สมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและ Flavourzyme®

พัสตราภรณ์ ทองอิ่มพงษ์[1] ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์[2*] อรพิน เกิดชูชื่น[2]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
สุรพงษ์ พินิจกลาง[3]
มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ดินแดง กรุงเทพฯ 10400
และ เบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์[4]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ แขวงวงศ์สว่าง เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ไฮโดรไลซ์จากกากทานตะวันด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ โบรมิเลน และ Flavourzyme® แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 ความเข้มข้น คือร้อยละ 5, 10 และ 15 ที่เวลาการไฮโดรไลซ์ 1, 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นและเวลาในการไฮโดรไลซ์มีผลต่อร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ทำให้ไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยโบรมิเลน (Enzymatic bromelain sunflower protein hydrolysate: eb-SPHs) และ Flavourzyme® (Enzymatic flavourzyme sunflower protein hydrolysate: ef-SPHs) สูงขึ้น ถึงแม้ว่า ef-SPHs มีระดับการไฮโดรไลซ์สูงกว่า eb-SPHs แต่ eb-SPHs มีค่า surface hydrophobicity (S_o) และมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) และ ABTS$^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging) สูงกว่า ef-SPHs โดยเฉพาะ eb-SPHs ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ สูงที่สุดที่ร้อยละ 83.94 และ 89.31 ตามลำดับ นอกจากนี้ eb-SPHs มีสมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดฟองและอิมัลชันที่สูงกว่า ef-SPHs ขณะที่ eb-SPHs ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีระดับการไฮโดรไลซ์เพียงร้อยละ 30.48 แต่มีค่า S_o สูงที่สุด เท่ากับ 1300 จัดเป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่แสดงสมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดฟองและอิมัลชันสูงที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 287.50 และ 56.17 ตามลำดับ

คำสำคัญ : โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / สมบัติการเกิดฟองและการเกิดอิมัลชัน / ระดับการไฮโดรไลซ์

---

* *Corresponding Author : nutta.lao@kmutt.ac.th*

1 *นักศึกษาปริญญาเอก สายวิชาเทคโนโลยี ชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

2 *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยี ชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

3 *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

4 *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์*

Antioxidant and Functional Properties of Extracted Sunflower Proteins by Bromelain and Flavourzyme®

Pastraporn Thongimpong[1], Natta Laohakunjit[2*], Orapin Kerdchoechuen[2]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Tha Kham, Bang Khun Thian, Bangkok 10150

Surapong Pinitglang[3]

University of the Thai Chamber of Commerce, Din Daeng, Bangkok 10400

and Benjawan Thumthanaruk[4]

King Monkut's University of Technology North Bangkok, Bangsue, Bangkok 10800

Abstract

The purpose of this study was to compare the antioxidant and functional properties of sunflower protein hydrolysates produced via the use of two proteases, bromelain (Enzymatic bromelain sunflower protein hydrolysate: eb-SPHs) and Flavourzyme® (Enzymatic flavourzyme sunflower protein hydrolysate: ef-SPHs). Enzyme concentration was varied at 3 different levels at 5, 10 and 15% and times of hydrolysis at 1, 3, 6, 12 and 18 h. Results showed that the enzyme concentration and hydrolysis time had effects on the degree of hydrolysis (DH). Degree of hydrolysis increased with increasing enzyme concentration and hydrolysis time. Although eb-SPHs had lower DH than ef-SPHs, eb-SPHs had higher surface hydrophobicity (S_o) and showed stronger antioxidant properties against $DPPH^{\bullet}$ (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and $ABTS^{\bullet+}$ (Azinobis (2, 2'-azinobis (2-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging) radical scavenging properties. In particular, eb-SPH produced via the use of 15% bromelain for 6 h had the highest antioxidant activities against $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ of 83.94 and 89.31%, respectively. Moreover, eb-SPHs contributed to the high foaming and emulsifying capacities than ef-SPHs. The best condition to produce sunflower protein hydrolysate by bromelain was at 10% (w/v) for 1 h (low DH, 3048%) which led to the highest S_o of 1300 and highest foaming and emulsifying capacities of 287.50 and 56.17%, respectively.

Keywords : Sunflower Meal Protein Hydrolysates / Antioxidant Activity / Foaming and Emulsifying Capacities / Degree of Hydrolysis

* *Corresponding Author : nutta.lao@kmutt.ac.th*

1 *Ph.D. Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

2 *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

3 *Assistant Professor, Food science and Technology, The School of Science and Technology.*

4 *Assistant Professor, Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science.*

1. บทนำ

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีปริมาณน้ำมันสูงถึงร้อยละ 48 หลังจากการสกัดน้ำมันทานตะวันได้กากเมล็ดทานตะวัน (sunflower meal) เป็นผลพลอยได้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนคงเหลือในกากประมาณร้อยละ 30-50 โดยทั่วไปกากทานตะวันถูกนำไปใช้ในการผลิตปุ๋ยและเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ [1] โปรตีนจากกากเมล็ดทานตะวันประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งซิสเตอีน และเมทไธโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [2] นอกจากนี้กากทานตะวันยังมีกลูตามิกและแอสปาร์ติก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสอร่อยในปริมาณสูง [1] โปรตีนในกากทานตะวันมีขนาดใหญ่ (360 kDa) โดยมีโปรตีนชนิดอัลบูมิน (ละลายในน้ำ) และกลอบูลิน (ละลายในเกลือ) เป็นกลุ่มโปรตีนหลักที่พบในกากทานตะวัน อย่างไรก็ตามการสกัดน้ำมันทำให้โปรตีนในกากทานตะวันเสียสภาพ และมีความสามารถในการละลายลดลง ส่งผลให้โปรตีนไม่สามารถแสดงสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ตลอดจนกรดอะมิโนในสายโปรตีนไม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological properties) [3] แต่วิธีการใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์กากโปรตีนจากแหล่งต่างๆ สามารถปรับปรุงโปรตีนหรือเพปไทด์ให้มีสมบัติเชิงหน้าที่ และเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนกากทานตะวันที่ดีได้

การไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสเป็นการใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) และสามารถกำหนดขอบเขตของการไฮโดรไลซ์ได้ [4] ซึ่งสามารถปรับปรุงสมบัติของโปรตีนให้อยู่ในรูปของเพปไทด์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ และมีสมบัติเชิงหน้าที่ เช่นการเกิดโฟม และการเกิดอิมัลชัน [5] อย่างไรก็ตามสมบัติของเพปไทด์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือมีสมบัติเชิงหน้าที่ขึ้นกับแหล่งของโปรตีนตั้งต้น และชนิดของเอนไซม์โปรติเอสซึ่งส่งผลต่อระดับการไฮโดรไลซ์ (degree of hydrolysis) ขนาดของเพปไทด์ (molecular weight) องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) และการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequence) [6]

มีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากพืช โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสหลายชนิด เช่น โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก canola ด้วย alcalase และ Flavourzyme® [7] โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก peanut kernel ด้วย Esperase® [8] และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากปาล์ม ด้วย alcalase, chymotrypsin, papain, pepsin, trypsin, Flavourzyme® และ bromelain พบว่าระดับการไฮโดรไลซ์มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อระดับการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น เช่น โปรตีนไฮโดรไลเซทถั่วลิสงไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น เมื่อระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้นจากร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 20 และเริ่มคงที่เมื่อระดับการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 40 [5] นอกจากระดับการไฮโดรไลซ์แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาผลของขนาดของเพปไทด์ต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยที่เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ขนาดใหญ่ จากการศึกษาของ Sarmadi และ Ismail (2010) [9] พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก African yam bean ไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase ได้เพปไทด์มีขนาดเล็กกว่า 1 kDa มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ ferric reducing power และการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ hydroxyl สูงกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 1 kDa

นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแหล่งโปรตีนและเอนไซม์โปรติเอสที่แตกต่างกัน เช่น โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก corn gluten ด้วย Protamex® [10] โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก chickpea ด้วย alcalase [11] และโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก pine nut ด้วย alcalase ซึ่งพบว่าระดับการไฮโดรไลซ์ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทมีสมบัติเชิงหน้าที่ลดลงโดยที่ระดับการไฮโดรไลซ์ต่ำ (ร้อยละ 5) โปรตีนไฮโดรไลเซทมีสมบัติการเกิดโฟมที่สูงกว่าโปรตีน ไฮโดรไลเซทที่ระดับการไฮโดรไลซ์สูง (ร้อยละ 25) และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วยเพปไทด์ขนาดใหญ่ (มากกว่า 10 kDa) มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี [12] จากการศึกษาของ Calderón de la barca และคณะ (2000) [13] พบว่า สมบัติการเกิดโฟมและการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทถั่วเหลือง

ด้วยเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin มีค่าลดลงเมื่อโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซ์มีขนาดเล็กลง

ถึงแม้มีรายงานวิจัยที่ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase, Flavourzyme®, pepsin, pancreatin และ caseinate [14-15] และมีรายงานการใช้โบรมิเลนมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทกากถั่วเขียวและสาหร่ายมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส [16-17] แต่ยังไม่พบการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน ทั้งที่โบรมิเลนเป็นเอนไซม์เอนโดรโปรติเอสที่ตัดจำเพาะภายในสายเพปไทด์ของโปรตีนได้เพปไทด์สายสั้นๆ และมีความจำเพาะ (specificity) กับกรดอะมิโนไลซีน อาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคที่พบมากในกากทานตะวัน การใช้โบรมิเลนไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันนอกจากเป็นการปรับปรุงให้ได้เพปไทด์และกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคในสายเพปไทด์ ซึ่งมีศักยภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อปรับปรุงสมบัติของโปรตีนจากกากทานตะวันไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนเปรียบเทียบกับ Flavourzyme® ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้า

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมกากทานตะวันและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

กากทานตะวันจากบริษัทฟลาเวอร์ฟูด จำกัด นำมาสกัดน้ำมัน โดยการแช่ในเฮกเซน อัตราส่วนกากทานตะวันต่อเฮกเซน 1:3 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผ่าน Whatman เบอร์ 1 (สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง หรือจนกระทั่งมีปริมาณไขมันน้อยกว่าร้อยละ 1) และระเหยเฮกเซนออกจากกากทานตะวันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกากทานตะวันที่ผ่านการสกัดน้ำมันนำมาบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช อบที่ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นฐานแห้งเท่ากับร้อยละ 7.88 บรรจุใส่ภาชนะปิดสนิท นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน กากใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต [18] และวิเคราะห์กลุ่มโปรตีน [19]

วิเคราะห์กลุ่มโปรตีน

นำกากทานตะวันที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วปริมาณ 2 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนกลุ่มอัลบูมิน จากนั้นนำตะกอนที่ได้เติม 0.5M NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงและกรองส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนกลุ่มกลอบูลิน เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอน เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงและกรองส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนกลุ่มโปรลามิน และเติม 0.1N NaOH ลงในตะกอน เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยง และกรองส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนกลุ่มกลูเตลิน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มด้วยวิธีไบยูเร็ต โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ดัดแปลงวิธีจาก [19]

2.2 การไฮโดรไลซ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

นำกากทานตะวันที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้ว 10 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมโบรมิเลน (activity เท่ากับ 97,043.92 ยูนิต/มิลลิลิตร) หรือ Flavourzyme® (activity เท่ากับ 120,777.03 ยูนิต/มิลลิลิตร) แปรความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 5, 10 และ 15 (น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักกากทานตะวัน) แปรเวลาในการไฮโดรไลซ์ที่ 1, 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง เขย่าทุก 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน (95 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วย Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของ enzymatic bromelain Sunflower Protein Hydrolysates (eb-SPHs) และ enzymatic

Flavourzyme Sunflower Protein Hydrolysates (ef-SPHs) ได้แก่ ค่าสี ระดับการไฮโดรไลซ์ (Degree of hydrolysis, DH) ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนขนาดของโมเลกุลของเพปไทด์ค่า surface hydrophobicity ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วิเคราะห์ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals scavenging ($DPPH^{\bullet}$) และ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radicals scavenging ($ABTS^{\bullet+}$) และวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ (การเกิดโฟมและการเกิดอิมัลชัน)

2.2.1 วิเคราะห์ค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

วิเคราะห์ค่าสี ด้วยเครื่องวัดสี ตามระบบ L^*, a^*, b^* และค่า hue angle นำ eb-SPHs และ ef-SPHs ทุกสภาวะการย่อย ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วัดด้วยเครื่องวัดสี (MiniScan® EZ, Hunter Lab, USA) โดยเปรียบเทียบกับค่าสีที่ภาวะควบคุม (เอนไซม์ร้อยละ 0) คำนวณค่าแตกต่างของสี ΔE ดังสมการ

$$\Delta E = [(L^*_2 - L^*_1)^2 + (a^*_2 - a^*_1)^2 + (b^*_2 - b^*_1)^2]^{1/2}$$

โดยที่ L^*_1, a^*_1 และ b^*_1 : ค่าสีของภาวะควบคุม
L^*_2, a^*_2 และ b^*_2 : ค่าสีของตัวอย่าง

2.2.2 วิเคราะห์ระดับการไฮโดรไลซ์ (Degree of hydrolysis: DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

วิเคราะห์ระดับการไฮโดรไลซ์ (DH) ดัดแปลงวิธีจาก Flavia และ Maria (1998) [20] โดยนำ eb-SPHs และ ef-SPHs 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacitic acid : TCA) เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200×g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl และนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

โดยที่ Total - N = ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ และ 20% TCA soluble-N = ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ใน TCA

$$\text{ระดับการไฮโดรไลซ์ (ร้อยละ)} = \left(\frac{\text{(20 \% TCA soluble–N)}}{\text{total-N}} \right) \times 100$$

2.2.3 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกากทานตะวันและโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกากทานตะวัน และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน โดยนำกากทานตะวันที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้ว ปริมาณ 1 กรัม มาไฮโดรไลซ์ด้วย 6N HCl ก่อนวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน ไม่ต้องผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 6N HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำแต่ละตัวอย่างมาเตรียมอนุพันธ์ด้วย AccQ-fluor derivertization และ AccQ-fluor reagent ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นฉีดสารละลายอนุพันธ์ตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (JASCO FP2020, Japan) โดยใช้คอลัมน์ Hypersil Gold column C18 และสารละลายผสม eluent A (sodium acetate 19 กรัม, phosphoric acid 40 กรัม, triethylamine 2.27 กรัม) กับ eluent B (60% acetonitrile) เป็นตัวพา ด้วยอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์สารประกอบด้วย fluorescence detector มี excitation ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร และ emission ที่ความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร วิเคราะห์กรดอะมิโนเทียบกับสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน

2.2.4 วิเคราะห์น้ำหนักเพปไทด์ (Molecular weight peptide distribution) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

วิเคราะห์น้ำหนักเพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Villanueva และคณะ [15] โดยนำ eb-SPHs และ ef-SPHs ผสมกับ sample buffer (0.3125 M Tris

HCl, SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10, glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 50, bromphenol blue G ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 2-Mercaptoethanol ความเข้มข้นร้อยละ 10) ในอัตราส่วน 5:1 ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ขนาดเพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน ที่ 15% separating gel และ 5% stacking gel ใน 25mM Tris running buffer ที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีเจลด้วย Coomassie brilliant blue G -250 และล้างเจลด้วย สารละลาย 10% acetic acid ใน 20% methanol เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานขนาด 2-250 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Bio Rad)

2.2.5 วิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

ค่า surface hydrophobicity ของ eb-SPHs และ ef-SPHs วิเคราะห์ตามวิธีของ Wu และคณะ (1998) [21] โดยใช้ตัวติดตามฟลูโอเรสเซนส์ คือ 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) เตรียม eb-SPHs และ ef-SPHs ให้มีความเข้มข้น 0.00125 ถึง 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.1 phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 8 mM ANS (ละลายใน 0.1 phosphate buffer pH 7.0) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity, FI) ด้วยเครื่อง spectrofluorometer (FP-6200®, Jasco) โดยกำหนดความยาวคลื่น excitation เท่ากับ 390 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission เท่ากับ 470 นาโนเมตร นำค่า FI ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟสมการเส้นตรง โดยค่าความชันแสดงถึง surface hydrophobicity index (S_o) ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.3 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

