

การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ



นางสาวศุภกรจิตต์ เขี่ยมนเรพร

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM  
TOBACCO LEAVES



Miss Sookjit Eiamnaraeporn

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ

โดย

นางสาวศุภรจิตต์ เอี่ยมนเรพร

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

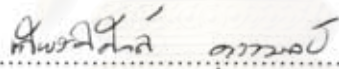


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

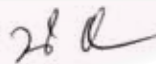
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(อาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย)



..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดณ์ ยงสวัสดิ์กุล)

ศุภกิจิตต์ เขี่ยมนเรพร: การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ  
(PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM  
TOBACCO LEAVES.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย, 100 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® และศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีในระหว่างการเก็บรักษา ชั้นแรกศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบ ผลการทดลองพบว่าภาวะที่ใช้น้ำกลั่นอุณหภูมิ 30°C สามารถแยกนิโคตินออกได้ประมาณ 67% ชั้นที่สองหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 50°C pH 6.5 โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 0.0, 1.0, 2.0, 5.0 และ 7.5% w/w และแปรเวลาในการย่อยโปรตีนเป็น 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าภาวะที่ใช้เอนไซม์ 5.0 และ 7.5% w/w เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกันคือ 35.78% และ 35.25% ตามลำดับ แต่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่างกันคือ เมื่อใช้เอนไซม์ 5.0% w/w จะให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด 277.25 mg/ ตัวอย่าง 100 g ขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ 7.5% w/w ให้ปริมาณ 414.13 mg/ ตัวอย่าง 100 g และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ 7.5% w/w ให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีซึ่งได้แก่ aspartic acid, glutamic acid และ proline สูงกว่าการใช้เอนไซม์ 5.0% w/w ผลของมอลโทเดกซ์ทริน (0 และ 5% w/v) ต่อสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ในด้านค่า surface hydrophobicity พบว่าการเติมมอลโทเดกซ์ทรินส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่า surface hydrophobicity ลดลง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ขณะที่ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อพิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยวิเคราะห์ค่า ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ metal chelating พบว่าตัวอย่างที่ใส่มอลโทเดกซ์ทรินมีค่า FRAP และ metal chelating ลดลง เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินโดยใช้เครื่อง scanning electron microscope พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นโพรงมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน เมื่อพิจารณาสมบัติด้านการละลายในช่วง pH 3-10 พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ pH 8 และ 10 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อพิจารณาสมบัติด้านการเกิดฟองในช่วง pH 4-7 พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการเกิดฟอง และความคงตัวของฟองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมีค่าลดลง ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อพิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันพบว่าค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มคงที่ตลอดช่วงการเก็บรักษา ขณะที่ค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตพบว่าเฉพาะกลุ่มที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีแนวโน้มของค่า metal chelating activity ลดลง

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ลายมือชื่อนิสิต.....สำราญต์ คุ้มคง.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย.....

ปีการศึกษา.....2551.....



# # 4872605423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: TOBACCO LEAVES/ PROTEIN HYDROLYSATE/ FUNCTIONAL PROPERTIES

SOOKJIT EIAMNARAEPORN : PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF  
PROTEIN HYDROLYSATES FROM TOBACCO LEAVES.

ADVISOR : KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., 100 pp.

The aims of this research were to produce protein hydrolysate from tobacco leaves by using Flavourzyme<sup>®</sup> and to study the effect of maltodextrin on the chemical, physical and functional properties of freeze-dried protein hydrolysate including the changes in chemical properties during storage. Using water at 30°C could remove about 67% of nicotine from tobacco. Tobacco powder, extracted with water at 30°C for 1 h., was used as a raw material for protein hydrolysate production. This sample was hydrolysed at 50°C, pH 6.5. Five concentrations (0, 1.0, 2.0, 5.0, and 7.5% w/w) of Flavourzyme<sup>®</sup> were used and incubation time was varied from 0 to 4 hours. The results showed that either using 5% w/w enzyme for 3 hours or using 7.5% w/w enzyme for 3 hours yielded the same level of degree of hydrolysis. However, the condition of using 7.5% w/w enzyme for 3 hours yielded the highest amount of total free amino acids (414.13 mg/ 100 g) compared with the others (277.25 mg/ 100 g). Protein hydrolysate obtaining from this former condition also yielded higher amount of aspartic acid, glutamic acid, and proline which are the precursors of flavors formation during cigarette production. Properties of freeze-dried protein hydrolysate were studied. The results showed that surface hydrophobicity of protein hydropholysate containing maltodextrin was lower than that of sample without maltodextrin. However, the difference was not significant ( $p > 0.05$ ). Free amino group of protein hydrolysate containing maltodextrin was significantly higher than that of sample without maltodextrin ( $p \leq 0.05$ ). Antioxidant activities of protein hydrolysate were measured using two methods namely, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and metal chelating activity. Both FRAP and metal chelating activity in sample containing maltodextrin were lower than sample without maltodextrin. Image of protein hydrolysate powder under scanning electron microscope revealed that the surface of sample without maltodextrin was more compact. Solubility of sample containing maltodextrin was lower than sample without maltodextrin. Foam expansion and foam stability of protein hydrolysate containing maltodextrin were significantly decreased ( $p \leq 0.05$ ) compared to those of sample without maltodextrin. During storage, the result showed that as the storage time increased, surface hydrophobicity and free amino group of both protein hydrolysate samples were decreased ( $p \leq 0.05$ ). FRAP activity of both protein hydrolysate samples was rather constant while metal chelating activity of sample containing maltodextrin was decreased during storage.

Department : .....Food Technology.....

Student's Signature : *S. Sookjit* .....

Field of Study : .....Food Technology.....

Advisor's Signature : *Kiattisak Duangmal* .....

Academic Year : .....2008.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชนิษฐา ธนาอนุวงศ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทาง และให้คำแนะนำในการปรับปรุง และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญาามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัยและพัฒนา โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคุณณิทยา ชัยวัฒน์คุปต์ คุณนิมิตพิสุทธิ ณรงค์ชวนะ และคุณวิลาศินี สุวรรณประศาสน์ ที่ให้คำแนะนำ และให้ความรู้ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการค้นคว้าข้อมูลในการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคน สำหรับกำลังใจ และความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ สำหรับความรัก ความเอาใจใส่ และกำลังใจที่ให้มาโดยตลอดอย่างไม่มีวันหมด ขอขอบคุณคุณปู่ คุณย่า คุณตา และคุณยายที่คอยมองลงมาจากข้างบนและช่วยส่งกำลังใจมาให้หลานคนนี้เสมอ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ .....	1
2 วารสารปริทัศน์ .....	3
2.1 ยาสูบ .....	3
2.2 ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ .....	4
2.3 ไพรตีนไฮโดรไลเสต .....	8
2.4 สมบัติทางเคมีของไพรตีนไฮโดรไลเสต .....	14
2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของไพรตีนไฮโดรไลเสต .....	21
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย .....	25
3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของใบยาสูบ .....	28
3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไพรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ .....	29
3.3 ศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทรีนต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของไพรตีนไฮโดรไลเสต .....	31
3.4 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีของไพรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการเก็บรักษา .....	36
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	38
4.1 องค์ประกอบของใบยาสูบ .....	38
4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไพรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ .....	40
4.3 ผลของมอลโทเดกซ์ทรีนต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของไพรตีนไฮโดรไลเสต .....	49

บทที่	หน้า
4.4 ผลการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการ เก็บรักษา.....	63
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	69
รายการอ้างอิง .....	71
ภาคผนวก .....	77
ภาคผนวก ก .....	78
ภาคผนวก ข .....	86
ภาคผนวก ค .....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	100



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในระบบ gradient ที่เวลาต่าง ๆ.....	29
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของไบยาซูบ.....	38
4.2	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่มีในไบยาซูบ.....	39
4.3	ปริมาณนิโคตินคงเหลือในตัวอย่างไบยาซูบหลังผ่านการสกัด .....	40
4.4	ระดับการย่อยโปรตีนในตัวอย่างไบยาซูบที่ภาวะในการสกัดต่าง ๆ.....	42
4.5	ระดับการย่อยโปรตีนจากไบยาซูบที่ภาวะต่าง ๆ.....	43
4.6	ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาซูบ และ BSA.....	49
4.7	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาซูบ และ BSA.....	50
4.8	ความสามารถในการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาซูบ.....	52
4.9	Metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาซูบ และ EDTA.....	54
4.10	ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไบยาซูบ และ BSA ในช่วง pH 4-7.....	63
4.11	ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วงการเก็บรักษา.....	64
ข 1	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากไบยาซูบที่ภาวะ ต่าง ๆ.....	86
ข 2	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากไบยาซูบที่ ภาวะต่าง ๆ.....	86
ข 3	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่ได้จากการย่อยโปรตีน จากไบยาซูบที่ภาวะต่าง ๆ.....	87
ข 4	ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทริน.....	87
ข 5	ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทริน และ BSA.....	88

ตารางที่	หน้า
ข 6	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 88
ข 7	ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการ เก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 89
ข 8	Metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 89
ข 9	องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทริน..... 89
ค 1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณนิโคตินคงเหลือในตัวอย่างใบยาสูบ หลังการสกัด..... 90
ค 2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนที่ภาวะการสกัดนิโคติน ต่าง ๆ..... 90
ค 3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนที่ภาวะต่าง ๆ..... 90
ค 4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีน ไฮโดรไลเสด..... 91
ค 5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีใน โปรตีนไฮโดรไลเสด..... 91
ค 6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ในโปรตีนไฮโดรไลเสด..... 91
ค 7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน ไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินจากใบยาสูบ และ BSA..... 92
ค 8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสด ที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินจากใบยาสูบ และ BSA..... 92
ค 9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้าน ออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน..... 92
ค 10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีน ไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในช่วง pH 3-10..... 92
ค 11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีน ไฮโดรไลเสดที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วง pH..... 93

ตารางที่	หน้า
ค 12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน และ BSA ในช่วง pH 4-7..... 93
ค 13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน และ BSA ในแต่ละช่วง pH..... 94
ค 14	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน และ BSA ในช่วง pH 4-7..... 94
ค 15	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน และ BSA ในแต่ละช่วง pH..... 95
ค 16	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 95
ค 17	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในแต่ละช่วงการเก็บรักษา..... 96
ค 18	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 96
ค 19	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในแต่ละช่วงการเก็บรักษา..... 97
ค 20	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 97
ค 21	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในแต่ละช่วงการเก็บรักษา..... 98
ค 22	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์..... 98
ค 23	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีนในแต่ละช่วงการเก็บรักษา... 99

## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	อนุกรมวิธานของต้นยาสูบ.....	3
2.2	สูตรโครงสร้างของนิโคติน.....	5
2.3	สูตรโครงสร้างของมอลโทเดกซ์ทรีน.....	14
2.4	ปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับหมู่อะมิโน.....	15
2.5	ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารประกอบ Ferric-TPTZ.....	20
4.1	ค่า relative nicotine content ของตัวอย่างใบยาสูบหลังผ่านการสกัดนิโคติน...	41
4.2	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่ภาวะต่าง ๆ.....	44
4.3	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีเปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่เวลาในการย่อยต่าง ๆ.....	46
4.4	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic เปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่เวลาในการย่อยต่าง ๆ.....	47
4.5	Gel filtration chromatography ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน.....	55
4.6	ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของมอลโทเดกซ์ทรีน และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน จากเครื่อง scanning electron microscope ที่กำลังขยายต่าง ๆ.....	57
4.7	กราฟระหว่าง heat flow และอุณหภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์มอลโทเดกซ์ทรีน และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรีน จากเครื่อง differential scanning calorimeter.....	58
4.8	ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบยาสูบในช่วง pH 3-10.....	59
4.9	ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบยาสูบ และ BSA ในช่วง pH 4-7.....	61
4.10	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วงการเก็บรักษา.....	65
4.11	ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วงการเก็บรักษา.....	66

รูปที่		หน้า
4.12	ค่า metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วงการเก็บรักษา	67
ก 1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry.....	81
ก 2	โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน.....	83
ก 3	กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของ trolox .....	84
ก 4	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	85



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 1

### บทนำ

ยาสูบเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ใน วงศ์ Solanaceae จี้นัส *Nicotiana* มีทั้งหมด 64 สปีชีส์ แต่ที่นิยมปลูกในเชิงพาณิชย์ คือ *Nicotiana tabacum* (Tso, 1990) ในประเทศไทยสายพันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์เวอร์จิเนีย พันธุ์เบอร์เลย์ พันธุ์เตอร์กิช และพันธุ์พื้นเมือง โดยใบของยาสูบนิยมนำมาผลิตเป็นบุหรี่ยาเส้น ยานัตถุ และยาฉุน นอกจากนี้ใบยาสูบยังสามารถสกัดเป็นยาฆ่าแมลง หรือยา ชนิดต่าง ๆ เช่น ยานอนหลับ ยาระงับประสาท และยาขับเหงื่อ ในใบยาสูบประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุต่าง ๆ (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม ) รวมทั้งสารอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณมาก สารอัลคาลอยด์มีดี วัยกันหลายชนิด เช่น แอนาเบซิน (anabasine) แอนาตาบิน (anatabine) นอร์นิโคติน (nornicotine) แต่ที่มีมากในใบยาสูบ คือ นิโคติน (nicotine) ซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 90 ของสารอัลคาลอยด์ทั้งหมด (Morris, 2004) นิโคตินจัดเป็นสารที่มีอันตรายต่อมนุษย์โดยมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น และหัวใจเต้นเร็วและแรงขึ้น ถ้าร่างกายได้รับนิโคตินในปริมาณที่สูงอาจถึงตายได้ โดยพบว่าค่า LD<sub>50</sub> ของนิโคตินมีค่าเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Merck Index, 2001) ดังนั้นก่อนนำใบยาสูบไปใช้ประโยชน์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปริมาณนิโคตินที่มีอยู่ในใบยาสูบ

การทำโปรตีนไฮโดรไลเซต จัดเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำโปรตีนจากใบยาสูบมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่และคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนเหล่านั้น โดยเป็นการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญ ต่อการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญในการพิจารณานำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อีกทั้งความสามารถในการละลายยังสามารถส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านอื่น (การเกิดโฟม และการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์) นอกจากนี้ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเซต ยังมีผลต่อการเกิดกลิ่น และกลิ่นรสที่เฉพาะตัว ทำให้สามารถนำโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นไปใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสได้ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จะถูกทำให้แห้งก่อนการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

เพื่อเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาและสะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสต แต่เนื่องจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีที่ใช้ อุณหภูมิและความดันต่ำ ซึ่งอาจทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนจึงอาจเติมสารให้ความคงตัว (stabilizing excipients) เช่น การเติมมอลโทเดกซ์ทรินลงไปโปรตีนไฮโดรไลเสตก่อนการทำแห้ง เพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน (Chronakis, 1998; Passot et al., 2005) แต่มอลโทเดกซ์ทรินอาจทำให้สมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไบยาซูบ โดยใช้ เอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> และศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ตลอดจนสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต รวมทั้งศึกษาผล การเปลี่ยนแปลงสมบัติ ทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสต ในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ จากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 ยาสูบ

ยาสูบเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Solanaceae จีนัส *Nicotiana* (รูปที่ 2.1) ซึ่งมีด้วยกันทั้งหมด 64 สปีชีส์ แต่ที่นิยมปลูกในเชิงพาณิชย์ คือ *Nicotiana tabacum* (Tso, 1990) ยาสูบจัดเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอเมริกา เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับมะเขือเทศ มันฝรั่ง และพริก ในประเทศไทยยาสูบที่ปลูกนั้นเป็นยาสูบพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งส่วนมากปลูกในบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ จากหลักฐานพบว่า มีการนำยาสูบเข้ามา ปลูกในประเทศไทย ตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 16 ใน พ.ศ. 2478 บริษัท British American Tobacco (B.A.T.) ได้นำวิธีการปลูกและผลิตยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนียเข้ามาเผยแพร่ในประเทศไทย แต่ใน พ.ศ. 2482 รัฐบาลไทยได้ซื้อกิจการยาสูบทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยโรงบ่มใบยา โรงงานผลิตบุหรี่ และ บริษัทที่จัดจำหน่ายบุหรี่จากบริษัท B.A.T. ต่อมาในปี พ.ศ. 2502 จึงเริ่มมีการปลูกยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์และพันธุ์เตอร์ริชที่จังหวัดสุโขทัย และร้อยเอ็ดตามลำดับ (สุรพล อุบัติสสกุล, 2527)

Kingdom:	Plant
Subkingdom:	Embryophyta
Division:	Tracheophyta
Subdivision:	Pteropsida
Class:	Angiosperma
Subclass:	Dicotyledonae
Order:	Solanales
Family:	Solanaceae
Genus:	<i>Nicotiana</i>

รูปที่ 2.1 อนุกรมวิธานของต้นยาสูบ  
ที่มา: Tso (1990)

การจัดประเภทของยาสูบสามารถจัดแบ่งโดยอาศัยหลักเกณฑ์ต่าง ๆ เช่น สายพันธุ์ของยาสูบ วิธีการเขตรกรรม วิธีการเก็บใบยา และวิธีการบ่มใบยาสูบ โดยสุรพล อุบัติสสกุล (2527) ได้จัดประเภทของยาสูบโดยใช้วิธีการบ่มใบยาสูบเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง ดังนี้

1 การบ่มใบยาสูบด้วยไอร้อน (flue-cured) เป็นการบ่มที่ อาศัยความร้อนจากไอร้อนที่ผ่านไปตามท่อทั่วทั้งโรงบ่ม เพื่อป้องกันไม่ให้ใบยาสูบถูกควันไฟโดยตรง ทำให้ใบยาสูบที่บ่มได้มีสีเหลืองสด หรือ ส้ม สายพันธุ์ยาสูบที่ใช้วิธีการบ่มประเภทนี้ได้แก่ ยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย (Virginia) พันธุ์ Speight พันธุ์ Coker และพันธุ์ Hicks broadleaf

2 การบ่มใบยาสูบด้วยอากาศ (air-cured) เป็นการบ่มที่นำใบยาสูบมาตากไว้ในโรงบ่มที่มีอากาศถ่ายเทดี เพื่อให้น้ำจากใบยาสูบค่อย ๆ ระเหยออกไป อาจมีการใช้ความร้อนช่วยในการระเหยในกรณีที่อากาศมีความชื้นสูง โดยสายพันธุ์ยาสูบที่ใช้วิธีการบ่มประเภทนี้ได้แก่ ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ (Burley) และพันธุ์แมรี่แลนด์ (Maryland)

3 การบ่มใบยาสูบด้วยแดด (sun-cured) เป็นการบ่มที่นำใบยาสูบมาตากแดด และผึ่งลมไว้กลางแจ้ง ใบยาสูบที่ บ่มได้จะมีสีสดกว่าใบยาสูบที่บ่มด้วยอากาศ พันธุ์ยาสูบที่นิยมใช้วิธีการบ่มประเภทนี้ได้แก่ ยาสูบพันธุ์เตอร์กิช (Turkist) และยาสูบพันธุ์พื้นเมือง

4 การบ่มใบยาสูบด้วยควันไฟ (fire-cured) เป็นการบ่มที่ให้ใบยาสูบสัมผัสกับควันไฟโดยตรง ทำให้ใบยาที่ได้อาจมีสีคล้ำ และมีกลิ่นฉุนกว่าใบยาที่บ่มด้วยไอร้อน สายพันธุ์ยาสูบที่นิยมใช้วิธีการบ่มประเภทนี้ได้แก่ ยาสูบพันธุ์ Madole และพันธุ์ Yellow mammoth

ในประเทศไทยสายพันธุ์ยาสูบที่นิยมปลูกได้แก่ สายพันธุ์เวอร์จิเนีย สายพันธุ์เตอร์กิช สายพันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์เบอร์เลย์ ซึ่งยาสูบแต่ละสายพันธุ์จะมีวิธีในการผลิตเป็นยาสูบได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากยาสูบแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไป

## 2.2 ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์

ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ เป็นยาสูบที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูง นิยมปลูกมากบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสุโขทัย เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ พิษณุโลก และพิจิตร ใบยาสูบที่ได้จากยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์นิยมนำมาใช้ผลิตเป็นบุหรี่ โดยคุณภาพของใบยาสูบขึ้นกับองค์ประกอบที่มีอยู่ในใบยาสูบ (ทวีศักดิ์ วัฒนกุล, 2530)

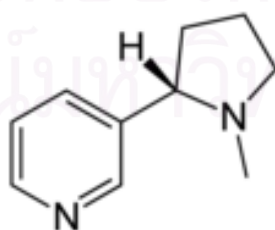
## 2.2.1 องค์ประกอบในใบยาสูบจากยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ (สุรพล อุบัติสสกุล, 2527)

### 2.2.1.1 สารประกอบไนโตรเจน แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ

– สารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในรูปโปรตีน ในระหว่างการบ่มใบยาสูบ โปรตีนจะถูกละลายเป็นกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น proline, asparagine, glutamine, aspartic acid และ glutamic acid ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้ นี้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา Maillard ทำให้ได้สารที่ให้กลิ่นรสดีในใบยาสูบ โดยทั่วไปโปรตีนที่อยู่ในใบพืช นั้นเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ ซึ่งจะอยู่ในส่วนของไซโตพลาสต์ และคลอโรพลาสต์ (นิสานารถ กระแสร์ชล, 2540) สำหรับโปรตีนที่มีอยู่ในใบยาสูบนั้น ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ในน้ำ (albumin)

– สารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในรูปนอนโปรตีนไนโตรเจน ได้แก่ สารประกอบอัลคาลอยด์ เช่น แอนาเบซิน (anabasine) แอนาตาบิน (anatabine) นอร์นิโคติน (nornicotine) ไนเตรท แอมโมเนีย และนิโคติน สารประกอบนิโคตินมี ปริมาณมากร้อยละ 90 ของปริมาณสารอัลคาลอยด์ทั้งหมด

นิโคติน (รูปที่ 2.2) เป็นสารที่มีอันตรายต่อมนุษย์ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัว (vasoconstriction) ส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น และหัวใจเต้นเร็วและแรงขึ้น ทำให้อัตราการหายใจเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้ความอยากอาหารลดลง ถ้าร่างกายได้รับนิโคตินในปริมาณสูงอาจถึงตายได้ โดยพบว่าระดับ LD<sub>50</sub> ของนิโคตินในหนูเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Merck Index, 2001) นิโคตินถูกสร้างขึ้นที่รากแล้วไปสะสมที่ใบ โดยปัจจัยที่ควบคุมปริมาณนิโคตินในใบยาสูบมีหลายประการ ได้แก่ พันธุ์ของยาสูบ ปริมาณธาตุอาหารที่ต้นยาสูบได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจน ความชื้นในดิน แสงสว่างและอุณหภูมิ ระยะการตอนยอด ความสมบูรณ์ของราก ระดับความแก่สุกของใบยา และตำแหน่งของใบยาบนลำต้น เป็นต้น (สุรพล อุบัติสสกุล, 2527)



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของนิโคติน

ที่มา: Merck Index (2001)



### 2.2.1.2 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุดในใบยาสูบ คือ มีประมาณร้อยละ 25-50 ของน้ำหนักใบยาแห้ง อัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของยาสูบ โดยทั่วไปยาสูบสายพันธุ์เวอร์จินีเยจะมีปริมาณสารประกอบคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด

คาร์โบไฮเดรตที่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของบุหรี่ยาก คือ น้ำตาลกลูโคส และซูโครส โดยน้ำตาลจะเกิดในระหว่างการเจริญเติบโตของต้นยาสูบ และปริมาณจะเพิ่มมากขึ้นในระหว่างขั้นตอนการบ่มใบยาสูบในโรงบ่ม น้ำตาลในใบยาสูบจะให้ควันซึ่งมีองค์ประกอบของกรดที่ระเหยได้ในระหว่างการเผาไหม้ของบุหรี่ยาก กรดที่ระเหยได้ที่เกิดขึ้นนี้จะช่วยลดความเป็นด่างของควันที่เกิดจากการเผาไหม้ของนิโคติน และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ทำให้บุหรี่ยากมีรสนุ่ม นวล ไม่ระคายคอ

### 2.2.1.3 กรดอินทรีย์ แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ

— กรดที่ระเหยได้ (volatile acid) ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดแอสติก กรดโพทิโอนิก กรดบิวทิริก กรดวาเลอริก และกรดไอโซวาเลอริก เป็นต้น ซึ่งถึงแม้ว่ากรดที่ระเหยได้จะมีปริมาณน้อย แต่ก็มีความสำคัญต่อกลิ่นรสและกลิ่นของบุหรี่ยาก โดยพบว่าใบยาสูบที่มีคุณภาพดีจะมีปริมาณกรดที่ระเหยได้มากกว่าใบยาสูบที่มีคุณภาพต่ำ

— กรดที่ไม่ระเหย (nonvolatile acid) ได้แก่ กรดมาลิก กรดซิตริก กรดออกซาลิก และกรดมาโลนิก เป็นต้น ซึ่งกรดที่ไม่ระเหยนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณกรดทั้งหมดในใบยาสูบ โดยกรดที่ไม่ระเหยจะมีความสัมพันธ์ในด้านลบกับคุณภาพของใบยาสูบ โดยพบว่าในใบยาคุณภาพดีจะมีปริมาณของกรดที่ไม่ระเหยต่ำกว่าใบยาคุณภาพต่ำถึงร้อยละ 50

### 2.2.1.4 แร่ธาตุ แบ่งออกเป็นสามประเภท ดังนี้

— ธาตุอาหารหลัก เป็นธาตุอาหารที่ต้นยาสูบต้องการเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และกำมะถัน

— ธาตุอาหารรอง เป็นธาตุอาหารที่ต้นยาสูบต้องการเป็นจำนวนน้อย ได้แก่ อะลูมิเนียม โบรอน คลอรีน ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม โซเดียม ซิลิกอน และสังกะสี

— ธาตุอาหารโครงสร้าง เป็นธาตุอาหารที่ต้นยาสูบใช้เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างส่วนต่าง ๆ ได้แก่ คาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน

ธาตุอาหารเหล่านี้จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบ และมีความสัมพันธ์กับสมบัติของการเผาไหม้ของใบยาสูบ การเผาไหม้บุหรี่ยากที่มี

สารอินทรีย์ที่มีอยู่สลายตัว หหมดเหลือแต่ถ้าที่เป็นสารอินทรีย์ โดยพบว่าแคลเซียมและแมกนีเซียมมีส่วนช่วยให้การเผาไหม้หรือสมบูรณ์ ขณะที่คลอรีน ฟอสฟอรัส ซิลิกอน และกำมะถัน จะถ่วงอัตราการเผาไหม้ของไบยาสูบ

