### 3.2.3.2 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวศึกษาในโปรตีนตัวอย่าง 5 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปร ตัวอย่างโปรตีนควบคุม ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมง

#### 3.2.3.2.1 สมบัติการละลายและ pH solubility profile

สมบัติการละลายศึกษาโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yong et al. (2004) วัดค่าความสามารถในการละลายของโปรตีนโดยละลายโปรตีน 1 มิลลิกรัม ใน 0.1 M acetate-phosphate buffer 1 มิลลิลิตรที่ pH = 3, 5, และ 7 โดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี DC protein assay คำนวณค่าความสามารถในการละลายของโปรตีน จากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.2

pH solubility profile ศึกษาโดยละลายโปรตีนจากมะพร้าว 1 มิลลิกรัมในสารละลาย 0.1 M acetate-phosphate buffer 1 มิลลิลิตรที่ pH 2.4-8.0 โดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี DC protein assay คำนวณค่าความสามารถในการละลายของโปรตีน จากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.2

$$PS(\%) = \frac{PN}{TP} \times 100 \quad (3.2)$$

|       |    |                                   |
|-------|----|-----------------------------------|
| เมื่อ | PS | คือ ความสามารถในการละลายของโปรตีน |
|       | PN | คือ ปริมาณโปรตีนที่ละลาย          |
|       | TP | คือ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น          |

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 3.2.3.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

ความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) และความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (OHC) ศึกษา ดัดแปลงวิธีจาก Sze-Tao and Sathe (2000) โดยผสมโปรตีนจากมะพร้าว 0.1 กรัมกับฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH = 7.0 หรือน้ำมัน 1 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,600xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักส่วนของเหลวและนำมาคำนวณหา WHC และ OHC ดังสมการที่ 3.3

$$LHC = \frac{(Pf - Pi)}{Pi} \quad (3.3)$$

|       |     |  |
|-------|-----|--|
| เมื่อ | LHC | คือ WHC หรือ OHC                                     |
|       | Pi  | คือ น้ำหนักโปรตีนเริ่มต้น                            |
|       | Pf  | คือ น้ำหนักโปรตีนหลังปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13600xg |

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 3.2.3.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

วิเคราะห์ค่า emulsifying activities index (EAI) และค่า emulsifying stability index (ESI) โดยดัดแปลงวิธีของ Pearce and Kinsella (1978) ละลายโปรตีนจากมะพร้าว 0.5% (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นผสมสารละลายโปรตีน 30 มิลลิลิตรกับน้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ ความเร็ว 22,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เจือจางอิมัลชันที่เวลา 0 และ 10 นาทีด้วยอัตราส่วน อิมัลชัน 100 ไมโครลิตรต่อสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 0.1%(w/v) 10 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรและคำนวณหา ค่า EAI และ ESI จากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

$$EAI(m^2/g) = \frac{2T \times A_0 \times \text{dilution factor}}{c \times \Phi \times 10000} \times 100 \quad (3.4)$$

$$ESI (\text{min}) = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times t \quad (3.5)$$

|       |          |   |
|-------|----------|---|
| เมื่อ | T        | คือ ค่าความขุ่น                           |
|       | $A_0$    | คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้น       |
|       | $A_{10}$ | คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 10 นาที       |
|       | c        | คือ น้ำหนักโปรตีนต่อปริมาตร               |
|       | $\Phi$   | คือ สัดส่วนของน้ำมันต่ออิมัลชันโดยปริมาตร |
|       | t        | คือ ระยะเวลา                              |

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 3.2.3.2.4 สมบัติการเกิดโฟม

Foaming capacity (FC) และ foaming stability (FS) ศึกษาโดยดัดแปลงวิธีของ Kanu et al. (2009) และ Segat et al. (2014) ละลายโปรตีนจากมะพร้าว 0.5%(w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.0) ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นตีสารละลายโปรตีน 50 มิลลิลิตรด้วยเครื่องโฮมจีไนเซอร์ให้เกิดโฟมด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วัดปริมาณโฟมที่ได้ตามช่วงเวลา 0, 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที ค่า FC และ FS คำนวณได้จากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ

$$FC(\%) = \frac{V_{Fo} - V_L}{V_L} \times 100 \quad (3.6)$$

$$FS (\%) = \frac{V_{FT}}{V_{Fo}} \times 100 \quad (3.7)$$

|       |          |   |
|-------|----------|---|
| เมื่อ | $V_L$    | คือปริมาตรของสารละลายก่อนทำการตีขึ้นเป็นโฟม         |
|       | $V_{Fo}$ | คือปริมาตรของโฟมที่นาที่ที่ 0                       |
|       | $V_{FT}$ | คือปริมาตรของโฟมที่นาที่ที่ 0, 5, 10, 20, 40 และ 60 |

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 3.2.3.2.5 Molecular weight distribution

Molecular weight distribution ของโปรตีนศึกษาโดยการทำ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงวิธีของ Laemmli (1970) และใช้ Novex NuPAGE SDS-PAGE gel system (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., US) ละลายโปรตีนจากมะพร้าวในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมะพร้าว 100 ไมโครลิตร ผสมกับ LDS sample buffer 100 ไมโครลิตรและ reducing agent 40 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เติม MES buffer 500 มิลลิตรและ antioxidant agent 500 ไมโครลิตรลงใน chamber ของเครื่อง XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis จากนั้นหยอดส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตรในช่องเจล Bis-Tris pre-cast gels โดยใช้ SeeBlue plus 2 pre-stain เป็น protein marker และนำไปผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นระยะเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิตรในเครื่องไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุดเป็นเวลา 45 วินาทีและเทน้ำออก ล้างน้ำกลั่นซ้ำจำนวน 3 รอบ จากนั้นย้อมเจลด้วย Simple Blue Safe Stain นำเจลที่แช่สีย้อมไปเข้าไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุดเป็นเวลา 45 วินาที และแช่เจลทิ้งไว้เป็นเวลา 22 นาที ก่อนจะล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น นำเจลที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยโปรแกรม software GeneSnap version 6.08 (SynGene, UK)



### 3.2.3.2.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

Amino acid profile วิเคราะห์โดยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และใช้ fluorescence detector เตรียมตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (โปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยโปรตีนกลูตามิเนสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง) โดยย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N เป็นเวลา 22 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส แล้วนำไปสร้างอนุพันธ์กับ AccQ-flour สารละลายตัวอย่าง (อนุพันธ์ของกรดอะมิโน) 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Hypersil Gold C18 และ sodium acetate buffer pH = 4.90 และ 60% acetonitrile เป็น eluents จากนั้นคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และรายงานผลเป็น mg/100 mg (AccQ, 1993)



## บทที่ 4

### ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

การสกัดโปรตีนมะพร้าวมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น ซึ่งต้องการให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 80%(w/w) พบว่าโปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดที่  $pI$  ของโปรตีนมะพร้าวมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 4.1 หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งพบว่าโปรตีนที่ได้มีค่าความชื้น 0.98 % มีปริมาณโปรตีน 81.68% ซึ่งถือว่าปริมาณโปรตีนสูงพอที่จะใช้ศึกษาในขั้นถัดไป นอกจากนี้ยังพบว่ามีไขมัน 16.57% โดยมีปริมาณผลผลิตโปรตีน  $yield = 3.81\%$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับโปรตีนมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีเดียวกันในงานวิจัยของ Thaiphanit and Anprung (2016) ซึ่งพบว่าสามารถสกัดได้ปริมาณโปรตีน 80.3% ปริมาณไขมัน 18.9% และมีปริมาณผลผลิตโปรตีน ( $yield$ ) 4.56% อย่างไรก็ตามการสกัดโปรตีนด้วยวิธีนี้จะได้โปรตีนที่มีปริมาณไขมันสูงซึ่งหากต้องการกำจัดไขมันจำเป็นจะต้องใช้สารเคมีเช่น hexane ช่วยในการดึงไขมันออกจากโปรตีนซึ่งจะสามารถลดปริมาณไขมันลงได้มากขึ้น (Onsaard et al., 2006)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ

| Constituents | Mean $\pm$ SD %(w/w) |
|--------------|----------------------|
| Moisture     | 0.98 $\pm$ 0.01      |
| Protein      | 81.68 $\pm$ 1.03     |
| Fat          | 16.57 $\pm$ 0.24     |

ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันของโปรตีนมะพร้าวด้วยโปรตีนกลูตามีน

ในการดัดแปรโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีนและเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน (E/S ratio) อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา ตัวทำละลายและสิ่งเจือปน เช่น ตัวยับยั้งการทำงาน

ของเอนไซม์ โดยปัจจัยที่นำมาศึกษาคือ E/S ratio อุณหภูมิ pH และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา (Whitaker, 1993)

#### 4.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันทำโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง (RSM) และวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ตัวแปรที่ใช้เป็นตัวแปรต้นได้แก่ E/S ratio ซึ่งกำหนดให้อยู่ในช่วง 5-50 unit/g protein อุณหภูมิระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส และ pH ในช่วง 5-9 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิ และ pH ที่เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสมีความเสถียรและสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ (Yamaguchi et al., 2001) ค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ของโปรตีนมะพร้าวที่ถูกตัดแปรในสภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.2 จากตาราง DD ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรเป็นระยะเวลา 60 นาทีมีค่าอยู่ในช่วง 19.48-39.66% และ DH มีค่าอยู่ในช่วง 1.72-5.26%

ตารางที่ 4.2 ค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกดัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่สภาวะต่าง ๆ

| design point | independent variables |                |                |              |    |     | dependent variables |      |
|--------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------|----|-----|---------------------|------|
|              | code                  |                |                | actual value |    |     | DD                  | DH   |
|              | x <sub>1</sub>        | x <sub>2</sub> | x <sub>3</sub> | E/S          | T  | pH  | (%)                 | (%)  |
| 1            | -1                    | -1             | -1             | 14           | 44 | 5.8 | 33.98               | 2.27 |
| 2            | 1                     | -1             | -1             | 41           | 44 | 5.8 | 33.98               | 2.51 |
| 3            | -1                    | 1              | -1             | 14           | 56 | 5.8 | 27.33               | 3.62 |
| 4            | 1                     | 1              | -1             | 41           | 56 | 5.8 | 30.58               | 4.28 |
| 5            | -1                    | -1             | 1              | 14           | 44 | 8.2 | 23.75               | 2.51 |
| 6            | 1                     | -1             | 1              | 41           | 44 | 8.2 | 27.91               | 2.27 |
| 7            | -1                    | 1              | 1              | 14           | 56 | 8.2 | 24.83               | 3.74 |
| 8            | 1                     | 1              | 1              | 41           | 56 | 8.2 | 34.61               | 2.76 |
| 9            | -1.68                 | 0              | 0              | 5            | 50 | 7   | 29.91               | 2.92 |
| 10           | 1.68                  | 0              | 0              | 50           | 50 | 7   | 36.68               | 1.72 |
| 11           | 0                     | -1.68          | 0              | 22.5         | 40 | 7   | 31.61               | 2.71 |
| 12           | 0                     | 1.68           | 0              | 22.5         | 60 | 7   | 31.61               | 5.26 |
| 13           | 0                     | 0              | -1.68          | 22.5         | 50 | 5   | 29.91               | 3.65 |
| 14           | 0                     | 0              | 1.68           | 22.5         | 50 | 9   | 19.48               | 2.75 |
| 15           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 34.85               | 2.51 |
| 16           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 33.92               | 2.80 |
| 17           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 37.05               | 2.80 |
| 18           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 39.66               | 2.62 |
| 19           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 38.97               | 2.80 |
| 20           | 0                     | 0              | 0              | 22.5         | 50 | 7   | 34.03               | 2.80 |

จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 นำมาขึ้นเป็นสมการถดถอยเชิงเส้นโค้งโดยใช้ค่าจริง สมการทำนายค่า DD และ DH ได้เป็นสมการที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

$$\begin{aligned} \text{DD (\%)} = & -89.386 - 0.629x_1 + 2.503x_2 + 22.025x_3 \\ & - 0.008x_1^2 - 0.05x_2^2 - 2.982x_3^2 + 0.012x_1x_2 \\ & + 0.089x_1x_3 + 0.309x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \text{DH (\%)} = & 19.428 + 0.176x_1 - 0.854x_2 + 0.097x_3 \\ & - 0.001x_1^2 + 0.012x_2^2 + 0.093x_3^2 - 0.001x_1x_2 \\ & - 0.015x_1x_3 - 0.024x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.2)$$

|       |       |               |
|-------|-------|---------------|
| เมื่อ | $x_1$ | คือ E/S ratio |
|       | $x_2$ | คือ อุณหภูมิ  |
|       | $x_3$ | คือ pH        |

สมการที่ 4.1 มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ ( $r^2$ ) = 0.929 และสมการที่ 4.2 มีค่า  $r^2$  = 0.928 ซึ่งหมายความว่าสมการทั้งสองสามารถทำนายค่า DD และ DH ได้ 92.9 และ 92.8% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นต้องพิจารณาความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) ควบคู่ไปด้วย lack of fit ที่เหมาะสมจะต้องมีค่ามากกว่า 0.05 จากสมการที่ 4.1 มีค่า lack of fit = 0.974 แสดงว่ามีความเหมาะสมของสมการ ส่วนสมการที่ 4.2 มีค่า lack of fit = 0.12 แสดงว่ามีความเหมาะสมของสมการเช่นกัน

วิธีแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างผิวเป็นการแสดงผลออกจากการพิจารณาปัจจัยหลักที่ 2 ปัจจัย จึงต้องเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญ 2 ปัจจัยมาสร้างกราฟเพื่อพิจารณาหาสถานะที่เหมาะสม โดยคัดเลือกจากปัจจัยหลักซึ่งได้แก่ E/S ratio อุณหภูมิ และ pH สำหรับค่า DD พบว่า ปัจจัยหลักทั้งสามไม่ได้มีผลต่อ DD อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จึงต้องพิจารณาปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่า DH ร่วมด้วย พบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า DH

อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่ E/S ratio ถือเป็นปัจจัยที่ไม่ส่งผลต่อค่า DH มากที่สุด จึงกำหนดให้ค่า E/S ratio เป็นค่าคงที่

ตารางที่ 4.3 p-value ของปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่า degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH)

| Factor      | DD    | DH    |
|-------------|-------|-------|
| E/S ratio   | 0.172 | 0.896 |
| Temperature | 0.869 | 0.009 |
| pH          | 0.253 | 0.563 |

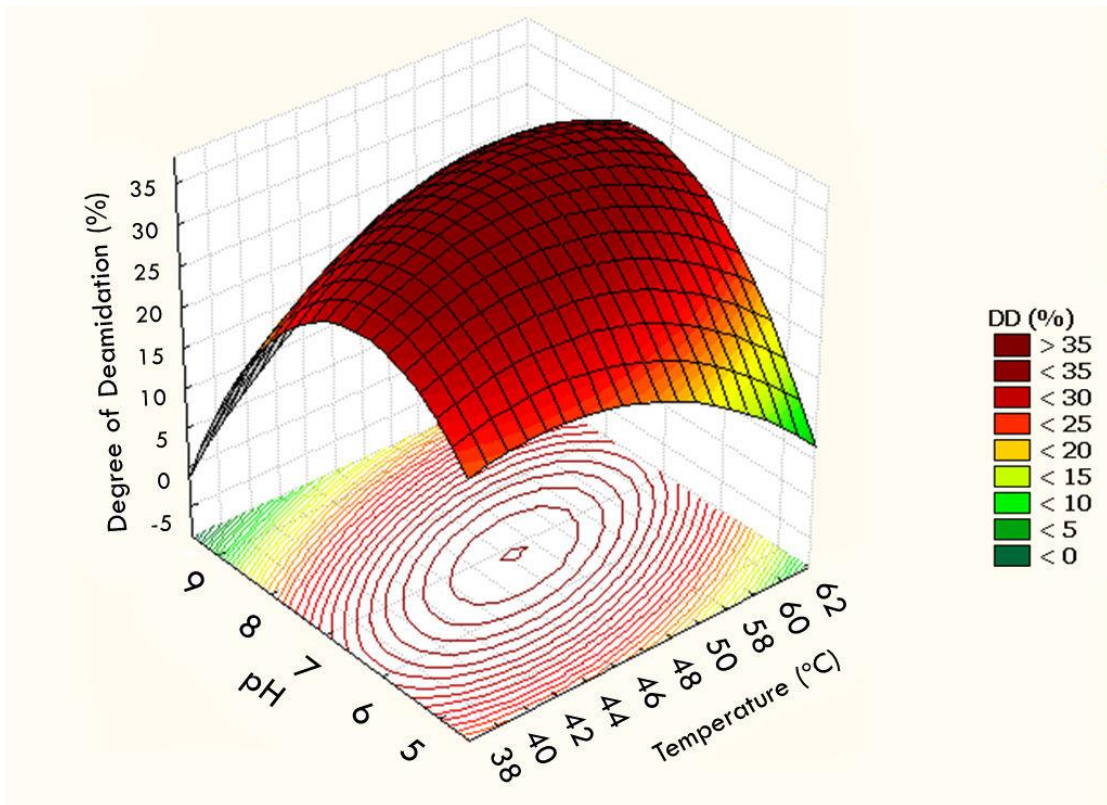
ค่าคงที่ของอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนพิจารณาจากค่าที่ทำให้ได้ DD สูงที่สุดคือ 36 unit/g protein ซึ่งค่าดังกล่าวนี้ได้จากการแทนค่าอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนลงในสมการที่ 4.1 และทำให้ได้ค่า DD สูงที่สุด จึงนำค่าดังกล่าวไปแทนในตัวแปร  $x_1$  ในสมการที่ 4.1 และ 4.2 และได้ออกมาเป็นสมการที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ สมการการทำนาย DD ที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนมีค่า 36 unit/g protein แสดงในสมการที่ 4.3 มีค่า  $r^2 = 0.729$  และมีค่า lack of fit = 0.894 ซึ่งถือว่ามีค่าความเหมาะสม ส่วนสมการทำนายค่า DH แบบสองปัจจัย (สมการที่ 4.4) มีค่า  $r^2 = 0.807$  และมีค่า lack of fit = 0.403 ซึ่งถือว่ามีค่าความเหมาะสมเช่นกัน

$$\begin{aligned} \text{DD (\%)} = & -122.386 + 2.935x_2 + 25.229x_3 \\ & - 0.05x_2^2 - 2.982x_3^2 + 0.309x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.3)$$

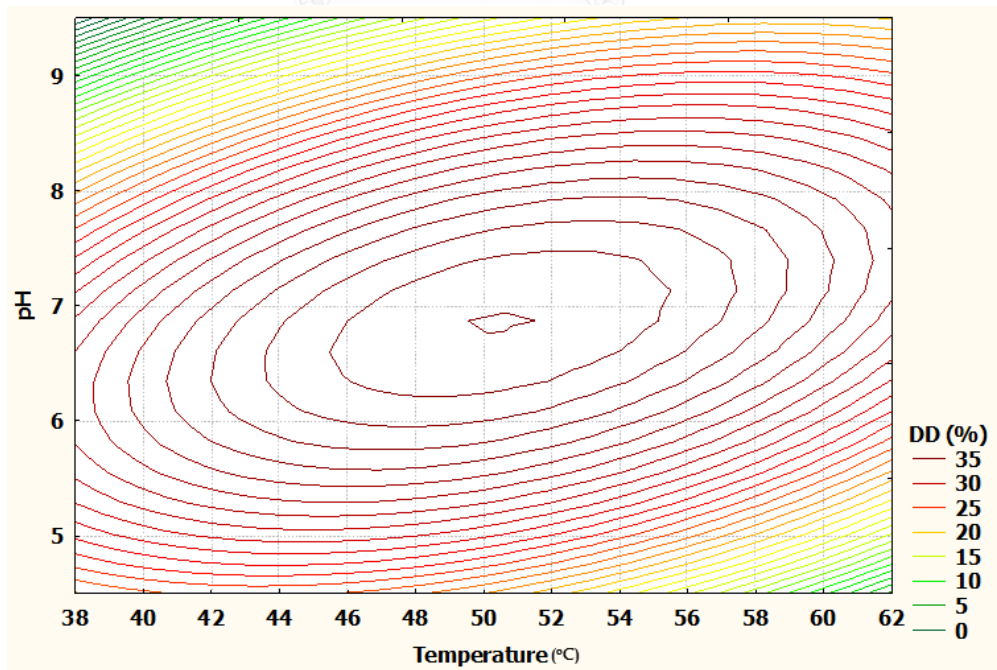
$$\begin{aligned} \text{DH (\%)} = & 24.594 - 0.8791x_2 - 0.4317x_3 \\ & + 0.012x_2^2 + 0.093x_3^2 - 0.024x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.4)$$

เมื่อ  $x_2$  คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)  
 $x_3$  คือ pH

การแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิวโดยมี E/S ratio เป็นค่าคงที่ที่ 36 unit/g protein ของสมการการทำนาย DD (สมการที่ 4.3) นำเสนอในรูปแบบ surface และ contour plot ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาดีเอมิเดชัน พบว่า DD มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีค่า 38% ที่ช่วงอุณหภูมิ 48-52 องศาเซลเซียส แล้วลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนสูงกว่า 52 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกันกับค่า pH ที่พบว่ามีความ DD เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่ม pH จนมีค่าสูงสุดที่ pH = 6.8 เมื่อ pH สูงกว่า 6.8 DD จะมีค่าลดลง การลดลงของ DD เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 52 องศาเซลเซียสเป็นผลมาความเสถียรของเอนไซม์ที่ลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยของ Yamaguchi et al. (2001) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสมีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส และสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH = 5-7 ซึ่งส่งผลให้ค่า DD เมื่อ pH มากกว่า 7 มีค่าลดลง นอกจากนี้ช่วง pH น้อยกว่า 5.0 เป็นช่วงที่เข้าใกล้ค่า pI ของโปรตีนมะพร้าว (pI = 3.9-4.0) ทำให้โปรตีนอยู่ในลักษณะที่รวมตัวกัน ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาจึงน้อย อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสยังขึ้นกับโครงสร้างและองค์ประกอบของกรดอะมิโนด้วย ตัวอย่างเช่น เคซีนที่มีปริมาณกลูตามีนและลิวซีนสูงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH = 6.8 ในขณะที่โปรตีนจากถั่วเหลืองที่มีปริมาณกลูตามีนและแอสปาราจिनสูง มีความเหมาะสมในสภาวะ อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส และ pH = 7.0 นอกจากนี้โปรตีนบางชนิดยังมีความจำเป็นต้องใช้สารอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา เช่น โปรตีนจากข้าวโพดที่จำเป็นต้องใช้เอทานอล 11.7% ในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH = 8.0 (Yamaguchi et al., 2001; Yong et al., 2004; Suppavorasatit et al., 2011)



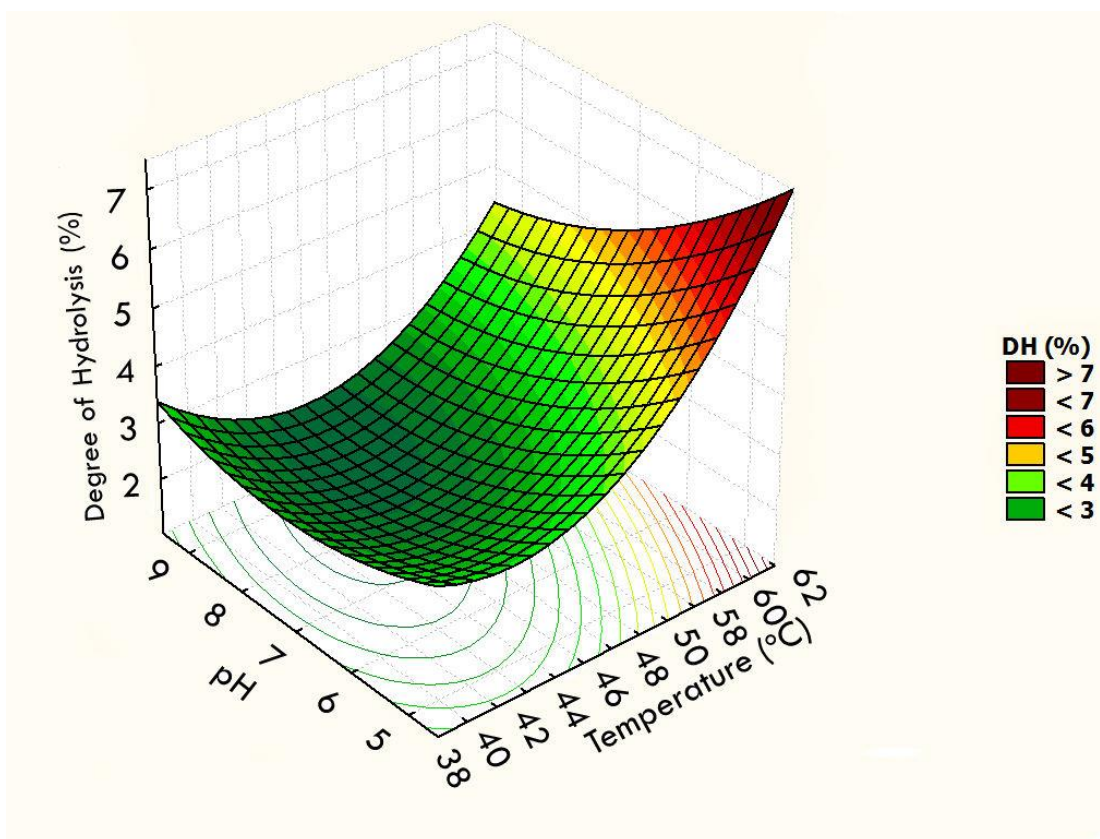
รูปที่ 4.1 surface plot จากสมการ degree of deamidation ( $E/S = 36$  unit/g protein)