2.3.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$)

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ โดยดัดแปลงวิธีจาก Cai และคณะ (2013) [12] โดยนำ eb-SPHs และ ef-SPHs ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 980 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 มิลลิโมลาร์ $DPPH^{\bullet}$ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูล } DPPH^{\bullet} = \left(\frac{A_{cont} + A_{blank} - A_{test}}{A_{cont}} \right) \times 100$$

โดยที่ A_{cont} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + $DPPH^{\bullet}$)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีตัวอย่าง (ตัวอย่าง + น้ำกลั่น + เอทานอล)

A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + น้ำกลั่น + $DPPH^{\bullet}$)

2.3.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{\bullet+}$)

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยดัดแปลงวิธีจาก Cai และคณะ (2013) [12] เตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ โดยผสม 7.0 μM ABTS และ 2.45 μM potassium persulphate ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เก็บไว้ในที่มืด 12 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วย 95% เอทานอล จนสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ มีค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.7±0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำ eb-SPHs และ ef-SPHs ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 980 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 4 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูล } ABTS^{\bullet+} = \left(\frac{A_{cont} + A_{blank} - A_{test}}{A_{cont}} \right) \times 100$$

โดยที่ A_{cont} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + $ABTS^{\bullet+}$)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีตัวอย่าง (ตัวอย่าง + น้ำกลั่น + เอทานอล)

A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + น้ำกลั่น + $ABTS^{\bullet+}$)

2.4 วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวัน

2.4.1 สมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดโฟม

เตรียม eb-SPHs และ ef-SPHs ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ปั่นให้เกิดโฟมด้วยโฮโมจิไนเซอร์ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วัดปริมาตรของฟองที่เกิดขึ้น ดัดแปลงวิธีจาก Cao และคณะ (2009) [22] คำนวณร้อยละการเกิดโฟมดังสมการ

$$\text{ร้อยละการเกิดโฟม} = \frac{\text{ปริมาตรโฟมที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมด}}$$

2.4.2 สมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดอิมัลชัน

เตรียม eb-SPHs และ ef-SPHs ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยโฮโมจิไนเซอร์ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เกิดอิมัลชัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200×g เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาตรอิมัลชันที่เกิดขึ้น ดัดแปลงวิธีจาก Cao และคณะ [22] คำนวณการเกิดอิมัลชันดังสมการ

$$\text{ร้อยละการเกิดอิมัลชัน} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายอิมัลชัน} \times 100}{\text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมด}}$$

2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 3×5 Factorial in Randomized Complete Block Design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SAS (1997)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากทานตะวันที่ผ่านกระบวนการสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน (ตารางที่ 1) พบว่า กากทานตะวันประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กากใย และเถ้า ร้อยละ 59.98, 25.29, 0.40, 5.58 และ 8.75 (ฐานน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยกากทานตะวันที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูง เหมาะแก่การนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนตั้งต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท เนื่องจากแหล่งโปรตีนตั้งต้นที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท ควรมีองค์ประกอบโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 ประกอบกับมีปริมาณไขมันต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 1) และกากใยปริมาณน้อย (น้อยกว่าร้อยละ 10) ทำให้ไม่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสส่งผลต่อความว่องไวในการทำงานของเอนไซม์ได้ [10] นอกจากนี้กากทานตะวันที่สกัดน้ำมันยังประกอบด้วยโปรตีนในกลุ่มกลอบูลิน (โปรตีนที่ละลายในน้ำเกลือ) อัลบูมิน (โปรตีนที่ละลายน้ำ) กลูเตลิน (โปรตีนที่ละลายด่าง) และโปรลามิน (โปรตีนที่ละลายในเอทานอล) ร้อยละ 53.18, 24.10, 18.21 และ 4.51 (ฐานน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในกากทานตะวัน (ตารางที่ 2) พบว่า กากทานตะวันนอกจากมีกลูตามิกและแอสปาร์ติกซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสอร่อยในปริมาณสูง (12.42 และ 5.27 มิลลิกรัม/กากทานตะวัน 100 กรัม ตามลำดับ) และกรดอะมิโนจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไกลซีน อะลานีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และโพรลีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคในปริมาณสูงแล้ว กากทานตะวันยังพบกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบได้แก่ ซิสเตอีน และเมทไธโอนีน และพบกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อการตัดของโบรมิเลน (ไลซีน อาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน) ดังนั้นกากทานตะวันจึงเป็นแหล่งโปรตีนที่ส่งผลให้กากทานตะวันเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากทานตะวันหลังการสกัดไขมันด้วยเฮกเซน

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (กรัม/100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)
Protein	59.98 ± 1.43
carbohydrate	25.29 ± 0.60
fat	0.40 ± 0.01
ber	5.58 ± 0.22
ash	8.75 ± 0.05

หมายเหตุ ความชื้นฐานแห้งของกากทานตะวันที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเท่ากับร้อยละ 7.88

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่พบในโปรตีนกากทานตะวันหลังการสกัดไขมันด้วยเฮกเซน และกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน และ Flavourzyme® และกรดอะมิโนที่พบในรูปอิสระและในรูปเพปไทด์

Amino acids	Sunflower meal (mg/100mg)	Amino acid of eb-SPHs at 15% bromelain for 6 h (mg/100mL)			Amino acid of eb-SPHs at 15% Flavourzyme® for 6 h (mg/100mL)		
	Total amino acid	Total amino acid	Free amino acid	Amino acids as peptides form	Total amino acid	Free amino acid	Amino acids as peptides form
Aspartic acid	5.27	162.03	2.15	159.88	138.53	23.94	114.59
Serine	2.42	84.66	4.31	80.35	71.61	37.25	34.36
Glutamic acid	12.42	409.35	4.12	405.23	390.46	40.73	349.73
Glycine	2.93	101.12	4.13	96.99	85.35	20.45	64.9
Histidine	1.27	37.66	1.01	36.65	39.01	19.47	19.54
Arginine	4.68	154.02	30.4	123.62	160.29	136.21	24.08
Threonine	2.02	64.91	4.35	60.56	61.29	26.41	34.88
Alanine	2.37	71.85	5.13	66.721	62.04	27.84	34.2
Proline	2.30	69.61	0.90	68.71	65.88	8.56	57.32
Cystine	0.50	45.68	6.87	38.81	43.77	18.02	25.75
Tyrosine	1.09	45.39	1.28	44.11	35.89	27.98	7.91
Valine	2.50	75.52	25.65	49.87	74.79	37.58	37.21
Methionine	0.77	16.29	4.03	12.26	21.86	12.59	9.27
Lysine	1.92	72.52	9.60	62.92	58.67	36.51	22.16
Isoleucine	2.08	64.24	1.02	63.22	63.68	29.52	34.16
Leucine	3.36	96.48	7.52	88.96	90.49	45.84	44.65
Phenylalanine	2.43	68.86	4.30	64.56	63.76	32.55	31.21
Total	50.33	1640.19	116.77	1523.42	1518.1	590.72	927.38

3.1 ลักษณะปรากฏและค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

การวิเคราะห์ค่าสี ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ค่าเฉดสี (hue angle) และ ค่าการเปลี่ยนแปลงของสี (ΔE) ซึ่งเปรียบเทียบจากค่าสีที่เปลี่ยนแปลงจากชุดควบคุม (ไม่ใส่เอนไซม์) โดยค่า L^* มีค่าตั้งแต่ 0 (มืดดำ) ถึง 100 (สว่างขาว) และค่า hue angle ซึ่งแสดงถึงสีที่แท้จริงที่ปรากฏ มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 360 โดยในแต่ละช่วงของแต่ละองศาแสดงสีที่ปรากฏแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยค่า hue angle อยู่ในช่วง 90-135 แสดงว่าโปรตีนที่ไฮโดรไลซ์จากกากทานตะวันมีเฉดสีตรงกับช่วงสีเหลือง โดยมีค่าความสว่าง หรือค่า L^* ของ eb-SPHs มีค่าอยู่ระหว่าง 83.68-88.27 และ ef-SPHs มีค่า L^* อยู่ระหว่าง 73.47-77.20 ซึ่งค่า L^* ของ ef-SPHs มีค่าสูงกว่า eb-SPHs ส่งผลให้ ef-SPH มีสีเข้มกว่า eb-SPH