#### 2.2.1.5 สารหอมในไบยาสูบ

สารหอมในไบยาสูบเป็นสารประกอบ เชิงซ้อนซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่เกิดจากต่อมใต้ผิวใบด้านล่างในระหว่างที่ไบยาเจริญเติบโต และเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกรรมวิธีการผลิต เช่น การบ่มและการเก็บให้ได้อายุ โดยปริมาณของสารหอมจะมีมากหรือน้อยขึ้นกับพันธุ์ยาสูบ ตำแหน่งของไบยาสูบบนลำต้น และความสุกแก่ของไบยา

#### 2.2.1.6 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกในไบยาสูบมีประมาณร้อยละ 7 ของน้ำหนักไบยาแห้ง โดยปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกอาจแตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความสุกแก่ของไบยาสูบ ตำแหน่งของไบยาสูบ และเทคนิคในการบ่มไบยาสูบ สารประกอบฟีนอลิกมีความสำคัญต่อกลิ่นของควันบุหรี่ ที่เกิดจากการเผาไหม้โดยตรง สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง ซิมเพลฟีนอล (simple phenol) ได้แก่ ฟีนอล เครซอล ยูจีซอล และไกลคอล และกลุ่มที่สอง พอลิฟีนอล (polyphenol) ได้แก่ กรดคอลลโรเจนิค รูติน สโคโพลิน และสโคโพลิติน

### 2.2.2 กระบวนการผลิตยาสูบจากยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ (วุฒิ อนันบุญทริก, 2549)

ยาสูบแต่ละสายพันธุ์จะมีขั้นตอนการเก็บเกี่ยว และการบ่มที่แตกต่างกันออกไปทั้งนี้เนื่องจากในไบยาสูบแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน สำหรับยาสูบสายพันธุ์เบอร์เลย์ที่นิยมนำมาบ่มด้วยอากาศนั้น กระบวนการผลิตจะเริ่มจากการเก็บไบยาสดจากต้นยาสูบภายหลังจากที่ทำการ topping แล้วประมาณ 2-3 สัปดาห์ จากนั้นนำไบยาสูบไปผ่านขั้นตอนการบ่มด้วยวิธีการบ่มด้วยอากาศเป็นเวลาประมาณ 30-45 วัน เพื่อให้ไบยาสดเปลี่ยนเป็นไบยาแห้งโดยการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงบ่ม การบ่มสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะทำสีเหลือง (yellowing stage) ระยะทำสีน้ำตาล (browning stage) ระยะทำใบแห้ง (lamina drying stage) และระยะทำก้านแห้ง (stem drying stage) โดยในระหว่างการบ่มจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งมีผลต่อ อุดมภาพและกลิ่นรสของไบยาสูบ ปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญ คือ ปฏิกิริยา Maillard ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโน โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งกรดอะมิโน aspartic acid, glutamic acid และ proline กับน้ำตาลรีดิวิซิ่ง ทำให้ได้สารที่ ให้กลิ่นรสดีในบะยุ (สุรพล อุบัติสกูล, 2527; Hwang, Hartman and Ho, 1995) บะยุที่ ผ่านขั้นตอนการบ่มแล้ว เรียกว่า บะยุมัดก่า ซึ่งจะถูกนำมาแยกก้านบะยุออก แล้วจึงผ่านเข้าสู่ ขั้นตอนการ re-dry เพื่อหยุดการบ่ม และยืดอายุในการเก็บรักษาบะยุให้นานขึ้น หลังจากนั้น เก็บให้ได้อายุที่อุณหภูมิห้องเพื่อ ทำให้บะยุมีกลิ่นหอม รสกลมกล่อม ลดความระคาย และรอ การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ในการผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น ยาเส้น และบุหรี่ย จะนำบะยุสายพันธุ์เบอร์เลย์ที่ผ่าน ขั้นตอนการเก็บให้ได้อายุแล้วมาผสมกับบะยุสายพันธุ์อื่นตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ เพื่อให้ได้ กลิ่นรสตามต้องการ จากนั้นนำบะยุผ่านเข้าเครื่องให้ความชื้น เพื่อให้บะยุอ่อนตัวลง แล้วผ่านเข้าสู่ขั้นตอนการ casing ซึ่งจะพ่นสารปรุงแต่งกลิ่นรสลงในบะยุ เพื่อให้บะยุที่ได้ มีกลิ่นรสดีขึ้น จากนั้นหมักบะยุทิ้งไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำบะยุมาคลุกเคล้าให้เข้า กัน แล้วจึงหั่นบะยุเป็นเส้นฝอยและนำไปคั่วให้แห้ง หลังจากนั้นพ่นสารปรุงแต่งกลิ่นรสลงในบะ ยุอีกครั้ง หมักบะยุทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง บะยุที่ผ่านการหมักขั้นสุดท้ายแล้วจะเรียกว่ายา เส้น ในการผลิตบุหรี่ยจะนำยาเส้นที่ได้ เข้าเครื่องมวนเพื่ อมวนเป็นบุหรี่ยออกมา (สุรพล อุบัติสกูล, 2527)

## 2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสต คือผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่มีโปรตีนเป็น องค์ประกอบโดยการใช้น้ำหรือเอนไซม์ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการ และสมบัติเชิงหน้าที่ บางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดอิมัลชัน สมบัติการเกิดโฟม และ สมบัติในการเกิดเจล เป็นต้น (Kristinsson and Rasco, 2000)

### 2.3.1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

โดยทั่วไปการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตมีสองวิธี ได้แก่

#### 2.3.1.1 การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี

เป็นการทำให้พันธะเพปไทด์แตกออกโดยใช้น้ำหรือเบส ซึ่ง เป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ควบคุมระดับการย่อยโปรตีนได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพ ไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด เป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ สามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี แต่จะทำให้ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นถูกทำลาย นอกจากนี้ยังพบว่ากรดย่อยโปรตีนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูง ในภาวะอุณหภูมิสูงทำให้เกิดสาร 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในกลุ่ม chloropropanol โดยจะมีพิษต่อตับ ไต ต่อมไทรอยด์ เยื่อช่องปากและลิ้น และยังเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสาร 1-3-dichloro-2-propanol-2-dichlorohydrine (1-3-DCP) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2543) ดังนั้นในการย่อยโปรตีนโดยใช้กรดจึงจำเป็นที่จะต้องระมัดระวัง และควบคุมให้เกิดสารปนเปื้อนดังกล่าวให้น้อยที่สุด สารละลายกรดที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟูริก

กรดไฮโดรคลอริก โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้ จะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยในการย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกนั้นจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต และการย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้นจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นในกระบวนการนั้นเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไป จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์มากนัก (Kristinsson and Rasco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส สารละลายเบสที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากย่อยในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา racemization ของกรดอะมิโน โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก L-form ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังจะทำให้เกิดปฏิกิริยา  $\beta$ -elimination ของ serine และ cysteine ทำให้เกิดสารประกอบ dehydroalanine ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด เช่น lysinoalanine, ornithinoalanine และ lanthionine เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000)

### 2.3.1.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้ โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเพปไทด์ของโมเลกุลโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง และภาวะที่ใช้ในการย่อยโปรตีนไม่รุนแรง ดังนั้นโครงสร้างของกรดอะมิโนจะไม่ถูกทำลาย การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์จะมีอัตราการย่อยค่อนข้าง

สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือเบส แต่การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์อาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ในโมเลกุลโปรตีน เช่น isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine และ tryptophan ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกลิ่นรสที่ได้ (Prendergast, 1974) ในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

— ชนิดของเอนไซม์ การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันจะ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ต่างกัน ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ งานวิจัยของ Kamnerdpetch และคณะ (2007) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนจากเนื้อมันฝรั่ง โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง endoprotease และ exopeptidase ในการย่อยเปรียบเทียบกับ การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว คณะผู้วิจัยเลือกใช้เอนไซม์ทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่ เอนไซม์ Alcalase® (Novo Nordisk, Denmark) เอนไซม์ Novo Pro-D® (Novo Nordisk, Denmark) ซึ่งเป็น endoprotease เอนไซม์ Flavourzyme® (Novo Nordisk, Denmark) และเอนไซม์ Corolase® (Rohm Enzyme, Germany) ซึ่งเป็น exopeptidase ในการย่อย จากนั้นจับคู่เอนไซม์โดยใช้อัตราส่วนของ endoprotease ต่อ exopeptidase เท่ากับ 2:5 และ 3:4 ตามลำดับ ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 26 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์ 2 ชนิดควบคู่กันในการย่อยให้ประสิทธิภาพในการย่อยซึ่งพิจารณาจากระดับการย่อยโปรตีนที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ endoprotease และ exopeptidase ควบคู่กันยังให้ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวอีกด้วย โดยพบว่าการใช้เอนไซม์ Alcalase® และ Flavourzyme® ในอัตราส่วน 2:5 ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่สูงที่สุด คือ ร้อยละ 44 และให้ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดเท่ากับ 306 มิลลิกรัมต่อโปรตีน 1 กรัม

— ปริมาณเอนไซม์ การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง จากนั้นระดับการย่อยโปรตีนจะคงที่ เนื่องจากโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาทำปฏิกิริยาพอดีกับเอนไซม์ที่ใช้ ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เป็นผลิตภัณฑ์มีปริมาณที่คงที่ ดังนั้นระดับการย่อยโปรตีนจึงมีค่าคงที่ Alvisse และคณะ (2000) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โปรตีนไฮโดรไลเสตจาก alfalfa โดยใช้เอนไซม์ Delvolase® (Gist Brocades, France) ในการย่อย และใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีนเท่ากับ 0.8, 7.6, 76, 152 และ 184 ยูนิตต่อโปรตีนเข้มข้นจาก alfalfa 1 กรัม ย่อยที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีนเพิ่มขึ้น ปริมาณสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการรักษาระดับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 9.5 ตามวิธี pH-stat จะ



มีค่าเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีนเท่ากับ 152 และ 184 ยูนิตต่อโปรตีนเข้มข้นจาก alfalfa 1 กรัม ใช้ปริมาณสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ 60 และ 65 มิลลิโมล ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าปริมาณสารละลายไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อรักษาระดับ pH เมื่อใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีน 0.8, 7.6 และ 76 ยูนิตต่อโปรตีนเข้มข้นจาก alfalfa 1 กรัม ที่ใช้ปริมาณสารละลายไฮดรอกไซด์ 25, 40 และ 45 มิลลิโมลตามลำดับ

— ภาวะในการย่อยโปรตีน เอนไซม์โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันที่ระดับความเป็นกรดเบส (pH) ต่างกัน แต่จะมีช่วงความเป็นกรดเบสหนึ่งที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่สุด ดังนั้นในการนำเอนไซม์มาใช้งานจึงต้องมีการควบคุมความเป็นกรดเบสให้เหมาะสม และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง อุณหภูมิในการย่อยโปรตีนจึงมีบทบาทสำคัญ ถ้าใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงเกินไป จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดควรคำนึงถึงความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ นอกจากนี้ระยะเวลาการย่อยโปรตีนก็มีผลต่อการย่อยโปรตีนเช่นกัน โดยในช่วงแรกของการย่อยโปรตีน เอนไซม์จะเข้าจับกับโปรตีนอย่างรวดเร็วเกิดการย่อยโปรตีนจนทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นขึ้น เมื่อเวลาในการย่อยมากขึ้นความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ (Adler-Nissen, 1986)

### 2.3.2 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ในการย่อยโปรตีนเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติเป็นไปตามความต้องการนั้น จำเป็นต้องควบคุมระดับการย่อยโปรตีนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เนื่องจากระดับการย่อยโปรตีนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่แตกต่างกัน ในการหาระดับการย่อยโปรตีนนั้นสามารถคำนวณได้จาก

$$DH = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

$N_0$  = ปริมาณไนโตรเจน หรืออะมิโนทั้งหมดที่ได้ก่อนการย่อย

$N_1$  = ปริมาณไนโตรเจน หรืออะมิโนที่ได้ภายหลังการย่อย

โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน หรือหมู่อะมิโนที่นำมาใช้ ในการคำนวณนั้นมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การใช้เทคนิค Kjeldahl ในการหาปริมาณไนโตรเจน หรือวิธีทาง

spectrophotometry ในการหาหมู่อะมิโนโดยใช้สารเคมีซึ่งเกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะกับหมู่อะมิโนทำให้เกิดสารประกอบที่มีสี จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในช่วง ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น biuret, ninhydrine, กรด trinitrobenzene sulfonic, fluorescamine และ orthophthaldehyde (OPA) เป็นต้น นอกจากนี้การหาระดับการย่อยโปรตีนอาจใช้การไตเตรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เรียกว่า เทคนิค pH-stat โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลาง หรือเบสเล็กน้อย ทำให้หมู่อะมิโนหลุดออกมา และเกิดการปลดปล่อยโปรตอนซึ่งจะทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลซิสลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นคำนวณหาระดับการย่อยโปรตีนจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างการทำปฏิกิริยา ดังสมการ (2) (Adler-Nissen, 1986; Silvestre, 1997)

$$DH = \frac{B \times N_b \times 1 \times 1 \times 100}{M_b \alpha h_{tot}} \dots\dots\dots(2)$$

- B = ปริมาณต่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)  
 $N_b$  = ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)  
 $M_b$  = มวลของโปรตีน (กรัม)  
 $\frac{1}{\alpha}$  = ค่า calibration สำหรับ pH-stat  
 $h_{tot}$  = จำนวนพันธะเพปไทด์ในโปรตีน

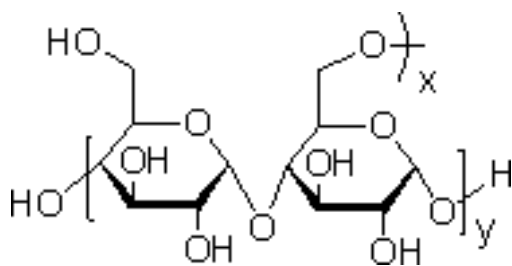
จากงานวิจัยของ Guan และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยโปรตีนที่มีต่อค่า TCA-soluble nitrogen (NTCA) ของโปรตีนไฮโดรไลซิสจากรำข้าวโอ๊ต (โปรตีนร้อยละ 73.4) ซึ่งย่อยโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ trypsin (Novo Industry, Denmark) ร้อยละ 1.5 w/w ของสารตั้งต้น (pH 8, 45°C) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่ย่อยด้วยระดับการย่อยโปรตีนโดยใช้วิธี pH-stat จากการทดลองพบว่าในช่วงสองชั่วโมงแรกของการย่อยโปรตีน ระดับการย่อยโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นระดับการย่อยโปรตีนจะคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากการลดลงของพันธะเพปไทด์ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ trypsin ขณะที่ค่า NTCA มีแนวโน้มเช่นเดียวกับระดับการย่อยโปรตีน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นใหม่ภายหลังจากการย่อยจะถูก

ใช้เป็นสารตั้งต้นของการวิเคราะห์ NTCA ดังนั้นค่า NTCA ที่ได้จึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสองชั่วโมงแรก แล้วมีค่าคงที่

### 2.3.3 การทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยสารเคมี หรือเอนไซม์ตามภาวะที่เหมาะสม จนได้ระดับการย่อยโปรตีนตามที่ต้องการแล้ว จะถูกนำมาทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย หรือวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและสะดวกต่อการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้ในผลิตภัณฑ์ หรือรอการวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนต่อไป การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นการทำแห้งที่นิยมนำมาใช้ในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้คุณสมบัติในการทำแห้ง แต่พบว่ากระบวนการทำแห้งดังกล่าวก่อให้เกิด freezing และ drying stress ต่าง ๆ เช่น การเกิดผลึกน้ำแข็ง และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ซึ่งจะส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนเกิดการคลายตัว (unfold) และโปรตีนเกิดการเสียสภาพได้ ดังนั้นจึงมีการนำสารให้ความคงตัว (stabilizer) มาใช้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการคลายตัวและเสียสภาพในระหว่างกระบวนการทำแห้ง (Wang, 2000) สารให้ความคงตัวที่นำมาใช้ เช่น น้ำตาลบางชนิด (ซูโครส มอลโทส และ trehalose) polyols (mannitol, inositol และ sorbitol) พอลิเมอร์ (เดกซ์แทรน และมอลโทเดกซ์ทริน ) หรือ non-aqueous solvents (ethylene glycol, glycerol, dimethylsulphoxide และ dimethylformamide) เป็นต้น (Wang, 2000; Passot et al., 2005)

มอลโทเดกซ์ทริน (รูป 2.3) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ โดยมีมอลโทเดกซ์ทรินจะมีค่า dextrose equivalent (DE) น้อยกว่า 20 โมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินประกอบด้วยแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงที่เป็นพอลิแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 glucosidic สมบัติเชิงหน้าที่ของมอลโทเดกซ์ทรินจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับค่า DE ของมอลโทเดกซ์ทริน สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของมอลโทเดกซ์ทริน ได้แก่ bulking ความสามารถในการเกิดเจลและฟิล์ม ความสามารถในการจับไขมัน ความสามารถในการกระจายตัวและการละลาย ความสามารถในการดูดซับความชื้น ความสามารถในการควบคุมการแช่แข็ง (freezing control) และการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (preventing crystallization) เป็นต้น (Chronakis, 1998; Moore, Amante and Soldi, 2005; Passot et al., 2005) จากสมบัติเชิงหน้าที่ของมอลโทเดกซ์ทรินที่กล่าวมา ทำให้มอลโทเดกซ์ทรินถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความคงตัวในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหาร



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของมอลโทเตทราซึน  
ที่มา: Anonymous (2000)

## 2.4 สมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสต

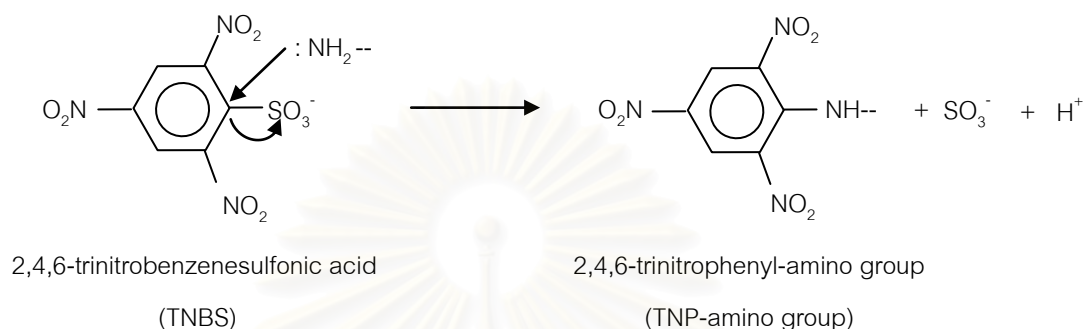
### 2.4.1 Surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

Surface hydrophobicity เป็นค่าที่บอกปริมาณหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่อยู่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในอาหาร ได้แก่ สมบัติด้านการละลาย การเกิดฟอ์ม และการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การวัดค่า surface hydrophobicity สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ ligand ที่ไม่มีขั้วหรือที่เป็น hydrophobic จับกับโปรตีน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือการใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ในการวัดค่า hydrophobicity โดยพิจารณาจาก retention time ของสารที่วิเคราะห์ได้ หรือการใช้ fluorescent probes ในการวัดค่า surface hydrophobicity ด้วยเครื่อง spectrofluorometer เป็นต้น การวัดค่า surface hydrophobicity โดยใช้ fluorescent probes นั้น เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการวัด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถทำได้รวดเร็ว สำหรับ fluorescent probes ที่นิยมใช้ ได้แก่ *cis-parinaric acid* และ 1-anilino-8-naphtalene-sulphonate (ANS) (Nakai, Li-Chan, and Arteaga, 1996)

### 2.4.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ คือปริมาณหมู่อะมิโนที่อยู่ในโมเลกุลโปรตีนซึ่งมีไอ กาสที่จะเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไปได้ การวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทำได้โดยใช้ 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ (ทั้งที่เป็นหมู่  $\alpha$ -amino และ  $\epsilon$ -amino) ที่อยู่ในโมเลกุลโปรตีน ในภาวะที่มี pH สูง หรือในช่วงที่มีค่า pH เป็นเบส โดยหมู่อะมิโนอิสระซึ่งจัดเป็นนิวคลีโอไฟล์จะเข้าไปแทนที่หมู่ sulphite ในโมเลกุลของ TNBS เกิดเป็นสารประกอบ TNP-amino group (รูปที่ 2.4) (Adler-Nissen, 1979; Cayot and Tainturier, 1997) ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยทั่วไปปริมาณหมู่อะมิโนอิสระนิยมนำมาใช้ในการพิจารณาระดับการย่อยโปรตีน เนื่องจากการที่ปริมาณ

หมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสายพอลิเพปไทด์ของโปรตีนถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือเพปไทด์สายสั้น ๆ มากขึ้น ดังนั้นปริมาณหมู่ อะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ TNBS จึงเพิ่มขึ้น



### รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับหมู่อะมิโน

ที่มา: Adler-Nissen (1979)

#### 2.4.3 กลิ่นรสที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสตประกอบด้วยกรดอะมิโน หรือเพปไทด์สายสั้นซึ่งมีความสามารถในการให้ กลิ่น และกลิ่นรสที่เฉพาะตัวแตกต่างกันไป เพปไทด์บางชนิดเช่น N-acetyl-phenylalanine-L-lysine หรือ กรดอะมิโนพวก glycine, alanine, threonine, proline และ serine จะให้รสหวาน กรดอะมิโนบางชนิดเกี่ยวข้องกับรสเปรี้ยวและรสอู่อ้อย (umami) เช่น glutamic acid และ aspartic acid นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนและเพปไทด์บางชนิดที่ให้รสขม โดยกรดอะมิโนที่ให้รสขม ได้แก่ arginine, phenylalanine, tryptophan และ tyrosine ส่วนเพปไทด์ที่ให้รสขม ได้แก่ Arg-Pro-Phe-Phe และ Leu-Glu-Leu เป็นต้น (Weir, 1992)

Dauids, Yaylayan และ Turcotte (2004) ศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในน้ำมันฝรั่ง (juice extracted from potato) ที่ผ่าน และไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® (Novo Nordisk, Denmark) ซึ่งได้จากมันฝรั่งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0, 12 และ 24°C เป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นนำมันฝรั่งมาปั่นและกรองแยกส่วน ที่เป็นกากออก แล้วนำน้ำมันฝรั่งที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 50°C pH 9 เป็นเวลา 42 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนโดยใช้เทคนิค GC-MS เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทำเป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหาร จากการทดลองพบว่าการเก็บมันฝรั่งที่อุณหภูมิ 0, 12 และ 24°C เป็นเวลา 3 เดือน ทำให้น้ำมันฝรั่งที่ได้มีความเข้มข้นของ glutamine เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนในน้ำมันฝรั่งที่ผ่าน และไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® พบว่าน้ำมันฝรั่งที่ไม่ผ่านการ



ย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยพบว่าน้ำมันฝรั่งที่ไม่ได้ผ่านการย่อยมีปริมาณ alanine, valine, aspartic acid, asparagine และ arginine เพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง leucine, isoleucine และ phenylalanine ที่มีปริมาณมากกว่าปริมาณ leucine, isoleucine และ phenylalanine ที่พบในน้ำมันฝรั่งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ถึง 12, 6 และ 5 เท่า ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดดังกล่าวจะส่งผลให้น้ำมันฝรั่งที่ได้ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท miso substitutes หรือ broths

#### 2.4.4 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสด

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า โปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเสด ซึ่งประกอบด้วย เพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโน ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้ง หรือ ทำตัวเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996; Elias, Kellerby, and Decker, 2008) สารต้านออกซิเดชันนั้นหมายถึงสารที่สามารถชะลอ ยับยั้ง หรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีสาเหตุมาจากการเข้าทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ (free radical) หรือ reactive oxygen species (ROS) กับสารต่าง ๆ โดยเฉพาะไขมัน ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายกับสาร และระบบต่าง ๆ เช่น การเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีในอาหาร และการแก่ของเซลล์สิ่งมีชีวิต (aging) รวมทั้งยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ (Gordon, 2001) ทั้งนี้ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเพปไทด์ และกรดอะมิโนที่ใช้ และค่า pH ของอาหารในขณะนั้น (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996) ในการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ของโปรตีนไฮโดรไลเสดจำเป็นที่จะต้องเข้าใจชนิดและกลไกในการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณาเลือกวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่เหมาะสมกับโปรตีนไฮโดรไลเสดที่ได้ต่อไป

##### 2.4.4.1 ชนิดของสารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งตามกลไกในการเข้าทำปฏิกิริยาของสารได้ ดังนี้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996)

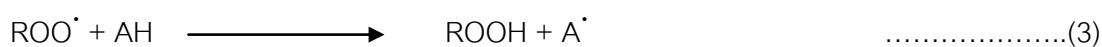
— Primary antioxidant สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้จะกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระนั้น ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรจึงไม่สามารถเข้าสู่ปฏิกิริยาถูกใช้ได้

- Secondary antioxidant สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยน lipid peroxides เป็นสารที่เสถียรทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้
- Synergistic antioxidant สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ แบ่งเป็น สารที่สามารถเป็น oxygen scavengers ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน อิสระที่เข้าไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระในช่วง propagation แล้วกำจัดออกซิเจนอิสระออกไปจากระบบ และสารที่สามารถเป็น metal chelators ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ทำให้ไอออนของโลหะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร hydroperoxide เพื่อเปลี่ยนเป็น peroxy radical ( $ROO\cdot$ ) และ alkoxy radical ( $RO\cdot$ ) และป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมัน เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่สามารถเกิดขึ้นได้
- Miscellaneous antioxidant สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้มีกลไกในการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้มากกว่าหนึ่งกลไก คือ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับ primary antioxidant และสามารถเกิดปฏิกิริยากับโลหะ หรือออกซิเจนอิสระเช่นเดียวกับ synergistic antioxidant ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่สามารถเกิดขึ้นได้ สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น ฟลาโวนอยด์ และกรดอะมิโน

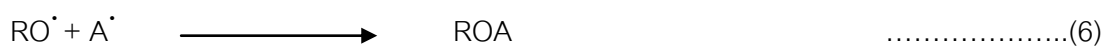
#### 2.4.4.2 กลไกการป้องกันอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดมีกลไกในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน อุณหภูมิ ชนิดของสารตั้งต้น รวมทั้งชนิดและโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน โดยกลไกการป้องกันสามารถแบ่งออกได้ ดังนี้

- สารต้านออกซิเดชันทำหน้าที่กำจัด อนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดย สารต้านออกซิเดชัน จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ได้แก่ peroxy radical และ alkoxy radical (สมการที่ (3) และ (4)) แล้วเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant radical,  $A\cdot$ ) ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันต่อไปได้