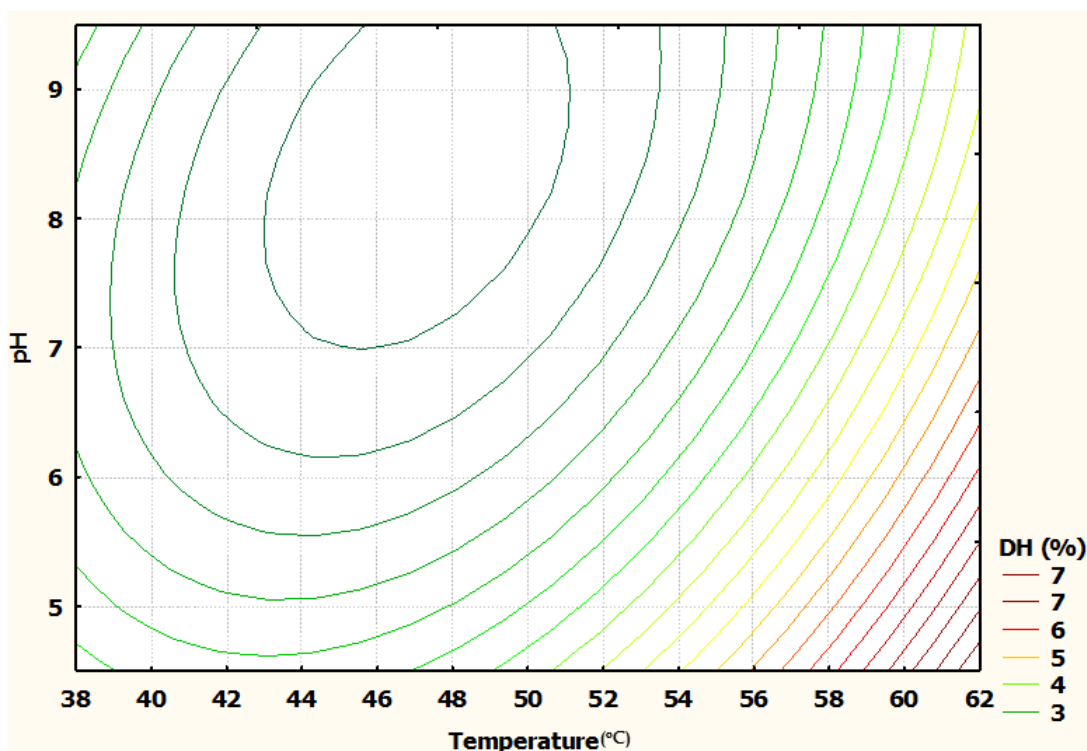
รูปที่ 4.2 contour plot จากสมการ degree of deamidation ( $E/S = 36$  unit/g protein)



การแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวโดยมี E/S ratio เป็นค่าคงที่ที่ 36 unit/g protein ของสมการการทำนาย DH (สมการที่ 4.4) นำเสนอในรูปแบบ surface และ contour plot ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา DH มีค่าลดลงเล็กน้อยจนมีค่าต่ำสุดคือ มีค่าน้อยกว่า 3% ที่ช่วงอุณหภูมิ 46-50 องศาเซลเซียส และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มค่า pH พบว่า DH มีค่าลดลงเล็กน้อย จนมีค่าต่ำที่สุดที่ช่วง pH = 7.0-9.0 อย่างไรก็ตามค่า pH ถือเป็นปัจจัยที่มีผลน้อยเนื่องจากมีค่า p-value สูง (ไพโรจน์ วิริยจारी, 2544) เมื่อ pH มีการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้ DH มีค่าที่เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย

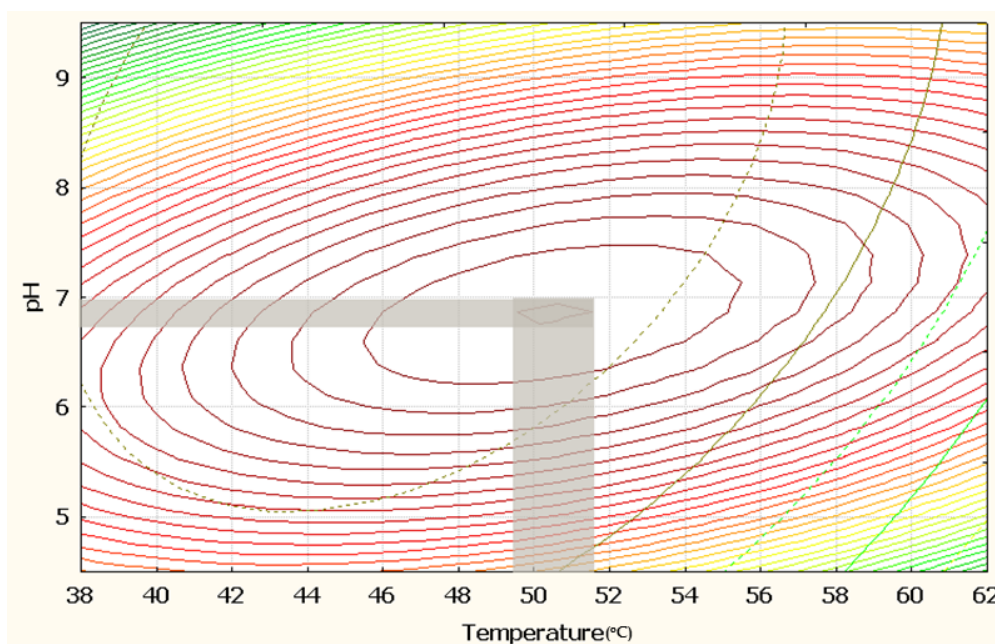


รูปที่ 4.3 surface plot จากสมการ degree of hydrolysis (E/S = 36 unit/g protein)



รูปที่ 4.4 contour plot จากสมการ degree of hydrolysis ( $E/S = 36$  unit/g protein)

สภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสควรเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีเอมิเดชันสูงและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่ำ กล่าวคือมีค่า DD สูง และมีค่า DH ต่ำ เมื่อนำรูปที่ 4.2 และ 4.4 มาซ้อนกันจะได้เป็น overlaid contour plot (รูปที่ 4.5) ซึ่งสามารถนำมาใช้หาสภาวะที่เหมาะสมได้ โดยสภาวะดังกล่าวมี อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และ pH ประมาณ 7.0 สภาวะดังกล่าวจะทำให้ได้ค่า DD สูงที่สุด อย่างไรก็ตามสภาวะนี้ไม่ได้ให้ค่า DH ที่ต่ำที่สุด แต่เนื่องจากเมื่อพิจารณาเฉพาะค่า DH พบว่ามีค่าค่อนข้างต่ำ กล่าวคือมีค่าน้อยกว่า 3% ซึ่งถือเป็นค่าที่ยอมรับได้ เนื่องจาก DH ที่มีค่ามากกว่า 5% อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรสชาติเนื่องจากกรดอะมิโนอิสระบางชนิดอาจทำให้เกิดรสขม ทำให้สามารถเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนเป็น  $E/S$  ratio = 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH = 7.0



รูปที่ 4.5 overby contour plot จากสมการ degree of deamidation และ degree of hydrolysis ( $E/S = 36$  unit/g protein)

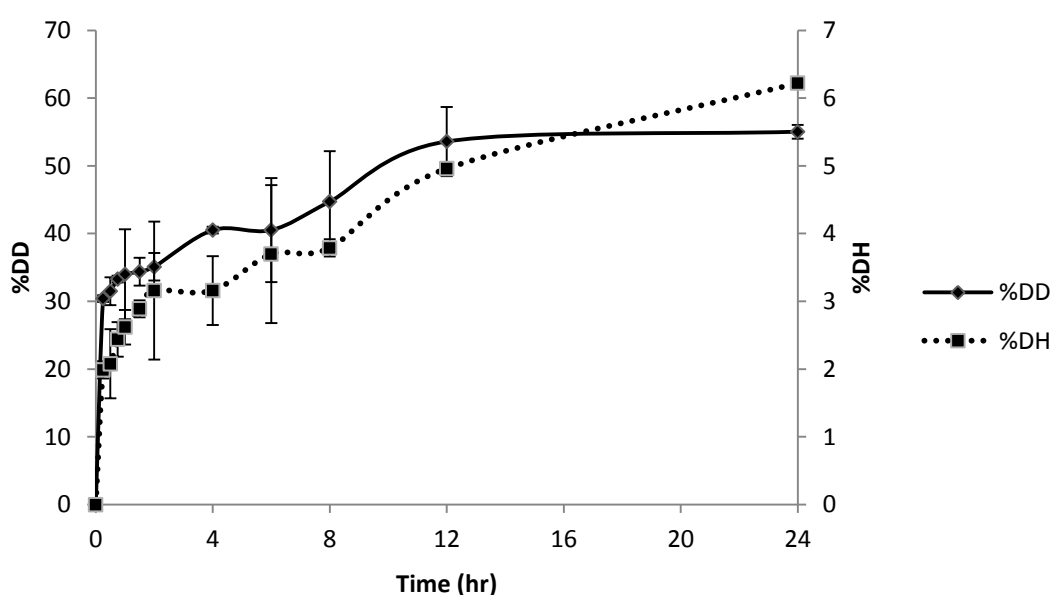
การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ DD และ DH ที่ได้จากการทดลองและจากสมการ พบว่า ค่า DD และ DH ที่ได้จากการทดลองไม่มีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากการคำนวณจากสมการอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

#### 4.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชัน

ในขั้นตอนการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสโดยใช้  $E/S$  ratio = 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 โดยแปรระยะเวลาในการตัดแปรตั้งแต่ 0-24 ชั่วโมงแสดงในรูปที่ 4.6 degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา จากรูปพบว่า DD มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นโดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกจนมีค่าเท่ากับ 30% ภายใน 15 นาทีของการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงจนมีค่าเข้าใกล้ค่าคงที่ที่ 54% ภายใน 12 ชั่วโมง การลดลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นผลมาจากการที่โปรตีนตั้งต้นมีจำนวนจำกัด (Whitaker, 1993)

เมื่อพิจารณาค่า DH ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรในรูปที่ 4.6 พบว่าค่า DH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาโดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3% ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และที่ระยะเวลาการตัดแปร 24 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่า 6% นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว ซึ่งปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ เช่น การให้ความร้อน หรือการที่อาจมีเอนไซม์ที่เจือปนในเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่นำมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากเป็นเอนไซม์ทางการค้า จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) ตัวอื่นปนอยู่ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ในส่วนของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดมาตัดแปรนั้น ไม่ได้มีขั้นตอนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดั้งเดิมภายในมะพร้าว จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการตัดแปร (Panicker et al., 2009; Suppavorasatit et al., 2011)



รูปที่ 4.6 degree of deamidation (DD) และ degree of hydrolysis (DH) ที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา

การตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง พบว่าค่า DD ที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ มีค่าประมาณ 30, 40 และ 50% จึงนำไปศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ในขั้นต่อไป

#### 4.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

เนื่องจากการตัดแปรเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเป็นการตัดแปรระดับหลอดทดลอง แต่การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ต้องมีการขยายขนาดการผลิต ค่า DD และ DH จึงมีความ

แตกต่างจากการทำในปริมาณน้อย ผลของการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า ตัวอย่างควบคุมมี DD = 10.46% โปรตีนมะพร้าวที่ถูกตัดแปรโดยวิธีดีเอมิเดชันเป็นระยะเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมงมีค่า DD = 32.21, 42.57 และ 49.61% ตามลำดับ ทั้งนี้ค่า DD ที่มีความแตกต่างจากการทดลองในข้อ 4.2.2 เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารตั้งต้นซึ่งจากเดิมใช้สารละลายโปรตีนความเข้มข้น 10 mg/ml เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น 200 mg/ml ซึ่งส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปด้วย ส่วน DH ของตัวอย่างควบคุมมีค่า 5.01% ในขณะที่โปรตีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมงมีค่า DH = 2.50, 5.23 และ 5.58% ตามลำดับ ซึ่งค่า DH ที่สูงกว่าในข้อ 4.2.2 เป็นผลมาจากปริมาณสารตั้งต้นที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เอนไซม์อื่น ๆ ที่เจือปนมาสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน (Whitaker, 1993; Suppavorasatit et al., 2011)

ตารางที่ 4.4 degree of deamidation และ degree of hydrolysis ของโปรตีนมะพร้าวที่ถูกตัดแปรที่ระยะเวลาต่าง ๆ สำหรับศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

| Treatment | %DD        | %DH       |
|-----------|------------|-----------|
| Control*  | 10.46±0.32 | 5.01±0.21 |
| 15 min    | 32.21±0.41 | 2.50±0.16 |
| 6 h       | 42.57±0.41 | 5.23±0.30 |
| 12 h      | 49.61±1.65 | 5.58±0.22 |

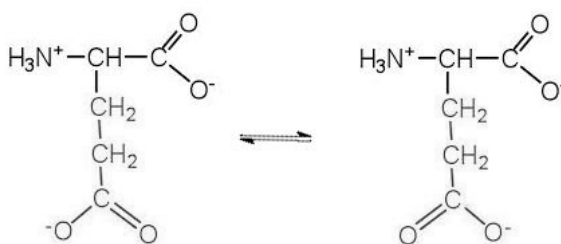
\*Control คือ โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH = 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงโดยไม่ใช้เอนไซม์ แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 4.3.1 สมบัติการละลาย

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติที่สำคัญของโปรตีนสมบัติหนึ่ง นอกจากจะเป็นสมบัติที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการนำไปใช้งานแล้ว ยังส่งผลต่อสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีนอีกด้วย เช่น สมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดโฟม เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 3.0, 5.0 และ 7.0 แสดงในตารางที่ 4.5 – 4.7 ตามลำดับ การละลายของโปรตีนที่ pH = 7.0 มีค่าสูงสุดคือมีค่ามากกว่า 66% และมีค่าต่ำสุดที่ pH = 5.0 คือมีค่าน้อยกว่า 25% การที่โปรตีนจากมะพร้าวมีความสามารถในการละลายน้อยที่ pH = 5.0 เป็นผลมาจากเป็น pH ที่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริก (pI)

ของมะพร้าวซึ่งมีค่าประมาณ 3.9-4.0 นอกจากนี้ในช่วง pH = 4.0-6.0 ยังเป็นช่วงที่โปรตีนมะพร้าวมีพฤติกรรมการละลายต่ำซึ่งพบผลเช่นเดียวกันในงานวิจัยของ Thaiphanit and Anprung (2013) ที่ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH ต่าง ๆ พบว่าที่ pH = 5.0 ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวต่ำกว่าที่ pH = 3.0