ตารางที่ 3 ค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน และ Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก ที่เวลา 1, 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

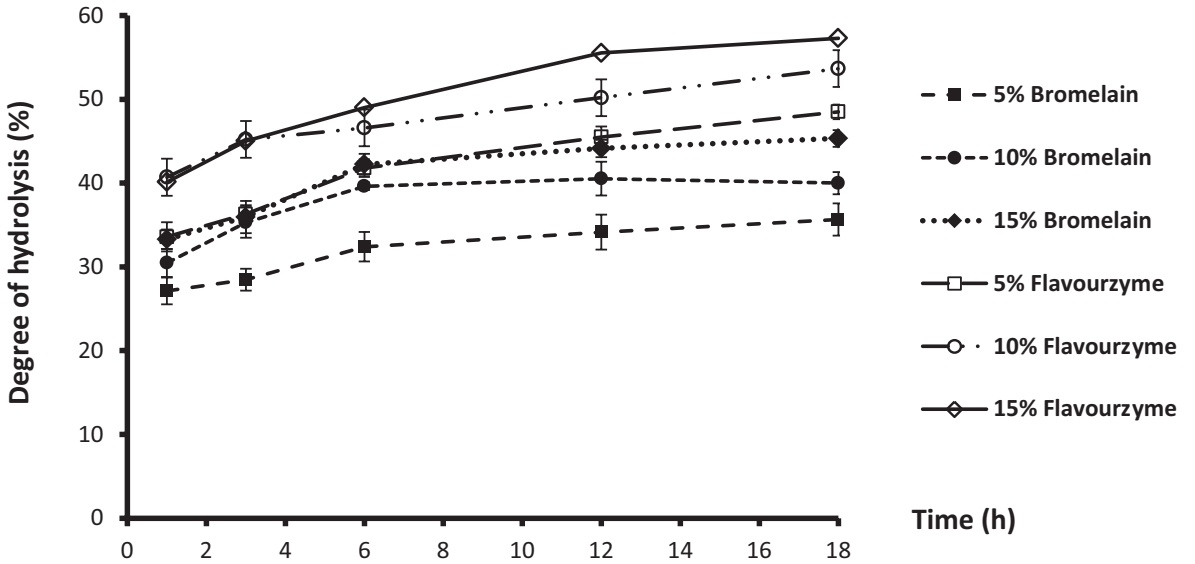
Enzyme concentration (%)	Time (h)	eb-SPH			ef-SPH		
		L^*	ΔE	h^o	L^*	ΔE	h^o
0 (control)	1	88.68	-	108.07	88.68	-	108.07
	3	87.73	-	107.95	87.73	-	107.95
	6	86.79	-	107.90	86.79	-	107.90
	12	86.57	-	106.34	86.57	-	106.34
	18	85.05	-	104.87	85.05	-	104.87
5	1	88.27	2.47	101.48	77.20	3.49	101.52
	3	87.69	2.77	93.86	76.96	3.86	101.73
	6	86.41	2.47	90.35	75.96	3.07	102.44
	12	85.71	3.47	88.45	74.93	4.42	100.94
	18	84.10	2.47	93.02	73.47	4.68	102.96
10	1	87.72	2.92	91.43	76.50	3.79	100.98
	3	86.49	3.42	93.66	76.21	4.06	100.84
	6	85.90	3.52	89.92	75.48	3.76	101.08
	12	84.95	3.92	90.23	74.64	5.08	100.31
	18	84.08	4.92	97.03	73.62	5.19	99.88
15	1	87.71	3.29	90.36	75.63	5.05	98.97
	3	86.32	3.79	92.95	75.49	4.20	99.70
	6	85.68	3.89	93.19	75.73	4.10	99.52
	12	84.25	4.29	91.09	74.30	5.25	99.95
	18	83.68	5.29	90.99	73.47	5.96	97.95
F test		ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V.(%)		2.03	3.24	8.88	2.41	3.55	6.45
LSD		0.59	0.64	0.81	0.55	0.59	1.11

ns หมายถึง ค่าสีในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

อย่างไรก็ตามค่า ΔE ของ ef-SPHs ยังมีค่าสูงกว่า eb-SPHs แสดงว่าการไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันด้วย Flavourzyme® ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทมากกว่าการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะปรากฏของ eb-SPHs และ ef-SPHs ที่ ef-SPHs มีสีเหลืองน้ำตาลเข้มกว่า eb-SPHs เนื่องจาก Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ได้ทั้งภายในและปลายสายของโปรตีน ทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของโปรตีนไฮโดรไลเซท [23] แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของร้อยละความเข้มข้นเอนไซม์ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซท

3.2 ระดับการไฮโดรไลซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

ระดับการไฮโดรไลซ์แสดงถึงสัดส่วนร้อยละของเพปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการไฮโดรไลซ์มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการไฮโดรไลซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนในช่วง 1 ถึง 6 ชั่วโมง ระดับการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 1) เนื่องจากกากทานตะวันมีโปรตีนกลอบูลินและอัลบูมิน เป็นกลุ่มโปรตีนหลักในกากทานตะวัน ซึ่งโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้สามารถละลายได้ดีในน้ำและน้ำเกลือ ตามลำดับ จึงถูกไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาแรกๆ ของการเกิดปฏิกิริยา [24] ซึ่งที่เวลาไฮโดรไลซ์ 6 ชั่วโมง พบว่า eb-SPHs ที่ความเข้มข้นโบรมิเลนร้อยละ 15 มีร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์สูงที่สุด (ร้อยละ 42.23) แต่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหลังการไฮโดรไลซ์กากทานตะวันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ค่าระดับการไฮโดรไลซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าคงที่ เนื่องจากกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดีที่เป็นสับสเตรทถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์จึงไม่สามารถไฮโดรไลซ์ได้อีก ทำให้สับสเตรทไม่เพียงพอต่อเอนไซม์ หรือเกิด product inhibition ส่งผลให้ค่าระดับการไฮโดรไลซ์คงที่ [25] ส่วนการไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันด้วย Flavourzyme® มีร้อยละการย่อยสลายที่สูงกว่าโบรมิเลน เนื่องจากเอนไซม์ Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ endo-exo protease ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์ได้ทั้งภายในสายและปลายสายของโปรตีน ทำให้มีระดับการไฮโดรไลซ์สูงกว่าการใช้โบรมิเลนที่เป็นเอนไซม์ endoprotease ซึ่งการไฮโดรไลซ์กากทานตะวันด้วย Flavourzyme® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีร้อยละการย่อยสลายสูงที่สุด (ร้อยละ 57.29)



รูปที่ 1 ค่าระดับการไฮโดรไลซ์กากทานตะวันด้วยเอนไซม์โบรมิเลน และ Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 5 10 และ 15 เวลา 1, 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