นอกจากนี้ อนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน ที่เกิด ขึ้นยัง สามารถ เกิดปฏิกิริยาต่อกับ peroxy radical และ alkoxy radical แล้วเกิดเป็นสารประกอบที่ เสถียร ดังสมการ



สารต้านออกซิเดชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระดังสมการข้างต้นได้แก่ วิตามินอี สารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ และยูจีนอล (eugenol) สารพอลิไฮดรอกซีฟีนอลิก เช่น gallates รวมทั้งสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น butylated hydroxyanisol (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylated hydroquinone (TBHQ) (Yanishlieva-Maslarova, 2001)

— สารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะบางชนิด (metal chelating) เช่น เหล็ก และทองแดง เพื่อป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะเปลี่ยนสาร hydroperoxide เป็น peroxy radical และ alkoxy radical และป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมัน ตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น transferrin, albumin, ceruloplasmin, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), citrate esters, กรดซิตริก กรดฟอสฟอริก รวมทั้งกรดอะมิโน และเพปไทด์สายสั้น ๆ เป็นต้น (Yanishlieva-Maslarova, 2001)

— สารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยากับออกซิเจน และ reactive oxygen species (ซึ่งได้แก่ hydroxyl radical ( $\text{HO}^\bullet$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ ozone ( $\text{O}_3$ )) ก่อนที่ออกซิเจน และ reactive oxygen species จะเข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ ไขมันไม่อิ่มตัว สารในกลุ่มนี้ได้แก่ ascorbyl palmitate, erythorbates, วิตามินซี และซัลไฟต์ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996)

— สารต้านออกซิเดชันเปลี่ยนสาร hydroperoxides เป็นสารที่เสถียร (non-radical species) ทำให้สาร hydroperoxides ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาถูกใช้ในกระบวนการเกิดออกซิเดชันของ ไขมันได้ สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiodipropionate และ thiodipropionic acid (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996) ซึ่งรวมถึงเอนไซม์บางชนิด เช่น glutathione peroxidase ที่เปลี่ยน hydroperoxides เป็นสารที่เสถียรและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ นอกจากนี้หมู่เอมีนอิสระของโปรตีนยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับ hydroperoxides แล้ว

เปลี่ยนเป็นอิมิน (imines) ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้ (Yanishlieva-Maslarova, 2001)

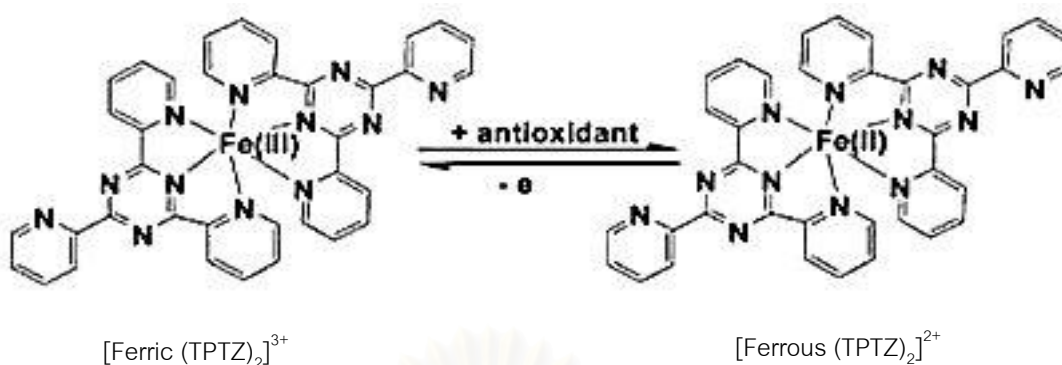
— สารต้านออกซิเดชัน ทำหน้าที่ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ มีที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยา การสลาย polyunsaturated fatty acid (PUFA) ในภาวะที่มีออกซิเจน ทำให้เกิดเป็นสาร hydroperoxides ที่จะเปลี่ยนเป็น aldehydes และสารประกอบอื่น ๆ ส่งผลให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีในอาหารได้ สารต้านออกซิเดชันที่สามารถ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase เช่น gallates, ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก (Yanishlieva-Maslarova, 2001)

#### 2.4.4.3 วิธีการวัดความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ของโปรตีน ไฮโดรไลเซต

โปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งประกอบด้วย เปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโน ที่มีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ โดยทำหน้าที่เป็นทั้ง primary antioxidant สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenge free radicals) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น รสในอาหาร และยังสามารถทำหน้าที่เป็น synergistic antioxidant ที่สามารถยับยั้ง reactive oxygen species ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นต่อไปได้ นอกจากนี้เปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนยังสามารถ ทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะบางชนิด ทำให้สาร hydroperoxide ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโลหะแล้วเปลี่ยนเป็น peroxy radical และ alkoxy radical ได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996; Yanishlieva-Maslarova, 2001) ในการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษา ได้แก่

##### — การวิเคราะห์ค่า ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การวิเคราะห์ค่า FRAP เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการรีดิวซ์ ferric ion (Fe(III)) ให้เปลี่ยนเป็น ferrous ion (Fe(II)) ภายใต้ภาวะที่เป็นกรด (Benzie and Strain, 1996) การวิเคราะห์ค่า FRAP ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบ Fe(II)-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ซึ่งเกิดจากสารประกอบ Fe(III)-TPTZ ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน (รูปที่ 2.6) ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร



**รูปที่ 2.5** ปฏิกริยาระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารประกอบ Ferric-TPTZ  
ที่มา: Prior, Wu, and Schaich (2005)

— การวิเคราะห์ค่า metal chelating

ค่า metal chelating เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการ chelate Fe(II) จึงสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996 ; Gordon, 2001) การวิเคราะห์ค่า metal chelating activity ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสารประกอบเชิงซ้อน  $Fe(Ferrozine)_3^{2+}$  ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สารที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสต chelate Fe(II) ทำให้ Fe(II) ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ferrozine ได้

Li และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก chickpea โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® (Novo Nordisk, Denmark) ที่ความเข้มข้น 2% w/w ย่อยที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50°C 40 นาที จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปแยก fraction โดยใช้ gel filtration แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแต่ละ fraction ด้วยการวิเคราะห์ค่า DPPH radical scavenging, superoxide radical scavenging และ hydroxyl radical scavenging จากการทดลองพบว่า fraction IV ซึ่งมีขนาดเพปไทด์อยู่ในช่วง 200-3000 Da มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ fraction I, fraction II และ fraction III โดย fraction IV มีค่า DPPH radical scavenging, superoxide radical scavenging และ hydroxyl radical scavenging ร้อย ละ 85.82, 69.15, และ 81.39 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าค่า DPPH radical scavenging, superoxide radical scavenging และ hydroxyl radical scavenging ของ fraction I, fraction II และ fraction III อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



งานวิจัยของ Zhu, Zhou และ Qian (2006) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก wheat germ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® (Novo Nordisk, Denmark) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นเท่ากับ 4:10 ย่อยที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50°C 6 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก wheat germ มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH radical, superoxide radical และ hydroxyl radical ได้ โดยมีค่า EC<sub>50</sub> ของการวิเคราะห์ค่า DPPH radical scavenging, superoxide radical scavenging และ hydroxyl radical scavenging เท่ากับ 1.30, 0.40 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก wheat germ มีความสามารถในการจับกับ ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>) ได้ โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า ferrous chelating activity สูงถึงร้อยละ 89

## 2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน หมายถึง สมบัติทางกายภาพและเคมีซึ่งมีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนในระบบอาหารระหว่าง กระบวนการผลิต การเก็บรักษา การเตรียมการผลิต และการบริโภค โดยสมบัติทางกายภาพและเคมีที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมเชิงหน้าที่ของโปรตีน (functional behavior of proteins) ในอาหารนั้นรวมถึงขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของโปรตีน องค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโน ประจุ สุทธิและการกระจายตัวของประจุ ตลอดจนความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของโมเลกุลในการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก (เช่น pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ) ตลอดจนความสามารถในการจับกับน้ำ ไขมัน และสารให้กลิ่น (Adler-Nissen, 1986; Damodaran, 1996)

โปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีน โดยสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต จะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของโปรตีน และวิธีการในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ และระดับการย่อยโปรตีน สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีบทบาทสำคัญต่อการพิจารณา นำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญในการพิจารณานำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นอกจากนี้ความสามารถในการละลายยังส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่

ในด้านการเกิดโฟม และการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ด้วย สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตได้แก่

### 2.5.1 การละลาย (Solubility)

การละลายของโปรตีนสำหรับนักเคมีทางอาหารและเทคโนโลยีอาหารนั้น หมายถึง ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในอาหารซึ่งสามารถสกัดได้ด้วยน้ำ หรือสารละลายเกลือในภาวะที่จำเพาะ โดยปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติการละลายของโปรตีนดังกล่าวขึ้นขึ้นกับสมบัติของโปรตีนแต่ละชนิด ขนาดโมเลกุล ค่า pH ค่า ionic strength รวมทั้งอุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ การละลายเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่มีความสำคัญเนื่องจากความสามารถในการละลายจะส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่น ๆ เช่น การเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดเจล และการเกิดโฟม เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถรายงานในรูปแบบ nitrogen solubility index (NSI) (Sikorski, 2001)

Bejosano และ Corke (1999) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก *Amaranthus 2* ชนิด (*Amaranthus cruentus* และ *Amaranthus hybridus*) และ buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นส่วนผสมในอาหาร โดยใช้เอนไซม์ pepsin A (Sigma, USA) 0.2 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารตั้งต้น ในการย่อยโปรตีนเข้มข้นในภาวะ pH 2.0 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงปรับ pH เป็น 6.5 ก่อนนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากพืชทั้งสองชนิดมีความสามารถในการละลาย ที่ pH 7 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเข้มข้นที่ไม่ได้ผ่านการย่อย โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก *Amaranthus* มีความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้นถึง ร้อยละ 221 ขณะที่ โปรตีนไฮโดรไลเสตจาก buckwheat มีความสามารถในการละลายเพิ่มสูงขึ้น ร้อยละ 35 ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยทำให้ โปรตีนถูกตัดเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ ทำให้ไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายที่เพิ่มสูงขึ้น

Tsumura และคณะ (2005) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ papain (EC 3.4.22.2 จาก Sigma, USA) และเอนไซม์ pepsin (EC 3.4.23.1 จาก Sigma, USA) โดยใช้เอนไซม์ papain 0.2 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมโปรตีนในตัวอย่าง ในภาวะที่มี pH 7 อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 นาที และใช้เอนไซม์ pepsin 0.5 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมโปรตีนในตัวอย่าง ในภาวะ pH 2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ทั้งสองชนิดไปทำแห้งแบบพ่นฝอย

แล้วนำไปศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายในช่วง pH 3-9 จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการละลายต่ำสุดที่ pH 4.5 ซึ่งเป็น isoelectric point (pI) ของโปรตีนจากถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกับโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อยพบว่าในช่วง pH 4-5 โปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองมีความสามารถในการละลายมากกว่าโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ถูกตัดเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งเปปไทด์ที่ได้นี้สามารถที่จะละลายน้ำได้ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จึงมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ขณะที่ในช่วง pH มากกว่า 7 โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ papain เท่านั้นที่มีความสามารถในการละลายสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย เมื่อพิจารณาในช่วง pH ที่ต่ำกว่า 3.5 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองกลับมีความสามารถในการละลายต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากในช่วง pH ที่เป็นกรด ส่วนของโปรตีนที่มีหมู่ hydrophobic จะสามารถแยกออกมามากขึ้น ทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง

### 2.5.2 การเกิดโฟม (Foaming properties)

การเกิดโฟมของโปรตีน หมายถึง ความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิล์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก โดยสามารถพิจารณาได้จาก foam ability และ foam capacity ของโปรตีนซึ่งจะรายงานในรูปแบบ foaming power (FP) หรือ foam expansion (FE) ดังสมการ

$$FP = \frac{\text{ปริมาตรของโฟมที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาตรของของเหลว}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(8)$$

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม ได้แก่ ค่า pH ปริมาณไขมัน ความเข้มข้นของโปรตีน ค่า surface hydrophobicity ประจุและค่า pI ของโปรตีน รวมทั้งโครงสร้างของโปรตีน (Kristinsson and Rasco, 2000)

Larre และคณะ (2006) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก rapeseed isolate โดยใช้เอนไซม์ pepsin ซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 1:50 ในการย่อย โดยย่อยที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 37°C จนมีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 3 และ 7 และเปรียบเทียบกับการใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5, และ 3.0 M ในการย่อย (ย่อยที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ซึ่งให้ระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 2.3, 2.9, 3.2

และ 4.1 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ได้จากการย่อยทั้งสองแบบ มีความสามารถในการเกิดโฟม (พิจารณาจากความหนาแน่นของโฟมที่เกิดขึ้น) อยู่ในช่วง 0.163 ถึง 0.176 และมีความคงตัวของโฟม (พิจารณาจากเวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลงครึ่งหนึ่ง) ในช่วง 213 ถึง 306 วินาที ซึ่งดีกว่าความสามารถในการเกิดโฟม และความคงตัวของโฟมของโปรตีน isolate ที่ไม่ได้ผ่านการย่อยที่มีค่า 0.142 และ 125 วินาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ โฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยไซโตลิมไฮดรอกไซด์กับโฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่า โฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยไซโตลิมไฮดรอกไซด์ (มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำกว่าร้อยละ 3 และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 7-26 kDa) มีความหนาแน่นของโฟม 0.176 ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นของโฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (มีระดับการย่อยโปรตีนร้อยละ 3 และมีน้ำหนักโมเลกุล 15 kDa) ที่มีค่า 0.169 แต่พบว่าโฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ใช้เวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลงครึ่งหนึ่งมากกว่า โฟมที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยไซโตลิมไฮดรอกไซด์ 70 วินาที ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขนาดของเพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้

Kong, Zhou และ Qian (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก wheat gluten โดยใช้ เอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> (Novo Nordisk, Denmark) ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 1:100 ย่อยที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 60°C จนได้ระดับการย่อยโปรตีนซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี pH-stat ร้อยละ 5, 10 และ 15 ตามลำดับ จากการทดลองเมื่อระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 15 ความสามารถในการเกิดโฟมจะมีค่าลดลงจากร้อยละ 158 เป็นร้อยละ 90 เช่นเดียวกับความคงตัวของโฟมซึ่งมีค่าลดลงจากร้อยละ 40 เป็นร้อยละ 35 เนื่องจากระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดเล็กเพิ่มขึ้น และทำให้ค่า surface activity ลดลง ดังนั้นโปรตีน จึงมีความสามารถในการจัดเรียงตัวเป็นแผ่นฟิล์มบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวของฟิล์มที่หุ้มอากาศได้ลดลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### วัตถุดิบ

ใบยาสูบสายพันธุ์เบอร์เลย์ โดยใช้ใบยาสูบซึ่งอยู่ส่วนกลางของต้นยาสูบ พันธุ์เบอร์เลย์ สายพันธุ์ Ky 14 (ใบยา B หมู่ C พันธุ์ Ky 14) ชนิดใบยาหมัดก่า จากสถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ อำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ บดละเอียดให้มีขนาดผ่านตะแกรง 0.1 มิลลิเมตร (150 mesh) บรรจุในขวดแก้วปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

#### เอนไซม์

Flavourzyme<sup>®</sup> (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* เอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> เป็น protease/peptidase complex ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง endoprotease และ exopeptidase ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 5.0-7.0 อุณหภูมิ 40-60°C โดยมี activity 500 leucine amino peptidase units per gram (LAPU/g)

#### สารเคมี

Acetic acid	BDH	England	A.R. grade
L-ascorbic acid	Sigma	Germany	A.R. grade
Boric acid	Univar	Australia	A.R. grade
Bovine serum albumin (98%)	Sigma	Germany	A.R. grade
Brij <sup>®</sup> 35	Merck	Germany	A.R. grade
Chloramine-T	Merck	Germany	A.R. grade
Copper sulphate	Carlo Erba	Italy	A.R. grade
2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	Sigma	Germany	A.R. grade
Di-sodium hydrogen phosphate	Univar	Australia	A.R. grade
Ethylenediamine tetraacetic acid	Sigma	Germany	A.R. grade
Folin-Ciocalteu phenol reagent	Carlo Erba	Italy	A.R. grade



6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid	Sigma	Germany	A.R. grade
Hydrochloric acid	J.T. Baker	USA	A.R. grade
Iron (II) chloride tetrahydrate	Merck	Germany	A.R. grade
Iron (III) chloride	Sigma	Germany	A.R. grade
Maltodextrin (DE = 10)	Tate and Lyle	USA	A.R. grade
Mono-Sodiumhydrogen phosphate	Univar	Australia	A.R. grade
3-(2-pyridyl)-5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt	Sigma	Germany	A.R. grade
Potassium cyanide	Merck	Germany	A.R. grade
Potassium hydrogen phthalate	Carlo Erba	Italy	A.R. grade
Picrylsulfonic acid	Sigma	Germany	A.R. grade
Sodium carbonate	Univar	Australia	A.R. grade
Sodium chloride	Univar	Australia	A.R. grade
Sodium citrate	Univar	Australia	A.R. grade
Sodium deoxycholate	Himedia	India	A.R. grade
Sodium dodecyl sulphate	Sigma	Germany	A.R. grade
Sodium hydroxide	Univar	Australia	A.R. grade
Sodium tetraborate	Univar	Australia	A.R. grade
Sulfanilic acid	Merck	Germany	A.R. grade
Trichloroacetic acid	Merck	Germany	A.R. grade
2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine	Sigma	Germany	A.R. grade

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

Acetonitrile (HPLC grade)	Fisher Scientific	UK
Waters AccQ-Tag eluent A concentrate (HPLC grade)	Waters	USA
Waters AccQ. fluor reagent kit ประกอบด้วย		
- Waters AccQ. fluor borate buffer (Waters, Milford, Massachusetts, USA)		

- Waters AccQ. fluor reagent powder (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Waters AccQ. fluor reagent diluent (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

Waters amino acid hydrolysate standard ampoules (Pierce, Rockford, Illinois, USA)

## อุปกรณ์

Automatic wet chemistry analyzer (Skalar รุ่น SA1050, Breda, Netherlands)

Differential scanning calorimeter (PerkinElmer รุ่น Diamond DSC, Waltham, Massachusetts, USA)

Freeze dryer (Heto รุ่น DW8-85, hetoholten, Allerod, Denmark)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters, Milford, Massachusetts, USA) ประกอบด้วย

- ระบบฉีดตัวอย่าง (Waters รุ่น 717, Milford, Massachusetts, USA)
- คอลัมน์ Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 x 150 มิลลิเมตร (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- เครื่องตรวจวัดชนิด UV/VIS (Waters รุ่น 2487, Milford, Massachusetts, USA)

ชุดคอลัมน์โครมาโตกราฟี ประกอบด้วย

- คอลัมน์ C 16/100 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
- เครื่องปั๊ม (Pharmacia Biotech รุ่น P-1, Uppsala, Sweden)
- เครื่องเก็บ fraction (Pharmacia Biotech รุ่น RediFrac, Uppsala, Sweden)

pH meter (Horiba รุ่น F-21, Kyoto, Japan)

Scanning electron microscope (Jeol รุ่น JSM-5410LV, Tokyo, Japan)

Spectrofluorometer (Jasco รุ่น FP-6200, Tokyo, Japan)

UV/VIS spectrometer (Thermo Spectronic รุ่น Genesys 10 uv, Rochester, New York, USA)

เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Leco รุ่น TruSpec® N, St. Joseph, Michigan, USA)

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น BP210S, Goettingen, Germany)

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Hettich รุ่น Mikro 22 R, Tuttlingen, Germany)

ตู้อบลมร้อน (Mettert รุ่น 600, Schwabach, Germany)

## ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของใบยาสูบ

#### 3.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก ก 1) ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก 2) และ ปริมาณนิโคติน (ภาคผนวก ก 3) ของใบยาสูบตามวิธีการใน A.O.A.C. (1995)

#### 3.1.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในใบยาสูบ

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด (aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, cysteine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine, และ phenylalanine) ด้วยวิธีการย่อยด้วยกรด โดยชั่งใบยาสูบ 0.04 กรัม ลงในหลอด vacuum hydrolysis ขนาด 19 × 100 มิลลิเมตร (Kontes, Vineland, New Jersey, USA) จากนั้นเติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M (ที่มีฟีนอล 0.1% w/v ผสมอยู่) 4 มิลลิลิตร ผ่านก้านไนโตรเจนลงในหลอดเป็นเวลา 10 นาที ดูดอากาศออก จากหลอดด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ นำหลอดแก้วดังกล่าวไปอบ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตั้งไว้ ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 2-3 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 M ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารสกัดที่ได้ ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ Waters AccQ. reagent (Waters, USA) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC (AccQ. Tag method; Waters, USA) (ภาคผนวก ก 5) โดยใช้คอลัมน์ Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 × 150 มิลลิเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ acetonitrile 60% v/v และ AccQ. Tag Eluent A concentrate ซึ่งใช้ระบบ gradient ในการทำงาน (ตารางที่ 3.1) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37°C

### ตารางที่ 3.1 ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในระบบ gradient ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	ร้อยละของ acetonitrile 60%(v/v) ที่ใช้	ร้อยละของ AccQ. Tag Eluent A concentrate ที่ใช้
0	100	0
0.5	98	2
15	93	7
19	90	10
32	67	33
34	0	100
38	100	0

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน tryptophan เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการย่อยด้วยต่าง A.O.A.C. บทที่ 45 หน้า 66 (A.O.A.C.,1995) ซึ่งไปยาสูบ 0.05 กรัม ลงในหลอด vacuum hydrolysis เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4.5 N 3 มิลลิลิตร ทำให้เป็นสุญญากาศ แล้วปิดหลอดให้สนิท นำไป อบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 19 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้มา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ด้วยเครื่อง HPLC (Amino acid analyzer รุ่น LC-6A; Shimadzu, Japan) (ภาคผนวก ก 6) โดยใช้คอลัมน์ Shim-pack ISC-07/S 1504Na เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลาย sodium citrate 0.6 N (ที่มี boric acid 0.2 N ผสมอยู่) ซึ่งใช้ระบบ isocratic ในการทำงาน และมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 55°C

### 3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ

#### 3.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน

ซึ่งไปยาสูบ 7.5 กรัม เติมตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยแปรตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่น กรดแอสติคเข้มข้น 1% และ 5% v/v แปรอุณหภูมิในการสกัดเป็นสองระดับ (30 และ 40°C) จากนั้นกรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 โดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ เพื่อแยกใบยาสูบออกจากสารละลาย นำใบยาสูบที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินด้วยเครื่อง automatic wet

chemistry analyzer (ภาคผนวก ก 3) เลือกภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคตินจากปริมาณนิโคตินที่เห ลืออยู่ในใบยาสูบควบคู่กับระดับการย่อยโปรตีน โดยนำตัวอย่างใบยาสูบที่ได้จากการสกัดนิโคตินด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างใบยาสูบต่อสารละลายเท่ากับ 1 ต่อ 20 ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ความเข้มข้น 1.0% w/w อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ นำสารละลายส่วนใสซึ่งคือโปรตีนไฮโดรไลเสต ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน (degree of hydrolysis (%); DH (%)) โดยคำนวณจาก

$$DH (\%) = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่ได้ภายหลังการย่อย} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \dots\dots(1)$$

โดยปริมาณโปรตีนทั้งหมดได้จากการวิเคราะห์โปรตีนที่มีอยู่ ในใบยาสูบด้วยวิธี Dumas combustion (conversion factor = 6.25) (ภาคผนวก ก 2) และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้ ภายหลังจากการย่อยใบยาสูบด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ด้วยวิธี Modified Lowry (Peterson, 1977) (ภาคผนวก ก 4) ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อคัดเลือกภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน โดยพิจารณาจากภาวะที่ให้ปริมาณนิโคตินคงเหลือน้อย และให้ระดับการย่อยโปรตีนที่ดีที่สุด วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

### 3.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบ

นำใบยาสูบที่ผ่านการสกัดนิโคตินตามภาวะที่ดีที่สุดในข้อ 3.2.1 ปริมาณ 2.0 กรัม ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ย่อยใบยาสูบด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 50°C โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์เป็นห้าระดับ คือ 0, 1.0, 2.0, 5.0 และ 7.5 % w/w และแปรระยะเวลาการย่อยเป็นห้าระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ



### 3.2.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน

วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนจากสมการที่ 1 (ข้อ 3.2.1) ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะในการย่อยโปรตีนที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

### 3.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ไปทำอนุพันธ์ และ วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเครื่อง HPLC (AccQ. Tag method; Waters, USA) (ภาคผนวก ก 5) จากนั้นคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด กรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสที่ ดี และกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด กรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสที่ดี และกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ในปริมาณสูง โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

## 3.3 ศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 3.2.2 (โดยใช้อัตราส่วนระหว่างไบยาสูบต่อสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1 ต่อ 5) มาเติมมอลโทเดกซ์ทริน (DE = 10) 0 และ 5% w/v นำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 0.05 hPa vacuum อุณหภูมิ -60°C จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ได้ในถุง aluminum foil (polyester/nylon/aluminium foil/cast polypropylene) ขนาด 15 x 23 เซนติเมตร หนา 100 ไมครอน ถูกละ 2 กรัม ปิดสนิทแบบสุญญากาศเก็บที่อุณหภูมิ 4°C วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ดังนี้

### 3.3.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต

#### 3.3.1.1 วิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity

วิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตตามวิธีการของ Wagner และ Anon (1990) โดยละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

(pH 7.0) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.010%, 0.015%, 0.020%, 0.025%, 0.030% และ 0.035% w/v ตามลำดับ จากนั้นเติม 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) ที่มีความเข้มข้น 0.01% w/v 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า fluorescence intensity (FI) โดยใช้เครื่อง spectrofluorometer ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 390 และ 470 นาโนเมตร ตามลำดับ แล้วพลอตกราฟระหว่างค่า FI กับปริมาณโปรตีนเพื่อคำนวณหาความชัน ซึ่งก็คือค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ มอลโทเดกซ์ทรินต่อค่า surface hydrophobicity และเปรียบเทียบค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้กับค่า surface hydrophobicity ของ bovine serum albumin (BSA) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

### 3.3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

วิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Adler-Nissen (1979) โดยเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซต ต้มน้ำ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ละลายในสารละลาย sodium dodecyl sulphate 1% w/v) 0.25 มิลลิลิตร เติม สารละลาย sodium tetraborate buffer (pH 9.3) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) เข้มข้น 0.10% w/w 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M 4 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 420 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณ หมู่อะมิโนอิสระจาก

$$\text{ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครโมลต่อกรัมโปรตีน)} = \frac{\text{Absorbance}_{420} \times \text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมด}}{\epsilon \times 1 \text{ เซนติเมตร} \times \text{น้ำหนักโปรตีนในตัวอย่าง (กรัม)}} \times 10^6 \quad \dots(2)$$