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายในแต่ละช่วง pH พบว่า ที่ pH = 3.0 (ตารางที่ 4.5) ตัวอย่างควบคุมมีความสามารถในการละลายต่ำ (42.92 %) กว่าตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลจากการใช้ความร้อนในการเตรียมตัวอย่าง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนมะพร้าวกลุ่มกลอบูลินซึ่ง (Kwon et al., 1996) จึงทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนบางส่วน ทำลายอันตรกิริยาทั้งภายในและภายนอกโมเลกุล โปรตีนจึงเกิดการจัดเรียงตัวใหม่และส่งผลให้ surface hydrophobicity มีค่าเพิ่มขึ้น อันตรกิริยาภายในโปรตีนจึงเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเกิดอันตรกิริยากับน้ำลดลง ความสามารถในการละลายจึงลดลง นอกจากนี้โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการทำดีแอมิเดชันมีความสามารถในการละลายสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม เนื่องจากดีแอมิเดชันจะเปลี่ยนกลูตามีนให้เป็นกลูตามิกแอซิดซึ่งมีความเสถียรในโครงสร้างที่เป็นประจุตั้งรูปที่ 4.7 และโครงสร้างนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดี ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Hamada, 1992; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 4.7 โครงสร้างประจุของกลูตามิกแอซิด  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Hamada (1992)

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 3.0

| Treatment | Solubility (%)            |
|-----------|---------------------------|
| Untreated | 54.90 <sup>a</sup> ± 1.79 |
| Control   | 42.92 <sup>b</sup> ± 4.05 |
| 15 min    | 51.72 <sup>a</sup> ± 2.66 |
| 6 h       | 56.11 <sup>a</sup> ± 7.01 |
| 12 h      | 51.85 <sup>a</sup> ± 4.17 |

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

จากตารางที่ 4.6 แสดงความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 5.0 พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร ตัวอย่างโปรตีนควบคุม และตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรไม่มีความแตกต่างกันเนื่องจากเป็น pH มีค่าใกล้กับ pI ซึ่งประจุรวมของโปรตีนมีค่าใกล้ 0 ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน และมีความสามารถในการละลายของโปรตีนต่ำ

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 5.0

| Treatment | Solubility <sup>ns</sup> (%) |
|-----------|------------------------------|
| Untreated | 20.03 <sup>C</sup> ± 2.94    |
| Control   | 19.85 <sup>C</sup> ± 6.20    |
| 15 min    | 20.63 <sup>C</sup> ± 2.50    |
| 6 h       | 22.27 <sup>C</sup> ± 3.58    |
| 12 h      | 24.36 <sup>C</sup> ± 5.33    |

ns ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 7.0 แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุมมีความสามารถในการละลายต่ำกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรเนื่องจากเหตุผลเดียวกับที่ pH = 3.0 ตามทฤษฎีของการเกิดดีแอมิเดชัน ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันควรมีความสามารถในการละลายสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่จากตารางที่ 4.7 พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 15 นาที และ 6 ชั่วโมงมีค่าต่ำกว่าความสามารถในการละลายของตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปร 12 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่า DH ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการตัดแปร ความสามารถในการละลายที่ต่ำลงในช่วง pH สูงเป็นผลมาจากการทำดีแอมิเดชันและการใช้ความร้อนควบคู่กันซึ่งมีผลทำให้ค่า pI เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากกลูตามิกแอซิดที่เกิดขึ้นจะเสถียรในโครงสร้างที่เป็นประจุลบ (รูปที่ 4.7) ทำให้ pI มีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้เคยพบในงานวิจัยของ Yong et al. (2006) ที่ทำการตัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ pH = 7.0 จะลดลงเมื่อ DD มีค่ามากกว่า 10% และจะเพิ่มขึ้นเมื่อ DD มีค่ามากกว่า 70% (Hamada, 1992; Damodaran et al., 2007)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 7.0

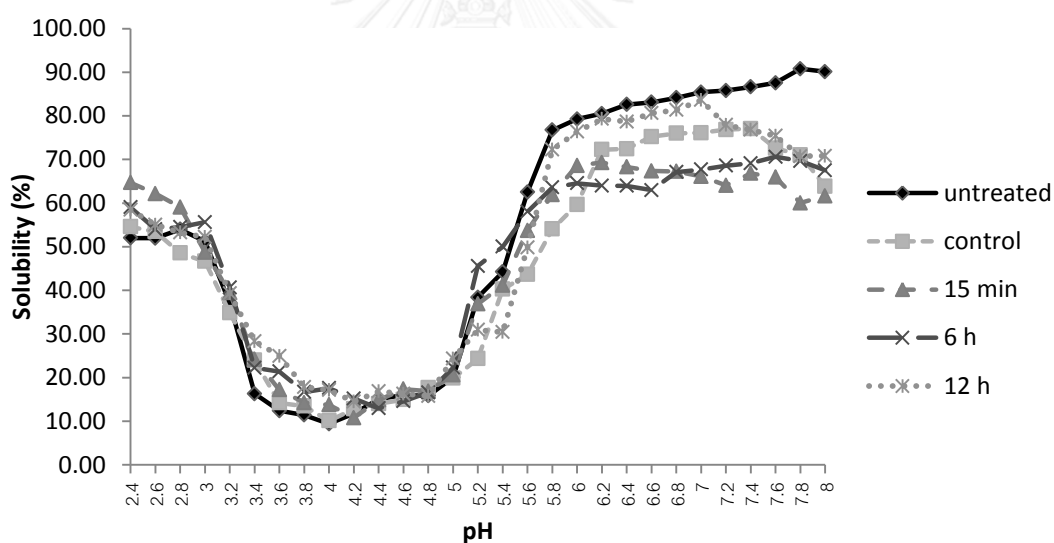
| Treatment | Solubility (%)             |
|-----------|----------------------------|
| Untreated | 85.43 <sup>aA</sup> ± 1.83 |
| Control   | 76.11 <sup>bA</sup> ± 1.54 |
| 15 min    | 66.12 <sup>cA</sup> ± 2.19 |
| 6 h       | 67.68 <sup>cA</sup> ± 2.46 |
| 12 h      | 83.63 <sup>aA</sup> ± 1.22 |

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

ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่เปลี่ยนตาม pH ตั้งแต่ 2.4-8.0 แสดงในรูปที่ 4.8 โปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร (เส้นทึบสีดำ) มีช่วงการละลายต่ำที่ช่วง pH 3.4-5.0 ซึ่งมีความสามารถในการละลายไม่เกิน 20% และมีค่าต่ำสุดที่ pH 4.0 คือมีความสามารถในการละลาย



9.41% และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น โดยมีความสามารถในการละลายมากกว่า 80% ที่ pH มากกว่า 6.2 (80.25%) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของตัวอย่างพบว่า ที่ pH น้อยกว่า 4.2 ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรในทุกช่วงระยะเวลา มีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรและโปรตีนควบคุม ช่วง pH 4.2-5.0 ไม่มีความแตกต่างของสมบัติการละลายของโปรตีนในตัวอย่างที่แตกต่างกัน และช่วง pH มากกว่า 5.0 ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรสูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น ลักษณะของ pH solubility profile ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำดีเอมิดชันควบคู่กับการใช้ความร้อน ซึ่งส่งผลให้ pI มีค่าเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายในสภาวะกรดจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Yong et al., 2006; Suppavorasatit et al., 2011) นอกจากนี้ ความสามารถในการละลายที่แสดงในรูปที่ 4.7 เป็นการสนับสนุนสมบัติการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่วิเคราะห์ได้ในในตารางที่ 4.5 ค่า pI ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรเท่ากับ 3.9 แต่เมื่อตัดแปรแล้วจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือมีค่าประมาณ 4.2-4.4



รูปที่ 4.8 pH solubility profile ของโปรตีนจากมะพร้าว

#### 4.3.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

สมบัติการอุ้มน้ำ (water holding capacity; WHC) และสมบัติการอุ้มน้ำมัน (oil holding capacity) ของโปรตีนเป็นสมบัติที่ส่งผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส และการกระจายตัวในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรและผ่านการตัดแปรที่เวลาต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.8

สมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันมีค่าสูงกว่าโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระยะเวลาการดัดแปรที่แตกต่างกันไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของสมบัติการอุ้มน้ำ ความสามารถในการอุ้มน้ำที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเสียสภาพของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีนซึ่งเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและน้ำ จากงานวิจัยของ Kinsella (1979) และ Mune et al. (2014) รายงานว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำคือการเสียสภาพของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและเปิดเผยบริเวณที่มีประจุหรือมีขั้วมากขึ้น ส่งผลให้สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีขึ้น จากตารางที่ 4.8 พบว่าค่า WHC ของตัวอย่างควบคุมมีแนวโน้มที่จะมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการดัดแปร ทั้งนี้อาจเกิดจากการเตรียมโปรตีนของตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปรมีการให้ความร้อน ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัว และส่งผลให้ความสามารถในการจับกับน้ำสูงขึ้น การเกิดดีเอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสจะเป็นการเปลี่ยนจากกลูตามีนเป็นกลูตามิกแอซิดซึ่งจะอยู่ในรูปที่เป็นประจุที่มีความเสถียรสูงกว่า โครงสร้างแบบนี้จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้มากกว่า โครงสร้างของกลูตามีน ทำให้ WHC มีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นการลดขนาดของโปรตีนยังส่งเสริมการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวอีกด้วย ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนจึงเพิ่มขึ้น (Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009)

ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรไม่มีความแตกต่างจากโปรตีนที่ผ่านการดัดแปร โดยที่ระยะเวลาในการดัดแปรไม่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำมันเช่นกัน จากตารางที่ 4.8 พบว่า มีค่า OHC ระหว่าง 1.19-1.43 g oil/g protein ค่า OHC ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรควรแตกต่างจากโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร เนื่องจากการทำดีเอมิเดชันจะเปลี่ยนแปลงประจุของโปรตีนจึงส่งผลให้ค่า OHC เปลี่ยนแปลงไป เช่น งานวิจัยของ Mirmoghtadaie et al. (2009) ที่ได้ทำการดัดแปรโปรตีนจากโอ๊ตด้วยการทำดีเอมิเดชันโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและวัดค่า OHC ด้วยน้ำมันถั่วเหลืองพบว่า การทำดีเอมิเดชันจะทำให้สมบัติการจับกับน้ำมันเพิ่มขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนหลังการทำดีเอมิเดชัน แต่ปัจจัยหลักของการเปลี่ยนแปลงของสมบัตินี้คือ ความสามารถในการกักเก็บทางกายภาพ (physical entrapment) และความหนาแน่นรวม ซึ่งการทำดีเอมิเดชันไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นรวมอย่างชัดเจน ส่งผลให้ความสามารถในการจับกับน้ำมันของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรไม่มีความแตกต่างจากโปรตีนดั้งเดิม (Kinsella, 1979) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chan and Ma (1999) ได้ดัดแปรโปรตีนจาก okara โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและพบว่าสมบัติในการจับกับน้ำมันไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนจากมะพร้าว

| Treatment | WHC<br>(g water/g protein) | OHC <sup>ns</sup><br>(g oil/g protein) |
|-----------|----------------------------|--|
| Untreated | 0.90 <sup>b</sup> ± 0.05   | 1.24 ± 0.06                            |
| Control   | 1.01 <sup>ab</sup> ± 0.06  | 1.21 ± 0.16                            |
| 15 min    | 1.08 <sup>a</sup> ± 0.12   | 1.25 ± 0.12                            |
| 6 h       | 1.16 <sup>a</sup> ± 0.08   | 1.43 ± 0.20                            |
| 12 h      | 1.08 <sup>a</sup> ± 0.01   | 1.19 ± 0.05                            |

a, b ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

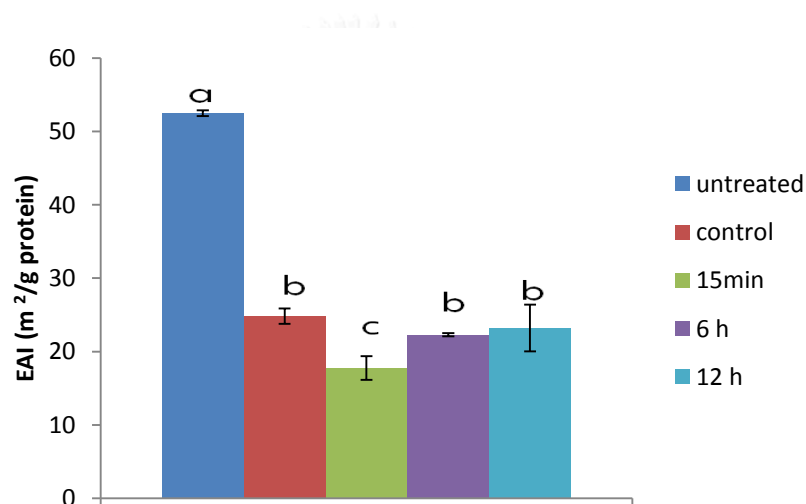
ns ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

#### 4.3.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

สมบัติการเกิดอิมัลชันที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้คือค่า emulsifying activity index (EAI) และ emulsifying stability index (ESI) ค่า EAI และ ESI แสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) ซึ่งจะโปรตีนจะสร้างชั้นฟิล์มหุ้มหยดน้ำมันที่รอยต่อระหว่างน้ำมันกับน้ำ