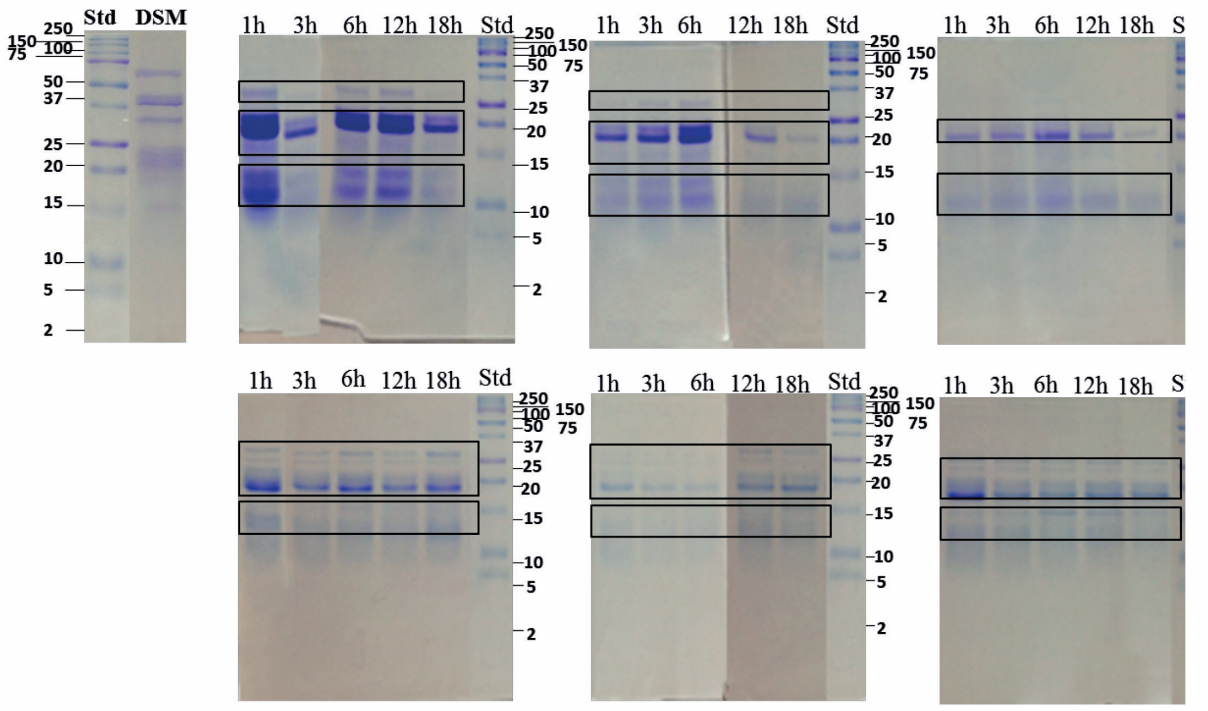
3.3 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนของ eb-SPHs และ ef-SPHs พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme® ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไกลซีน อะลานีน โพรลีน วาลีน ไลซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และฟีนิลอะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโน-ไฮโดรโฟบิค และกรดอะมิโนซิสเตอีน และเมทไธโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 2)

กรดอะมิโนที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันอยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ และสายเพปไทด์ ซึ่ง Flavourzyme® สามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนอิสระได้เท่ากับ 590.72 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่ากรดอะมิโนอิสระทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (116.77 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) เนื่องจาก Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์โปรตีนได้ทั้งภายในและปลายสายของโปรตีน ef-SPHs จึงมีกรดอะมิโนในรูปกรดอะมิโนอิสระสูง ในขณะที่โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่ตัดภายในสายโปรตีน กรดอะมิโนส่วนใหญ่ของ eb-SPHs จึงอยู่ในรูปของเพปไทด์ (1,640.19 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ซึ่งสูงกว่า ef-SPHs (927.38 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับค่าระดับการไฮโดรไลซ์ของ eb-SPHs และ ef-SPHs

3.4 การจัดเรียงขนาดเพปไทด์ (Molecular weight peptide distribution) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

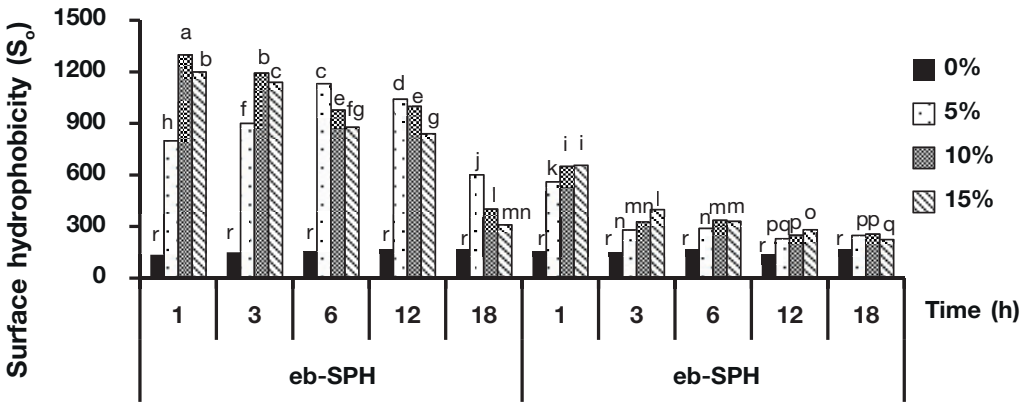
ผลวิเคราะห์ Molecular weight distribution ของ eb-SPHs และ ef-SPHs ด้วยวิธี SDS-PAGE จากรูปที่ 2 พบว่าโปรตีนกากทานตะวันที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาด 60kDa (รูป a) ไม่ปรากฏในแผ่นเจล (รูป b1, b2, b3, c1, c2 และ c3) เนื่องจากโปรตีนถูกเอนไซม์โบรมิเลนและ Flavourzyme® ไฮโดรไลซ์เป็นโปรตีนขนาดเล็กและเพปไทด์สายสั้นๆ eb-SPHs มีขนาดโมเลกุลกระจายหลายขนาด ได้แก่ 10, 13, 17, 21, 24 และ 34 kDa เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ทำให้ eb-SPHs และ ef-SPHs มีระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้น ส่งผลให้เพปไทด์ที่ได้มีขนาดเล็กลง เช่น แถบโปรตีนขนาด 34 kDa ใน eb-SPHs จางลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโบรมิเลนและเวลาในการไฮโดรไลซ์ และแถบโปรตีนไม่ปรากฏเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโบรมิเลนเป็นร้อยละ 15 (รูป b3) [24] แต่เมื่อเวลาในการไฮโดรไลซ์มากกว่า 6 ชั่วโมง เพปไทด์ขนาดใหญ่มีสีจางลง หรือไม่ปรากฏแถบโปรตีน แต่พบการกระจายตัวของเพปไทด์ขนาดเล็กๆ แทน ซึ่งสอดคล้องกับร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์ และเนื่องจาก Flavourzyme® สามารถตัดพันธะเพปไทด์ที่ปลายสายได้กรดอะมิโนอิสระหรือได้เพปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ (2 kDa) จึงไม่แสดงแถบสีบนเจล (รูป c1, c2 และ c3) จึงทำให้พบการกระจายตัวของเพปไทด์ของ eb-SPHs มากกว่า ef-SPHs ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนของ ef-SPHs ที่พบว่ามีกรดอะมิโนอยู่ในรูปกรดอะมิโนอิสระมากกว่า eb-SPHs



รูปที่ 2 ขนาดโปรตีนของกากทานตะวัน (DSM) (a) ขนาดเพปไทด์ของ eb-SPHs ความเข้มข้นโบรมิเลนร้อยละ 5 (b1) 10 (b2) และ 15 (b3) และ ef-SPHs ความเข้มข้น Flavourzyme® ร้อยละ 5 (c1) 10 (c2) และ 15 (c3)

3.5 ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

จากผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity (S_o) หรือค่าที่แสดงแนวโน้มของความไม่ชอบน้ำที่ผิวของโปรตีน ซึ่งเป็นค่าที่มีบทบาทสำคัญในการกำหนดโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน [26] จากรูปที่ 3 ค่า S_o ของ eb-SPHs และ ef-SPHs มีค่าสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สภาวะควบคุม (ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0) เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนเริ่มต้นหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) เข้าสู่ภายในโครงสร้างของโปรตีน แต่การไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพียงบางส่วน ทำให้โปรตีนเผยด้าน hydrophobic group ออกสู่ภายนอกโครงสร้างของโปรตีนได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า S_o เพิ่มสูงขึ้น [21] อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นเอนไซม์ และเวลาในการไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวัน พบว่า S_o มีค่าลดลง เพราะการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ที่มากเกินไป ทำให้เกิดเพปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโน ซึ่งมี hydrophobic binding sites น้อยกว่าเพปไทด์สายยาว [27] และจากการที่ Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ตัดปลายสายโปรตีนจึงทำให้เพปไทด์ที่ได้มีขนาดเล็กหรือเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งส่งผลให้มีค่า S_o ต่ำกว่า eb-SPHs

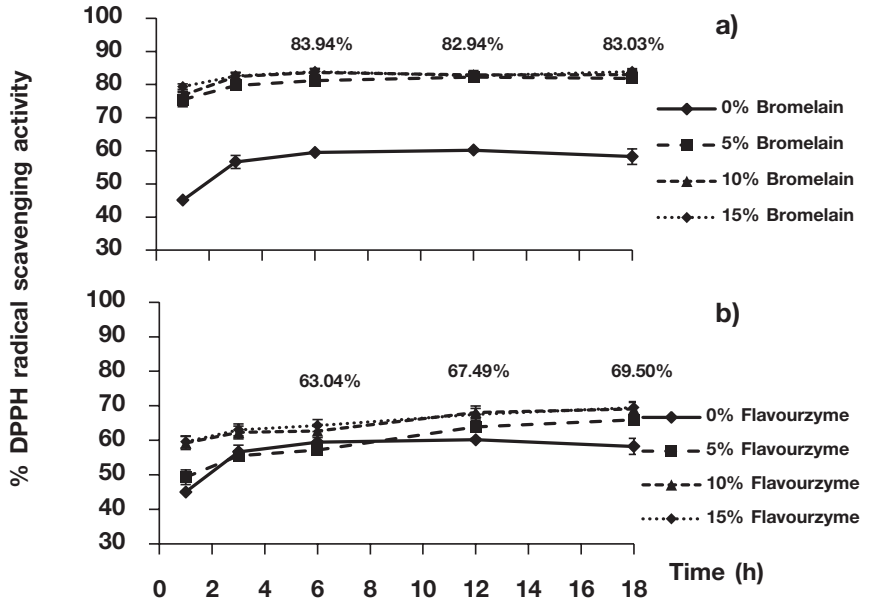


หมายเหตุ a, b, c, ...ตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

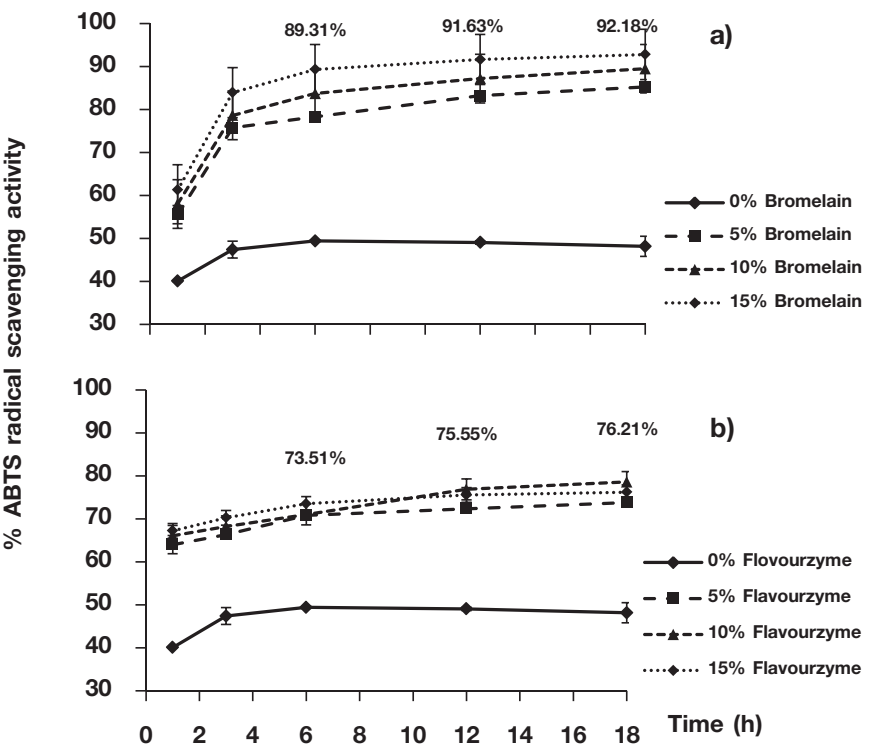
รูปที่ 3 ค่า Surface hydrophobicity (S_o) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (a) และ Flavourzyme® (b) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่างๆ

3.6 ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• และ ABTS•+ ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH• ของ eb-SPHs และ ef-SPHs ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่า eb-SPHs ที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ถึงร้อยละ 83.94 แต่ eb-SPHs และ ef-SPHs หลังจากการไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH คงที่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์ของ eb-SPHs ซึ่งมีงานศึกษาของ Jamdra และคณะ (2010) [5] พบว่าเมื่อระดับการไฮโดรไลซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วลิสงไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase เพิ่มสูงขึ้นถึงระดับหนึ่งประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วลิสงมีค่าคงที่ ส่วนประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของ ef-SPHs มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์ ซึ่งพบว่าที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วย Flavourzyme® ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ ef-SPHs มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH• สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ร้อยละ 69.50 จากผลวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีทดสอบกับอนุมูลอิสระ ABTS•+ ของ eb-SPHs และ ef-SPHs ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่า eb-SPHs และ ef-SPHs มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•+ ที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สูงถึงร้อยละ 92.18 และ 76.21 ตามลำดับ



รูปที่ 4 ประสิทธิภาพในการดักจับสารอนุมูลอิสระ DPPH• ของ โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (a) และ Flavourzyme® (b) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่างๆ



รูปที่ 5 ประสิทธิภาพในการดักจับสารอนุมูลอิสระ ABTS•+ ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (a) และ Flavourzyme® (b) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่างๆ

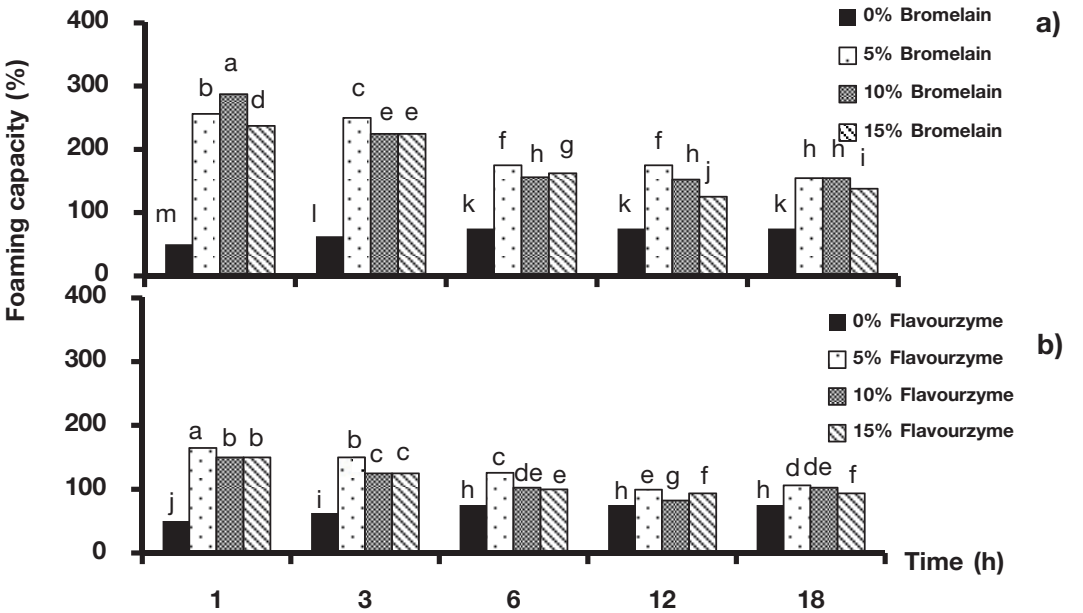
จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ eb-SPHs และ ef-SPHs พบว่า ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ eb-SPHs และ ef-SPHs เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ eb-SPHs นั้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูงกว่า ef-SPHs ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่พบใน eb-SPH และ ef-SPHs จากตารางที่ 4 ซึ่งพบว่า eb-SPHs มีปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิค ในปริมาณที่สูงกว่า ef-SPHs เนื่องจากโบรมิเลนมีความจำเพาะในการไฮโดรไลซ์โปรตีนที่ตำแหน่งกรด อะมิโนไลซีน อาร์จีนีน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน ซึ่งอาจทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นๆ ที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้ที่ปลายสาย โดยกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคเหล่านี้มีผลต่อการจับกันระหว่างสายเพปไทด์และอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะไทโรซีน ซึ่งมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดี [28] การใช้โบรมิเลนยังสามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนและเมทไธโอนีนปริมาณสูงกว่าการใช้ Flavourzyme® ซึ่งมีรายงานว่าซิสเตอีน และเมทไธโอนีนมีหมู่ซัลเฟอร์ (thiol) อยู่ในโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้โดยซัลเฟอร์ในโครงสร้างของซิสเตอีนและเมทไธโอนีนนั้นมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี้ (electronegativity) ต่ำทำให้กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ง่าย [29] นอกจากนี้ปริมาณกรดอะมิโนส่วนใหญ่ของ eb-SPHs อยู่ในรูปเพปไทด์ (ตารางที่ 2) เนื่องจากโบรมิเลนเป็นเอนไซม์เอนโดรโปรติเอส (ตัดจำเพาะภายในสายโปรตีน) ในขณะที่ ef-SPHs ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระมาก เนื่องจาก Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ทั้งภายในสายและปลายสายของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่อยู่ในรูปของเพปไทด์สายสั้นๆ มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่ากรดอะมิโนอิสระ ดังนั้น eb-SPHs จึงมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระที่สูงกว่า ef-SPHs โดยนอกเหนือจากกรดอะมิโนกลูตามิกและแอสปาร์ติก ยังพบกรดอะมิโน-ไกลซีน อะลานีน โพรลีน วาลีน ไลซีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และฟีนิลอะลานีนในรูปของเพปไทด์ ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ eb-SPHs

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ของ eb-SPHs และ ef-SPHs พบว่า ให้ผลประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในทางเดียวกัน โดยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ มีค่าสูงกว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เป็นเพราะอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นอนุมูลที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับเพปไทด์ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มากกว่านั้น $ABTS^{\bullet+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยาในระบบที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย เช่นเดียวกับ eb-SPHs และ ef-SPHs [30] ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันจึงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูงกว่า $DPPH^{\bullet}$

3.7 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนและ Flavourzyme®

จากผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ได้แก่ สมบัติการเกิดโฟม และสมบัติการเกิดอิมัลชันของ eb-SPHs และ ef-SPHs พบว่า การไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันด้วยโบรมิเลน และ Flavourzyme® สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของกากโปรตีนทานตะวันได้ โดย eb-SPHs และ ef-SPHs มีสมบัติการเกิดโฟมสูงกว่าสภาวะควบคุม (ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0) ถึง 10 เท่า เนื่องจากโปรตีนของกากทานตะวันมีขนาดใหญ่ ไม่สามารถฟอร์มตัวเพื่อเก็บกักอากาศไว้ภายในโครงสร้างโปรตีนได้ การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์สามารถลดขนาดของโปรตีนกากทานตะวัน และเกิดการคลายเกลียวของสายโปรตีนทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปจับกับโครงสร้างที่เป็นอากาศ และส่วนที่ชอบน้ำจับกับส่วนที่เป็นของเหลวเกิดเป็นฟิล์มห่อหุ้มรอบๆ อากาศไว้และเกิดเป็นโฟมได้ [31] อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 6 สมบัติในการเกิดโฟมของ eb-SPHs และ ef-SPHs ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าระดับการไฮโดรไลซ์ร่วมด้วยพบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์ที่เพิ่มขึ้นทำให้ระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้นและได้เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง ทำให้สมบัติในการเกิดโฟมลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Cai และคณะ [12] ซึ่งพบว่าโปรตีน pine nut ไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase ที่ระดับ

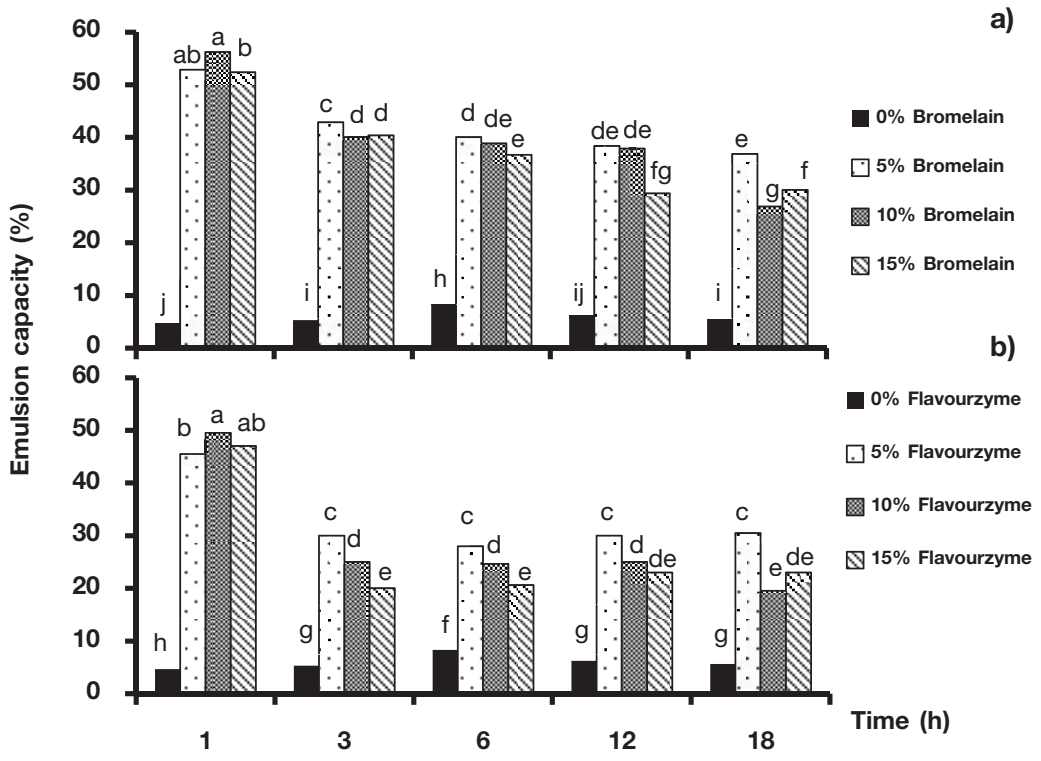
การไฮโดรไลซ์ต่ำ มีสมบัติการเกิดโฟมที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ระดับการไฮโดรไลซ์สูง ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ระดับการไฮโดรไลซ์ต่ำๆ จึงมีสมบัติการเกิดโฟมสูง โดยเฉพาะการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนความเข้มข้นร้อยละ 10 เวลา 1 ชั่วโมง มีสมบัติการเกิดโฟมสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 283.5 เนื่องจากสมบัติการเกิดโฟมต้องอาศัยพื้นที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนหรือเพปไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับค่า surface hydrophobicity ของเพปไทด์ และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติการเกิดโฟมของ eb-SPHs และ ef-SPHs พบว่า ef-SPHs มีค่า surface hydrophobicity น้อยกว่า eb-SPHs ส่งผลให้มีบริเวณโปรตีนส่วนที่ไม่ชอบน้ำมีน้อย จึงทำให้มีสมบัติในการเกิดโฟมได้น้อยเช่นกัน



หมายเหตุ a, b, c, ...ตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

รูปที่ 6 ประสิทธิภาพในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (a) และ Flavourzyme® (b) ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่างๆ

สมบัติการเกิดอิมัลชันของโปรตีนนั้น เกิดจากโปรตีนทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ช่วยในการล้อมรอบอิมัลชันที่เกิดขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน และ Flavourzyme® มีสมบัติการเกิดอิมัลชันสูงกว่าสภาวะควบคุม (ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 0) เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทำให้โปรตีนสามารถเผยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ซึ่งพิจารณาจากค่า surface hydrophobicity ทำให้เพิ่มแรงยึดกันระหว่างไขมันและโปรตีนมากขึ้น แต่เมื่อระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้นเพปไทด์มีขนาดสั้นลงซึ่งส่งผลต่อสมดุลของส่วนที่ชอบและไม่ชอบน้ำของเพปไทด์ ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทมีสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ลดลง [32] จากรูปที่ 7 พบว่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ eb-SPHs และ ef-SPHs ซึ่งมีค่ามากที่สุดเท่ากับร้อยละ 49.5 เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนความเข้มข้นร้อยละ 10 เวลา 1 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการไฮโดรไลซ์ ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง ส่งผลให้มีสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ลดลงสอดคล้องกับร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์ ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ และ ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซท



หมายเหตุ a, b, c, ...ตัวอักษรต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

รูปที่ 7 ประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากทานตะวันที่ไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลน (a) และ Flavourzyme® (b) ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่างๆ

4. สรุป

การไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันโดยโบรมิเลน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะภายในสายของโปรตีน สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนกากทานตะวันได้ โดยการไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันด้วยโบรมิเลนทำให้โปรตีนกากทานตะวันมีขนาดเล็กลง ค่า surface hydrophobicity สูงขึ้น ส่งผลให้ eb-SPHs มีสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นสารก่อโฟมและอิมัลชันสูงกว่าโปรตีนกากทานตะวันที่ไม่ได้ผ่านการไฮโดรไลซ์และสูงกว่าการไฮโดรไลซ์ด้วย Flavourzyme® ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะทั้งภายในและปลายสายของโปรตีน นอกจากนี้ eb-SPHs ยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ สูงกว่าโปรตีนกากทานตะวันที่ไม่ได้ผ่านการไฮโดรไลซ์และสูงกว่าการไฮโดรไลซ์ด้วย Flavourzyme® โดยเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์สูงขึ้นและเวลาในการไฮโดรไลซ์นานขึ้น ส่งผลให้ร้อยละระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้น ขนาดของโปรตีนเล็กลงมาก ทำให้ surface hydrophobicity มีค่าลดลง ส่งผลให้ eb-SPHs มีสมบัติเชิงหน้าที่ลดลง ซึ่งการไฮโดรไลซ์ด้วยโบรมิเลนที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 10 เวลา 1 ชั่วโมง สามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีสมบัติการเกิดโฟมและอิมัลชันได้ดีที่สุด แต่ eb-SPHs มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ได้สูงขึ้นเมื่อระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้น โดยการไฮโดรไลซ์โปรตีนกากทานตะวันด้วยโบรมิเลนที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาการไฮโดรไลซ์นาน 6 ชั่วโมง สามารถปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนกากทานตะวันได้ดีที่สุด

5. เอกสารอ้างอิง

1. Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Adsuleand, R.N. and Kadam, S.S., 1992, World Oilseed Chemistry Technology and Utilization, Van Nostrand Reinhold Co., New York.

2. Canibe, N., Martin, M., Robredo, L. and Knudsen, K., 1999, "Chemical Composition, Digestibility and Protein Quality of 12 Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultivars," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, pp. 1775-1782.

3. Yust, M.M., Pedroche, J., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. and Vioque, J., 2003, "Improvement of Protein Extraction from Sunflower Meal by Hydrolysis with Alcalase," *Grasas y Aceites*, 54, pp. 419-423.

4. Laohakunjit, N., Phetaveeporndet, P., Kerdchoechuen, O. and Ratanakhanokchai, K., 2011, "Flavoring Agent Produced from Mungbean Meal by Protease," *KMUTT Research and Development Journal*, 34 (2), pp. 129-145. (In Thai)

5. Jamdar, S.N., Rajalakshmia, V., Pednekara, M.D., Juanb, F., Yardib, A. and Sharmaa, V., 2010, "Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate," *Food Chemistry*, 121, pp. 178–184.

6. Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C.F., Karangwa, E., Abbas, S. and Kamdema, P.E., 2013, "Influence of Enzymatic Hydrolysis and Enzyme Type on the Nutritional and Antioxidant Properties of Pumpkin Meal Hydrolysates," *Food and Function*, 4, p. 811.

7. Cumby, N., Zhong, Y.,Naczk, M. and Shahidi, M., 2008, "Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates," *Food Chemistry*, 109, pp. 144-148.

8. Hong, F., Ming, L., Yi S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L., 2008, "The Antihypertensive Effect of Peptides: A Novel Alternative to Drugs Peptides," *Peptides*, 29, pp. 1062-1071.

9. Sarmadi, B.H. and Ismail, A., 2010, "Antioxidative Peptides from Food Proteins : A Review," *Peptides*, 31, pp. 1949-1956.

10. Zheng, L., Zhao, Y., Xiao, C., Sun-Waterhouse, D., Zhao, M. and Su, G., 2015, "Mechanism of the Discrepancy in the Enzymatic Hydrolysis Efficiency between Defatted Peanut Flour and Peanut Protein Isolate by Flavorzyme," *Food Chemistry*, 168, pp. 100-106.

11. Ghribi, A.M., Gafsi, I.M., Sila, A., Bleckerd, C., Danthined, S., Attiaa, H., Bougatefb, L. and Besbesa, S., 2015, "Effects of Enzymatic Hydrolysis on Conformational and Functional Properties of Chickpea Protein Isolate," *Food Chemistry*, 187, pp. 322-330.

12. Cai, L., Xiao, L., Liu, C. and Ying, T., 2013, "Functional Properties and Bioactivities of Pine Nut (Pinus gerardiana) Protein Isolates and Its Enzymatic Hydrolysates," *Food and Bioprocess Technology*, 6, pp. 2109-2117.

13. Calderon de la Barca, A.M., Ruiz-Salazar, R.A. and Jara-Marini, M.E., 2000, "Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Soy Protein to Improve Its Amino Acid Composition and Functional Properties," *Journal of Food Science*, 65, pp. 246-253.

14. Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.D. M., Alaiz, M., Giroän-calle, J., MillaäN, F. and Vioque, J., 2009, "Sunflower Protein Hydrolysates Reduce Cholesterol Micellar Solubility," *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 64, pp. 86-93.

15. Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez, V.R., Clement, A., Pedroche, J., Bautista, J. and Millán. F., 1999, "Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, pp. 1455-1460.

16. Sonklin, C., Laohakunjit, N. and Kerdchoechuen, O., 2011, "Physicochemical and Flavor Characteristics of Flavoring Agent from Mungbean Protein Hydrolyzed by Bromelain," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 8475-8483.

17. Laohakunjit, N, Selamassakul, O. and Kerdchoechuen, O., 2014, "Seafood-Like Flavour Obtained from the Enzymatic Hydrolysis of the Protein By-products of Seaweed (Gracilaria sp.)," *Food Chemistry*, 158, pp. 162-170.

18. AOAC, 2000, Official Methods of Analysis, 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

19. Chanput, W., Theerakulkait, C. and Nakai, S., 2009, "Antioxidative Properties of Partially Purffed Barley Hordein, Rice Branprotein Fractions and Their Hydrolysates," *Journal of Cereal Science*, 49, pp. 422–428.

20. Flavia, M.N. and Maria, A., 1998, "Production and Characterization of Enzymatic Hydrolysate from Soy Protein Isolate," *Food Science and Technology*, 31, pp. 624–631.

21. Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. and Qi, M., 1998, "Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Soy Protein Peptides Prepared by Papain Modification and Ultrafiltration," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, pp. 845-850.

22. Cao, X., Wen, H., Li, C. and Gu, Z., 2009, "Differences in Functional Properties and Biochemical Characteristics of Congenetic Rice Proteins," *Journal of Cereal Science*, 50, pp. 184-189.

23. Benjakul, S. and Morrissey, M.T., 1997, "Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 3423–3430.

24. Parrado, J., Millan, F., Hernandez-Pinzon, I., Bautista, J. and Machado, A., 1993, "Characterization of Enzymatic Sunflower Protein Hydrolyzates," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp. 1821-1825.

25. Jack, F.K. and Mona, I., 1966, "The Kinetics of the Papain-catalyzed Hydrolysis of Esters of Carbobenzoxyglycine Evidence for an Acyl-enzyme Intermediate," *Journal of Biochemical*, 5, pp. 783-791.

26. Cardamone, M. and Puri, N.K., 1992, "Spectrofluorimetric Assessment of the Surface Hydrophobicity of Proteins," *Biochem*, 282, pp. 589-593.

27. Kato, A., Komatsu, K., Fujimoto, K. and Kobayashi, K., 1985, "Relationship between Surface Functional Properties and Flexibility of Proteins Detected by the Protease Susceptibility," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, pp. 931-934.

28. Kunst, T., 2003, "Protein Modification in Optimize Functionality: Protein Hydrolysates," pp. 222-236, in J. Whitaker, A. Voragen and D. Wong (Eds.) Handbook of food enzymology, *Marcel Dekker*, New York.

29. Atmaca, G., 2004, "Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids," *Yonsei Medical*, 45 (5), pp. 776-88.

30. Wong, D.W., 2009, "Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, pp. 174-209.

31. Townsend, A. and Nakai, S., 1983, "Relationships between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins," *Journal of Food Science*, 48 (2), pp. 588-594.

32. Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L. and Xia, X., 2010, "Antioxidant Activity and Functional Properties of Porcine Plasma Protein Hydrolysate as Influenced by the Degree of Hydrolysis," *Food Chemistry*, 118 (2), pp. 403-410.