$\epsilon$  = molar extinction coefficient (20300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

ปริมาตรสารละลายทั้งหมด = 0.00825 ลิตร (ปริมาตรโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ใช้ + ปริมาตรสารละลาย sodium tetraborate buffer + ปริมาตร TNBS + ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริก)

ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ มอลโทเดกซ์ทริน ต่อ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ และเปรียบเทียบปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้กับปริมาณ หมู่อะมิโนอิสระของ BSA โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

โดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

### 3.3.1.3 วิเคราะห์การเป็นสารต้านออกซิเดชัน

วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ดังนี้

#### 3.3.1.3.1 ค่า ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ค่า FRAP ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Binsan และคณะ (2008) โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย FRAP (ประกอบด้วยสารละลาย acetate buffer (pH 3.6) เข้มข้น 300 mM 25 มิลลิลิตร สารละลาย ferric chloride เข้มข้น 20 mM 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 mM ในกรดไฮโดรคลอริก 40 mM 2.5 มิลลิลิตร) โดยนำสารละลาย FRAP ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาใช้ และใช้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตกับสารละลาย FRAP เท่ากับ 1:10 ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณของสารละลาย trolox (ภาคผนวก ก 7) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

#### 3.3.1.3.2 ค่า metal chelating activity

วิเคราะห์ค่า metal chelating activity ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Klompong และคณะ (2007) โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย  $FeCl_2$  เข้มข้น 2 mM 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 mM 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 6.6 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร คำนวณหาค่า metal chelating activity (%) จาก

$$\text{Metal chelating activity (\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100 \quad \dots\dots(4)$$

$A_c$  = Absorbance<sub>562</sub> ของ control

$A_s$  = Absorbance<sub>562</sub> ของตัวอย่าง

โดย control จะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในการทดลอง ทำการ ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ มอลโทเดกซ์ทรีนต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ และ เปรียบเทียบ ความสามารถในการเป็นสารต้าน ออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้กับ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความ แปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

#### 3.3.1.4 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสต

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสต ทั้งสองตัวอย่าง ด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีความเข้มข้นโปรตีน 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ C 16/100 ภายในบรรจุเรซินชนิด Sephacryl S-200 HR ที่มีความสูง 83 เซนติเมตร และใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 mM อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของ fraction ที่เก็บ 3 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นนำ fraction ที่แยกได้มาวัดการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดย เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ conalbumin จาก chicken egg white (75.0 kDa), ovalbumin จากไข่ไก่ (43.0 kDa), carbonic anhydrase จาก bovine erythrocytes (29.0 kDa), ribonuclease A จาก bovine pancreas (13.7 kDa), และ aprotinin จาก bovine lung (6.5 kDa) (ภาคผนวก ก 8)

#### 3.3.1.5 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสต

วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติม และ ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนโดยใช้เครื่อง scanning electron microscope (SEM) เพื่อเปรียบเทียบ ความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสต

#### 3.3.1.6 วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของโปรตีนไฮโดรไลเสต

วิเคราะห์ สมบัติทางความร้อน ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติม และไม่ได้เติม มอลโทเดกซ์ทรีนด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) โดยชั่งตัวอย่าง โปรตีน ไฮโดรไลเสต 2 มิลลิกรัม ลงใน aluminum pan ขนาดบรรจุ 20 ไมโครลิตร (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) แล้วปิดผนึก นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC โดย scan

ในช่วงอุณหภูมิ  $-50^{\circ}\text{C}$  ถึง  $110^{\circ}\text{C}$  ใช้อัตราการให้ความร้อน  $2^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที พิจารณาลักษณะของกราฟระหว่าง heat flow และอุณหภูมิ จากนั้นคำนวณ พลังงานเอนทาลปีที่เกิดขึ้น ( $\Delta H$ , J/g) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ พลังงาน เอนทาลปี ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน

### 3.3.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

#### 3.3.2.1 วิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

วิเคราะห์ความสามารถในการละลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Tsumura และคณะ (2005) เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น  $1\% \text{ w/v}$  โดยชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต  $0.10$  กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นซึ่งปรับ pH เป็น 3-10 (โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น  $0.1 \text{ M}$ )  $10$  มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้  $30$  นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว  $5,000 \text{ g}$  เป็นเวลา  $15$  นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Modified Lowry (ภาคผนวก ก 4) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น  $0.1 \text{ M}$  จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Modified Lowry คำนวณความสามารถในการละลายจาก

$$\% \text{ Solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100 \quad \dots\dots(5)$$

ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ มอลโทเดกซ์ทริน และ pH ต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

#### 3.3.2.2 วิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโฟม

วิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโฟมซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Tsumura และคณะ (2005) เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น  $2\% \text{ w/v}$  โดยชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต  $1$  กรัม เติมน้ำกลั่นประมาณ  $30$  มิลลิลิตร แล้ว ปรับ pH เป็น 4, 5, 6 และ 7 โดยใช้สารละลาย กรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น  $0.1 \text{ M}$  จากนั้นปรับปริมาตรเป็น  $50$  มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดวัดปริมาตร ตีสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องตีไข่ ความเร็ว  $1,100$  รอบต่อนาที เป็นเวลา  $1$  นาที



วัดปริมาณโฟมที่ลดลงและปริมาตรของเหลวที่เพิ่มขึ้นทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัด ปริมาตรโฟมและปริมาตรของเหลวทุก 10 นาที จนครบ 60 นาที คำนวณความสามารถในการเกิด โฟมจาก

$$\text{Foam expansion (FE\%)} = \frac{\text{ปริมาตรโฟมที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น}} \times 100 \quad \dots\dots(6)$$

และความคงตัวของโฟม โดยคำนวณจากเวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลง ร้อยละ 50 ของปริมาตร โฟมเริ่มต้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของมอลโทเดกซ์ทริน และ pH ต่อความสามารถ ในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้น ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ วางแผนการทดลอง แบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

### 3.4 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่าง การเก็บรักษา

เตรียมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเช่นเดียวกับข้อ 3.3 บรรจุในถุง aluminum foil ชนิด polyester/nylon/aluminium foil/cast polypropylene ถุงละ 2 กรัม แล้ว ปิดสนิทแบบ สูญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตในข้อ 3.4.1-3.4.3 ทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 15 สัปดาห์

#### 3.4.1 ค่า surface hydrophobicity

วิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยทำการ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษา ผลการเปลี่ยนแปลงของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ในระหว่างการเก็บรักษา โดยวางแผนการทดลอง แบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

#### 3.4.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

วัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3.1.2 ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ของโปรตีน

ไฮโดรไลเซตที่ได้ในระหว่างการเก็บรักษา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

#### 3.4.3 การเป็นสารต้านออกซิเดชัน

วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ดังนี้

##### 3.4.3.1 ค่า FRAP

วิเคราะห์ ค่า FRAP โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.3.1 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผล การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นสารต้าน ออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในระหว่างการเก็บรักษา

##### 3.4.3.2 ค่า metal chelating activity

วิเคราะห์ ค่า metal chelating activity โดยทำ การทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.3.2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาผล การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นสารต้าน ออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในระหว่างการเก็บรักษา

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 องค์ประกอบของใบยาสูบ

##### 4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ชนิดใบยาวมัดกำ จากจังหวัดเชียงใหม่ ที่นำมาใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%)
ความชื้น	12.98 ± 0.03
โปรตีน*	21.19 ± 0.09
นิโคติน*	3.42 ± 0.00

\* โดยน้ำหนักแห้ง

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบยาสูบ (ตารางที่ 4.1) พบว่าปริมาณโปรตีน และนิโคตินจาก ใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณ โปรตีน และนิโคติน ที่พบในใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ที่ได้จากงานวิจัยของ Leffingwell (2001) ที่มีค่าร้อยละ 24.75 และ 2.91 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ยังมีค่าสอดคล้องกับปริมาณโปรตีน และนิโคตินในใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ชนิดใบยาวมัดกำ จากงานวิจัยของวิลาสินี สุวรรณประศาสน์ (2550) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ของใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ที่ปลูกในจังหวัดสุโขทัย เพชรบูรณ์ แพร่ นอนงคาย และนครพนม โดยพบว่าปริมาณโปรตีน และนิโคตินในใบยาสูบจากทั้งห้าจังหวัดมีปริมาณอยู่ในช่วงร้อยละ 23.00-26.31 และร้อยละ 1.97-3.72 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

##### 4.1.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในใบยาสูบ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดใน ใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ชนิดใบยาวมัดกำด้วย เครื่อง HPLC แสดงดังตารางที่ 4.2 จากผลการ วิเคราะห์พบว่า ใบยาสูบ มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 1,009.50 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง และพบว่า มีปริมาณมากกว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่มีในใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ที่ผ่านการบ่มซึ่งมีปริมาณ 784.00 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม (Leffingwell, 2001) การที่ใบยาสูบ พันธุ์เดียวกัน มี

ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดแตกต่างกันเป็นผลมาจาก ปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ สภาพแวดล้อมในการปลูก คุณภาพของดิน และชนิดของธาตุอาหารที่มีอยู่ในดิน ตลอดจน ตำแหน่งของใบยาสูบบนลำต้น (Leffingwell, 2001) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดพบว่ากรดอะมิโนที่มีอยู่มากที่สุดในใบยาสูบ คือ aspartic acid รองลงมา คือ glutamic acid ซึ่ง กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นกรดอะมิโนที่เป็นแหล่งของกลีโนรสที่ดีในผลิตภัณฑ์จากใบ ยาสูบ เนื่องจากเมื่อใบยาสูบได้รับความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิต กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้ สามารถทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา Maillard ทำให้ได้สารที่ให้กลิ่นรสดี นอกจากนี้ กรดอะมิโนทั้งสองชนิดยังสามารถเกิดการ deamidation ให้แอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียที่เกิดขึ้นสามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล (ammonia-sugar reaction) ทำให้เกิดสารที่ให้กลิ่นรสที่ดีในใบยาสูบได้ (Hwang, Hartman and Ho, 1995; Sohn and Ho, 1995)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่มีในใบยาสูบ

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง)*
Aspartic acid	179.81 ± 39.75
Serine	39.30 ± 2.14
Glutamic acid	127.59 ± 15.25
Glycine	61.43 ± 0.74
Histidine	16.59 ± 0.72
Arginine	44.48 ± 2.07
Threonine	46.11 ± 1.63
Alanine	28.19 ± 4.92
Proline	54.84 ± 1.74
Cysteine	10.38 ± 3.82
Tyrosine	38.66 ± 5.86
Valine	56.17 ± 5.83
Methionine	17.63 ± 3.86
Lysine	25.02 ± 17.44
Isoleucine	49.99 ± 7.80
Leucine	79.43 ± 12.33
Phenylalanine	66.67 ± 23.71
Tryptophan	67.21 ± 0.34
<b>Total</b>	<b>1,009.50 ± 26.15</b>

\* วิเคราะห์ 2 ซ้ำ

## 4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ

### 4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคติน

ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคตินออกจากใบยาสูบจะพิจารณาจากปริมาณนิโคตินคงเหลือ และระดับการย่อยโปรตีนในใบยาสูบ โดยเลือกจากภาวะที่ให้ปริมาณนิโคตินคงเหลือน้อยควบคู่กับระดับการย่อยโปรตีนที่สูง เนื่องจากในใบยาสูบบมีนิโคตินซึ่งเป็นสารที่มีอันตรายต่อระบบประสาทส่วนกลาง ของมนุษย์ ดังนั้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปริมาณนิโคตินคงเหลือ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ผลการสกัดนิโคตินแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณนิโคตินคงเหลือในตัวอย่างใบยาสูบหลังผ่านการสกัด

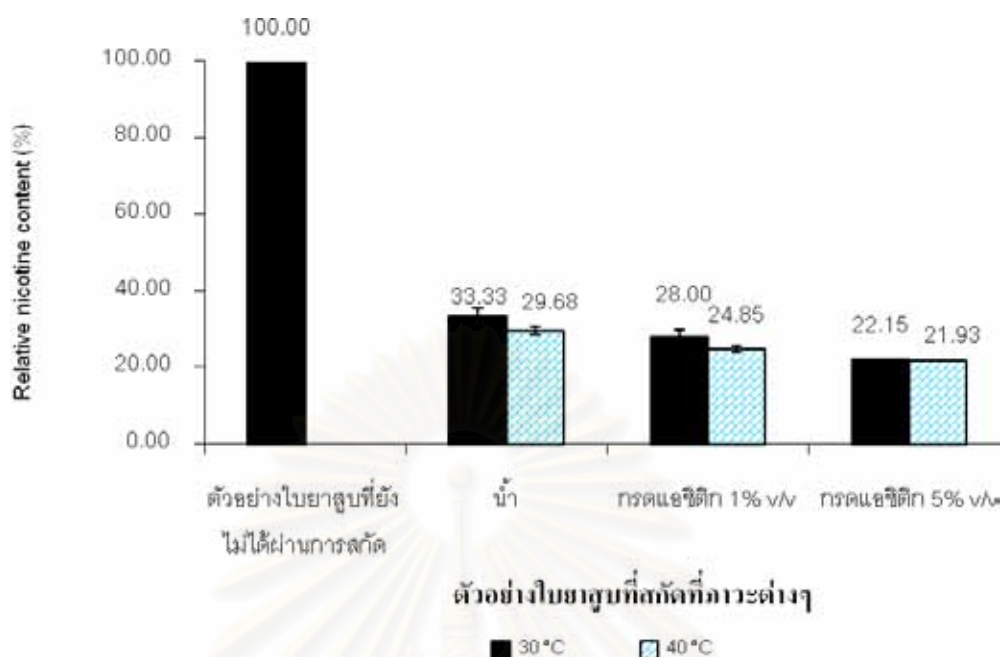
ภาวะในการสกัดนิโคติน		ปริมาณนิโคตินคงเหลือ (% โดยน้ำหนักแห้ง)
ตัวทำละลายที่ใช้	อุณหภูมิที่ใช้ (°C)	
น้ำ	30	1.14 <sup>a</sup> ± 0.07
	40	1.02 <sup>b</sup> ± 0.04
กรดแอสซิติค 1%	30	0.96 <sup>b</sup> ± 0.06
	40	0.85 <sup>c</sup> ± 0.03
กรดแอสซิติค 5%	30	0.76 <sup>c</sup> ± 0.00
	40	0.75 <sup>c</sup> ± 0.00

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

\* ตัวอย่างใบยาสูบที่ยังไม่ได้ผ่านการสกัด มีปริมาณนิโคตินร้อยละ 3.42 โดยน้ำหนักแห้ง

จากตารางที่ 4.3 พบว่าภาวะในการสกัดมีผล ให้ปริมาณนิโคตินคงเหลือ ในใบยาสูบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 1) โดยภาวะที่ใช้กรดแอสซิติค 5% v/v อุณหภูมิ 40°C มีประสิทธิภาพในการสกัดนิโคตินออกได้ดีที่สุด โดยให้ปริมาณนิโคตินคงเหลือร้อยละ 0.75 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 21.93 เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณนิโคตินในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการสกัด (รูปที่ 4.1) ขณะที่ภาวะที่ใช้น้ำ อุณหภูมิ 30°C มีประสิทธิภาพในการสกัดนิโคตินออกได้น้อยที่สุด โดยให้ปริมาณนิโคตินคงเหลือร้อยละ 1.14 (คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการสกัด (รูปที่ 4.1))





รูปที่ 4.1 ค่า relative nicotine content ของตัวอย่างใบยาสูบหลังผ่านการสกัดนิโคติน

เมื่อ พิจารณาระดับการย่อยโปรตีน ภายใต้ ภาวะควบคุม (โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 1.0% w/w ในภาวะ pH 6.5 อุณหภูมิ 50°C ย่อย เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) (ตารางที่ 4.4) พบว่าภาวะในการสกัดมีผล ให้ระดับการย่อยโปรตีนลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 2) โดยตัวอย่างใบยาสูบที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ อุณหภูมิ 30°C ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่ดีที่สุดคือ 34.13% ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยกรดแอสซิติค เข้มข้น 5% v/v อุณหภูมิ 40°C ให้ระดับการย่อยโปรตีนน้อยที่สุดคือ 20.14% ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กรดแอสซิติคสกัด นิโคติน ทำให้ตัวอย่างมี pH ต่ำ โดยตัวอย่างที่ใช้กรดแอสซิติค 5% v/v มี pH 3.4 ขณะที่ตัวอย่างที่ใช้น้ำมี pH 7.6 การที่ค่า pH ของตัวอย่างแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า electrostatic interaction ระหว่างโมเลกุลโปรตีน ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน (Damodaran, 1996) จึงอาจเป็นผลให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน และถึงแม้ก่อนการย่อยโปรตีนใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 แต่เนื่องจากตัวอย่าง ที่ใช้กรดแอสซิติค 5% v/v ในการสกัด มี pH ต่ำ อาจทำให้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่สามารถ ปรับค่า pH ให้สูงขึ้นถึงระดับที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ จึงอาจ ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่เต็มที่ ทำให้ระดับการย่อยโปรตีนของตัวอย่างที่ใช้กรดแอสซิติคในการสกัดมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการย่อยโปรตีนของตัวอย่างที่ใช้น้ำในการสกัด และจากผลการทดลองที่ได้พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดนิโคตินออกจาก

ไบยาสูบ คือ ภาวะที่สกัดด้วยน้ำ อุณหภูมิ 30°C เนื่องจากเป็นภาวะที่สกัดนิโคตินออกได้ร้อยละ 66.67 และยังคงให้ระดับการย่อยโปรตีนสูง (34.13%)

ตารางที่ 4.4 ระดับการย่อยโปรตีนในตัวอย่างไบยาสูบที่ภาวะในการสกัดต่าง ๆ

ตัวอย่างไบยาสูบที่ภาวะในการสกัดต่าง ๆ	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	ระดับการย่อยโปรตีน (%)
AT	0	0	9.73 <sup>hi</sup> ± 1.53
pH 7.6	1	2	30.33 <sup>abcd</sup> ± 3.89
		0	9.28 <sup>hi</sup> ± 2.92
AF	0	2	34.13 <sup>a</sup> ± 3.73
		0	6.97 <sup>ji</sup> ± 0.76
pH 7.6	1	2	25.23 <sup>defg</sup> ± 1.73
		0	9.91 <sup>hi</sup> ± 0.92
BT	0	2	33.27 <sup>ab</sup> ± 0.42
		0	11.71 <sup>hi</sup> ± 1.94
pH 4.2	1	2	28.93 <sup>abcde</sup> ± 3.55
		0	14.45 <sup>h</sup> ± 0.18
BF	0	2	32.45 <sup>abc</sup> ± 2.24
		0	2.06 <sup>j</sup> ± 1.32
pH 4.2	1	2	27.07 <sup>cdef</sup> ± 2.55
		0	10.74 <sup>hi</sup> ± 2.57
CT	0	2	27.78 <sup>bcd</sup> ± 4.01
		0	2.90 <sup>j</sup> ± 0.60
pH 3.4	1	2	23.37 <sup>efg</sup> ± 1.41
		0	5.76 <sup>ji</sup> ± 0.89
CF	0	2	24.69 <sup>defg</sup> ± 0.05
		0	1.74 <sup>j</sup> ± 0.56
pH 3.4	1	2	22.58 <sup>fg</sup> ± 2.43
		0	2.96 <sup>j</sup> ± 1.49
		2	20.14 <sup>g</sup> ± 9.76

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

AT: ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ อุณหภูมิ 30°C, AF: ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ อุณหภูมิ 40°C, BT: ตัวอย่างที่สกัดด้วยกรดแอสติค 1% v/v อุณหภูมิ 30°C, BF: ตัวอย่างที่สกัดด้วยกรดแอสติค 1% v/v อุณหภูมิ 40°C, CT: ตัวอย่างที่สกัดด้วยกรดแอสติค 5% v/v อุณหภูมิ 30°C และ CF: ตัวอย่างที่สกัดด้วยกรดแอสติค 5% v/v อุณหภูมิ 40°C

## 4.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากไบยาซูบ

### 4.2.2.1 ระดับการย่อยโปรตีน

ย่อยไบยาซูบที่ผ่านการสกัดนิกโคติน ด้วยน้ำ อุณหภูมิ 30°C ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนที่ภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับการย่อยโปรตีนจากไบยาซูบที่ภาวะต่าง ๆ

ความเข้มข้น ของเอนไซม์ (% w/w)	ระดับการย่อยโปรตีน (%)				
	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)				
	0	1	2	3	4
0	3.44 <sup>Cb</sup> ± 0.50	22.23 <sup>Ba</sup> ± 0.98	23.00 <sup>Ba</sup> ± 2.51	26.28 <sup>Ba</sup> ± 6.66	25.51 <sup>Ca</sup> ± 4.20
1	8.84 <sup>Bc</sup> ± 2.88	25.20 <sup>Bb</sup> ± 3.08	30.09 <sup>ABa</sup> ± 1.97	32.07 <sup>ABa</sup> ± 1.13	32.11 <sup>ABa</sup> ± 1.15
2	8.44 <sup>Bb</sup> ± 0.70	26.39 <sup>Ba</sup> ± 2.29	27.53 <sup>ABa</sup> ± 1.96	26.76 <sup>Ba</sup> ± 1.22	28.53 <sup>BCa</sup> ± 1.82
5	12.22 <sup>Bb</sup> ± 2.15	34.92 <sup>Aa</sup> ± 3.76	32.91 <sup>Aa</sup> ± 6.41	35.78 <sup>Aa</sup> ± 3.70	33.41 <sup>ABa</sup> ± 3.45
7.5	16.60 <sup>Ab</sup> ± 2.56	34.64 <sup>Aa</sup> ± 2.33	35.66 <sup>Aa</sup> ± 6.76	35.25 <sup>Aa</sup> ± 5.26	36.31 <sup>Aa</sup> ± 3.35

A, B, C ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

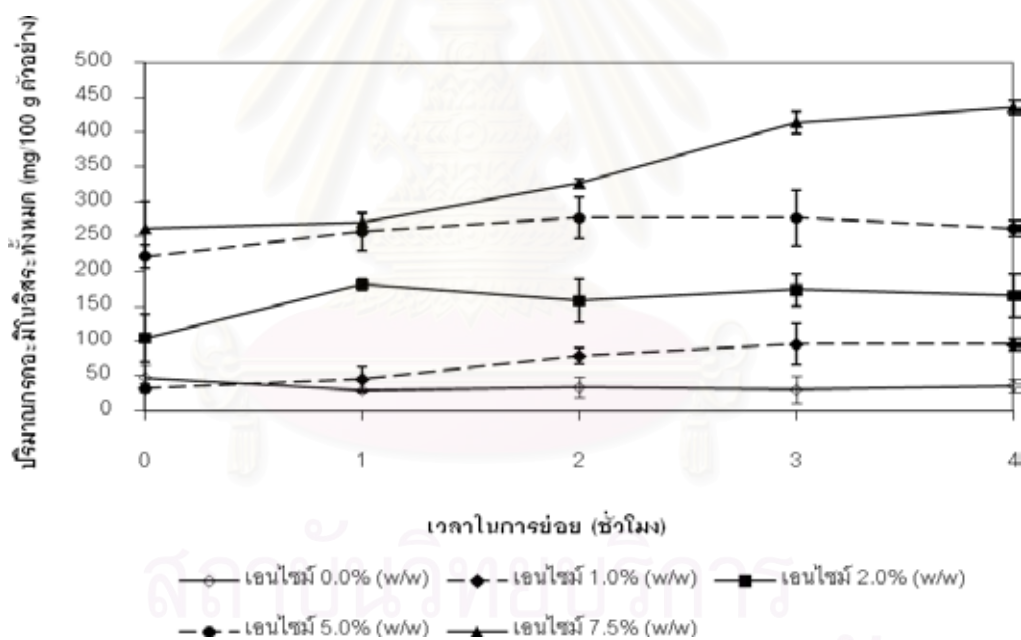
a, b, c ตัวเลขในแถวเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีนมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แต่ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีน ( $p > 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 3) เมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนสูงขึ้น ระดับการย่อยโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการย่อยผ่านไป หนึ่งชั่วโมง (ตารางที่ 4.5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Guan และคณะ (2007) ที่ศึกษาการทำโปรตีนไฮโดรไลสจากรำข้าวโอ๊ต โดยใช้เอนไซม์ trypsin ปริมาณ 1.5% ของสารตั้งต้น ย่อยที่อุณหภูมิ 45°C pH 8 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนผ่านไปสองชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้มีปริมาณลดลง ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไประดับการย่อยโปรตีนจึงค่อนข้างคงที่ หรือเกิดจากการที่สารตั้งต้นถูกย่อย เป็นผลิตภัณฑ์มากขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ระดับการย่อยโปรตีนจึงคงที่

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอนไซม์พบว่า ที่เวลาในการย่อยโปรตีนเท่ากัน เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้น ระดับการย่อยโปรตีนจะมีค่าสูงขึ้น โดยพบว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 5.0 และ 7.5% w/w ใช้เวลาในการย่อย 3 และ 4 ชั่วโมง ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่สูงที่สุด และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่ในการเลือกภาวะในการเตรียม โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหมาะสม ควรพิจารณาระดับการย่อยโปรตีนควบคู่กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ได้ เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

#### 4.2.2.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยตัวอย่างใบยาสูบด้วยเอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> ตามภาวะต่าง ๆ โดยใช้ HPLC (ภาคผนวก ก 5) ผลของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงดังรูปที่ 4.2 (ข้อมูลในตารางที่ ข 1)



รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่ภาวะต่าง ๆ

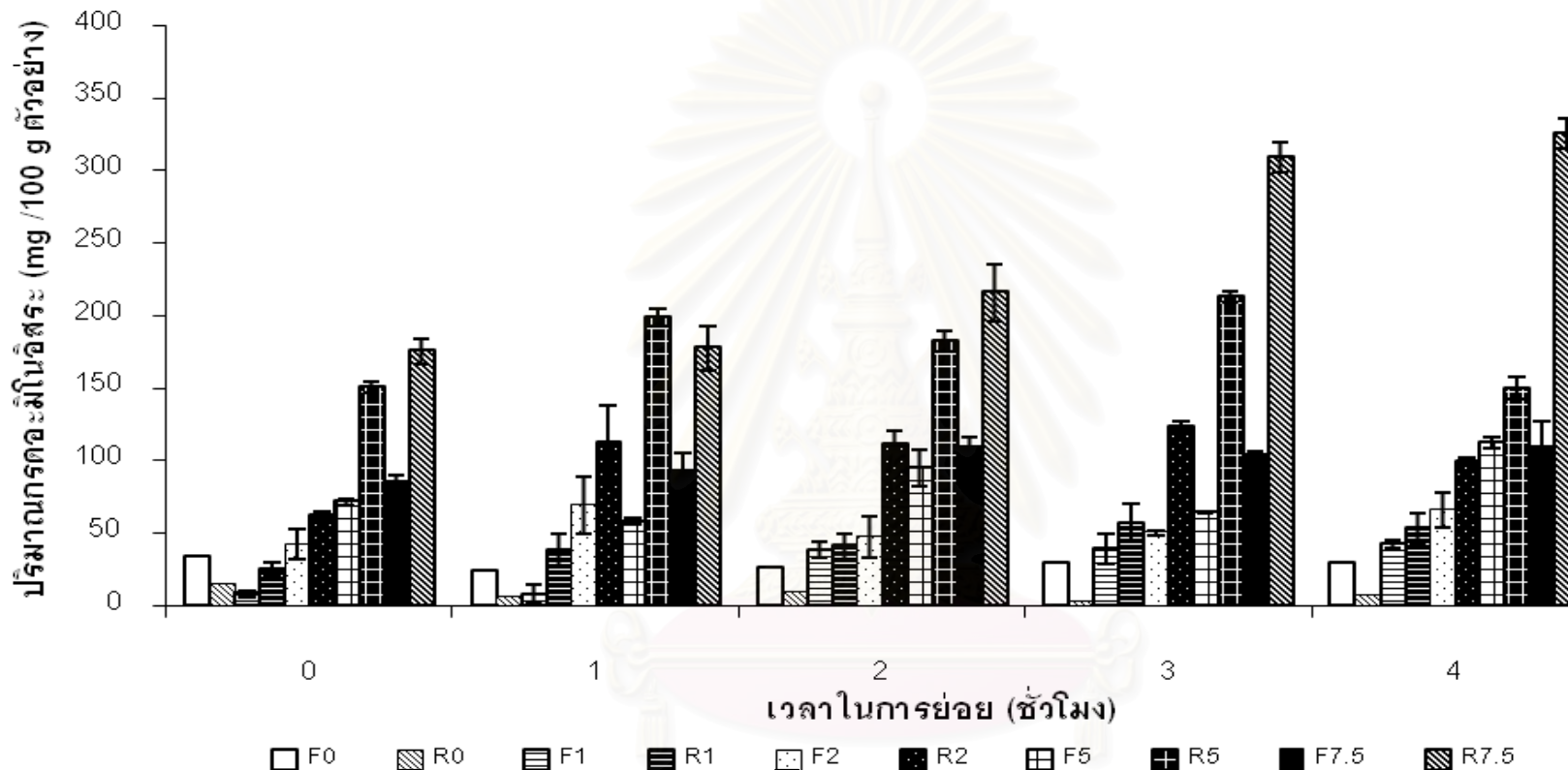
จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีนมีผลต่อ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีน ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 4) โดยเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์และ เวลาในการย่อยโปรตีนมากขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดจะเพิ่มมากขึ้น และมีปริมาณคงที่เมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนผ่าน

ไปหนึ่งชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนที่ได้ และพบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 7.5% w/w เวลาในการย่อย 3 และ 4 ชั่วโมง ให้ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดสูงที่สุด 414.13 และ 435.71 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ

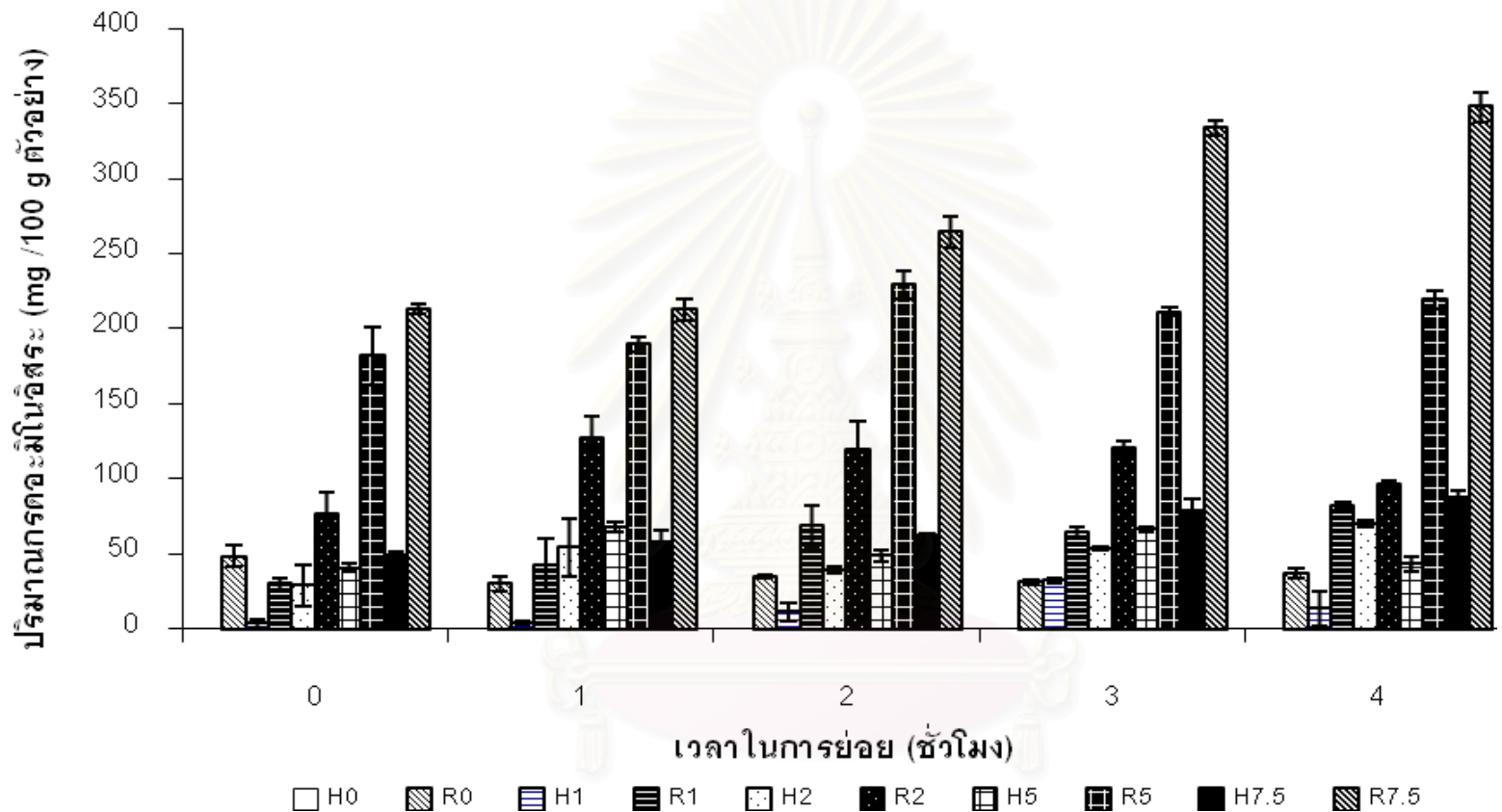
เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีในใบยาสูบได้แก่ aspartic acid, glutamic acid และ proline (Hwang et al., 1995) (ข้อมูลใน ตารางที่ ข 2) เปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น ๆ ผลแสดงดังรูปที่ 4.3 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีนมีผลต่อ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยโปรตีน ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 5) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อยโปรตีน เพิ่มขึ้น กรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีในใบยาสูบจะมีปริมาณมากขึ้น โดยพบว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 7.5% w/w เวลาในการย่อย 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นพบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีมีปริมาณน้อยกว่า เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เป็นกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดี และกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ก็จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ในใบยาสูบซึ่งได้แก่ tyrosine, valine, isoleucine, leucine และ phenylalanine (ข้อมูลในตารางที่ ข 3) เปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น ผลแสดงดังรูปที่ 4.4 จากผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นพบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่ากรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เป็นกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic และกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น ๆ ที่ได้จากการย่อยโปรตีนของเอนไซม์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ กรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic กับกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์มากขึ้นจึงพบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดี ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic จะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ ด้านการละลาย การเกิดโฟม และการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสต





รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลีโนรสดีเปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่เวลาในการย่อยต่าง ๆ (F0, F1, F2, F5 และ F7.5 คือ กรดอะมิโนอิสระที่ให้กลีโนรสดีที่ได้จากภาวะที่ใช้เอนไซม์เข้มข้น 0%, 1%, 2%, 5% และ 7.5% w/w ตามลำดับ และ R0, R1, R2, R5 และ R7.5 คือ กรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากภาวะที่ใช้เอนไซม์เข้มข้น 0%, 1%, 2%, 5% และ 7.5% w/w ตามลำดับ)



รูปที่ 4.4 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic เปรียบเทียบกับปริมาณ กรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่เวลาในการย่อยต่าง ๆ (H0, H1, H2, H5 และ H7.5 คือ กรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่ได้จากภาวะที่ใช้เอนไซม์เข้มข้น 0%, 1%, 2%, 5% และ 7.5% w/w ตามลำดับ และ R0, R1, R2, R5 และ R7.5 คือ กรดอะมิโนอิสระชนิดอื่นที่ได้จากภาวะที่ใช้เอนไซม์เข้มข้น 0%, 1%, 2%, 5% และ 7.5% w/w ตามลำดับ)

จากงานวิจัยของ Nilsang และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> เข้มข้น 50 leucine aminopeptidase unit/g โปรตีน และย่อยที่อุณหภูมิ 45°C pH 6 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น ปริมาณของ tryptophan อีสาระในโปรตีนไฮโดรไลเสตจะเพิ่มสูงขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการย่อยผ่านไปหนึ่งชั่วโมง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ กรดอะมิโนอีสารทั้งหมด กรดอะมิโนอีสารที่ให้กลิ่นรสดี และกรดอะมิโนอีสารที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ในใบยาสูบที่ได้ให้ผลในทำนองเดียวกับผลการทดลองดังกล่าว โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน เมื่อเวลาในการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนอีสารทั้งหมด กรดอะมิโนอีสาร ที่ให้กลิ่นรสดี และกรดอะมิโนอีสารที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic จะเพิ่มสูงขึ้น และเริ่มมีปริมาณคงที่เมื่อเวลาผ่านไปหนึ่งชั่วโมง

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Imm และ Lee (1999) ที่ศึกษาการผลิตกลิ่นรสอาหารทะเล (seafood flavor) จากปลา red hake (*Uraophycis chuss*) โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> เข้มข้น 0.3% w/w ย่อยที่อุณหภูมิ 50°C pH 6.8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของกรดอะมิโนอีสาร จะมีค่าสูงขึ้น ยกเว้นกรดอะมิโน arginine และ histidine ที่ค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของกรดอะมิโน glutamine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รส umami มีค่าเพิ่มขึ้น 6-9 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการย่อย ในทำนองเดียวกันความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ให้รสขม ได้แก่ leucine, phenylalanine และ valine ก็มีค่าที่สูงขึ้นด้วย

ในการเลือกภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> จะพิจารณาจากภาวะที่ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่สูงและปริมาณกรดอะมิโนอีสารทั้งหมด รวมทั้งปริมาณกรดอะมิโนในกลุ่มต่าง ๆ ที่สูง จากการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนพบว่าภาวะที่ใช้เอนไซม์ 5.0 และ 7.5% w/w เวลาในการย่อย 3 และ 4 ชั่วโมง ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่สูงที่สุด เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนอีสารทั้งหมด ปริมาณกรดอะมิโนอีสารที่ให้กลิ่นรสดี และปริมาณกรดอะมิโนอีสารที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic พบว่าภาวะที่ใช้เอนไซม์ 7.5% w/w เวลาในการย่อย 3 และ 4 ชั่วโมง ให้ปริมาณกรดอะมิโนอีสารทั้งหมด และปริมาณกรดอะมิโนอีสารในกลุ่มต่าง ๆ สูงที่สุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 4 ค 5 และค 6) ดังนั้นในการย่อยโปรตีนจึงเลือกภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 7.5% w/w เวลาในการย่อย 3 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

### 4.3 ผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซต

จากการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพ และ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตซึ่งเตรียมโดยใช้อัตราส่วนของไบยา สูบ ที่ผ่านการสกัดนิกโคตินด้วยน้ำ อุณหภูมิ 30°C ต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1 ต่อ 5 ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 7.5% w/w เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเติมมอลโทเดกซ์ทริน (DE = 10) 0 และ 5% w/v แล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ข้อ 3.3) ได้ผลดังนี้

#### 4.3.1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซต

##### 4.3.1.1 ค่า surface hydrophobicity

ผลการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่เติมมอลโทเดกซ์ทริน โดยใช้ 1-anilino-8-naphthalene-sulphonate (ANS) เป็น fluorescence probe ในการวัดหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีน แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาสูบ และ BSA

ชนิดของตัวอย่าง	Surface hydrophobicity (ANS hydrophobicity index)
โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	9.40 <sup>b</sup> ± 0.32
โปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)	6.03 <sup>b</sup> ± 0.59
BSA	844.30 <sup>a</sup> ± 52.47

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

จากการวิเคราะห์ผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อค่า surface hydrophobicity พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 7) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่โมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของโปรตีน โดยเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน ทำให้โมเลกุลโปรตีน มีการจัดเรียงตัวใหม่ หรืออาจจะมีสาเหตุมาจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้ hydration shell ของโปรตีนถูกกำจัดออกไป โครงสร้างของโปรตีนจึงเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ตำแหน่งของหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (Wang, 2000; Anokhina et al., 2005)

เมื่อเปรียบเทียบค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตกับค่า surface hydrophobicity ของ BSA พบว่าค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มมีค่าน้อยกว่าค่า surface hydrophobicity ของ BSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธัญพร จันท์แสนโรจน์ (2550) ที่พบว่าค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากหอยเป่าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> มีค่าน้อยกว่าค่า surface hydrophobicity ของ BSA อาจเพราะ BSA เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 kDa และมีหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่อยู่ด้านนอกผิวมาก ดังนั้น BSA จึงมี affinity binding site ในการจับกับ ANS สูง (Moller and Denicola, 2002) ทำให้ค่า surface hydrophobicity ของ BSA ที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีน นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากไบยาซูบยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มี หมู่ที่เป็นวงแหวน aromatic ได้แก่ tyrosine และ phenylalanine (ข้อมูลในตารางที่ 4.2) ปริมาณน้อย ทำให้เกิดปฏิกิริยากับ ANS ได้น้อย ดังนั้นค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองจึงมีค่าน้อย

#### 4.3.1.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินวิเคราะห์ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบระหว่าง trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระ รายละเอียดในข้อ 3.3.1.2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.7

**ตารางที่ 4.7** ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่เต็ม มอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาซูบ และ BSA

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครโมลต่อกรัม)
โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน	3342.19 <sup>b</sup> ± 46.43
โปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)	5005.34 <sup>a</sup> ± 136.74
BSA	120.73 <sup>c</sup> ± 7.77

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

จากผลการทดลองพบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซต เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์



ความแปรปรวน ค 8) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากมอลโทเดกซ์ทรี นที่เติมลงไปไนโปรตีนไฮโดรไลเสต ประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์ และ โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็น interference ในการวิเคราะห์ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ โดยใช้ TNBS (Owusu-Apenten, 2002) ทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีมีค่าสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติม มอลโทเดกซ์ทรีนมาก และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตกับ BSA พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมี ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่มากกว่า BSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์สายสั้น ๆ ดังนั้น โปรตีนไฮโดรไลเสตจึงมีหมู่อะมิโนอิสระที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย TNBS ได้มากกว่า BSA ทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่า BSA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krasaechol และคณะ (2008) ศึกษาผลของการย่อย sarcoplasmic โปรตีนจาก threadfin beam ด้วยเอนไซม์ trypsin โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1: 50 ย่อยที่อุณหภูมิ 55°C pH 7 เป็นเวลา 1 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 1 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ 594 และ 890 ไมโครโมลต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่วิเคราะห์ได้จากโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (318 ไมโครโมลต่อกรัม)

#### 4.3.1.3 การเป็นสารต้านออกซิเดชัน

การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็น สารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะวิเคราะห์กลไกในการต้านออกซิเดชันของสารที่แตกต่างกัน ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาสุบ ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ และอาจประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก ที่เหลืออยู่ภายหลังการสกัดนิโคติน ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ โดยสารแต่ละชนิดมีกลไกในการต้านออกซิเดชันได้แตกต่างกันไป (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996 ; Johnson, 2001; Yanishlieva-Maslarova, 2001; Klompong et al., 2007; Elias, Kellerby, and Decker, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงวิเคราะห์ความสามารถของสาร ต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ รายละเอียดในข้อ 3.3.1.3 ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

#### 4.3.1.3.1 ค่า ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ค่า FRAP เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการรีดิวซ์ ferric ion (Fe(III)) ให้เปลี่ยนเป็น ferrous ion (Fe(II)) ภายใต้ภาวะที่เป็นกรด (Benzie and Strain, 1996) การวิเคราะห์ค่า FRAP ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบ Fe(II)-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ที่มีสีน้ำเงินซึ่งเกิดจากสารประกอบ Fe(III)-TPTZ ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน และวัดได้ที่มีความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe(III) ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ หรือสารประกอบฟีนอลิกในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สามารถรีดิวซ์ Fe(III) ได้ (Kartika et al., 2007; Elias et al., 2008) จากการวิเคราะห์ผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อค่า FRAP พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ค่า FRAP ลดลงประมาณ 51% เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินอาจเป็นผลมาจากโมเลกุลมอลโทเดกซ์ทรินเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลโปรตีน ทำให้ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการรีดิวซ์ Fe(III) ลดลง หรือเกิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีปริมาณโปรตีน น้อยกว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ประมาณ 3 เท่า ทำให้ปริมาณ เพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe(III) ลดลง

**ตารางที่ 4.8** ความสามารถในการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากใบยาสูบ

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน	โปรตีนไฮโดรไลเซต	
	มอลโทเดกซ์ทริน 0% w/v	มอลโทเดกซ์ทริน 5% w/v
FRAP (mmole trolox equivalent /g ตัวอย่าง)	204.08 <sup>a</sup> ± 0.29	98.09 <sup>b</sup> ± 0.73
Metal chelating activity (%)	50.98 <sup>a</sup> ± 0.91	43.00 <sup>b</sup> ± 1.56

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

#### 4.3.1.3.2 ค่า metal chelating activity

Metal chelating activity เป็นปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการ chelate Fe(II) ทำให้สาร hydroperoxide ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Fe(II) แล้วเปลี่ยนเป็น peroxy radical (ROO<sup>•</sup>) และ alkoxy radical (RO<sup>•</sup>) ได้ จึงสามารถ

ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996 ; Gordon, 2001) การวิเคราะห์ค่า metal chelating activity ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสารประกอบเชิงซ้อน  $\text{Fe}(\text{Ferrozine})_3^{2+}$  ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สารที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซต chelate  $\text{Fe}(\text{II})$  ทำให้  $\text{Fe}(\text{II})$  ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ferrozine ได้ จากการวิเคราะห์ผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อค่า metal chelating activity (ตารางที่ 4.8) พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตลดลงเล็กน้อย ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 9) และจากค่า metal chelating activity ที่ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตสามารถ chelate  $\text{Fe}(\text{II})$  ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้เติมโปรตีนไฮโดรไลเซต ทั้งนี้เป็นผลจากสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ประกอบด้วยหมู่ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่อิสระ (unshared pair of electron) ทำให้สามารถ chelate  $\text{Fe}(\text{II})$  ได้ จากการนำค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซต ทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกับค่า metal chelating activity ของ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (ตารางที่ 4.9) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่า metal chelating activity เทียบเท่ากับ EDTA ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก EDTA เป็น metal chelator ที่สามารถ chelate กับโลหะได้ดี ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ EDTA เพียง 0.10 ถึง 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงมีความสามารถในการ chelate  $\text{Fe}(\text{II})$  ได้ใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ใช้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการเปรียบเทียบค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มกับ EDTA พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu, Zhou และ Qian (2006) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก wheat germ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น 4:10 ย่อยที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50°C 6 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก wheat germ มีความสามารถในการ chelating  $\text{Fe}(\text{II})$  ได้น้อยกว่า EDTA โดยที่ความเข้มข้นเดียวกัน (1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โปรตีนไฮโดรไลเซตมีค่า ferrous chelating activity ร้อยละ 89 ขณะที่ EDTA มีค่าร้อยละ 99

**ตารางที่ 4.9** Metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลสที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากไบยาสูบ และ EDTA

ชนิดของตัวอย่าง	ความเข้มข้นของตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Metal chelating activity (%)
โปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	20.00	50.98 ± 0.91
โปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)	20.00	43.00 ± 1.56
EDTA	0.10	39.88 ± 2.60
EDTA	0.15	61.04 ± 1.30
EDTA	0.20	75.77 ± 2.17

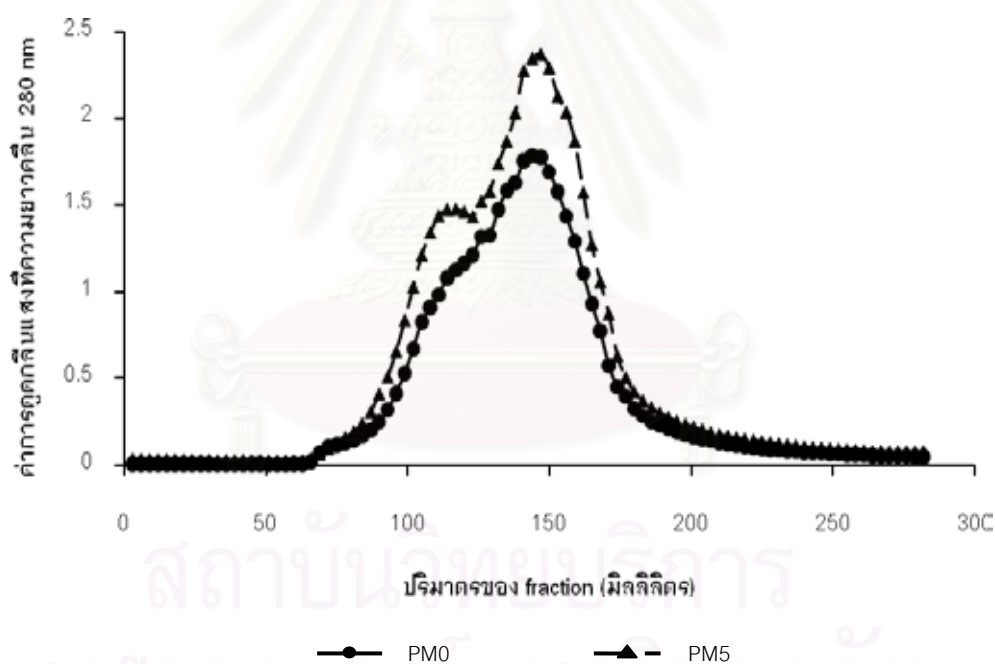
จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลส โดยการวิเคราะห์ค่า FRAP และ metal chelating activity แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากไบยาสูบมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยการรีดิวซ์ Fe(III) และ chelate Fe(II) ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Rao และคณะ (2007) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากไบยาสูบที่เหลือใช้จากกระบวนการผลิต ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ papain (โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:100 ย่อยที่อุณหภูมิ 50°C pH 6 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง) จากรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากไบยาสูบมีความสามารถในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรด linoleic ได้ โดยมีอัตราส่วนการยับยั้งออกซิเดชัน (oxidation inhibitory ratio ซึ่งวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี thiobarbituric acid assay) ประมาณร้อยละ 23 การที่โปรตีนไฮโดรไลสมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้นั้น อาจเป็นผลจากสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลส ได้แก่ กรดอะมิโนอิสระ เช่น tryptophan, histidine, cysteine และ methionine หรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ตลอดจนสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ โดยเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระจัดเป็น miscellaneous antioxidant ที่ทำหน้าที่เป็น ได้ทั้ง primary antioxidation และ synergistic antioxidant (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996 ; Yanishlieva-Maslarova, 2001) ขณะที่สารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเปลี่ยนเป็นสารที่เสถียรจึงไม่สามารถเข้าสู่ปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางกลุ่ม เช่น ฟลาโวนอยด์ ยังสามารถกำจัด superoxide anion หรือ chelate โลหะ ทำให้

สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996; Johnson, 2001)

จากผลการวิเคราะห์ยังพบว่าค่า FRAP และ metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลสจากใบยาสูบแตกต่างกันไป ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่มในโปรตีนไฮโดรไลส ซึ่งเข้ามามีบทบาทในการต้านออกซิเดชันได้แตกต่างกันไปในแต่ละวิธีที่จะวิเคราะห์หลักไในการต้านออกซิเดชันของสารที่แตกต่างกัน ดังนั้นค่าที่วิเคราะห์ได้จึงต่างกัน

#### 4.3.1.4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลส

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี gel filtration chromatography แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 Gel filtration chromatography ของ โปรตีนไฮโดรไลส ที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลสที่เต็มมอลโทเดกซ์ทริน)

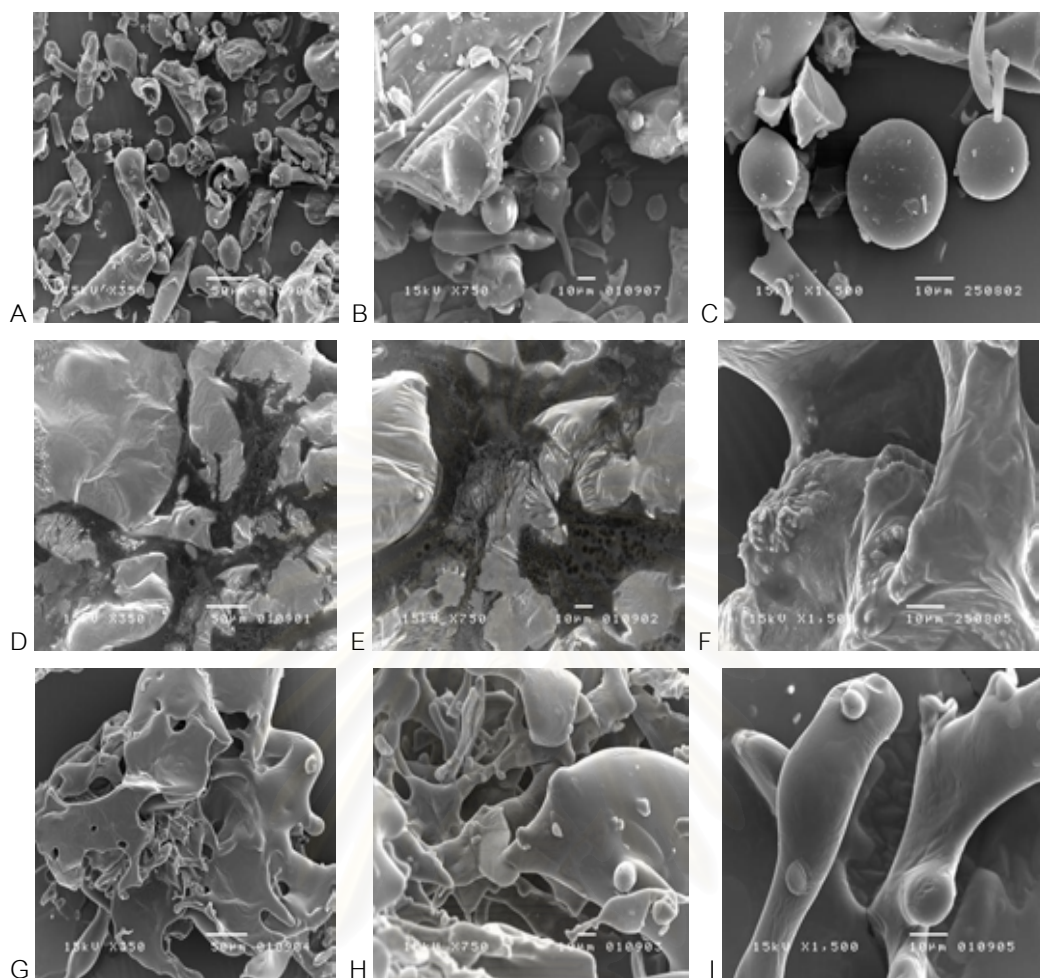
จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากใบยาสูบ ที่ไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินมีน้ำหนักโมเลกุล ในช่วงกว้าง มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 11,000 Da และมี