ค่า EAI ของโปรตีนมะพร้าวแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า โปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่า EAI สูงที่สุด ( $52.46 \text{ m}^2/\text{g protein}$ ) ส่วนโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสเป็นเวลา 15 นาที มีค่าต่ำที่สุด ( $17.76 \text{ m}^2/\text{g protein}$ ) จากการศึกษาพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า EAI คือความสามารถในการละลายของโปรตีน โปรตีนที่สามารถละลายได้มาก จะสามารถสร้างฟิล์มครอบหยดไขมันได้ดีด้วยเช่นกัน (Boye et al., 1997) จากตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรที่  $\text{pH} = 7.0$  มีค่าสูงที่สุด ซึ่งอิมัลชันที่ศึกษาเป็นอิมัลชันที่  $\text{pH} = 7.0$  จึงทำให้ค่า EAI ของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่าสูงที่สุดด้วย จากการศึกษา พบว่าความร้อนและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้เกิดการคลายตัวของโปรตีนและเปิดเผยพื้นที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งยังเพิ่มจำนวนเปปไทด์สายสั้น พื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นการเพิ่ม hydrophobic interaction ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน ชั้นฟิล์มที่หุ้มหยดไขมันจึงเกิดไม่สมบูรณ์ ซึ่งส่งผลให้ค่า EAI มีค่าลดลงได้ ค่า EAI ของตัวอย่างโปรตีนควบคุมและโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรจึงมี

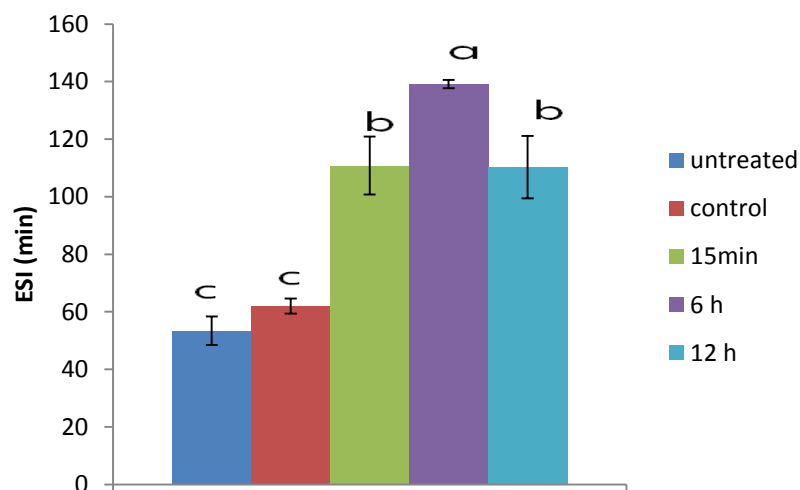
ค่าต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูป (Schwenke, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำดีแอมิเดชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีน ส่งผลให้ความชอบน้ำเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายจึงเพิ่มขึ้นและทำให้ค่า EAI ของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการตัดแปรรูปโปรตีนพบว่า เมื่อระยะเวลาการตัดแปรรูปเพิ่มขึ้น EAI มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากระยะเวลาการตัดแปรรูปที่นานขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ประจุของโปรตีนและ surface hydrophobicity ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลถึง hydrophilic-lipophilic balance ซึ่งมีความเหมาะสมกับระบบอิมัลชันที่ใช้มากขึ้น ค่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรรูปที่ 6 และ 12 ชั่วโมงจึงมีค่าสูงกว่าการตัดแปรรูปที่เวลา 15 นาที (Chan and Ma, 1999; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 4.9 Emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนมะพร้าว

ค่า ESI ของโปรตีนจากมะพร้าวแสดงในรูปที่ 4.10 โปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรรูปมีค่า ESI สูงกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปและตัวอย่างโปรตีนควบคุม การเกิดดีแอมิเดชันจะเพิ่มพื้นที่ที่ชอบน้ำทำให้สามารถเกิด hydrophobic interaction ได้น้อยลง ชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้นจึงมีความสมบูรณ์มากขึ้น ส่งผลให้อิมัลชันมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น ค่า ESI จึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Chan and Ma, 1999) เมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการตัดแปรรูปโปรตีนต่อ ESI พบว่าการทำดีแอมิเดชันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ค่า ESI มากที่สุด คือประมาณ 139 นาที จากนั้นค่า ESI ลดลงเมื่อระยะเวลาการตัดแปรรูปเป็น 12 ชั่วโมง การลดลงของ ESI ที่การตัดแปรรูป 12 ชั่วโมงเป็นผลมาจากการทำดีแอมิเดชันที่มากเกินไป จะเพิ่ม electrostatic repulsion ซึ่งการที่ electrostatic repulsion มีค่ามากเกินไปจะทำให้เกิดการผลักกันของโปรตีน และทำให้ฟิล์มที่หุ้มหยดไขมันบางลง และส่งผลให้ความเสถียรของอิมัลชันลดลง การลดลงของ ESI ยังพบในงานวิจัยอื่น ๆ เช่น การตัดแปรรูปโปรตีนจากโอ๊ตที่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ริก และกลูเตลินจาก *Akebia trifoliata* ที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดมาลิกและกรดซิตริกอีกด้วย (Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009; Liao et al., 2010; Lei et al., 2015)



รูปที่ 4.10 Emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีนมะพร้าว

#### 4.3.4 สมบัติการเกิดโฟม

สมบัติการเกิดโฟมที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ ค่า foaming capacity (FC) และ foaming stability (FS) ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 0-60 นาที ตารางที่ 4.9 แสดงค่า FC ของโปรตีนจากมะพร้าว ดั้งเดิมและผ่านการดัดแปร ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่า FC สูงกว่าตัวอย่าง ควบคุมและโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 15 นาทีและ 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถอธิบายได้ จากการให้ความร้อนในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างส่งผลให้เกิดการเสถียรภาพของโปรตีนบางส่วน และยังทำให้พื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิด ionic interaction ลดลง FC จึงมีค่าลดลง ทำให้ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน (ตัวอย่างโปรตีนควบคุมและโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร) มีค่า FC ต่ำกว่าโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร นอกจากนี้ความสามารถในการละลายยังเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ตัวอย่างโปรตีนดั้งเดิมมีค่า FC สูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ (ตารางที่ 4.7) โปรตีนที่สามารถละลายได้ดีจะสามารถสร้างชั้นฟิล์มเพื่อกักเก็บอากาศไว้ได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า FC สูงขึ้น (Boye et al., 1997; Damodaran et al., 2007) ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรที่ ระยะเวลา 12 ชั่วโมงมีค่า FC 5.91% ซึ่งมีค่าสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม (4.67%) อย่างมีนัยสำคัญ การทำดีแอมิเดชันทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ionic interaction มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมดีขึ้นจึง

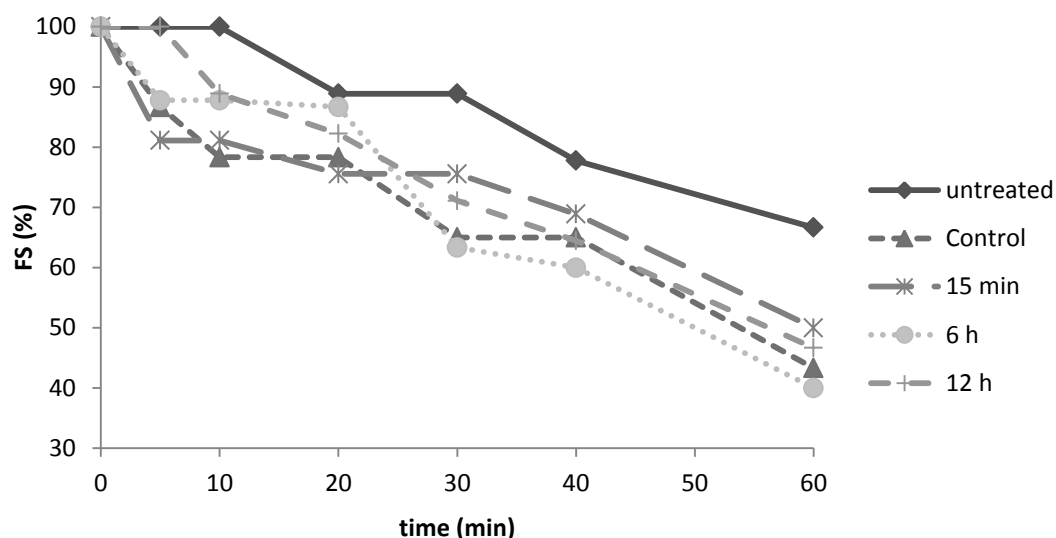
ทำให้มีค่า FC เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองลักษณะนี้พบในตัวอย่างโปรตีนกลูเตนจากข้าวสาลีที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Agyare et al., 2009)

ตารางที่ 4.9 Foaming capacity (FC) ของโปรตีนจากมะพร้าว

| Treatment | FC (%)                   |
|-----------|--------------------------|
| Untreated | 6.86 <sup>a</sup> ±1.27  |
| Control   | 4.67 <sup>c</sup> ±0.58  |
| 15 min    | 5.08 <sup>bc</sup> ±0.14 |
| 6 h       | 5.15 <sup>bc</sup> ±0.18 |
| 12 h      | 5.91 <sup>ab</sup> ±0.13 |

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

Foaming stability ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ระยะเวลาต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 4.11 ค่า FS ของทุกตัวอย่างลดลงเมื่อระยะเวลาการเกิดดีแอมิเดชันเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 นาที ค่า FS ของตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรมีค่าสูงที่สุด (66.67%) ตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีค่า FS ลดลงเร็วกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรซึ่งเป็นผลมาจากการให้ความร้อน และการทำดีแอมิเดชันซึ่งจะเพิ่ม electrostatic repulsion ค่า electrostatic repulsion ที่มากเกินไปจะขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนที่ก่อให้เกิดชั้นฟิล์มที่หุ้มอากาศ ฟิล์มที่ได้จึงบางลง ความเสถียรของโฟมจึงลดลง ผลการทดลองในลักษณะนี้พบในงานวิจัยอื่น ๆ เช่น การตัดแปรโปรตีนจาก okara ที่ FS ลดลงตามระยะเวลาในอัตราที่ใกล้เคียงกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร และโปรตีนจากโอ๊ตที่พบว่าความเสถียรของโฟมของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรลดลงเร็วกว่าโปรตีนดั้งเดิม (Chan and Ma, 1999; Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009)



รูปที่ 4.11 Foaming stability (FS) ของโปรตีนจากมะพร้าว

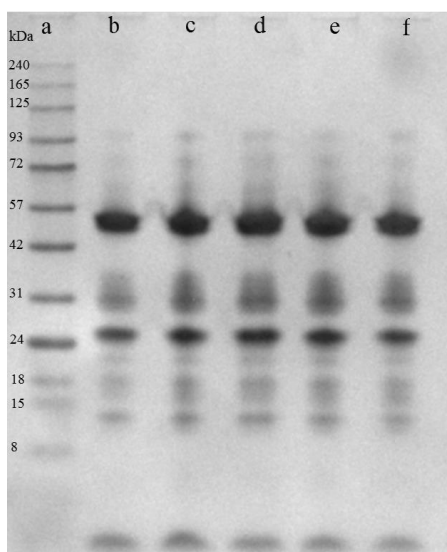
#### 4.3.5 Molecular weight distribution

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) ของโปรตีนมะพร้าว วิเคราะห์โดยการทำ sodium dodecyl sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยแสดงผลในรูปที่ 4.12 จากรูปแสดง protein marker (แถว a), แถบโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปร (แถว b), แถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (แถว c), แถบโปรตีนของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 15 นาที (แถว d), แถบโปรตีนของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (แถว e) และ แถบโปรตีนของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (แถว f) ในแถบโปรตีนมะพร้าวทุกชนิด (แถว b-f) ปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบหลักที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16, 24, 34, 55 และ 100 kDa ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเหล่านี้มาจากโปรตีนหลักในมะพร้าว จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า โปรตีนหลักในมะพร้าวประกอบด้วยโปรตีนกลุ่ม 11S และ 7S กลอบูลิน ซึ่งโปรตีนจากมะพร้าวส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม 11S กลอบูลินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 326 kDa แต่จะแสดงแถบโปรตีนในการทำ SDS-PAGE ในช่วงขนาดโมเลกุล 24, 34 และ 55 kDa ซึ่งแถบโปรตีนที่ขนาด 55 kDa เกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุล 24 และ 34 kDa (Garcia et al., 2005) โมเลกุลของโปรตีนกลุ่ม 7S กลอบูลินมีน้ำหนักประมาณ 156 kDa และแสดงผลในแถบโปรตีนที่ช่วงน้ำหนัก 16, 22 และ 24 kDa (Kwon et al., 1996; Garcia et al., 2005)

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรจะมีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นโดยเป็นผลมาจากขั้นตอนการให้ความร้อน โปรตีนในแถบน้ำหนักที่ต่ำกว่า

22 kDa ของตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปร (แถบ c-f) จะมีมากกว่าที่ปรากฏในตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร (แถบ b) คือมีประมาณ 13.44% (แสดงค่าในภาคผนวก ง) ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม, ตัวอย่างที่ผ่านการทำดีแอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 22 kDa เป็น 15.47, 17.11, 19.38 และ 22.09% ตามลำดับ โดยมีปริมาณโปรตีนสูงในช่วงน้ำหนัก 12 และ 16 kDa ซึ่งบ่งชี้ว่ามีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa ของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร (แถบ b) ยังมีความเข้มข้นมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ อย่างชัดเจน โดยมีปริมาณโปรตีน 40.67% ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม, ตัวอย่างที่ผ่านการทำดีแอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีน 31.79, 29.82, 22.25 และ 25.42% ตามลำดับ การที่ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรมีความโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นที่ 55 kDa มากกว่าตัวอย่างชนิดอื่นและมีปริมาณโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 22 kDa ต่ำกว่านั้นเป็นผลมาจากการใช้ความร้อนและการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ความร้อนจะทำลายอันตรกิริยาต่าง ๆ โปรตีนจึงเกิดการคลายตัวและปลดปล่อยโปรตีนสายสั้น เมื่อรวมกับการเกิดไฮโดรไลซิสที่ทำลายพันธะเปปไทด์และได้เป็นโปรตีนสายสั้นจึงทำให้แถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรมีปริมาณมาก และโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยมีปริมาณน้อยกว่าโปรตีนที่ผ่านการตัดแปร การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในลักษณะนี้ยังพบในตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรชนิดอื่น เช่น โปรตีนจากข้าวโพด และถั่วเหลือง เป็นต้น (Yong et al., 2004; Suppavorasatit et al., 2011)





รูปที่ 4.12 Molecular weight distribution ของโปรตีนมะพร้าว

a: protein marker, b: untreated coconut protein,  
 c: control coconut protein, d: deamidated coconut protein 15 min,  
 e: deamidated coconut protein 6 h, และ f: deamidated coconut protein 12 h

#### 4.3.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่สกัดจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแสดงในตารางที่ 4.10 โปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรมีปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนสูงที่สุดเป็นสองอันดับแรก (16.87 และ 10.94 mg/100 mg ตามลำดับ) หลังจากการตัดแปรโปรตีนแล้วพบว่า ปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนมีค่าเป็น 16.41 และ 10.62 mg/100 mg ตามลำดับ และกรดอะมิโนตัวอื่นยังมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรจึงมีความเป็นไปได้ว่า การทำดีแอมิเดชันไม่ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม การทำดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสเป็นการเปลี่ยนหมู่เอไมด์ของกลูตามีนเป็นคาร์บอกซิลซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกลูตามิกแอซิด ดังนั้นองค์ประกอบของกรดอะมิโนจึงควรมีการเปลี่ยนแปลง กล่าวคือ มีปริมาณกลูตามีนลดลง และมีปริมาณกลูตามิกแอซิดเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนมีการใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N ควบคู่กับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 22 ชั่วโมง เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนได้ (ภาคผนวก ค.1) ทำให้กลูตามีนในตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวเป็นกลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกแอซิด ไพโรกลูตามิกเป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของ

กลูตามีนและกลูตามิกแอซิด เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วย HPLC กลูตามีน กลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกจะออกมาในเวลาใกล้เคียงกันจนไม่สามารถแยกได้ ในการรายงานผลกลูตามิกแอซิดในตารางที่ 4.8 จึงเป็นการรวมปริมาณกลูตามีน กลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกไว้ด้วยกัน (Shih, 1985) ปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่ง Rasyid et al. (1992) รายงานว่ามีปริมาณกลูตามิกแอซิด 16.63-17.79%, อาร์จินิน 8.78-13.01% และแอสปาร์ติกแอซิด 9.36-11.12% ในขณะที่ Thaiphanit and Anprung (2016) รายงานว่ามีปริมาณกลูตามิกแอซิด 21.67 g/100 g, อาร์จินิน 12.22 g/100 g และแอสปาร์ติกแอซิด 8.65 g/100 g ซึ่งเมื่อพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโนยังพบอีกว่าในโปรตีนจากมะพร้าวมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทั้ง 9 ชนิด

ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรรูป

| Amino acids<br>(mg/100mg) | Untreated | Deamidated<br>6 hr |
|---------------------------|-----------|--------------------|
| Aspartic acid             | 6.65      | 6.74               |
| Serine                    | 3.19      | 3.21               |
| Glutamic acid             | 16.87     | 16.41              |
| Glycine                   | 3.16      | 3.12               |
| Histidine                 | 2.04      | 2.06               |
| Arginine                  | 10.94     | 10.62              |
| Threonine                 | 1.99      | 2.00               |
| Alanine                   | 2.85      | 2.93               |
| Proline                   | 2.44      | 2.47               |
| Tyrosine                  | 1.40      | 1.28               |
| Valine                    | 3.34      | 3.57               |
| Lysine                    | 3.85      | 3.95               |
| Isoleucine                | 1.92      | 2.09               |
| Leucine                   | 4.49      | 4.65               |
| Phenylalanine             | 3.43      | 3.35               |

การตัดแปรรูปโปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิจะเพิ่มความหลากหลายของสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำโปรตีนมะพร้าวไปใช้ในผลิตภัณฑ์เช่นกัน ทำให้โอกาสในการนำโปรตีนมะพร้าวไปใช้จริงในอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้โปรตีนมะพร้าวในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่เป็นอิมัลชัน แต่ไม่ต้องการให้เกิดโฟม เป็นต้น โปรตีนมะพร้าวยังสามารถพัฒนาเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคบางกลุ่ม เช่น การใช้แทนโปรตีนถั่วเหลืองที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้บริโภค และ การใช้โปรตีนมะพร้าวเป็นโปรตีนเกษตรสำหรับผู้บริโภคกลุ่มที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ (มังสวิรัต) นอกจากนี้การใช้งานโปรตีนมะพร้าวยังเป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโปรตีนมะพร้าวที่ศึกษาสกัดมาจากหางกะทิที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าว การศึกษาและปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าวจึงถือเป็นงานวิจัยที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารและสิ่งแวดล้อม



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมในการตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส
  - สภาวะที่มีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH = 7.0
  - ผลของระยะเวลาในการตัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยดีเอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสคือ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น DD และ DH มีค่าเพิ่มขึ้น
2. สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยโปรตีนกลูตามิเนส
  - ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรมีค่าสูงสุดที่ pH = 7.0 และมีค่าต่ำสุดที่ pH = 5.0 การตัดแปรโปรตีนด้วยดีเอมิเดชันส่งผลให้ความสามารถในการละลายที่ pH = 3.0 เพิ่มขึ้นในทุกช่วงระยะเวลาการตัดแปร ที่ pH = 5.0 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และที่ pH = 7.0 ความสามารถในการละลายลดลงในตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 15 นาที และ 6 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร
  - ความสามารถในการละลายของโปรตีนความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรที่ขึ้นกับ pH พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรในทุกช่วงเวลาในช่วง pH น้อยกว่า 4.2 มีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าน้อยลงในช่วง pH มากกว่า 5.0 เมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร
  - ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีค่าประมาณ 1.08-1.16 g water/g protein ซึ่งมีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร
  - ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีค่าประมาณ 1.19-1.43 g oil/g protein ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างไปจากตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร

- จากการศึกษาสมบัติในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากมะพร้าว พบว่า ตัวอย่างโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านตัดแปรมีค่า emulsifying activity index ลดลง และมีค่า emulsifying stability index เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร

- สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนมะพร้าวมีค่า foaming capacity ลดลงเมื่อทำการตัดแปรโปรตีนด้วยการทำดีเอมิเดชัน ค่า foaming stability ที่ลดลงตามระยะเวลาที่มีการลดลงที่เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร

- Molecular weight distribution ของตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวเมื่อทำการตัดแปรโปรตีน พบว่า โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากมีจำนวนลดลง และโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมีจำนวนเพิ่มขึ้น

- องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อตัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส โดยมีปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนสูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากมะพร้าวเนื่องจากการตัดแปรด้วยการทำดีเอมิเดชัน

2. ควรมีการศึกษาผลของการทำดีเอมิเดชันต่อสมบัติอื่นๆ ของโปรตีนมะพร้าว เช่น ความสามารถในการจับกับสารให้กลิ่นรส การเกิดการแพ้ เป็นต้น

3. ควรมีการศึกษาการเติมโปรตีนจากมะพร้าวในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ทัฬหเสนา ใจแก้ว (2556). สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วอะชูกิ *Vigna angularis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นีสานารถ กระจ่าง (2540). การสกัดและสมบัติทางโภชนาการและการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. .
- ปิตินันต์ อักษร (2553). ผลของปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและสารละลายเอทานอลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพโรจน์ วิริยจารี (2544). การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. เชียงใหม่ ไทย, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศุภรัตน์ เอี่ยมมนเรพร (2551). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไศยภัสร์ มินมณี and อภิษฎา รัตนนุกรม (2557). ผลของการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอมิเดชันแบบไม่ใช้เอนไซม์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.). โครงการปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). "ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร." Retrieved 1 ตุลาคม, 2559, from <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/coconut.pdf>.

### ภาษาอังกฤษ

- AccQ, W. (1993). AccQ-Tag Method Manual (Manual no. WAT052874). REVO.
- Agyare, K. K., K. Addo and Y. L. Xiong (2009). "Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt." Food Hydrocolloids 23(1): 72-81.
- Agyare, K. K., Y. L. Xiong and K. Addo (2008). "Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate." Food Chemistry 107(3): 1131-1137.

- AOAC (2000). Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Md., AOAC International.
- Babiker, E. E. (2000). "Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein." Food Chemistry 70(2): 139-145.
- Boye, J., C. Ma and V. Harwalkar (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. NY, MARCEL DEKKER.
- Cabra, V., R. Arreguin, R. Vazquez-Duhalt and A. Farres (2007). "Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the Z19  $\alpha$ -zein." Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(2): 439-445.
- Chan, W. M. and C. Y. Ma (1999). "Acid modification of proteins from soymilk residue (okara)." Food Research International 32: 119-127.
- Cumby, N., Y. Zhong, M. Naczki and F. Shahidi (2008). "Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates." Food Chemistry 109(1): 144-148.
- Damodaran, S., K. L. Parkin and O. R. Fennema (2007). Fennema's food chemistry, CRC press.
- Das, B., A. P. Roy, S. Bhattacharjee, S. Chakraborty and C. Bhattacharjee (2015). "Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology." Ecotoxicology and Environmental Safety 121: 244-252.
- FAO. (2013). "Production." Retrieved 20 October, 2016, from [http://faostat3.fao.org/browse/O\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/O*/E).
- Garcia, R. N., R. V. Arocena, A. C. Laurena and E. M. Tecson-Mendoza (2005). "11S and 7S Globulins of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and Characterization." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1734-1739.

- Gu, Y., Y. Matsumura, S. Yamaguchi and T. Mori (2001). "Action of protein-glutaminase on  $\alpha$ -lactalbumin in the native and molten globule states." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(12): 5999-6005.
- Hamada, J. S. (1992). "Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase." Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(5): 719-723.
- Kanu, P. J., J. B. Kanu, E. H. Sandy, J. B. Kande, P. Mornya and Z. HuiMing (2009). "Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate." American Journal of Food Technology 4(6): 226-240.
- Kato, A., A. Tanaka, N. Matsudomi and K. Kobayashi (1987). "Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH." Journal of Agricultural and Food Chemistry 35(2): 224-227.
- Kinsella, J. E. (1979). "Functional properties of soy proteins." Journal of the American Oil Chemists' Society 56(3): 242-258.
- Kwon, K., K. H. Park and K. C. Rhee (1996). "Fractionation and Characterization of Proteins from Coconut (*Cocos nucifera* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 1741-1745.
- Kwon, K. S., D. Bae, K. H. Park and K. C. Rhee (1996). "Aqueous Extraction and Membrane Techniques Improve Coconut Protein Concentrate Functionality." Journal of Food Science 61(4): 753-756.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227: 680-685.
- Lei, L., Q. Zhao, C. Selomulya and H. Xiong (2015). "The effect of deamidation on the structural, functional, and rheological properties of glutelin prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed." Food Chemistry 178: 96-105.
- Liao, L., T.-X. Liu, M.-M. Zhao, C. Cui, B.-E. Yuan, S. Tang and F. Yang (2010). "Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid." Food Chemistry 123(1): 123-130.



- McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques, CRC press.
- Metwalli, A. and M. Van Boekel (1998). "On the kinetics of heat-induced deamidation and breakdown of caseinate." Food Chemistry 61(1): 53-61.
- Mirmoghtadaie, L., M. Kadivar and M. Shahedi (2009). "Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate." Food Chemistry 114(1): 127-131.
- Miwa, N., K. Yokoyama, H. Wakabayashi and N. Nio (2010). "Effect of deamidation by protein-glutaminase on physicochemical and functional properties of skim milk." International Dairy Journal 20(6): 393-399.
- Mohammadi, R., M. A. Mohammadifar, A. M. Mortazavian, M. Rouhi, J. B. Ghasemi and Z. Delshadian (2016). "Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM)." Food Chemistry 190: 186-193.
- Motoki, M., K. Seguro, N. Nio and K. Takinami (1986). "Glutamine-specific deamidation of  $\alpha$  S1-casein by transglutaminase." Agricultural and Biological Chemistry 50(12): 3025-3030.
- Mune, M., M. Alain, M. S. René and M. I. Lape (2014). "Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate." Food Chemistry 154: 32-37.
- Nedovic, V. A., B. Obradovic, I. Leskosek-Cukalovic and G. Vunjak-Novakovic (2001). Immobilized yeast bioreactor systems for brewing—recent achievements. Engineering and manufacturing for biotechnology, Springer: 277-292.
- Onsaard, E., M. Vittayanont, S. Srigan and D. J. McClements (2005). "Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Coconut Skim Milk Proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 5747-5753.
- Onsaard, E., M. Vittayanont, S. Srigan and D. J. McClements (2006). "Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate." Food Research International 39: 78-86.

- Östling, S. and P. Virtama (1946). "A modified preparation of the universal buffer described by Teorell and Stenhagen." Acta Physiologica Scandinavica 11(4): 289-293.
- Panicker, L. M., R. Usha, S. Roy and C. Mandal (2009). "Purification and characterization of a serine protease (CESP) from mature coconut endosperm." BMC research notes 2(1): 81.
- Pearce, K. N. and J. E. Kinsella (1978). "Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique." Journal of Agricultural and Food Chemistry 26(3): 716-723.
- Pynghthngs. (2012). "Coconut Water Vs Coconut Milk VS Coconut Oil." Retrieved 20 October, 2016, from <http://hubpages.com/food/coconut-water-vs-coconut-milk-vs-coconut-oil>.
- Rasyid, F., M. Manullang and P. M. T. Hansen (1992). "Isolation and characterization of coconut protein." Food Hydrocolloids 6: 301-314.
- Scheuplein, R. J., A. Mizutani and S. Yamaguchi (2007). "Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: Protein-glutaminase." Regulatory Toxicology and Pharmacology 49(2): 79-89.
- Schwenke, K. D. (1997). Enzyme and chemical modification of proteins. NEW YORK, MARCEL DEKKER.
- Segat, A., N. Misra, A. Fabbro, F. Buchini, G. Lippe, P. J. Cullen and N. Innocente (2014). "Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate." Food Research International 66: 365-372.
- Shih, F. (1985). "Analysis of glutamine, glutamic acid and pyroglutamic acid in protein hydrolysates by high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A 322: 248-256.
- Sikorski, Z. E. (2006). Chemical and functional properties of food components, CRC Press.
- Suppavorasatit, I., E. G. De Mejia and K. R. Cadwallader (2011). "Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its

- effect on the functional properties of the protein." Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(21): 11621-11628.
- Sze-Tao, K. W. C. and S. K. Sathe (2000). "Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate." Food Chemistry 69: 153-160.
- Thaiphanit, S. and P. Anprung (2013). "Enzymatic modification of coconut protein I: its bioactive compounds and effect on pH-solubility profile of the modified protein." Thai Journal of Agricultural Science 44(2): 397-400.
- Thaiphanit, S. and P. Anprung (2016). "Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment." Food Hydrocolloids 52: 756-765.
- Thaiphanit, S., G. Schleining and P. Anprung (2016). "Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions." Food Hydrocolloids 60: 252-264.
- U.S. Food and Drug Administration. (2008). "GRN No. 267." GRAS Notices Retrieved 5 November, 2016, from [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=267&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=protein%20glutaminase](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=267&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=protein%20glutaminase).
- Whitaker, J. R. (1993). Principles of enzymology for the food sciences, CRC Press.
- Yada, R. (2004). Proteins in food processing. UK, Woodhead Publishing.
- Yamaguchi, S., D. J. Jeenes and D. B. Archer (2001). "Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminyl residues in proteins." European Journal of Biochemistry 268(5): 1410-1421.
- Yamaguchi, S. and M. Yokoe (2000). "A Novel Protein-Deamidating Enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a Newly Isolated Bacterium from Soil." Applied and Environmental Microbiology 66(8): 3337-3343.
- Yong, Y. H., S. Yamaguchi, Y. S. Gu, T. Mori and Y. Matsumura (2004). "Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and

functional properties of  $\alpha$ -zein." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(23): 7094-7100.

Yong, Y. H., S. Yamaguchi and Y. Matsumura (2006). "Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(16): 6034-6040.

Zhao, J., Z. Tian and L. Chen (2011). "Effects of deamidation on aggregation and emulsifying properties of barley glutelin." Food Chemistry 128(4): 1029-1036.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก  
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

**ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตามวิธีของ AOAC (2000))**

อุปกรณ์

1. ถ้วยอลูมิเนียม
2. เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S, Switzerland)
3. Hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK)
4. เตาชிகเคเตอร์

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วยอลูมิเนียมและฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเตาชิกเคเตอร์ จากนั้นชั่งน้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียม
2. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งและเย็นแล้ว
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบและทิ้งให้เย็นในเตาชิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก
5. นำไปอบต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกมาทิ้งให้เย็นในเตาชิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่
6. คำนวณปริมาณความชื้นหรือน้ำที่หายไปจากสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(W_i - W_f) \times 100}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

Wi คือ น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะก่อนอบ (กรัม)

Wf คือ น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังอบ (กรัม)

## ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี kjeldahl (ตามวิธีของ AOAC (2000))

### อุปกรณ์

1. Digester (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)
2. Scrubber (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)
3. Distillation Unit (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)
4. เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S, Switzerland)

### สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98%
2. กรดไฮโดรคลอริก 37% ความเข้มข้น 0.1 M
3. กรดบอริก ความเข้มข้น 4 % (w/v)
4. Indicator
  - เตรียมโดยละลาย methy red 0.125 กรัม และ methylene blue 0.0825 กรัม ใน 90% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 35 %(w/v)
6. Kjeldahl tablet

### วิธีการวิเคราะห์

#### ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในหลอดย่อย

2. เติม Kjeldahl tablet 1 เม็ด เพื่อเร่งปฏิกิริยา และกรดซัลฟิวริก 20 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อย
3. ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
4. นำหลอดย่อยต่อเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีนที่มีการควบคุมอุณหภูมิการย่อย รอจนตัวอย่างมีสีเขียวอ่อน (ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที)
5. ปิดเตาย่อยและนำออกจากเครื่องย่อย และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

#### ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรต

1. จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิตช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4 % (w/v) 25 มิลลิลิตรผสม indicator 2-3 หยด ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายของอุปกรณ์ควบแน่น แขนในสารละลาย ตั้งค่าเครื่องโดยการกำหนดปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 % (w/v) ที่จะใช้ในการกลั่นเท่ากับ 90 มิลลิลิตรและเวลาในการกลั่น 7 นาที
3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยโปรตีนหลอดละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องกลั่น และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ตามปริมาณที่กำหนดไว้ เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกินพอ ซึ่งสังเกตได้จากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ
4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 200 มิลลิลิตร
5. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 M ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนถึงจุดยุติที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ต้องการ ดังสมการ

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

- เมื่อ  $V_s$  คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- $V_b$  คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)



N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

#### 6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดย

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \% \text{Nitrogen} \times 6.25$$

### ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ตามวิธีของ AOAC (2000))

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S, Switzerland)
2. Hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK)
3. Soxhlet apparatus (Gerhardt)
4. เดซิเคเตอร์ (desiccator)
5. กระดาษกรอง Whatman No.1
6. ทิมเบล

#### สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์

#### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้งแล้วให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
2. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วลงในทิมเบลและบรรจุในขวดสกัดที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
3. เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในขวดสกัด และต่อเข้ากับชุดสกัด ใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. ระเหยปีโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้

5. นำไขมันหรือน้ำมันที่ได้ในขวดสกัดไปอบที่อุณหภูมิ  $100 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

6. ชั่งน้ำหนักของไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณหาปริมาณไขมันจากสมการ

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

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W<sub>o</sub> คือ น้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)

**ก.4 การวิเคราะห์ Degree of deamidation** (โดยใช้ ammonia colorimetric assay kit II)

#### อุปกรณ์

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

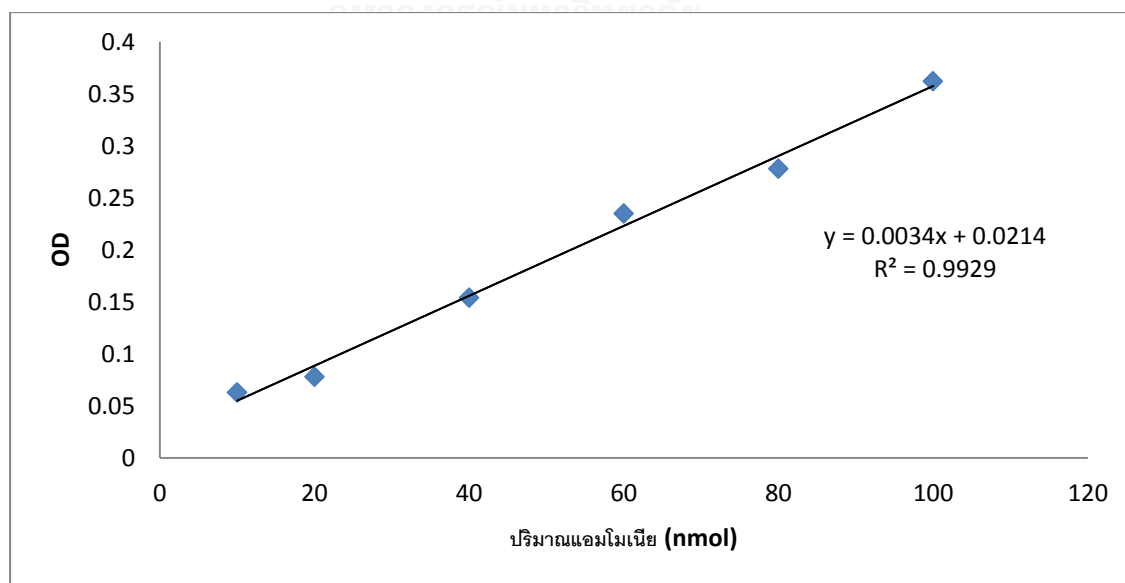
#### สารเคมี

1. ammonia colorimetric assay kit II (Biovision Inc., Milpitas, CA)
  - สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์มาตรฐาน
  - Reagent A
  - Reagent B
2. น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย

### วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดย เจือจางสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ มาตรฐาน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย 990 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ลง 96 well microtiter plate ในปริมาณ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสารละลายใน หลุมเป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย จะได้ความเข้มข้นเป็น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 nmol/หลุม
2. ใส่ตัวอย่างปริมาณระหว่าง 2-100 ไมโครลิตรใน 96 well microtiter plate และปรับ ปริมาตรภายในหลุมให้เป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย
3. เติม reagent A ปริมาณ 80 ไมโครลิตร
4. เติม reagent B ปริมาณ 40 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
5. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร
6. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลาย และคิด ปริมาณแอมโมเนียของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

### กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมโมเนีย

## ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลาย (โดยใช้ DC protein assay)

### อุปกรณ์

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

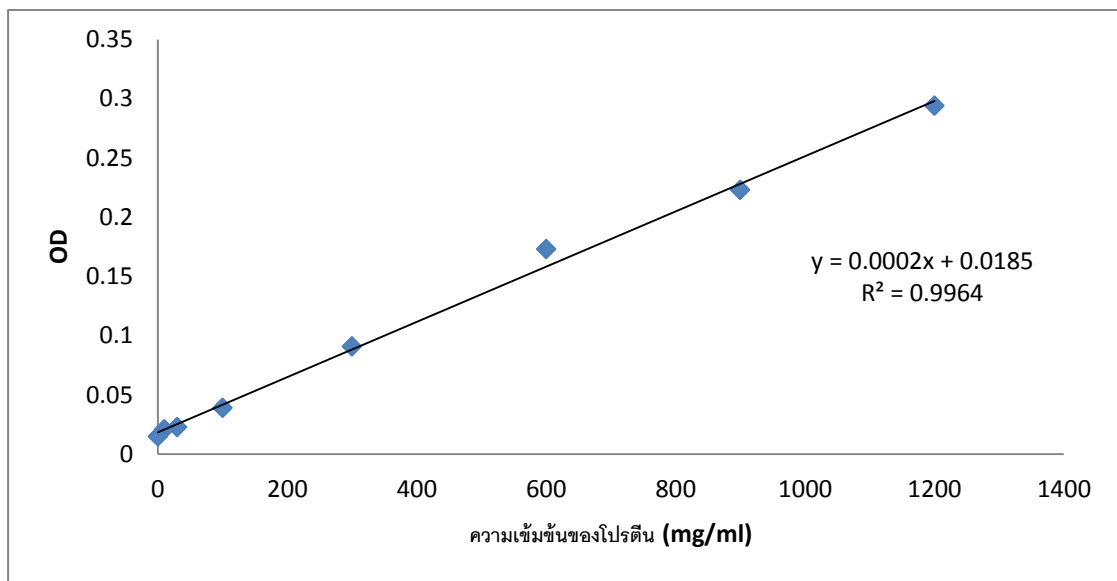
### สารเคมี

1. DC Protein Assay (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)
  - bovine serum albumin (BSA)
  - reagent A (alkaline copper tartrate solution)
  - reagent B (Folin Reagent)
2. Tris-buffer saline (TBS)

### วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน ละลาย BSA 30 มิลลิกรัม ในสารละลาย TBS 20 มิลลิลิตร เจือจางสารละลาย BSA ทั้งหมด 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1200, 900, 600, 300, 100, 30, 10 และ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. หยอดสารละลาย BSA และตัวอย่างอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลง 96 well microtiter plate
3. เติม reagent A ปริมาณ 25 ไมโครลิตร
4. เติม reagent B ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ภายใน 1 ชั่วโมงหลังเติม reagent B
6. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลาย BSA และคิดปริมาณโปรตีนที่ละลายของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

## กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย

ภาคผนวก ข  
การเตรียม buffer

ข.1 Citrate-phosphate-borate buffer (ดัดแปลงจาก (Östling and Virtama (1946)))

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 N
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
4. กรดซิตริก
5. กรดบอริก
6. น้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอน

วิธีการเตรียม

การเตรียม buffer stock

1. ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมล กรดซิตริก 0.033 โมล และกรดบอริก 0.0507 โมล กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N ปริมาณ 243 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียม buffer ที่ pH ต่างๆ

1. ผสม buffer stock ปริมาณ 20 มิลลิลิตร กับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 N ในปริมาณตามตารางที่ ข.1
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่เติมเพื่อให้สารละลายมี pH ต่าง ๆ

| pH→ | .00   | .10   | .20   | .30   | .40   | .50   | .60   | .70   | .80   | .90   |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ↓   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2   |       | 72.10 | 69.25 | 66.87 | 64.90 | 63.25 | 61.77 | 60.48 | 59.29 | 58.29 |
| 3   | 57.49 | 57.60 | 56.05 | 55.42 | 54.83 | 54.28 | 53.72 | 53.17 | 52.61 | 52.07 |
| 4   | 51.52 | 51.00 | 50.46 | 49.92 | 49.40 | 48.88 | 48.35 | 47.81 | 47.28 | 46.72 |
| 5   | 46.18 | 45.64 | 45.10 | 44.54 | 43.99 | 43.40 | 42.77 | 42.15 | 41.51 | 40.89 |
| 6   | 40.28 | 39.66 | 39.02 | 38.31 | 37.54 | 36.73 | 36.02 | 35.36 | 34.72 | 34.13 |
| 7   | 33.51 | 32.97 | 32.46 | 31.90 | 31.36 | 30.82 | 30.33 | 29.88 | 29.45 | 29.06 |
| 8   | 28.70 | 28.44 | 28.20 | 27.91 | 27.56 | 27.20 | 26.83 | 26.34 | 25.77 | 25.12 |
| 9   | 24.48 | 23.82 | 23.21 | 22.60 | 21.95 | 21.32 | 20.71 | 20.13 | 19.60 | 19.10 |
| 10  | 18.65 | 18.24 | 17.84 | 17.51 | 17.20 | 16.92 | 16.68 | 16.35 | 15.98 | 15.56 |
| 11  | 15.09 | 14.59 | 13.92 | 13.08 | 12.09 | 10.75 |       |       |       |       |

## ข.2 Acetate-phosphate buffer (ความเข้มข้น 0.1 M)

### สารเคมี

1. โซเดียมอะซิเตด
2. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

### วิธีการเตรียม

1. ชั่งโซเดียมอะซิเตด 34.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรในขวดกำหนดปริมาตร
2. ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 29.9950 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรในขวดกำหนดปริมาตร
3. ปรับ pH ของสารละลายในข้อ 1 ด้วยสารละลายในข้อ 2 จนได้ pH ที่ต้องการ

### ข.3 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.0, ความเข้มข้น 0.1 M)

#### สารเคมี

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

#### วิธีการเตรียม

1. ชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 43.5450 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรในขวดกำหนดปริมาตร
2. ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 34.0225 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรในขวดกำหนดปริมาตร
3. ปรับ pH ของสารละลายในข้อ 1 ด้วยสารละลายในข้อ 2 จนได้ pH = 7.0



## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

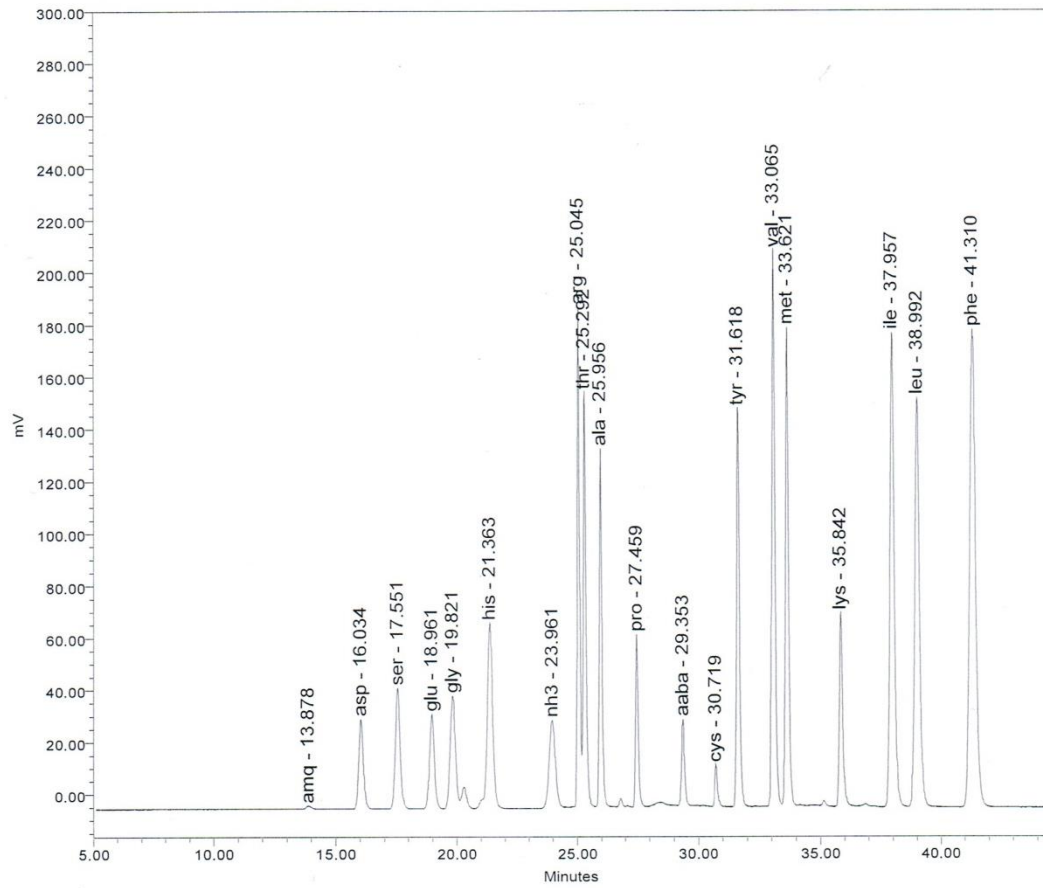
#### ค.1 การเตรียมตัวอย่าง

1. ผสมตัวอย่างกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 22 ชั่วโมง
2. เติม internal standard และเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน
3. นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาผสมกับ AccQ-fluor derivatization buffer และ AccQ-fluor reagent
4. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

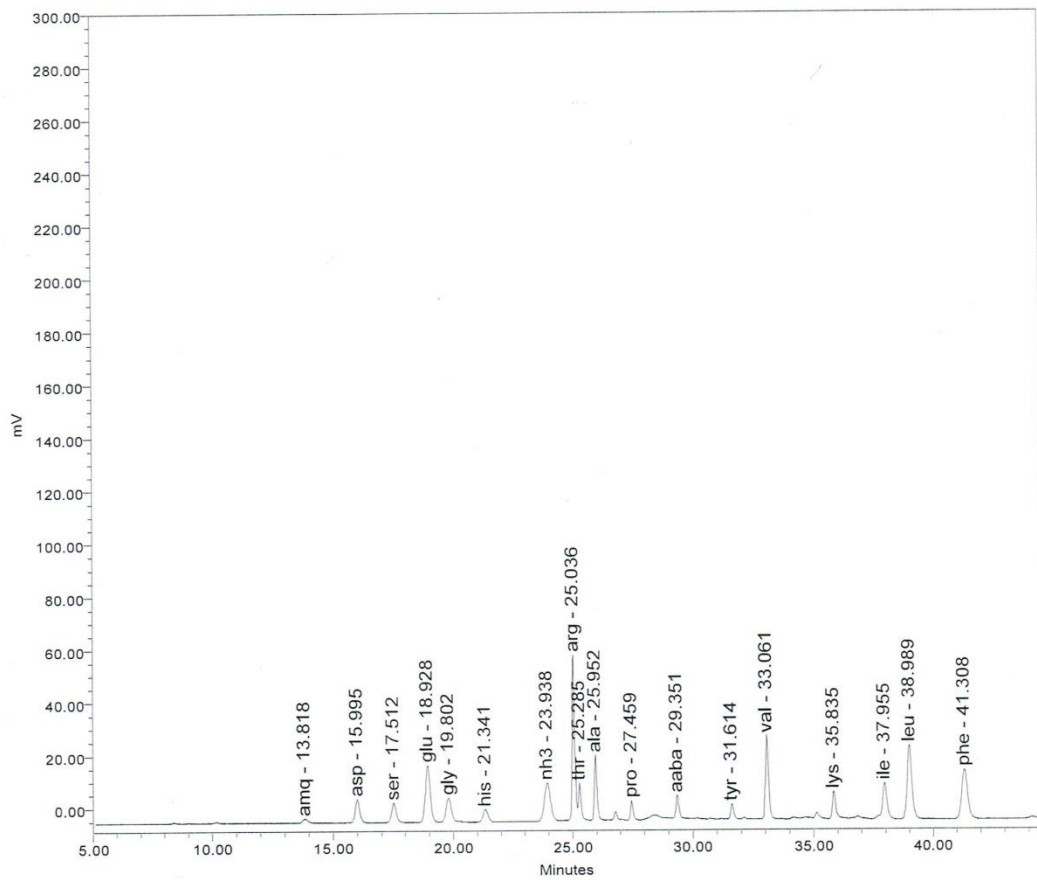
#### ค.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง HPLC

|               |   |
|---------------|---|
| HPLC System   | : Water Alliance 2695 with heater<br>Jasco FP2020 fluorescence Detector (EX: 250, EM: 395 nm) |
| Column        | : Hypersil Gold column C18 (4.6*150 mm, 3 $\mu$ m)<br>Temp. 35 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C           |
| Sample volume | : 5 $\mu$ l   |
| Eluents       | : Sodium acetate buffer pH 4.90 $\pm$ 0.05<br>60% acetonitrile                                |

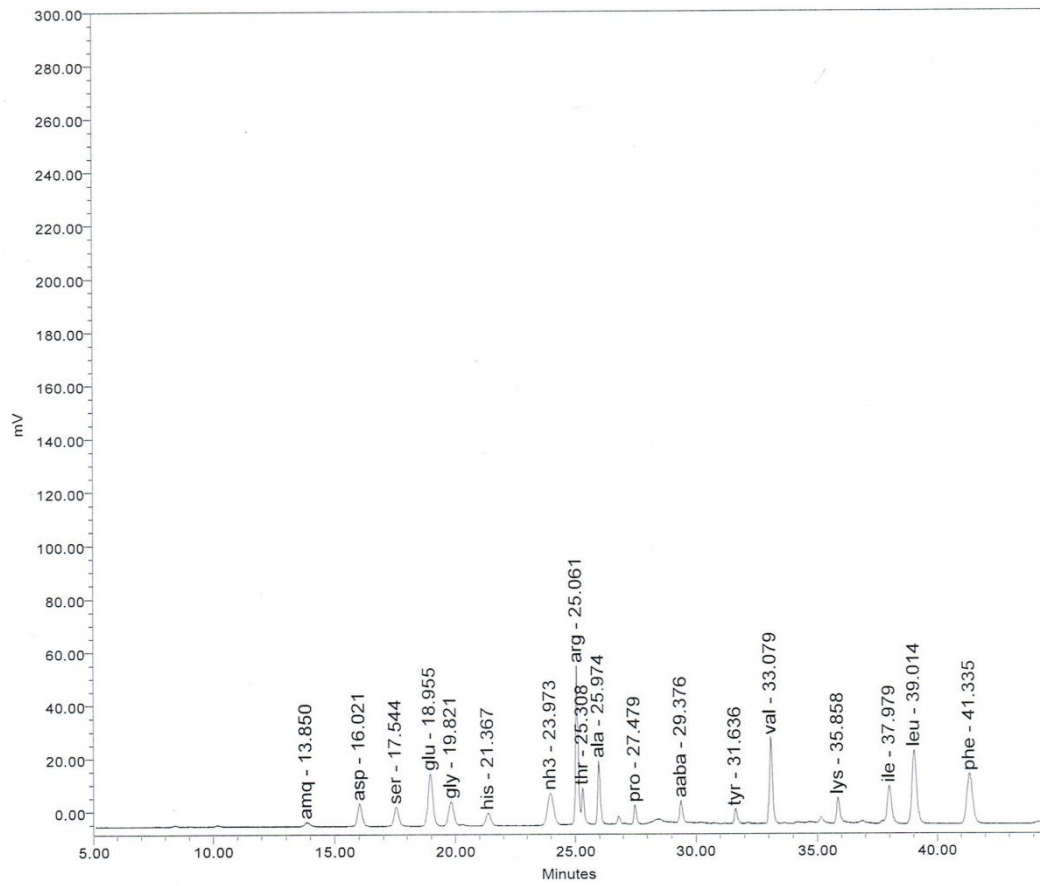
### ค.3 Chromatogram



รูปที่ ค.1 Chromatogram ของกรดอะมิโนมาตรฐาน



รูปที่ ค.2 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรร



รูปที่ ค.3 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ 6 ชั่วโมง

## ภาคผนวก ง

## Molecular weight distribution

## ง.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล

ตารางที่ ง.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าว

| น้ำหนักโมเลกุล<br>(kDa) | Untreated<br>(b) | Control<br>(c) | 15 min<br>(d) | 6 h<br>(e) | 12 h<br>(f) |
|-------------------------|------------------|----------------|---------------|------------|-------------|
| 55                      | 40.67            | 31.79          | 29.82         | 22.25      | 25.42       |
| 35                      | 4.57             | 4.75           | 3.62          | 4.83       | 4.52        |
| 32                      | 3.70             | 5.38           | 5.75          | 3.29       | 3.93        |
| 30                      | 11.63            | 11.19          | 12.37         | 16.63      | 14.80       |
| 24                      | 15.95            | 16.50          | 17.41         | 18.19      | 16.45       |
| 22                      | 2.95             | 2.25           | 2.61          | 3.29       | 4.04        |
| 16                      | 4.84             | 7.05           | 8.20          | 9.50       | 10.42       |
| 12                      | 5.65             | 6.17           | 6.30          | 6.59       | 7.63        |

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุพิชชา คุณารยกุล เกิดวันที่ 4 มกราคม 2535 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจาก ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

นางสาวสุพิชชา คุณารยกุล ได้นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในหัวข้อ Comparison study on selected functional properties of coconut proteins affected by deamidation methods. ในการประชุมวิชาการ The 42nd Congress on Science and Technology of Thailand ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ เซ็นทรัลพลาซา ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 30 พฤศจิกายน – 2 ธันวาคม พ.ศ. 2559