ส่วนล่างของกราฟที่แสดงน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 24,000 Da ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลสได้จากไบยาซูบที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีน้ำหนักโมเลกุลสองช่วง ที่ชัดเจนกว่าคือ ประมาณ 10,000 Da และประมาณ 24,000 Da โดยจะเห็น peak แยกออกค่อนข้างชัดเจน โดยจากการวิเคราะห์พบว่า peak ที่ 2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 Da มีขนาดใหญ่กว่า peak ที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดโมเลกุลในช่วง 10,000 Da มากกว่าในช่วง 24,000 Da การที่โปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมี peak ในช่วง 24,000 Da เพิ่มขึ้นมาอาจเป็นผลมาจากการที่มอลโทเดกซ์ทริน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 Da (Argaiz et al., 1993) เกิดอันตรกิริยากับโปรตีนบางส่วน เกิดเป็นโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

#### 4.3.1.5 ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของผงโปรตีนไฮโดรไลส

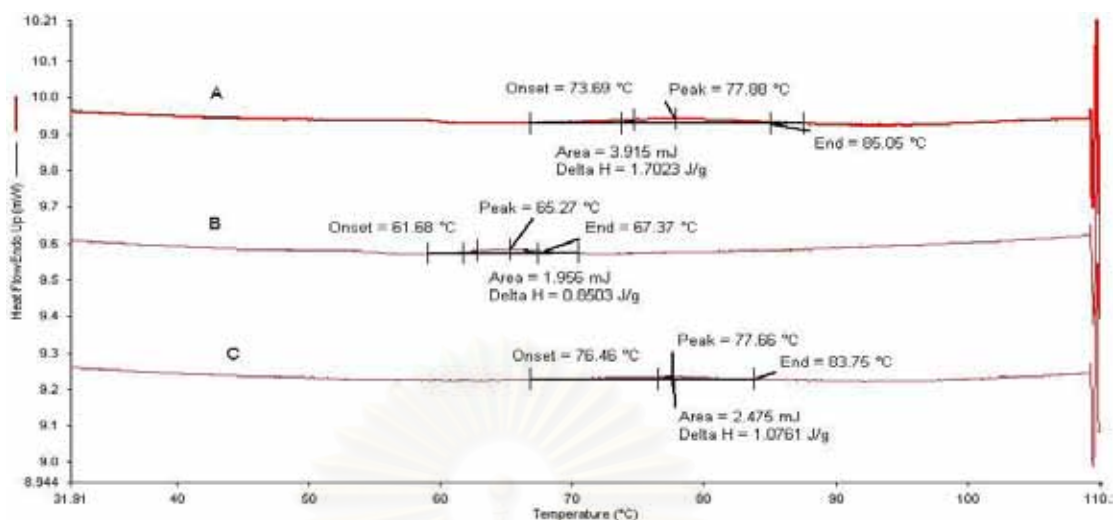
ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของ ผงโปรตีนไฮโดรไลสที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากการใช้เครื่อง scanning electron microscope (SEM) แสดงดังรูปที่ 4.6 จากผลการวิเคราะห์พบว่าลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลสทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกัน โดยโปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน (รูป D, E และ F) จะมีลักษณะที่ไม่เป็นโพรงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (รูป G, H และ I) ซึ่งมีลักษณะที่เป็นโพรง ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจาก มอลโทเดกซ์ทรินทำให้ขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีขนาดเล็ก และกระจายตัว ดังนั้นเมื่อทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลสแล้ว โปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นโพรง (ซึ่งเกิดจากผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก) มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน นอกจากนี้บริเวณผิวสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน ยังพบอนุภาคที่มีรูปร่างกลมเกาะอยู่ ซึ่งอาจเป็นอนุภาคที่ผสมอยู่ในมอลโทเดกซ์ทริน (รูป A, B และ C) ที่เข้าไปเกาะอยู่บริเวณดังกล่าว จากความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลสที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงอาจส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลสทั้งสองกลุ่มมีสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.3.1.1 ถึง 4.3.1.4



**รูปที่ 4.6** ลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของมอลโทเดกซ์ทรีน และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีน จากเครื่อง scanning electron microscope ที่กำลังขยายต่างๆ (A, B และ C คือ ลักษณะพื้นผิวของมอลโทเดกซ์ทรีนที่กำลังขยาย 350, 750 และ 1,500 เท่าตามลำดับ D, E และ F คือ ลักษณะพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนที่กำลังขยาย 350, 750 และ 1,500 เท่า ตามลำดับ และ G, H และ I คือ ลักษณะพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีนที่กำลังขยาย 350, 750 และ 1,500 เท่า ตามลำดับ)

#### 4.3.1.6 สมบัติทางความร้อนของโปรตีนไฮโดรไลเสต

สมบัติทางความร้อน ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) แสดงดังรูปที่ 4.7



**รูปที่ 4.7** กราฟระหว่าง heat flow และอุณหภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ มอลโทเดกซ์ทริน จากเครื่อง differential scanning calorimeter (A คือกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน B คือกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ มอลโทเดกซ์ทริน และ C คือกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน)

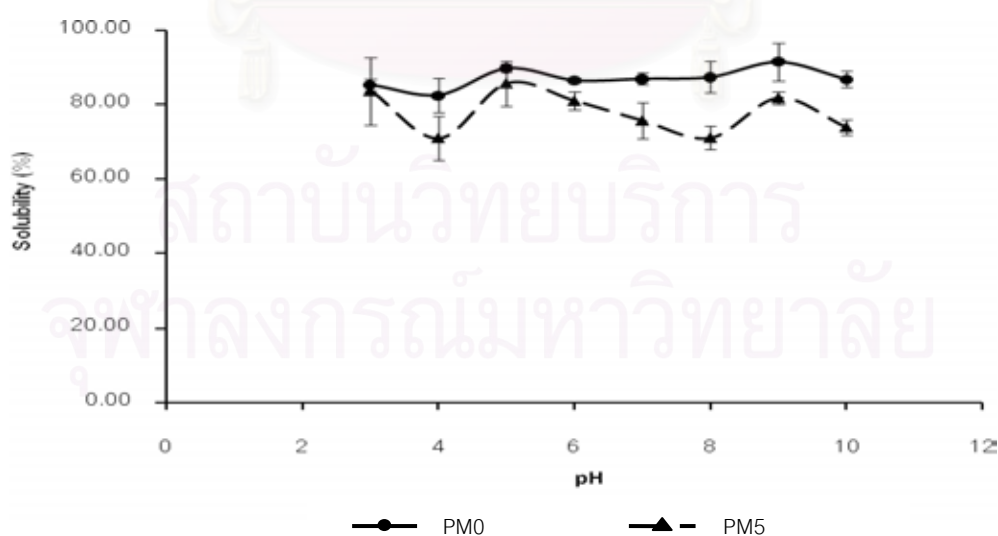
จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มด้วยเครื่อง DSC (รูปที่ 4.7) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน มีอุณหภูมิ onset และพลังงาน เอนทาลปี ในช่วง 73 ถึง 85°C แตกต่างจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง มอลโทเดกซ์ทรินกับโมเลกุลโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้อุณหภูมิ onset และพลังงาน เอนทาลปี ในช่วง 73 ถึง 85°C ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่โปรตีนเกิดการเสียสภาพ มีค่าแตกต่างกัน การที่พลังงานเอนทาลปี ที่ได้มีค่าน้อยอาจเป็นผลมาจากโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ดังนั้นพลังงานที่ ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนจึงมีค่าน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Ryan และคณะ (2008) ที่ศึกษาสมบัติทางความร้อนของโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองด้วยเครื่อง DSC โดยชั่งตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโปรตีน 3.6% w/v 20 มิลลิกรัม ใส่ลงใน pan จากนั้น scan ในช่วงอุณหภูมิ 30°C ถึง 140°C โดยใช้อัตราการให้ความร้อน 5°C ต่อนาที จากการทดลองพบว่าโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองมีอุณหภูมิ onset 75.99 และ 78.80°C ตามลำดับ โดยโปรตีนเข้มข้นจากถั่วเหลือง มีพลังงานเอนทาลปี ที่มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยโปรตีนเข้มข้นมีพลังงานเอนทาลปี 661.13 J/g ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสตมีพลังงานเอนทาลปี 92.15 J/g ทั้งนี้ การที่พลังงานเอนทาลปีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบมีค่าน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก

ตัวเหลืองที่ได้จากงานวิจัย ของ Ryan และคณะ (2008) มาก อาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลสได้จากใบยาสูบแบบแห้ง และใช้ปริมาณตัวอย่าง 2 มิลลิกรัม ทำให้เห็นพลังงานเอนทาลปีไม่ชัดเจนเท่ากับการใช้ตัวอย่างในรูปสารละลายในการวิเคราะห์

### 4.3.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลส

#### 4.3.2.1 ความสามารถในการละลาย

รูปที่ 4.8 แสดงความสามารถในการละลายของโปรตีน ไฮโดรไลสได้จากใบยาสูบในช่วง pH 3-10 โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 1% w/v จากรูป พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วง pH 3-10 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) (ข้อมูลในตารางที่ ข 4 และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 10) โดยมีความสามารถในการละลายอยู่ในช่วง 82-91% เช่นเดียวกับ โปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีความสามารถในการละลายในช่วง pH 3-10 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 70-85% การที่ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลสทั้งสองกลุ่มมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็ก เป็นผลให้หมู่ที่ขอบน้ำเผยออกมา ด้านนอกโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนมากขึ้น โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จึงเกิดปฏิสัมพันธ์กับน้ำ ได้ดี (Kristinsson and Rasco, 2000) ดังนั้นความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลสทั้งสองกลุ่มจึงมีค่าสูง



รูปที่ 4.8 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากใบยาสูบในช่วง pH 3-10 (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลสที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% w/v)



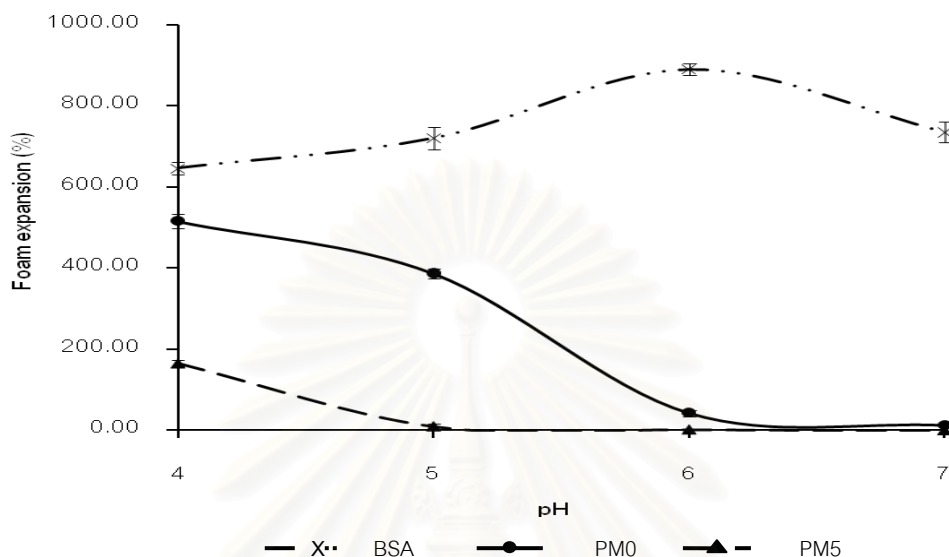
เมื่อพิจารณาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินที่ pH เดียวกัน ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการเกิด อันตรกิริยา ระหว่างมอลโทเดกซ์ทรินกับโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl ของมอลโทเดกซ์ทรินกับหมู่ R ที่มีขั้ว (polar functional groups) ของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซต (Anokhina et al., 2005) ทำให้โปรตีนเกิดปฏิสัมพันธ์กับน้ำได้ น้อยลง ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีค่าลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากการที่โมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินประกอบด้วยหมู่ hydroxyl เป็นจำนวนมาก ทำให้โมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินมีโอกาสที่จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลของน้ำได้มาก ดังนั้นเมื่อเติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงอาจเกิดการแย่งจับน้ำระหว่างโมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินกับโปรตีน ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตจึงมีค่าลดลง

#### 4.3.2.2 ความสามารถในการเกิดโฟม

ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วง pH 4-7 พิจารณาจากค่า foam expansion (%) (รูปที่ 4.9 และตารางที่ ข 5) และความคงตัวของ โฟมซึ่งคำนวณจากเวลาที่ทำให้ปริมาตรของโฟมลดลง 50% (ตารางที่ 4.10) เมื่อพิจารณาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน พบว่าเมื่อ pH เพิ่มขึ้น (จาก pH 4.0 - pH 7.0) ความสามารถในการเกิดโฟมจะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ข้อมูลใน ตารางที่ ข 5 และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 12) และเมื่อพิจารณาความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซตในกลุ่มที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินพบว่า มีค่าลดลง ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกัน โดยที่ pH 4 โปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มจะมีความสามารถในการเกิดโฟมดีที่สุด เนื่องจากที่ pH 4 อยู่ในช่วง pH ที่อาจมีค่าใกล้เคียงกับค่า pi ของโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังนั้นประจุสุทธิของโปรตีนจึงมีค่าเป็นบวกหรือลบเล็กน้อย ทำให้ค่า electrostatic repulsion ของโปรตีนมีค่าไม่มาก โมเลกุลของโปรตีนจึงมี flexibility ดีขึ้น เป็นผลให้โมเลกุล โปรตีน เกิดการเคลื่อนที่ ไปยัง บริเวณ ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับ น้ำและเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ เพื่อห่อหุ้มอนุภาคของอากาศได้ดี โฟมจึงเกิดได้มาก (Guan et al., 2007) แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้น และมีค่ามากกว่าค่า pi ของโปรตีนไฮโดรไลเซต ประจุสุทธิของ โปรตีนมีค่าเป็นลบมากขึ้น ค่า electrostatic repulsion จึงมีค่าสูง ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการผลักกันมากขึ้น



flexibility ของโมเลกุลโปรตีนมีค่าลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการกระจายตัวและการจัดเรียงตัวของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสเกิดได้ไม่ดี การเกิดโฟมที่ pH สูงจึงมีค่าลดลง



**รูปที่ 4.9** ความสามารถในการเกิดโฟมของ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากไบยาซูบ และ BSA ในช่วง pH 4-7 (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีน 5% w/v)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟม ของโปรตีนไฮโดรไลเสตกับ bovine serum albumin (BSA) (รูปที่ 4.9) พบว่า BSA มีความสามารถในการเกิดโฟม ที่ดีที่สุดที่ pH 6 รองลงมาคือที่ pH 7, 5 และ 4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA กับโปรตีนไฮโดรไลเสตในแต่ละช่วง pH พบว่า BSA มีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่ม เนื่องจากโปรตีนจะสามารถเกิดโฟมได้ดีนั้นจะต้องมีสมบัติพื้นฐาน คือ โปรตีนต้องสามารถดูดซับที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำ (adsorb to the air-water interface) ได้ดีและรวดเร็ว จากนั้น โปรตีนต้องสามารถคลายตัวและจัดเรียงตัวเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บริเวณ ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับ น้ำได้ดี ซึ่งสมบัติพื้นฐานนี้ขึ้นกับสมบัติของโมเลกุลโปรตีนแต่ละชนิด ได้แก่ ความยืดหยุ่นของโมเลกุล ความหนาแน่นและการกระจายตัวรวมทั้งค่า hydrophobicity (Damodaran, 1996) BSA เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้สามารถจัดเรียงตัวเป็นแผ่นฟิล์มบริเวณ ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับ น้ำ และห่อหุ้มอนุภาคของอากาศไว้ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่เล็ก นอกจากนี้ BSA ยังมีหมู่ที่เป็น hydrophobic มากซึ่งสอดคล้องกับค่า surface hydrophobicity ที่วิเคราะห์ได้ในตารางที่ 4.6

โดยค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนแสดงถึงหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่บริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งจะมีผลต่อการดูดซับของโมเลกุลโปรตีนบริเวณผิวสัมผัส ระหว่างอากาศกับน้ำ ดังนั้น BSA จึงมีความสามารถในการเกิดฟอง ที่ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่ม

เมื่อพิจารณาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อความสามารถในการเกิดฟองพบว่ามอลโทเดกซ์ทรินมีผลให้ความสามารถในการเกิดฟองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ข้อมูลในตารางที่ ข 5 และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 13) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทรินเข้าไปขัดขวางการจัดเรียงตัวของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำ ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีค่าน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน หรือเป็นผลจากการที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ทำให้การจัดเรียงตัวของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำ เกิดได้ไม่ดี ความสามารถในการเกิดฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

จากผลการวิเคราะห์ความคงตัวของฟองจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ BSA ในช่วง pH 4-7 (ตารางที่ 4.10) พบว่าความคงตัวของฟองจากโปรตีนแต่ละชนิดในช่วง pH ที่ศึกษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 14) เนื่องจาก pH มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิของโปรตีน ทำให้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ตำแหน่งของหมู่ hydrophobic ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการดูดซับบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศและ น้ำในแต่ละช่วง pH ของโปรตีนจึงแตกต่างกัน ดังนั้นความคงตัวของฟองในแต่ละช่วง pH จึงมีค่าต่างกัน (Damodaran, 1996) เมื่อพิจารณาผลของมอลโทเดกซ์ทรินต่อความคงตัวของฟองของโปรตีนไฮโดรไลเสตในแต่ละช่วง pH พบว่ามอลโทเดกซ์ทรินส่งผลให้ความคงตัวของฟองมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 15) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจะมีความคงตัวของฟองต่ำที่สุดที่ pH 6 ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีความคงตัวของฟองต่ำที่สุดที่ pH 7 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่มอลโทเดกซ์ทรินเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกัน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีโครงสร้างที่แตกต่างไปจากเดิม ฟิสิกส์โปรตีนที่เกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศและ น้ำจึงไม่เสถียร ความสามารถในการหุ้มอากาศของฟิล์มที่เกิดขึ้นจึงไม่ดี ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีความคงตัวของฟองต่ำที่สุดที่ pH ซึ่งมีค่าต่างจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน หรือเป็นผลจากโปรตีน

ไฮโดรไลเซสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีปริมาณโปรตีน น้อยกว่าโปรตีน ไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน โปรตีนจึงเกิดฟิล์มบริเวณผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำได้ไม่ดี ความสามารถในการหุ้มอากาศของฟิล์มโปรตีนจึงลดลง ความคงตัวของโปรตีน ไฮโดรไลเซสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินจึงมีค่าต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

**ตารางที่ 4.10** ความคงตัวของฟิมของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากไบยาซูบ และ BSA ในช่วง pH 4-7

pH	เวลาที่ทำให้ปริมาตรฟิมลดลง 50% (นาที)		
	โปรตีนไฮโดรไลเซส		BSA
	ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5%	
	w/v		
4	5.05 <sup>Ba</sup> ± 1.48	1.35 <sup>Ab</sup> ± 0.02	4.00 <sup>Aab</sup> ± 0.14
5	4.63 <sup>Ba</sup> ± 0.64	0.70 <sup>Bb</sup> ± 0.42	1.63 <sup>Cb</sup> ± 0.17
6	1.66 <sup>Ca</sup> ± 0.02	0.30 <sup>Bc</sup> ± 0.00	0.92 <sup>Db</sup> ± 0.04
7	7.75 <sup>Aa</sup> ± 1.06	ND	2.34 <sup>Bb</sup> ± 0.08

A, B, C ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

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

ND ค่าที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ (non-detectable value)

#### 4.4 ผลการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซสในระหว่างการเก็บรักษา

##### 4.4.1 ค่า surface hydrophobicity

จากการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.11) พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 16) เช่นเดียวกับค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน ( $p \leq 0.05$ ) การที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสมีค่าลดลงอาจเป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลโปรตีน ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเกิดจากการ aggregation ระหว่างเพปไทด์ที่อยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซส ส่งผลให้ปริมาณของหมู่ที่เป็น hydrophobic มีค่าลดลงในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งจากงานวิจัยของ Lv, Guo, และ Yang (2009) ที่ศึกษาการเกิด aggregation ของ

โปรตีน fraction ต่าง ๆ (จากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง) ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 44 วัน โดยวิเคราะห์การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) จากผลการวิจัยพบ ว่าโปรตีน fraction ต่าง ๆ ที่ได้ จากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง สามารถเกิด aggregation ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ได้ โดย fraction ซึ่งมีเพปไทด์ที่เป็น hydrophobic อยู่สูงจะเกิดการ aggregation ของเพปไทด์มากที่สุด ซึ่ง aggregation ที่เกิดขึ้น นี้เป็นผลมาจาก การเกิด hydrophobic interaction ระหว่างเพปไทด์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการที่ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากใบยาสูบ ทั้งสองกลุ่ม มีค่าลดลงในระหว่างการเก็บรักษาอาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเพปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีน

**ตารางที่ 4.11** ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วงการเก็บรักษา

เวลาในการเก็บรักษา (สัปดาห์)	ANS hydrophobicity	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% w/v
0	9.40 <sup>Aa</sup> ± 0.32	7.13 <sup>Ab</sup> ± 0.96
3 <sup>ns</sup>	7.24 <sup>B</sup> ± 0.21	7.68 <sup>A</sup> ± 0.83
6 <sup>ns</sup>	6.96 <sup>B</sup> ± 0.49	5.12 <sup>B</sup> ± 0.49
9 <sup>ns</sup>	6.20 <sup>BC</sup> ± 0.98	5.00 <sup>B</sup> ± 0.20
12	6.10 <sup>BCa</sup> ± 0.01	5.04 <sup>Bb</sup> ± 0.06
15 <sup>ns</sup>	5.11 <sup>C</sup> ± 0.18	4.79 <sup>B</sup> ± 0.39

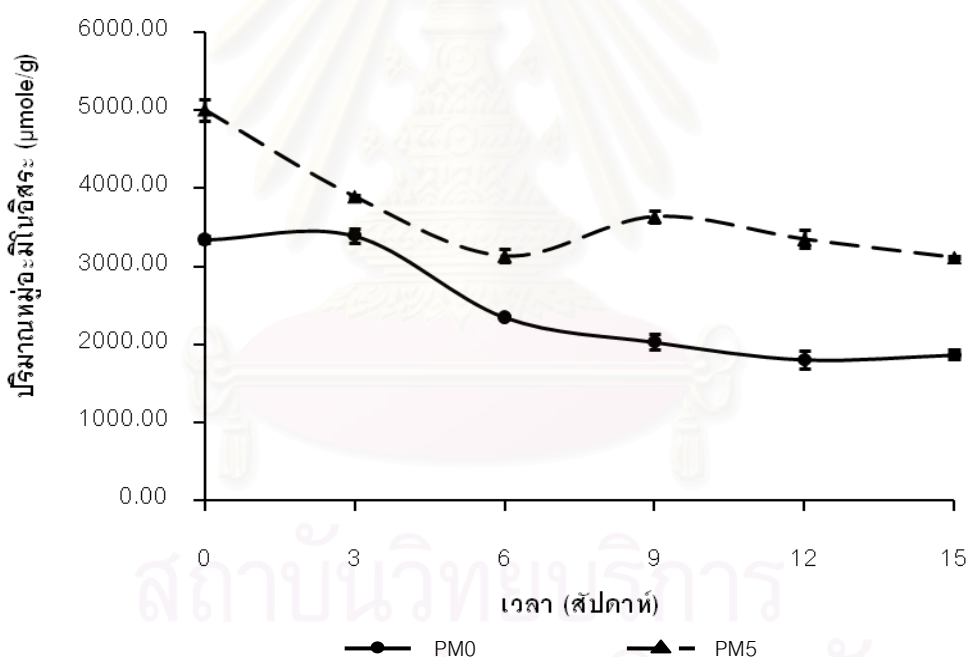
A, B, C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

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

#### 4.4.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

รูปที่ 4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์ จากผลการวิเคราะห์พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน ปริมาณ หมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าน้อยกว่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มในช่วงการเก็บรักษา พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ข้อมูลใน ตาราง ที่ ข 6 และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 18) เช่นเดียวกับปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีน ( $p \leq 0.05$ ) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลโปรตีนเกิด อันตรกิริยา กับสารอื่น ที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสต ในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่วิเคราะห์ได้จึงมีค่าลดลง โดยปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มที่ลดลงไม่น่าจะ มีส่วน เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา Maillard เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า water activity ( $a_w$ ) เท่ากับ 0.14 และ 0.07 ตามลำดับ ซึ่งค่า  $a_w$  ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มที่วิเคราะห์ได้ ไม่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา Maillard ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.40-0.67 (Rahman and Labuza, 1999) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ยังเก็บไว้ในถุง aluminum foil ทำให้ไม่ถูกแสง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  ดังนั้นอันตรกิริยาของโมเลกุลโปรตีนที่เกิดขึ้นจึงไม่น่ามีผลมาจากปฏิกิริยา Maillard



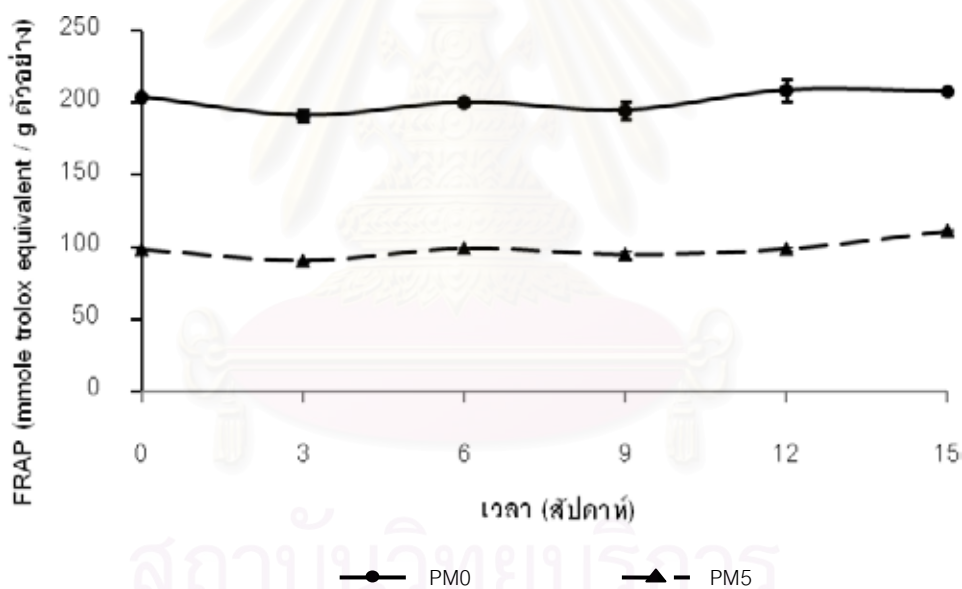
**รูปที่ 4.10** ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วงการเก็บรักษา (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีน 5% w/v)



#### 4.4.3 การเป็นสารต้านออกซิเดชัน

##### 4.4.3.1 ค่า FRAP

ผลการวิเคราะห์ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มเป็น เวลา 15 สัปดาห์ (รูปที่ 4.11) พบว่าค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าน้อยกว่าค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินประมาณ 2 เท่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนและมอลโทเดกซ์ทริน หรือเป็นผลจากโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินประมาณ 3 เท่า จึงทำให้ความสามารถ ในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่าน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

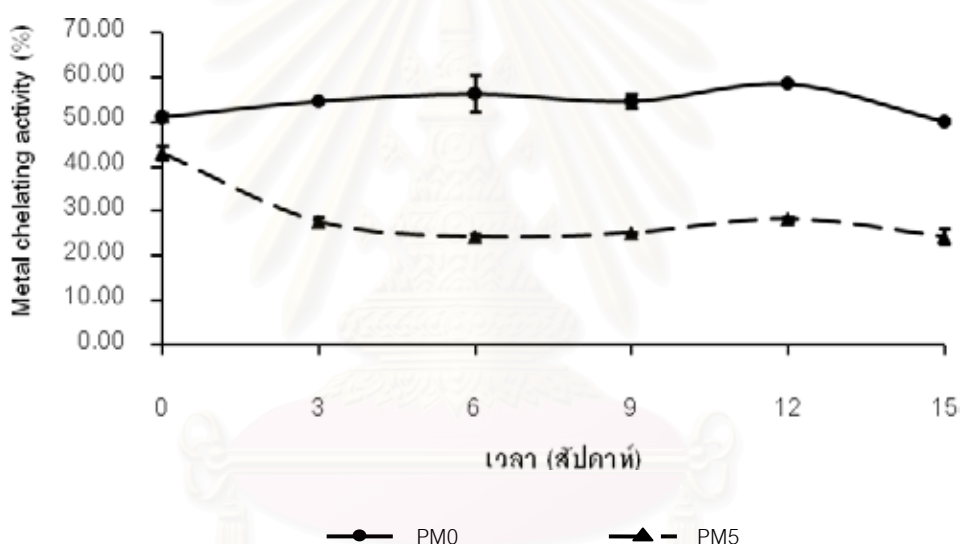


รูปที่ 4.11 ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วงการเก็บรักษา (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% w/v)

##### 4.4.3.2 ค่า metal chelating activity

ผลการวิเคราะห์ค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มตลอดระยะเวลาในการเก็บ 15 สัปดาห์ (รูปที่ 4.12) พบว่าที่ระยะเวลาในการเก็บเดียวกัน โปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่า metal chelating activity น้อยกว่าโปรตีน

ไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) (ข้อมูลในตารางที่ ข 8 และ ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ค 23) โดยโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่า metal chelating activity ค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาในการเก็บรักษา 15 สัปดาห์ ขณะที่ค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีแนวโน้มลดลงในช่วงหก สัปดาห์แรก จากนั้นมีค่าคงที่ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล โปรตีนกับมอลโทเดกซ์ทริน ทำให้ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีน ไฮโดรไลเซสเปลี่ยนแปลงไป หรือเกิดจากปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ทำให้ความสามารถในการ chelate Fe(II) ของเพปไทด์สาย สั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระลดลง



**รูปที่ 4.12** ค่า metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเซสในช่วงการเก็บรักษา (PM0 คือ โปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ PM5 คือ โปรตีนไฮโดรไลเซสที่เติม มอลโทเดกซ์ทริน 5% w/v)

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีน ไฮโดรไลเซสจากไบยาซูบ โดยการวิเคราะห์ค่า FRAP และ metal chelating พบว่าตลอด ระยะเวลาในการเก็บ โปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินมีค่า FRAP และ metal chelating สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เติม มอลโทเดกซ์ทริน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกการ วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันในแต่ละวิธี รวมทั้งชนิดของ สารต้านออกซิเดชันในโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีบทบาทในการต้านออกซิเดชันได้แตกต่างกัน การ

ที่โปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันตลอดระยะเวลาในการเก็บค่อนข้างคงที่ อาจเป็นผลมาจากภาวะในการเก็บรักษา (ที่อุณหภูมิ 4°C ในถุง aluminum foil ที่ปิดสนิทแบบสุญญากาศ) สามารถรักษาสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งสองกลุ่มไว้ได้



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำใบยาสูบที่ผ่านการสกัดนิโคตินออกโดยใช้น้ำ ที่อุณหภูมิ 30°C มาย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 7.5% w/w เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นภาวะที่ให้ระดับการย่อยโปรตีนที่สูง และให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด สูง มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยศึกษาผลของ มอลโทเดกซ์ทรีน (DE = 10) (0 และ 5% w/v) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติม มอลโทเดกซ์ทรีนมีสมบัติด้านการละลายในช่วง pH 3-10 ใกล้เคียงกัน โดยมีความสามารถในการ ละลายอยู่ในช่วง 70-85% และ 82-91% ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีน จะมีสมบัติด้านการเกิดโฟมที่ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนตลอดช่วง pH 4-7 โดยโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มมีความสามารถในการเกิดโฟม และความคงตัวของโฟม ดีที่สุดที่ pH 4 เมื่อพิจารณาค่า surface hydrophobicity พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติม มอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า surface hydrophobicity ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมเล็กน้อย ขณะที่ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีค่าสูงกว่า เมื่อ พิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มมี ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า FRAP และ metal chelating activity ที่ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีน เมื่อ พิจารณาลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มพบว่าโปรตีน ไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นโพรงมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้ เติมมอลโทเดกซ์ทรีน

ในช่วงการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 สัปดาห์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีน และไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า surface hydrophobicity ลดลง เช่นเดียวกับปริมาณ หมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งสองกลุ่มที่มีค่าลดลง เมื่อพิจารณาความสามารถใน การเป็นสารต้านออกซิเดชันพบว่าตลอดระยะเวลาในการเก็บโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติม มอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า FRAP และ metal chelating คงที่ ขณะที่ตลอดระยะเวลาในการเก็บโปรตีน ไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทรีนมีค่า FRAP คงที่ แต่มีแนวโน้มของค่า metal chelating ลดลง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลของสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบยาสูบที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อื่น เช่น การนำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปใช้เป็นส่วนผสมของสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ยาสูบ เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีความสามารถในการละลายสูง นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตยังมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีและปริมาณหมู่อะมิโนอิสระอยู่มากซึ่งอาจเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเกิดสารให้กลิ่นรสที่ดีในใบยาสูบ ดังนั้นหากนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปเติมลงในผลิตภัณฑ์จากใบยาสูบอาจช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ดีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตยังมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การลดพิษภัยจากสารที่มีอยู่ในบุหรี่ได้ ทั้งนี้ควรศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้รวมทั้งสารประกอบชนิดอื่นเพิ่มเติมด้วย เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้มีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 7 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ในโปรตีนไฮโดรไลเซต จะประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบชนิดอื่น นอกเหนือจากเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้

การนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบยาสูบที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นสารให้กลิ่นรสในบุหรี่จำเป็นที่จะต้องศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับสารให้กลิ่นรสที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษา flavor profile ของสารให้กลิ่นรสทั้งที่มีอยู่ในใบยาสูบ และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตัดสินใจนำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ยาสูบต่อไป



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ธัญพร จันทร์แสนโรจน์ . 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลส ต่จากหอยเป่าชื่อ *Halotis asinine*. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิตานารถ กระแสร์ชล . 2540. การสกัด และสมบัติทางโภชนาการ และการใช้งานของโปรตีนเข้มข้นจากใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทวีศักดิ์ วัฒนกุล. 2530. ยาสูบ: พืชเศรษฐกิจที่เริ่มมีปัญหา. บทความทางวิชาการของธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร. 6-16.
- วิลาศินี สุวรรณประศาสน์ . 2550. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบยาเวอร์ยี่เนียและ เบอร์เลย์ไทยมัดกำ. งานวิจัยและพัฒนาประจำปีงบประมาณ 2550. 9-71.
- วุฒิ อนันบุญ ทริก . 2549. ยาสูบ ที่ใช้ผลิตบุหรี่ . [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://lab.excise.go.th/group3/tobacco/ttype.htm> [20 ธันวาคม 2549]
- สุรพล อุปดิศสกุล. 2527. พันธุ์ยาสูบที่ปลูกในประเทศไทย. ยาสูบ. 45-53.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข . 2543. สาร 3-MCPD และ 1,3-DCP ในซอสปรุงรส. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.fda.moph.go.th/fdanet/HTML/PRODUCT/FOOD/MCPD/3\\_MCPD.htm](http://www.fda.moph.go.th/fdanet/HTML/PRODUCT/FOOD/MCPD/3_MCPD.htm) [20 ธันวาคม 2549]

### ภาษาอังกฤษ

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27: 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. 1986. A review of food hydrolysis-specific areas. In J. Adler-Nissen (ed.), Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, pp.57-109. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Alvise, N.D., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., Dhulster, P., and Guillochon, D. 2000. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology 27: 286-294.

- Anokhina, M.S., Il'in, M.M., Semenova, M.G., Belyakova, L.E., and Polikarpov, Y.N. 2005. Calorimetric investigation of the thermodynamic basis of the effect of maltodextrins on the foaming ability of legumin in the presence of small-molecule surfactant. Food Hydrocolloids 19: 455-466.
- Anonymous. 2000. Maltodextrin. [Online]. Available from: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=419699%7CALDRIC&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO%7CBRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=419699%7CALDRIC&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&F=SPEC) [2006, December 11]
- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> ed. The Association of Official Analytical Chemists.: Washington D.C.
- Argaiz, A., Lopez-Malo, A., Palou, E., and Welti, J. 1993. Osmotic dehydration of papaya with corn syrup solid. Drying technology 12(7): 1709-1725.
- Bejosano, F.P. and Corke, H. 1999. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. Industrial Crops and Products 10: 175–183.
- Benzie, I.F.F. and Strain. J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239: 70-76.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., and Kishimura, H. 2008. Antioxidant activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Food Chemistry 106: 185-193.
- Brand-Williams, w., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie 28: 25-30.
- Cayot, P. and Tainturier, G. 1997. The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination. Analytical Biochemistry 249: 184–200.
- Chronakis, I.S. 1998. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38(7): 599–637.

- Cochran, W.C. and Cox, G.M. 1992. Experimental Design. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In O.R. Fennema (ed.), Food Chemistry, pp.322-424. New York: Marcel Dekker.
- Davids, S.J., Yaylayan, V.A., and Turcotte, G. 2004. Use of unusual storage temperatures to improve the amino acid profile of potatoes for novel flavoring applications. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie 37: 619-626
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., and Decker, E.A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. Food science and Nutrition 48: 430-441.
- Gordon, M.H. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. In J. Pokorny, N. V. Yanishlieva-Maslarova, and M.H. Gordon (eds.), Antioxidants in Food, pp.7-20. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L., and Zhang, M. 2007. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. Food Chemistry 101: 163–170.
- Hwang, H.-I., Hartman, T.G., and Ho, C.T. 1995. Relative reactivities of amino acids in pyrazine formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 179-184.
- Imm, J.Y. and Lee, C.M. 1999. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 2360-2366.
- Johnson, I.T. 2001 Antioxidants and antitumour properties. In J. Pokorny, N. V. Yanishlieva-Maslarova, and M.H. Gordon (eds.), Antioxidants in Food, pp.100-123. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Kammerdetch, C., Weiss, M., Kasper, C., and Scheper, T. 2007. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. Enzyme and Microbial Technology 40: 508-514.
- Kartika, H., Li, Q.X., Wall, M.M., Nakamoto, S.T., and Iwaoka, W.T. 2007. Major phenolic acids and total antioxidant activity in mamaki leaves, *Pipturus albidus*. Journal of Food Science 72: 696-701.

- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. 2007. Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry 102: 1317-1327.
- Kong, X., Zhou, H., and Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. Food Chemistry 101: 615–620.
- Krasaechol, N., Sanguandeeikul, R., Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R.K. 2008. Structure and functional properties of modified threadfin bream sarcoplasmic protein. Food Chemistry 107: 1-10.
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysate: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40(1): 43-81.
- Leffingwell, J.C. 2001. Chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. Leffingwell Reports 1(2): 1-56.
- Larre, C., Mulder, W., Sanchez-Vioque, R., Lazko, J., Berot, S., Gueguen, J., and Popineau, Y. 2006. Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 49: 40–48.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry 106: 444-450.
- Lv, Y., Guo, S., and Yang, B. 2009. Aggregation of hydrophobic soybean protein hydrolysates: Changes in molecular weight distribution during storage. Food Science and Technology 42: 914–917.
- Merck index. 2001. The Merck Index. 13<sup>rd</sup> ed, pp. 1169. New Jersey: Merck and Co.
- Moller, M. and Denicola, A. 2002. Study of protein-ligand binding by fluorescence. Biochemistry and Molecular Biology Education 30(5): 309–312.
- Morris, R. 2004. Tobacco. [Online]. Available from: <http://www.pfaf.org/database/plants?Nicotiana+tabacum> [2006, March 22]
- Moore, G.R.P., Amante, L.R.C.E.R., and Soldi, V. 2005. Cassava and corn starch in maltodextrin production. Quimica Nova 28(4): 596-600.

- Nakai, S., Li-chan, E., and Arteaga, G.E. 1996. Measurement of surface hydrophobicity. In G.M. Hall (ed.), Methods of Testing Protein Functionality, pp 226-259. London: Blackie academic and professional.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering 70: 571–578.
- Owusu-Apenten, R.K. 2002. Biological and chemical tests for protein nutrient value. In R.K. Owusu-Apenten (ed.), Food Protein Analysis, pp.341-380. New York: Marcel Dekker.
- Passot, S., Fonseca, F., Alarcon-Lorca, M., Rolland, D., and Marin, M. 2005. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 60: 335–348.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical Chemistry 83: 346-356.
- Prendergast, K. 1974. Protein hydrolysate – A review. Food Trade Review. January: 14-21.
- Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4290-4302.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. In D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe (eds.), Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health Perspectives, pp.65-157. New York: Marcel Dekker.
- Rahman, M.S., and Labuza, T.P. 1999. Water activity and food preservation. In M.S. Rahman (ed.), Handbook of Food Preservation, pp.339-382. Cambridge: CRC Press.
- Rao, G., Zhao, M., Lin, W., and Wang, H. 2007. Antioxidant activity of tobacco leaf protein hydrolysates. Food Technology and Biotechnology 45(1): 80-84.



- Ryan, M., Mcevoy, E., Duignan, S., Crowley, C., Fenelon, M., O'callaghan, D.M., and Fitzgerald, R.J. 2008. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. Food Chemistry 108: 503-510.
- Sikorski, Z.E. 2001. Functional Properties of Proteins in Food Systems. In Z.E. Sikorski (ed.), Chemical and Functional Properties of Food Proteins, pp.113-132. Lancaster: Technomic publishing.
- Silvestre, M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chemistry 6: 263-271.
- Sohn, M. and Ho, C.T. 1995. Ammonia generation during thermal degradation of amino acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(12): 3001-3003.
- Tso, T.C. 1990. The tobacco plant. In T.C. Tso (ed.), Production, Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant, pp.41-52. Maryland: Ideals.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., and Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie 38: 255-261.
- Wagner, J.R. and Anon, M.C. 1990. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. Journal of Food Science 55(3): 765-770.
- Wang, W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics 203: 1-60.
- Weir, G.S.D. 1992. Proteins as a source of flavor. In B.J.F. Hudson (ed.), Biochemistry of Food Proteins, pp.99-246. New York: Elsevier applied science.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. 2001. Inhibiting oxidation. In J. Pokorny, N. V. Yanishlieva-Maslarova, and M.H. Gordon (eds.), Antioxidants in Food, pp.22-57. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry 41: 1296-1302.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของใบยาสูบ

#### ก 1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ตามวิธีของ A.O.A.C. บทที่ 3 หน้า 30 (A.O.A.C., 1995)

ซึ่งตัวอย่างประมาณ 2-5 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ภาชนะอะลูมิเนียมซึ่งอบแห้ง และชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำตัวอย่างเข้าอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ  $99.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างเข้าอบในตู้อบ และชั่งน้ำหนักซ้ำ จนกระทั่งตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ นำมาคำนวณปริมาณความชื้นจาก

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

#### ก 2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Dumas combustion

ซึ่งตัวอย่าง 0.15 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในแผ่นอะลูมิเนียม ฟอยด์ แล้วใส่ตัวอย่างเข้าเครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนซึ่งจะเผาไหม้ตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $950^{\circ}\text{C}$  จนตัวอย่างเกิดการเผาไหม้สมบูรณ์ จากนั้นเครื่องจะเผาตัวอย่างที่ได้จากการเผาไหม้ในครั้งแรก อีกครั้งที่อุณหภูมิ  $850^{\circ}\text{C}$  เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนออกจนหมด แล้ววิเคราะห์ปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่เกิดขึ้น คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้จาก

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \text{ปริมาณไนโตรเจนที่ได้ (\% w/w)} \times \text{CF}$$

$$\text{CF} = \text{Conversion Factor (ในการทดลองใช้ 6.25 (A.O.A.C.959.04, 1995))}$$

#### ก 3 การวิเคราะห์ปริมาณนิโคติน

##### 1 การเตรียมสารเคมี

##### 1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9.2

ซึ่ง sodium chloride 2.35 กรัม และ sodium tetraborate 7.60 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร จากนั้นเติมสารละลาย Brij<sup>®</sup> 35 เข้มข้น 30% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารละลายที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ได้ 1 สัปดาห์

### 1.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0

ซึ่ง di-sodium hydrogen phosphate 32.60 กรัม กรดซิติริก 10.40 กรัม และ กรด sulfanilic 7.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นเติมสารละลาย Brij® 35 เข้มข้น 30% w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยสารละลายที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ได้ 1 สัปดาห์

### 1.3 การเตรียมสารละลาย potassium cyanide

ละลาย potassium cyanide 1.0 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

### 1.4 การเตรียมสารละลาย chloramines-T

ละลาย chloramines-T 4.33 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร สารละลายที่เตรียมสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 5 วัน

## 2 การสกัดนิโคตินออกจากตัวอย่างใบยาสูบ

ซึ่งตัวอย่างใบยาสูบ 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมกรด แอซิติคเข้มข้น 5% v/v ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำ flask ไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกใบยาสูบ ออกจากสารสกัด นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินโดยใช้เครื่อง automatic wet chemistry analyzer

## 3 การวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินด้วยเครื่อง automatic wet chemistry analyzer

นำสารสกัดนิโคติน ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง automatic wet chemistry analyzer โดยเครื่องจะดูดสารสกัด 230 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9.2 600 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 800 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นเครื่องจะเติม สารละลาย potassium cyanide 100 ไมโครลิตร และ สารละลาย chloramines-T 100 ไมโครลิตร เพื่อทำ ปฏิกิริยากับนิโคติน แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ นิโคตินจาก

$$\text{ปริมาณนิโคติน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณนิโคตินที่ได้จากเครื่อง (ppm)} \times 100}{100 - \text{ปริมาณความชื้น (\%)}}$$

#### ก 4 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry

ตามวิธีของ Peterson (1977)

##### 1 การเตรียมสารเคมี

##### 1.1 การเตรียมสารละลาย A

สารละลาย A ประกอบด้วยสารละลาย copper tartrate carbonate (CTC) สารละลาย sodium dodecyl sulphate เข้มข้น 10% w/v สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.8 N และน้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากัน

เตรียมสารละลาย CTC โดยเติมสารละลาย sodium carbonate เข้มข้น 20% w/v ลงในสารละลาย copper sulphate-tartrate ซึ่งคนตลอดเวลา จนสารละลายสุดท้ายที่ได้มี copper sulphate pentahydrate เข้มข้น 0.1% w/v potassium tartrate เข้มข้น 0.2% w/v และ sodium carbonate เข้มข้น 10% w/v

##### 1.2 การเตรียมสารละลาย B

ผสม Folin-Ciocalteu phenol reagent กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:5

##### 2 การทดลองหาปริมาณโปรตีน

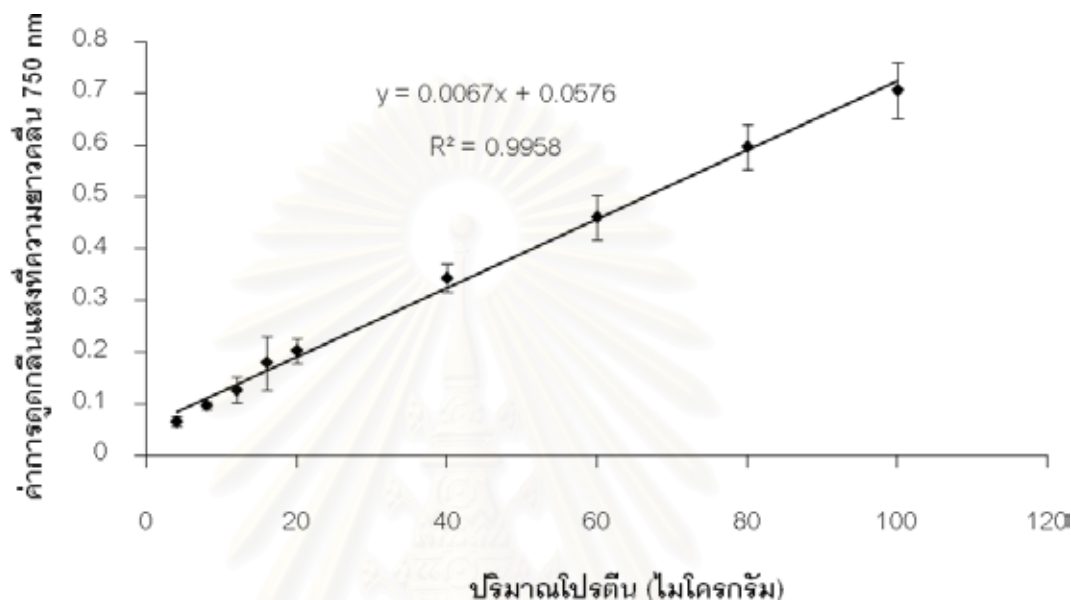
เติมตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน eppendorf tube จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลาย sodium deoxycholate (DOC) เข้มข้น 0.15% w/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 72% w/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไป centrifuged ด้วยความเร็ว 8000×g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร เขย่าจนตะกอนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย B 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

##### 3 การทำกราฟมาตรฐาน

เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0.1% w/v ปริมาตร 4, 8, 12, 16, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรแต่ละหลอดให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง) จากนั้นเติมสารละลาย DOC เข้มข้น 0.15% w/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย TCA เข้มข้น 72% w/v ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไป centrifuged ด้วยความเร็ว 8000×g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร เขย่าจนตะกอนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย B 0.5



มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับ blank พล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณของ BSA ได้กราฟมาตรฐานดังรูป ก 1



รูปที่ ก 1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry

ก 5 การ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน 17 ชนิด \* ด้วย เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

1 การเตรียม Waters AccQ. reagent เพื่อทำอนุพันธ์ กับตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย เครื่อง HPLC

เติม Water AccQ. fluor reagent diluents 1 มิลลิลิตร ลงใน Water AccQ. fluor reagent powder เขย่าให้สารตัวอย่างละลาย จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที โดย Waters AccQ. reagent ที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์

2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการทำอนุพันธ์

เติมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 40 ไมโครลิตร ลงในน้ำ Milli-Q 960 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ได้นาน 1 เดือน) สารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ ประกอบด้วย กรดอะมิโนแต่ละชนิดเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร

ทำอนุพันธ์ โดยเปิดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 6 x 50 มิลลิเมตร จากนั้นเติม Waters AccQ. fluor borate buffer (Waters, USA) 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม Waters AccQ. reagent ที่เตรียมไว้ 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

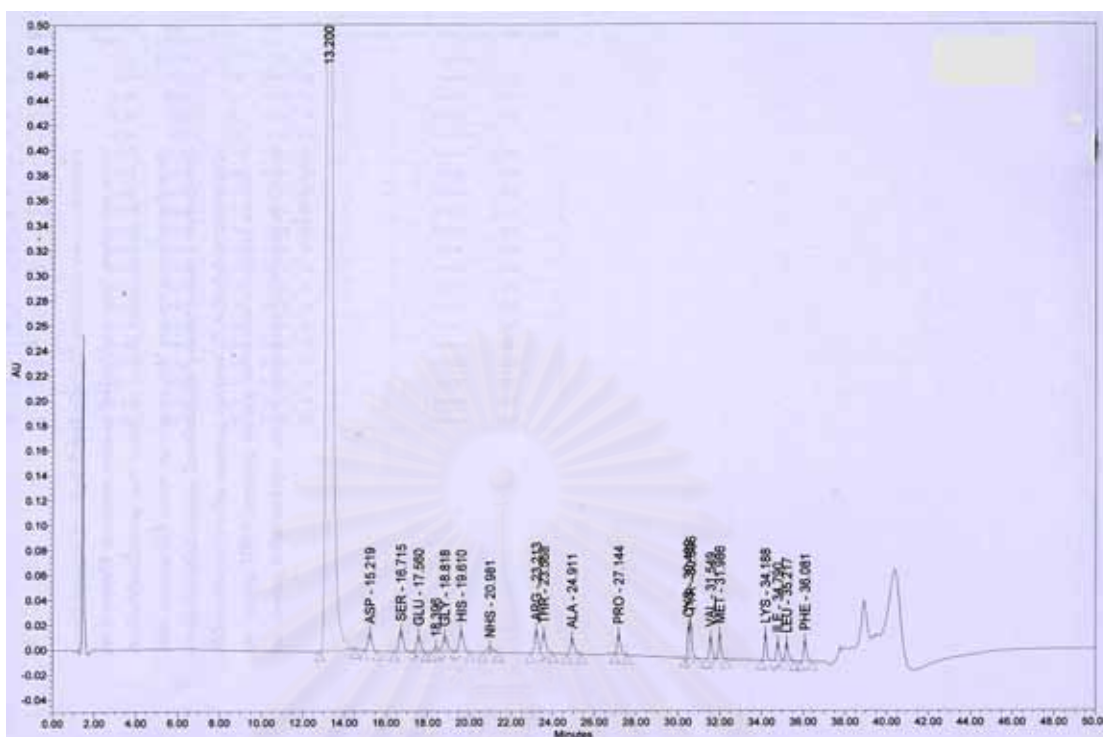
### 3 การทำกราฟมาตรฐาน

เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Waters AccQ. fluor borate buffer ปริมาตร 75, 70, 65 และ 60 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นไว้ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน เติม Waters AccQ. reagent 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วพลอตกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (รูปที่ ก 2) กับปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC

ปริมาณตัวอย่าง	10 ไมโครลิตร
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	Eluent A ( AccQ. Tag Eluent A Concentrate: น้ำ Milli-Q ; 1:10) Eluent B (acetonitrile 60%(v/v))
คอลัมน์	AccQ. Tag Amino Acid Analysis
เครื่องตรวจวัด	Water 2487 Dual Absorbance detector
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิในการวิเคราะห์	37°C
เวลาในการวิเคราะห์	50 นาทีต่อตัวอย่าง

หมายเหตุ \* กรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด ได้แก่ aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, cysteine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine, และ phenylalanine



รูปที่ ก 2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน

#### ก 6 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan ด้วยเครื่อง HPLC

วิธีการเตรียม o-phthal aldehyde reagent (OPA) เพื่อทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโน tryptophan ที่แยกได้จากตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan)

ซึ่ง o-phthal aldehyde 0.8 กรัม นำไปละลายด้วยเอทานอล 14 มิลลิลิตร จากนั้นเติม polyoxyethylene lauryl ether 0.4 กรัม และ n-acetyl-L-cysteine 1.0 กรัม นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับสารละลาย alkaline buffer 1 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย sodium carbonate (0.384 M), boric acid (0.216 M) และ potassium sulphate (0.108 M)

ภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโน tryptophan ด้วยเครื่อง HPLC

ปริมาณตัวอย่าง	20 ไมโครลิตร
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	สารละลาย sodium citrate 0.6 N pH 9 (ที่มี boric acid 0.2 N ผสมอยู่)
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
คอลัมน์	Shim-pack ISC-07/S 1504 Na
อัตราการไหลของ OPA ที่ใช้ทำอนุพันธ์	0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	Fluorescence detector
อุณหภูมิในการวิเคราะห์	55°C

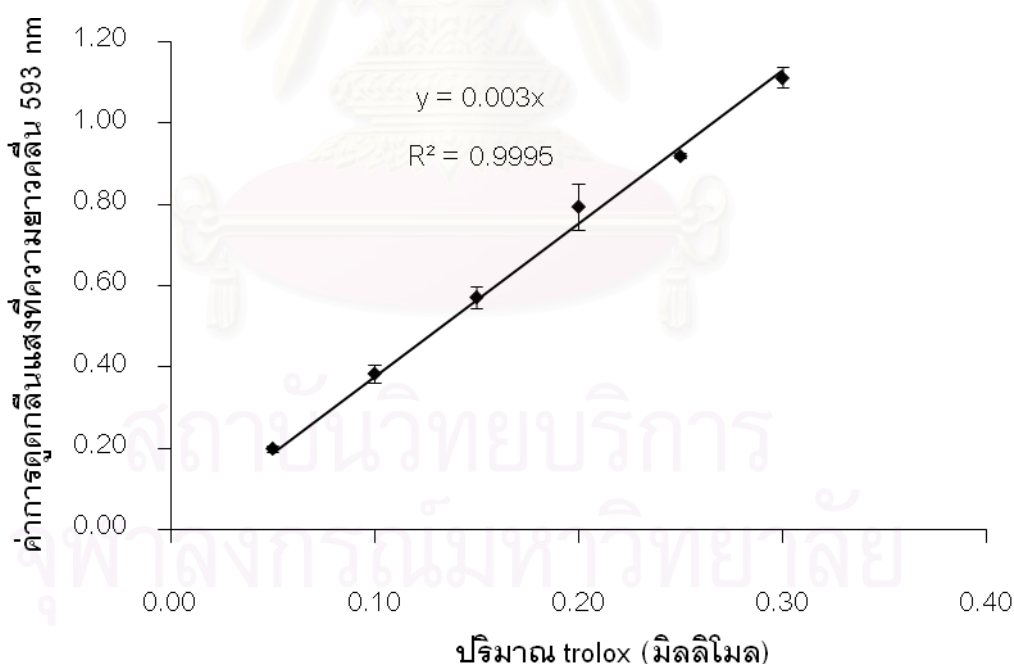
## ก 7 การวิเคราะห์ค่า ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของสารละลาย trolox

### 1 การเตรียมสารละลาย FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP โดยปีเปต สารละลาย acetate buffer (pH 3.6) เข้มข้น 300 mM 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมสารละลาย ferric chloride เข้มข้น 20 mM 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 mM (ที่ละลายใน สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 mM) 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่เตรียม ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาใช้ในการวิเคราะห์

### 2 การวิเคราะห์ค่า FRAP ของสารละลาย trolox

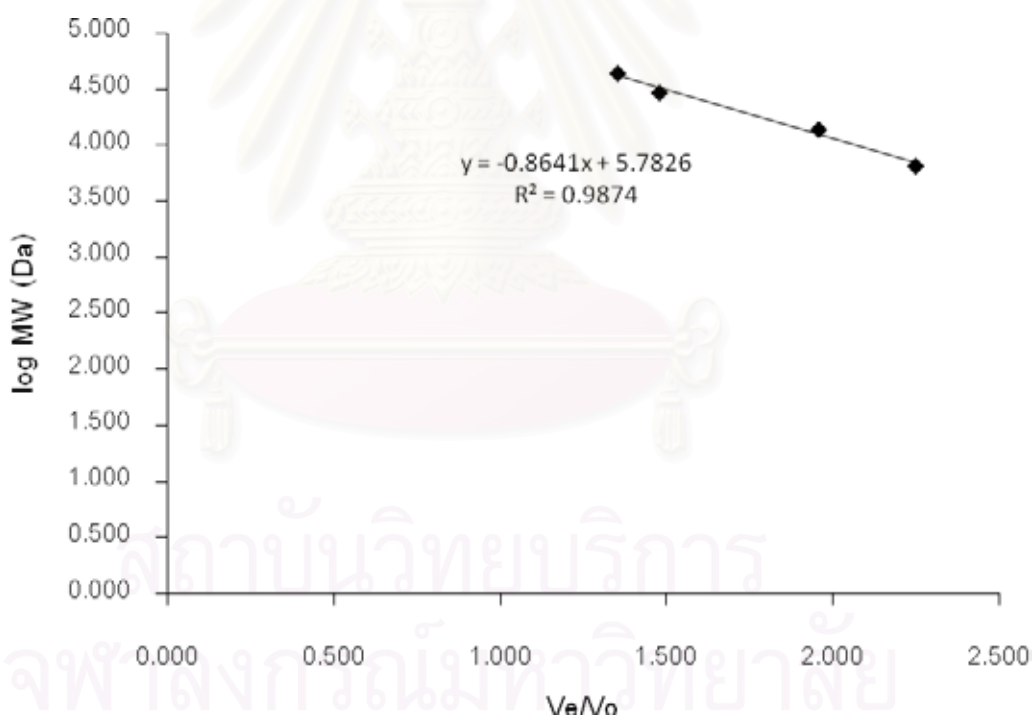
เติมสารละลาย trolox เข้มข้น 0.001 M ปริมาตร 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วปรับปริมาตรแต่ละหลอดเป็น 200 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลาย FRAP 2,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร พล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณของ trolox (รูป ก 3)



รูปที่ ก 3 กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณของ trolox

### ก 8 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ conalbumin จาก chicken egg white (75.0 kDa), ovalbumin จากไข่ไก่ (43.0 kDa), carbonic anhydrase จาก bovine erythrocytes (29.0 kDa), ribonuclease A จาก bovine pancreas (13.7 kDa), และ aprotinin จาก bovine lung (6.5 kDa) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ ด้วยคอลัมน์ โครมาโตกราฟี ที่บรรจุเรซินชนิด Sephacryl S-200 HR โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลาย โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 mM อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของ fraction ที่เก็บ 3 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นนำ fraction ที่แยกได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พล็อตกราฟ ระหว่างค่า  $\log$  molecular weight และค่า elution volume ( $V_e$ )/void volume ( $V_0$ ) (รูป ก 4) โดยค่า  $V_0$  หาได้จากการวิเคราะห์ blue dextran เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยคอลัมน์ โครมาโตกราฟี



รูปที่ ก 4 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี



**ภาคผนวก ข**  
**ข้อมูลการทดลอง**

**ตารางที่ ข 1** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่ภาวะต่าง ๆ

ความเข้มข้น เอนไซม์ (%)	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เวลาในการย่อยต่างกัน (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม)				
	0 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
0.0	48.12 <sup>gh</sup> ± 17.71	30.12 <sup>h</sup> ± 1.86	34.53 <sup>h</sup> ± 14.47	31.29 <sup>h</sup> ± 19.17	36.79 <sup>h</sup> ± 10.09
1.0	33.20 <sup>h</sup> ± 5.95	46.08 <sup>gh</sup> ± 18.20	79.44 <sup>fg</sup> ± 11.62	96.22 <sup>f</sup> ± 29.84	95.73 <sup>f</sup> ± 8.52
2.0	104.78 <sup>f</sup> ± 34.04	181.64 <sup>e</sup> ± 8.30	158.42 <sup>e</sup> ± 31.24	173.85 <sup>e</sup> ± 23.28	165.67 <sup>e</sup> ± 30.75
5.0	221.99 <sup>d</sup> ± 16.46	257.06 <sup>cd</sup> ± 27.44	277.29 <sup>c</sup> ± 29.51	277.25 <sup>c</sup> ± 39.30	262.03 <sup>c</sup> ± 11.75
7.5	262.08 <sup>c</sup> ± 38.69	271.33 <sup>c</sup> ± 13.12	326.90 <sup>b</sup> ± 5.37	414.13 <sup>a</sup> ± 15.96	435.71 <sup>a</sup> ± 10.36

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

หมายเหตุ: ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเริ่มต้นที่ไม่ได้เติมเอนไซม์เท่ากับ 30.12 ± 1.86 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม

**ตารางที่ ข 2** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากใบยาสูบที่ภาวะต่าง ๆ

ความเข้มข้น เอนไซม์ (%)	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เวลาในการย่อยต่างกัน (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม)				
	0 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
0.0	34.01 <sup>ghi</sup> ± 8.65	23.87 <sup>hi</sup> ± 1.39	25.72 <sup>hi</sup> ± 3.89	28.98 <sup>hi</sup> ± 3.84	29.83 <sup>hi</sup> ± 2.56
1.0	8.20 <sup>i</sup> ± 2.27	7.80 <sup>i</sup> ± 6.82	38.36 <sup>fgh</sup> ± 5.66	39.14 <sup>fgh</sup> ± 10.05	42.14 <sup>efgh</sup> ± 2.63
2.0	42.21 <sup>efgh</sup> ± 10.58	68.89 <sup>bcde</sup> ± 19.50	47.49 <sup>defgh</sup> ± 14.59	50.32 <sup>defgh</sup> ± 1.57	65.95 <sup>cdef</sup> ± 12.49
5.0	71.43 <sup>bcd</sup> ± 1.83	58.20 <sup>defg</sup> ± 1.82	95.08 <sup>ab</sup> ± 12.30	64.23 <sup>cdef</sup> ± 0.22	112.37 <sup>a</sup> ± 4.14
7.5	86.49 <sup>abc</sup> ± 3.80	93.85 <sup>ab</sup> ± 11.51	110.81 <sup>a</sup> ± 5.66	104.66 <sup>a</sup> ± 1.99	109.93 <sup>a</sup> ± 17.50

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

ตารางที่ ข 3 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจาก ไบยาซูบที่ภาวะต่าง ๆ

ความเข้มข้น เอนไซม์ (%)	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เวลาในการย่อยต่างกัน (มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม)				
	0 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
0.0	0 <sup>i</sup> ± 0	0 <sup>i</sup> ± 0	0 <sup>i</sup> ± 0	0 <sup>i</sup> ± 0	0 <sup>i</sup> ± 0
1.0	3.42 <sup>j</sup> ± 2.60	3.79 <sup>i</sup> ± 0.88	11.22 <sup>j</sup> ± 6.35	32.17 <sup>hi</sup> ± 1.33	13.55 <sup>i</sup> ± 11.33
2.0	28.61 <sup>i</sup> ± 13.61	54.27 <sup>def</sup> ± 19.45	39.09 <sup>ghi</sup> ± 2.20	53.45 <sup>defg</sup> ± 1.28	69.89 <sup>bc</sup> ± 1.98
5.0	40.42 <sup>fg</sup> ± 2.93	67.49 <sup>bcd</sup> ± 3.19	48.47 <sup>efg</sup> ± 3.91	66.24 <sup>bcd</sup> ± 1.44	42.92 <sup>fgh</sup> ± 5.40
7.5	49.21 <sup>efg</sup> ± 1.61	58.79 <sup>cde</sup> ± 7.04	62.42 <sup>cde</sup> ± 0.43	79.09 <sup>ab</sup> ± 7.79	88.00 <sup>a</sup> ± 4.27

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

ตารางที่ ข 4 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็ม มอลโทเดกซ์ทริน

pH	Solubility (%)	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน <sup>ns</sup>	ตัวอย่างที่เต็มมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v) <sup>ns</sup>
3 <sup>ns</sup>	85.33 ± 1.53	83.64 ± 9.06
4 <sup>ns</sup>	82.52 ± 4.57	70.93 ± 5.96
5 <sup>ns</sup>	89.86 ± 1.07	85.69 ± 6.07
6 <sup>ns</sup>	86.54 ± 0.57	80.97 ± 2.46
7 <sup>ns</sup>	86.98 ± 1.54	75.66 ± 4.88
8	87.44 <sup>a</sup> ± 4.28	71.02 <sup>b</sup> ± 3.21
9 <sup>ns</sup>	91.59 ± 5.11	81.73 ± 1.67
10	86.81 <sup>a</sup> ± 2.20	73.85 <sup>b</sup> ± 2.13

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

ns ข้อมูลในแถวเดียวกัน และในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

**ตารางที่ ข 5** ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติม  
มอลโทเดกซ์ทริน และ BSA

pH	foam expansion (%)		
	โปรตีนไฮโดรไลเสต		BSA
	ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v)	
4	515.17 <sup>Ab</sup> ± 17.51	164.68 <sup>Ac</sup> ± 7.79	646.00 <sup>Ca</sup> ± 15.56
5	386.44 <sup>Bb</sup> ± 12.77	9.85 <sup>Bc</sup> ± 6.75	720.00 <sup>Ba</sup> ± 1.41
6	42.17 <sup>Cb</sup> ± 7.87	2.00 <sup>Bc</sup> ± 0.00	890.00 <sup>Aa</sup> ± 7.07
7	12.22 <sup>Cb</sup> ± 2.22	ND	735.00 <sup>Ba</sup> ± 9.90

A, B, C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

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

ND คือค่าที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ (non-detectable value)

**ตารางที่ ข 6** ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน  
ในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

เวลาในการ เก็บรักษา (สัปดาห์)	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง)	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v)
0	3342.19 <sup>Ab</sup> ± 46.43	5005.34 <sup>Aa</sup> ± 136.74
3	3392.84 <sup>Ab</sup> ± 93.23	3896.66 <sup>Ba</sup> ± 20.08
6	2351.77 <sup>Bb</sup> ± 17.62	3136.87 <sup>Ea</sup> ± 80.96
9	2033.13 <sup>Cb</sup> ± 103.47	3639.14 <sup>Ca</sup> ± 74.93
12	1808.84 <sup>Db</sup> ± 112.38	3350.18 <sup>Da</sup> ± 114.43
15	1870.68 <sup>CDb</sup> ± 58.73	3117.78 <sup>Ea</sup> ± 11.05

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

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

**ตารางที่ 7:** ค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

เวลาในการเก็บรักษา (สัปดาห์)	FRAP (mmole trolox equivalent /g ตัวอย่าง)	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v)
0	204.08 <sup>ABa</sup> ± 0.29	98.09 <sup>Bb</sup> ± 0.73
3	191.19 <sup>Ca</sup> ± 3.84	90.19 <sup>Cb</sup> ± 1.05
6	200.33 <sup>ABCa</sup> ± 0.87	98.92 <sup>Bb</sup> ± 0.45
9	194.93 <sup>BCa</sup> ± 6.16	94.55 <sup>Cb</sup> ± 2.51
12	208.86 <sup>Aa</sup> ± 7.64	98.50 <sup>Bb</sup> ± 1.04
15	208.02 <sup>Aa</sup> ± 0.00	111.18 <sup>Ab</sup> ± 0.73

A, B, C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

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

**ตารางที่ 8:** Metal chelating activity (%) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

เวลาในการเก็บรักษา (สัปดาห์)	Metal chelating activity (%)	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v)
0	50.98 <sup>Ba</sup> ± 0.91	43.00 <sup>Ab</sup> ± 1.56
3 <sup>ns</sup>	54.60 <sup>AB</sup> ± 0.43	27.62 <sup>B</sup> ± 0.85
6	56.24 <sup>Aa</sup> ± 4.17	18.90 <sup>Db</sup> ± 1.73
9	54.58 <sup>ABa</sup> ± 1.65	25.08 <sup>BCb</sup> ± 0.11
12	58.54 <sup>Aa</sup> ± 0.10	28.22 <sup>Bb</sup> ± 0.50
15	50.01 <sup>Ba</sup> ± 0.42	24.25 <sup>Cb</sup> ± 1.70

A, B, C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

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

ns ข้อมูลในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

**ตารางที่ 9:** องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%)	
	ตัวอย่างที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่างที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน 5% (w/v)
โปรตีน	7.05 ± 0.07	2.06 ± 0.01
นิโคติน	1.03 ± 0.00	0.32 ± 0.00

**ภาคผนวก ค**  
**ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน**

**ตารางที่ ค 1** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณนิโคตินคงเหลือในตัวอย่างใบยาสูบหลังการสกัด

SOV		df	MS
ปริมาณนิโคตินคงเหลือ	trt	5	0.047*
	error	6	0.002

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 2** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนที่ภาวะการสกัดนิโคตินต่าง ๆ

SOV		df	MS
ปริมาณนิโคตินคงเหลือ	trt	23	279.168*
	error	24	7.234

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนที่ภาวะต่าง ๆ

SOV		df	MS
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (A)		4	330.692*
ระยะเวลาการย่อย (B)		4	1255.519*
AB		16	6.854
Error		50	11.607

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



**ตารางที่ ค 4** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีน ไฮโดรไลเสต

SOV	df	MS
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (A)	4	266670.326*
ระยะเวลาการย่อย (B)	4	14492.844*
AB	16	4350.511*
Error	50	554.607

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 5** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้กลิ่นรสดีในโปรตีน ไฮโดรไลเสต

SOV	df	MS
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (A)	4	12938.176*
ระยะเวลาการย่อย (B)	4	1221.133*
AB	16	420.100*
Error	50	182.823

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 6** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีหมู่ที่เป็น hydrophobic ในโปรตีนไฮโดรไลเสต

SOV	df	MS
ความเข้มข้นของเอนไซม์ (A)	4	9477.216*
ระยะเวลาการย่อย (B)	4	884.526*
AB	16	227.955*
Error	50	46.558

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 7** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากไบบาสุบ และ BSA

SOV		df	MS
ค่า surface hydrophobicity	trt	2	466589.786*
	error	3	917.757

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 8** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินจากไบบาสุบ และ BSA

SOV		df	MS
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ	trt	2	1.591E7*
	error	3	5571.257

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 9** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

SOV		df	MS
ค่า FRAP	trt	1	11232.820*
	error	2	0.302
ค่า metal chelating activity	trt	1	63.680*
	error	2	1.620

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 10** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน ในช่วง pH 3-10

SOV	df	MS	
		trt1	trt2
pH	7	14.986	67.137
Error	8	9.539	25.204

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

**ตารางที่ ค 11** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วง pH

SOV		df	MS
ความสามารถในการละลายที่ pH 3	trt	1	2.856
	error	2	42.126
ความสามารถในการละลายที่ pH 4	trt	1	134.328
	error	2	28.157
ความสามารถในการละลายที่ pH 5	trt	1	17.389
	error	2	18.982
ความสามารถในการละลายที่ pH 6	trt	1	31.081
	error	2	3.192
ความสามารถในการละลายที่ pH 7	trt	1	128.029
	error	2	13.080
ความสามารถในการละลายที่ pH 8	trt	1	269.616*
	error	2	14.281
ความสามารถในการละลายที่ pH 9	trt	1	97.220
	error	2	14.472
ความสามารถในการละลายที่ pH 10	trt	1	167.703*
	error	2	4.683

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 12** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ BSA ในช่วง pH 4-7

SOV	df	MS		
		trt1	trt2	BSA
pH	3	125453.747*	12953.438*	21013.833*
Error	4	201.136	39.863	98.000

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

**ตารางที่ ค 13** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดฟิมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ BSA ในแต่ละช่วง pH

SOV		df	MS
ความสามารถในการเกิดฟิมที่ pH 4	trt	2	123875.492*
	error	3	264.360
ความสามารถในการเกิดฟิมที่ pH 5	trt	2	252468.874*
	error	3	104.918
ความสามารถในการเกิดฟิมที่ pH 6	trt	2	502991.113*
	error	3	47.584
ความสามารถในการเกิดฟิมที่ pH 7	trt	2	354264.121*
	error	3	35.137

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 14** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความคงตัวของฟิมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ BSA ในช่วง pH 4-7

SOV	df	MS		
		trt1	trt2	BSA
pH	3	12.415*	0.681*	3.481*
Error	4	0.929	0.045	0.014

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

ศูนย์บริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ค 15** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความคงตัวของโฝมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน และ BSA ในแต่ละช่วง pH

SOV		df	MS
ความคงตัวของโฝมที่ pH 4	trt	2	7.288*
	error	3	0.735
ความคงตัวของโฝมที่ pH 5	trt	2	8.437*
	error	3	0.205
ความคงตัวของโฝมที่ pH 6	trt	2	0.934*
	error	3	0.001
ความคงตัวของโฝมที่ pH 7	trt	2	31.602*
	error	3	0.377

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 16** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

SOV	df	MS	
		trt1	trt2
เวลาในการเก็บรักษา	5	4.291*	3.191*
Error	6	0.230	0.343

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

ศูนย์บริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**ตารางที่ ค 17** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วงการเก็บรักษา

SOV		df	MS
ค่า surface hydrophobicity ที่ 0 สัปดาห์	trt	1	11.414*
	error	2	0.227
ค่า surface hydrophobicity ที่ 3 สัปดาห์	trt	1	0.196
	error	2	0.371
ค่า surface hydrophobicity ที่ 6 สัปดาห์	trt	1	3.378
	error	2	0.239
ค่า surface hydrophobicity ที่ 9 สัปดาห์	trt	1	1.428
	error	2	0.503
ค่า surface hydrophobicity ที่ 12 สัปดาห์	trt	1	1.110*
	error	2	0.002
ค่า surface hydrophobicity ที่ 15 สัปดาห์	trt	1	0.036
	error	2	0.066

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 18** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

SOV	df	MS	
		trt1	trt2
เวลาในการเก็บรักษา	5	1045370.667*	1009707.125*
Error	6	6324.013	7414.066

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

**ตารางที่ ค 19** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วงการเก็บรักษา

SOV		df	MS
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 0 สัปดาห์	trt	1	6871005.094*
	error	2	8979.340
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 3 สัปดาห์	trt	1	253834.592*
	error	2	4547.604
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 6 สัปดาห์	trt	1	616374.159*
	error	2	3432.242
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 9 สัปดาห์	trt	1	2579268.120*
	error	2	8160.527
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 12 สัปดาห์	trt	1	2375728.996*
	error	2	12861.923
ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ 15 สัปดาห์	trt	1	1555245.939*
	error	2	1785.815

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 20** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

SOV	df	MS	
		trt1	trt2
เวลาในการเก็บรักษา	5	101.525*	98.286*
Error	6	18.639	1.620

\*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

**ตารางที่ ค 21** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วงการเก็บรักษา

SOV		df	MS
ค่า FRAP ที่ 0 สัปดาห์	trt	1	11232.820*
	error	2	0.302
ค่า FRAP ที่ 3 สัปดาห์	trt	1	10199.990*
	error	2	7.919
ค่า FRAP ที่ 6 สัปดาห์	trt	1	12972.071*
	error	2	171.581
ค่า FRAP ที่ 9 สัปดาห์	trt	1	10076.144*
	error	2	22.117
ค่า FRAP ที่ 12 สัปดาห์	trt	1	12178.226*
	error	2	29.700
ค่า FRAP ที่ 15 สัปดาห์	trt	1	9378.954*
	error	2	0.260

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ ค 22** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เต็มและไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทรินในช่วงการเก็บรักษา 15 สัปดาห์

SOV	df	MS	
		trt1	trt2
เวลาในการเก็บรักษา	5	20.481*	103.648*
Error	6	3.543	1.121

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

trt1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ได้เติมมอลโทเดกซ์ทริน

trt2 แทนโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมมอลโทเดกซ์ทริน (5% w/v)

**ตารางที่ ค 23** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เต็มและไม่ได้เต็มมอลโทเดกซ์ทรินในแต่ละช่วงการเก็บรักษา

SOV		df	MS
ค่า metal chelating activity ที่ 0 สัปดาห์	trt	1	63.680*
	error	2	1.620
ค่า metal chelating activity ที่ 3 สัปดาห์	trt	1	728.190*
	error	2	0.453
ค่า metal chelating activity ที่ 6 สัปดาห์	trt	1	1393.529*
	error	2	10.174
ค่า metal chelating activity ที่ 9 สัปดาห์	trt	1	870.840*
	error	2	1.363
ค่า metal chelating activity ที่ 12 สัปดาห์	trt	1	919.302*
	error	2	0.127
ค่า metal chelating activity ที่ 15 สัปดาห์	trt	1	663.578*
	error	2	1.530

\*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศุภรจิตต์ เอี่ยมนเรพร เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อ พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคปลาย ปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย