บทความวิจัย

ผลของปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยสลายและสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส

กชกร กันทากาศ และ ไพโรจน์ วิริยจารี*
สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เรวัตร พงษ์พิสุทธินันท์ และ สุภกิจ ไชยพุฒ
หน่วยวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 08 1960 6630 อีเมล: pairote.w@cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2023.07.006
รับเมื่อ 11 พฤษภาคม 2564 แก้ไขเมื่อ 5 กรกฎาคม 2564 ตอบรับเมื่อ 13 สิงหาคม 2564 เผยแพร่ออนไลน์ 6 กรกฎาคม 2566
© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองผิวดำ (*Glycine max* (L.) merrill) (สายพันธุ์สุโขทัย 1) จัดเป็นพืชที่อุดมไปด้วยโปรตีน และเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเชิงหน้าที่ที่กำลังเป็นที่นิยมในปัจจุบัน โดยงานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ผันแปรปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ 0.25–0.75) และระยะเวลาการย่อย (3–6 ชั่วโมง) วางแผนการทดลองแบบ 2^2 แฟคทอเรียลและ 2 จุดศูนย์กลาง (2^2 Factorial Experiment with 2 Center Points) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ FRAP และน้ำหนักของโมเลกุลเพปไทด์พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดมีน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์อยู่ในช่วง 10–20 กิโลดาลตัน และจากการวิเคราะห์พื้นที่การตอบสนอง (Response Surface) โดยการประมาณความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและปัจจัย พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อยมีความสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโน โดยจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเพิ่มระยะเวลาการย่อย โดยทวนสอบค่าที่ได้ และค่าจากการทำนายมีความคลาดเคลื่อนต่ำ โดยสภาวะที่เหมาะสม (Optimal Condition) ที่ได้จากการทำนาย คือ ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.70 ที่ระยะเวลาการย่อย 5.60 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อยู่ที่ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อยู่ที่ 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ขนาดเล็ก และสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ได้

คำสำคัญ: ถั่วเหลืองผิวดำ โปรตีนไฮโดรไลเสต เอนไซม์อัลคาเลส ระดับการย่อยสลาย

การอ้างอิงบทความ: กชกร กันทากาศ, ไพโรจน์ วิริยจารี, เรวัตร พงษ์พิสุทธินันท์ และ สุภกิจ ไชยพุฒ, "ผลของปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อยต่อระดับการย่อยสลายและสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 33, ฉบับที่ 3, หน้า 1–12, เลขที่บทความ 233-165055, ก.ค.–ก.ย. 2566.

วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 ก.ค.–ก.ย. 2566
The Journal of KMUTNB., Vol. 33, No. 3, Jul.–Sep. 2023

Research Article

Effects of Enzyme Concentrations and Digestion Time on Degree of Hydrolysis and Chemical Properties of Protein Hydrolysate from Black Soybean Using Alcalase Enzyme

Gochakorn Kantakas and Pairote Wiriyacharee*
Division of Product Development Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
Rewat Phongphisutthinant and Supakit Chaipoot
Science and Technology Research Institute of Chiang Mai University, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 08 1960 6630, E–mail: pairote.w@cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2023.07.006
Received 11 May 2021; Revised 5 July 2021; Accepted 13 August 2021; Published online: 6 July 2023
© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Black soybean (*Glycine max* (L.) merrill) (Sukhothai 1 species) are considered to be high in protein content and they are suitable to serve as hydrolysate protein raw materials, which can be developed to functional food ingredients. This research aimed to study the effect of alcalase enzyme treatments for the optimal condition of black soybean hydrolysate. The two operating parameters were designed using 2^2 Factorial experiment with 2 center points comprising enzyme concentration (0.25–0.75%) and digestion times (3–6 h). Their individual and combined effects on 6 responses were investigated, i.e. degree of hydrolysis, peptide, total protein, amino acid, total phenolic content, ABTS radical scavenging activity (ABTS) and ferric-reducing Antioxidant Power (FRAP). Peptide molecular weights of all samples were in the range of 10–20 kDa. The result of response surface analysis showed that enzyme concentration and digestion time were related to the degree of hydrolysis and amino acid content. Increasing the amount of enzyme concentration and digestion time resulted in an increased degree of hydrolysis and amino acid content. In addition, the observed values in the responses had low error rates when compared with the predicted values. The predicted optimal condition was 0.70% enzyme concentration with 5.60 h. digestion time. Black soybean protein hydrolysate yielded ABTS radical scavenging activity (ABTS) (0.31 mg/ml), Ferric-reducing Antioxidant Power (FRAP) (0.72 mg/ml), and small peptide molecular weight. They could be developed to food ingredients for a functional food product.

Keywords: Black Soybean, Protein Hydrolysate, Alcalase Enzyme, Degree of Hydrolysis

Please cite this article as: G. Kantakas, P. Wiriyacharee, R. Phongphisutthinant, and S Chaipoot, "Effects of enzyme concentrations and digestion time on degree of hydrolysis and chemical properties of protein hydrolysate from black soybean using alcalase enzyme," *The Journal of KMUTNB*, vol. 33, no. 3, pp. 1–12, ID. 233-165055, Jul.–Sep. 2023 (in Thai).

1. บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเชิงหน้าที่ (Functional Foods) มีการพัฒนาส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่เป็นนวัตกรรมใหม่ เช่น โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากแหล่งโปรตีนจากพืช เช่น ถั่วดำ [1] ถั่วเหลือง [2] และถั่วอะซูกิ [3] เป็นต้น อีกหนึ่งชนิดของโปรตีนจากพืชที่มีการศึกษาน้อยในการพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเสต คือ ถั่วเหลืองผิวดำ (*Glycine max* (L.) merrill) ซึ่งถั่วเหลืองผิวดำเป็นหนึ่งในสินค้าเกษตรที่สำคัญ มีลักษณะเปลือกสีดำ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ไอโซฟลาโวน [4] และซาโปนิน [4] และมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ [4] ซึ่งการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถทำได้ 3 วิธีหลัก คือ การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายด่าง และการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดควบคุมระดับการย่อยได้ยาก ทำให้ผลิตได้คุณภาพที่ไม่คงที่ และมีกลิ่นของสารละลายกรดตกค้างในผลิตภัณฑ์ [5] และการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายด่าง ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างกรดอะมิโนจาก L-form เป็น D-form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้ เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี และสูญเสียสารอาหารสำคัญ [5] ดังนั้นวิธีที่เป็นที่นิยม คือ การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง และใช้สภาวะในการย่อยที่ไม่รุนแรง โดยเอนไซม์การค้าที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme), อัลคาเลส (Alcalase) และนิวเทรส (Neutrase) เป็นต้น [5] ซึ่งปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการผลิต เช่น ระยะเวลาในการย่อย เป็นต้น โดยสัดส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรทและระยะเวลามีความสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) Chabanon และคณะ [6] ได้ศึกษาปัจจัยดังกล่าวกับระดับการย่อยสลายของโปรตีนอัลบูมิน และกลูบูมิน พบว่า มีความสัมพันธ์แบบล็อก-ลิเนียร์ (Log-linear) โดยอัตราการย่อยจะเร็วในช่วงแรก และค่อยๆ ลดลง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายของโปรตีนทั้งสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้น Guan และคณะ [7] ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ทริปซินในการปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนจากรำข้าวโอ๊ตพบว่า ระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยสลาย โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น และคงที่ ซึ่งสาเหตุที่ระดับการย่อยสลายไม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการลดลงของพันธะเพปไทด์จำเพาะสำหรับการย่อยเอนไซม์ การหยุดการทำงานของเอนไซม์ และการแข่งขันระหว่างโปรตีนสภาพธรรมชาติ (Native Protein) และเพปไทด์อย่างต่อเนื่อง Lomjabok และคณะ [8] ได้ศึกษาผลของปริมาณเปปซิน และระยะเวลาในการย่อยในการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่พบว่า ปัจจัยทั้งสองมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน และปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มมากขึ้นและลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินและระยะเวลาการย่อยถึงจุดหนึ่ง โดยเพิ่มขึ้นถึง 0.0423–0.0431 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมโปรตีน และลดลงเหลือ 0.0380–0.0391 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนั้น อาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น ขนาดของโมเลกุลเพปไทด์ และชนิดของกรดอะมิโนอิสระที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นต้น [9] Tong และคณะ [10] ได้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสพบว่า ได้ขนาดของโมเลกุลเพปไทด์อยู่ที่ 10 กิโลดาลตัน และ 5–10 กิโลดาลตัน และเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นพบว่า ปริมาณโมเลกุลเพปไทด์ที่ 10 กิโลดาลตันลดลง อีกทั้งโมเลกุลเพปไทด์ที่ 5–10 กิโลดาลตัน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ติง (Angiotensin I Converting Enzyme; AEC) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chodnakarin และคณะ [11] ได้ศึกษาผลของขนาดโมเลกุลที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหนังปลากรายที่ใช้เอนไซม์ในการย่อยที่แตกต่างกันพบว่า เอนไซม์ อัลคาเลส ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 35.09 และให้ขนาดโมเลกุลเพปไทด์อยู่ที่มากกว่า 30 กิโลดาลตัน ขนาดระหว่าง 10–30 กิโลดาลตัน และน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดโมเลกุลเพปไทด์ที่น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน มีความสามารถ

ในการยับยั้ง ACE ร้อยละ 50.35 และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ร้อยละ 59.06 และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ที่ 304.56 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟต อีกทั้งการศึกษาของ Voss และคณะ [12] ได้ศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองหลังจากผลิตน้ำเต้าหู้ (Okara) ด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส และเอนไซม์ *Cynara cardunculus* พบว่า เอนไซม์ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 31.99 และมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นมากถึงร้อยละ 37.50 ซึ่งอุดมไปด้วยกรด อะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น โพรลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสและระยะเวลาการย่อยในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำต่อสมบัติทางเคมี เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำที่มีประสิทธิภาพ และสมบัติที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 วัตถุดิบ และสารเคมี

ถั่วเหลืองผิวดำจากงานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตพืชไร่บนพื้นที่สูง มูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่ สายพันธุ์สุโขทัย 1 อายุ 1 เดือน บรรจุในถุงสุญญากาศ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4–8 องศาเซลเซียส และเอนไซม์อัลคาเลส (7864.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก (Catalog Number: 3267338) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4–8 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองผิวดำ

นำถั่วเหลืองผิวดำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองผิวดำ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต [13] วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.3 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำ

นำถั่วเหลืองผิวดำบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอเนกประสงค์ (Nanotech, NT-200C, ประทศจีน) โดยผสมถั่วเหลืองบดกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 (มวลต่อปริมาตร) เติมเอนไซม์อัลคาเลส โดยผันแปรปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ 0.25–0.75 ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) เขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผันแปรระยะเวลาการย่อย (3–6 ชั่วโมง) หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที เหวี่ยงแยกตะกอนที่ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย

วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) โดยวิธี Ortho-phthaldialdehyde (OPA) ดัดแปลงจาก Nielsen และคณะ [14] โดยเตรียมสารละลาย OPA Reagent ด้วย di-Sodium Tetraborate Decahydrate 7.620 กรัม และ Sodium Dodecyl Sulfate 0.200 กรัม ละลายในน้ำ Deionized (DI) 150 มิลลิลิตร จากนั้นผสม Dithiothreitol (DTT) ร้อยละ 99 ปริมาณ 0.176 กรัม ผสมสารละลาย OPA ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 200 มิลลิลิตร

การเตรียม OPA โดยชั่ง OPA 0.160 กรัม ทำละลายใน Ethanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และการเตรียมสารมาตรฐาน Serine โดยผสม Serine 0.050 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 4 กรัม ละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดสารละลายที่มี OPA Reagent 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร คำนวณดังสมการ

$$Serine - NH_2 = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2}\right) \times 0.9156 \times \left(\frac{0.2 \times 100 L/g}{S \times P}\right) \quad (1)$$

เมื่อ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง
A_2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (DI)
A_3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

S คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

P คือ ร้อยละโปรตีนตัวอย่าง

$$h = \frac{Serine - NH_2 - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

เมื่อ ค่า α = 0.970 และ β = 0.342 [26]

$$\text{ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \left(\frac{h}{h_{tot}}\right) \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ h คือ จำนวนพันธะเพปไทด์ที่ถูกย่อยต่อกรัม

h_{tot} คือ จำนวนของพันธะเพปไทด์ทั้งหมดต่อกรัม [14]

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงจาก Waterhouse [15] โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Sodium Carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้ Gallic Acid เป็นสารมาตรฐาน

2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจาก Lee และคณะ [16] ผสม Potassium Persulphate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ และ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ใน Sodium Acetate Buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12–16 ชั่วโมง เจือจางด้วย Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร วิเคราะห์โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.30 มิลลิลิตร กับสารละลาย ABTS 2.70 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 6 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

2.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงจาก Benzie และคณะ [17] โดยเตรียม 2, 4, 6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน Hydrochloric Acid ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และเตรียม Iron (III) Chloride ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเตรียม Acetate Buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมด วิเคราะห์โดยปิเปตตัวอย่าง 0.05 มิลลิลิตร กับสารละลาย FRAP 0.95 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้ Ferrous sulfate เป็นสารมาตรฐาน

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ดัดแปลงจาก Masuda และคณะ [18] โดยใช้ High-performance Liquid Chromatography (HPLC) คอลัมน์ Shim-pack Amino-Na (100 mm × 6.0 mm I.D., 5μm; P/N: 228-18837-91, Shimadzu, ญี่ปุ่น) ใช้ Mobile Phase คือ Sodium Citrate Buffer ที่ pH 3.23 และ 10.00 ตามลำดับ และ Sodium Hydroxide ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

2.9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจาก Gu และคณะ [19] ชุดทดสอบ Laemmli's โดยใช้ Stacking Gel ร้อยละ 4 และ Acrylamide Separating Gel ร้อยละ 12 ใช้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต 50 มิลลิกรัม ผสมใน 2x Laemli Sample Buffer 50 มิลลิลิตร โหลดตัวอย่างปริมาณ 0.02 มิลลิลิตร ในแผ่นเจลที่อยู่ในบัฟเฟอร์ของ Tris-HCl ร้อยละ 3.03 Glycerol ร้อยละ 14.41 และ

Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ร้อยละ 1.00 ทำการอิเล็กโตรโฟซิสที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 70 นาที ตรึงเจลด้วย Methanol ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ Acetic Acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วย Bio-Safe Coomassie G-250 (Gio-Rad, Hercules, สหรัฐอเมริกา)

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส (*X*) และระยะเวลาการย่อย (*Y*) วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment with 2 Center Points โดยตัวแปรทั้งสองมี 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (–) และระดับสูง (+) แสดงจุดกลาง (0) ดังตารางที่ 1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Optimal Condition) โดยใช้โปรแกรม Design-Expert 11.0.0

ตารางที่ 1 ปัจจัยหลักและระดับที่ต้องการศึกษา

ปัจจัยหลัก	ระดับ		
	ระดับต่ำ (–)	จุดกลาง (0)	ระดับสูง (+)
X (ร้อยละ)	0.25	0.50	0.75
Y (ชั่วโมง)	3.00	4.50	6.00

3. ผลการทดลอง

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองผิวดำ

การวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบเริ่มต้นที่จะใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสำคัญมาก โดยจะวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต แสดงดังตารางที่ 2

จากการวิจัยพบว่า ถั่วเหลืองผิวดำมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับถั่วเหลืองผิวดำของเมืองไถหนาน ประเทศไต้หวัน โดย Yu และคณะ [20] พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของถั่วดังกล่าวมีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า เส้นใยที่ละลายน้ำได้ และเส้นใยที่ละลายน้ำไม่ได้ อยู่ที่ร้อยละ 10.32, 6.72, 37.65, 4.71, 2.45 และ 37.71 (โดยน้ำหนักสด) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองผิวดำขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น สายพันธุ์ ขนาดของเมล็ดถั่ว สภาพอากาศ สภาพดิน ที่ใช้ปลูก และการดูแลรักษา เป็นต้น [3]

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองผิวดำ

องค์ประกอบทางเคมี	ถั่วเหลืองผิวดำ (ร้อยละน้ำหนักสด)
ความชื้น	9.55 ± 0.01
โปรตีน	37.92 ± 0.74
ไขมัน	9.87 ± 0.69
เถ้า	5.03 ± 0.03
เส้นใยอาหาร	13.80 ± 0.12
คาร์โบไฮเดรต	23.82 ± 0.82

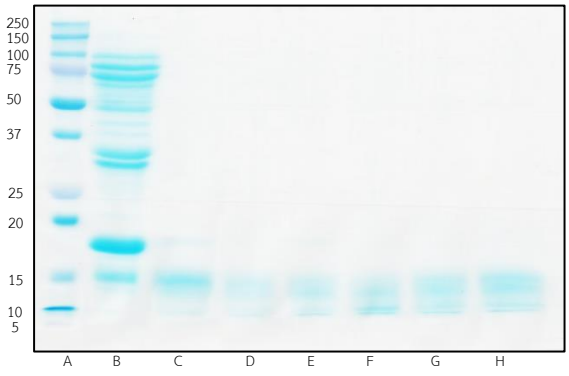
3.2 การศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส (X_1) ร่วมกับระยะเวลาการย่อย (X_2) ต่อระดับการย่อยสลาย (Y_1) ปริมาณโปรตีน (Y_2) ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Y_3) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Y_4) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (Y_5) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Y_6) สามารถจัดสิ่งทดลองได้ 6 สิ่งทดลองดังตารางที่ 3 และน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ ดังรูปที่ 1 เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ มาคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design Expert (Multiple Regression) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อยได้ผลดังตารางที่ 4 พบว่า จากการวิเคราะห์ทั้งหมด มีผลการวิเคราะห์ที่มีค่า R^2 ที่เข้าใกล้ 1 คือ ระดับการย่อยสลาย (0.8891) และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (0.9389) และมีค่า $p \leq 0.05$ ของระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อยมีผลที่น่าเชื่อถือ สามารถนำมาหาสภาวะที่การย่อยเหมาะสมที่สุดได้ (Optimal Condition) ในทางตรงกันข้ามปริมาณโปรตีน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และวิธี FRAP ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3 ค่าตอบสนองของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน

สิ่งทดลอง	X_1 (ร้อยละ)	X_2 (ชั่วโมง)	ค่าตอบสนอง					
			Y_1 (ร้อยละ)	Y_2 (ร้อยละ)	Y_3 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Y_4 (ไมโครกรัมต่อกรัม)	Y_5 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Y_6 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.25	3.00	36.39 ± 0.34	53.10 ± 0.05	3.75 ± 0.01	11.15 ± 0.27	0.29 ± 0.01	0.713 ± 0.01
2	0.75	3.00	45.26 ± 0.30	58.61 ± 0.03	3.92 ± 0.01	12.86 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.720 ± 0.01
3	0.25	6.00	42.03 ± 0.17	60.20 ± 0.13	7.44 ± 0.01	13.70 ± 0.68	0.28 ± 0.01	0.720 ± 0.02
4	0.75	6.00	59.25 ± 0.06	75.60 ± 0.10	7.60 ± 0.01	16.06 ± 0.89	0.31 ± 0.01	0.731 ± 0.01
5	0.50	4.50	48.24 ± 0.14	69.98 ± 0.11	6.73 ± 0.01	14.81 ± 0.96	0.32 ± 0.01	0.705 ± 0.01
6	0.50	4.50	49.82 ± 0.57	69.81 ± 0.18	5.92 ± 0.01	14.47 ± 0.08	0.30 ± 0.01	0.703 ± 0.01

($p > 0.05$) กับปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อย การที่ปริมาณโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินั้น เนื่องจากปริมาณโปรตีนในตัวอย่างไม่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโปรตีนในตัวอย่าง ซึ่งมีทั้งกรดอะมิโนอิสระ เพปไทด์สายสั้น และเพปไทด์สายยาว โดยเกิดจากการย่อยของเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformi* ที่ทำหน้าที่เป็นเอ็นโดเปปติเดส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์อย่างอิสระในโซ่โมเลกุลของโปรตีน [21] จึงมีทั้งเพปไทด์ไทด์สายสั้นและเพปไทด์สายยาวในแต่ละสิ่งทดลอง ส่วนปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตอื่น เช่น ถั่วเหลือง (ร้อยละ 59.07) [10] และถั่วดำ (ร้อยละ 63.60) [22] เป็นต้น อย่างไรก็ตามในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS โดย Shazly และคณะ [23] ได้รายงานว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเคซีน (Casein) ที่มีค่าสูงสุด พบได้ในสิ่งทดลองที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์น้อย และขึ้นอยู่กับชนิดของเพปไทด์ที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของงานวิจัยนี้กับน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ของสิ่งทดลองมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 10–20 กิโลดาลตัน ดังรูปที่ 1 จึงส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโปรตีนเพปไทด์ และความยาวของโครงสร้าง [24]



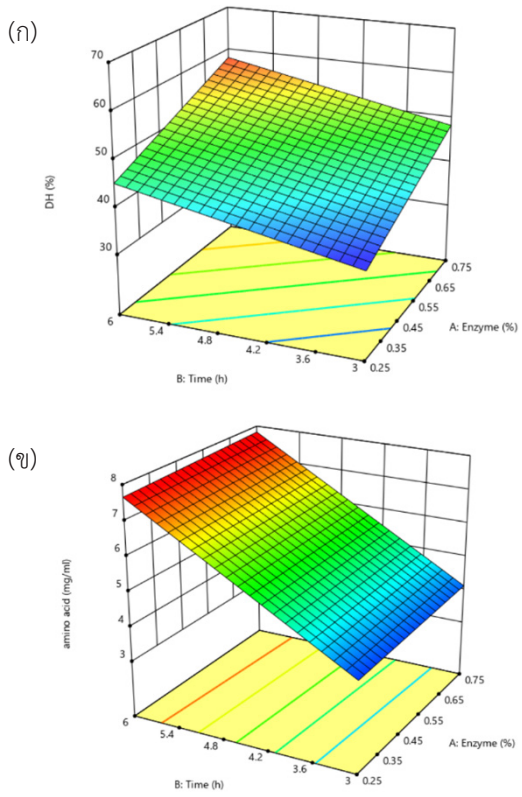
รูปที่ 1 SDS-PAGE แสดงน้ำหนักของเพปไทด์; Protein Molecular Weight Marker (A), ถั่วเหลืองผิวดำที่ไม่ผ่านการย่อย (B), สิ่งทดลองที่ 1 (C), สิ่งทดลองที่ 2 (D), สิ่งทดลองที่ 3 (E), สิ่งทดลองที่ 4 (F), สิ่งทดลองที่ 5 (G) และสิ่งทดลองที่ 6 (H)

น้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ในตัวอย่างถั่วเหลืองผิวดำที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เทียบกับถั่วเหลืองผิวดำที่ไม่ผ่านการย่อย (รูปที่ 1 (B)) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์อยู่ในช่วง 15–100 กิโลดาลตัน และเมื่อผ่านการย่อย พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์มีน้ำหนักลดลง (รูปที่ 1 (C–H)) เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลสมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการเปลี่ยนในโครงสร้างโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระ และเพปไทด์สายสั้น [25] ซึ่งเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอ็นโดเปปติเดสเชิงลึก

ตารางที่ 4 สมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อย ที่มีผลต่อสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำ

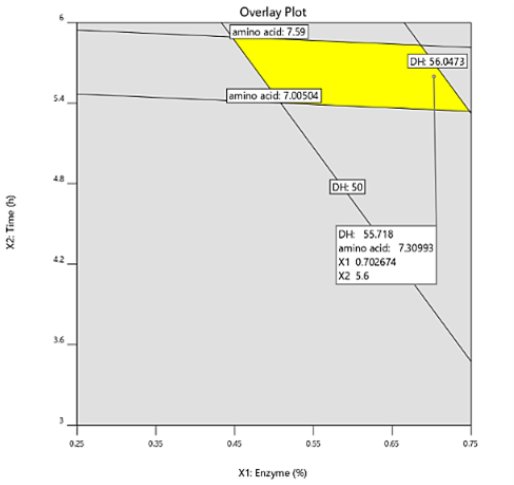
สมบัติทางเคมี	ความสัมพันธ์กับตัวแปร	*p*-value	R^2
ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)	= 19.07+26.09 (ปริมาณเอนไซม์) +3.27 (ระยะเวลา)	0.0369	0.8891
ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	= 0.21+0.32 (ปริมาณเอนไซม์) +1.23 (ระยะเวลา)	0.0151	0.9389

ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาจำนวนมากในการย่อยพันธะเพปไทด์ในโครงสร้างโปรตีน โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง แสดงให้เห็นถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังสามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} โดยปริมาณที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยมีการรายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลเพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP [26] Li และคณะ [26] ได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลูกไก่ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีน้ำหนักของเพปไทด์น้อย จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ได้ดีกว่าที่มีน้ำหนักเพปไทด์มากในส่วนปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสิ่งทดลองทั้งหมดพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัย Jaikaew [3] ที่ทำการทดลองย่อยถั่วอะซูกิ โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3, 5, และ 7 ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่า ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งตรงกับข้ามกับ Barreto และคณะ [27] ที่พบว่า เอนไซม์อัลคาเลส สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกากเมล็ดลินิน (*Linum usitatissimum*) ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือกในเมล็ด เนื่องจากเอนไซม์สามารถย่อยสลายหรือทำลายผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จึงส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวถูกปล่อยจากเซลล์มาได้มากขึ้น ซึ่งจะให้ผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ตัวอย่าง เมื่อนำสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อย (ตารางที่ 4) มาวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนอง (รูปที่ 2) ของระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยพื้นที่ผิวตอบสนองของระดับการย่อยสลาย แสดงดังรูปที่ 2 (ก) พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายก็จะเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear Effect) Noman และคณะ [28] ได้ศึกษาผลของการเพิ่มปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตในปลาพบว่า การใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ที่น้อย จะให้ระดับการย่อยสลายที่ต่ำ เมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น ระดับการย่อยสลายจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่สูงมาก ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจุดหนึ่งระดับการย่อยสลายลดลงเล็กน้อย อาจเกิดจากเอนไซม์เกิดการยับยั้งการแพร่กระจายของพื้นผิว จึงทำให้เกิดการอิ่มตัวของอัตราการเกิดปฏิกิริยา อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระยะเวลาการย่อยส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลาย และมีข้อสังเกตว่าหากมีการเพิ่มระยะเวลาการย่อย ระดับการย่อยสลายจะมีแนวโน้มคงที่ และลดลงเล็กน้อย Guan และคณะ [7] ได้ศึกษาระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากรำข้าวโอ๊ตพบว่า มีระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรก และคงที่ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 4 ชั่วโมง พบว่า ระดับการย่อยสลายลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์หยุดทำงาน (Enzyme Inactivation) และอาจเกิดการแข่งขันระหว่างโปรตีน และเพปไทด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย นอกจากนั้นระดับการย่อยสลายอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลง หากมีการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น การหมัก การให้ความร้อน เป็นต้น [29] ส่วนพื้นที่การตอบสนองของปริมาณกรดอะมิโน แสดงดังรูปที่ 2 (ข) พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสและ



รูปที่ 2 พื้นที่ผิวตอบสนองของระดับการย่อยสลาย (ก) และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (ข)

ระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง Chen และคณะ [30] พบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสและระยะเวลาในการย่อยทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจอยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์ โดยพบปริมาณของกรดอะมิโนฮีสทีดีน ไทโรซีน เมทไทโอนีน และไลซีนเพิ่มขึ้น 4.2, 3.6, 3.2 และ 3.6 เท่า ตามลำดับ Tarky และคณะ [31] รายงานว่ากลไกการย่อยสลายของเอนไซม์อัลคาเลส เกิดจากเอนไซม์อัลคาเลสแข่งขันกันเข้าจับบริเวณผิวของสารตั้งต้น ทำให้พันธะเพปไทด์ของโปรตีนเกิดการแตกตัว และปล่อยกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์ออกมาในสารละลาย ดังนั้น เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสมากขึ้น ทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายมากขึ้น ผลผลิตของกรดอะมิโนจึงเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อนำปัจจัยของระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโน



รูปที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสต จากถั่วเหลืองผิวดำ

ทั้งหมด มาหาสภาวะที่เหมาะสมจากการทำนายในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำพบว่า ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 0.70 ที่ระยะเวลาในการย่อยที่ 5.60 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3 โดยสามารถทำนายระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 55.68 ปริมาณโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 74.63 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดอยู่ที่ 7.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ที่ 15.81 ไมโครกรัมต่อกรัม ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อยู่ที่ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อยู่ที่ 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Wang และคณะ [32] ได้ศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วดำโดยใช้เอนไซม์พบว่า เอนไซม์ที่เหมาะสม คือ เอนไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1.61 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ FRAP ที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง (สายพันธุ์เชียงใหม่ 60) ถึง 0.05 (6.20 เท่า) และ 0.03 (24.00 เท่า) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (จากการทดลองเพิ่มเติมของผู้วิจัย) ที่ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสและระยะเวลาการย่อยเท่ากัน เมื่อนำมาทวนสอบความ

แม่นยำของสมการ พบว่ามีความคลาดเคลื่อนของระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ 3.52) และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (ร้อยละ 1.86)

4. สรุป

การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และระยะเวลาการย่อยในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก ถั่วเหลืองผิวดำต่อระดับการย่อยสลาย และสมบัติทางเคมีพบว่า ระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโนมีความแม่นยำ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Voss และคณะ [12] ที่พบว่า ระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาการย่อย ในการนำมาวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส และการเพิ่มระยะเวลาการย่อย ทำให้ระดับการย่อยสลาย และปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มสูงขึ้น โดยมีสภาวะที่เหมาะสมจากการทำนาย คือ ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.70 ที่ระยะเวลาการย่อย 5.60 ชั่วโมง โดยจะได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองผิวดำที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อยู่ที่ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อยู่ที่ 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง อุดมไปด้วยโมเลกุลเพปไทด์ขนาดเล็กที่อยู่ในช่วง 10–20 กิโลดาลตัน และสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบอาหารของผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ได้หลากหลายชนิด

เอกสารอ้างอิง

[1] L. Gu, N. Peng, C. Chang, D. J. Mcclements, Y. Su, and Y. Yang, “Fabrication of surface-active antioxidant food biopolymers: conjugation of catechin polymers to egg white proteins,” *Food* biophysics, vol. 12, no. 1, pp. 198–210, 2017.

[2] X. Tong, Z. Lian, L. Miao, B. Qi, S. Zhang, Y. Li, H. Wang, and L. Jiang, “An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value,” *LWT-Food Science and Technology*, vol. 134, pp.1–9, 2020.

[3] T. Jaikaew, “Antioxidation and functional properties of adzuki bean Vigna angularis protein hydrolysate,” M.S. thesis, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2013 (in Thai).

[4] Y. H. Kim, H. T. Yun, and K. Y. Park, “Biological effects of black colored soybean,” *Korean Journal Plant Research*, vol. 7, no. 3, pp. 195–199, 2004.

[5] H. G. Kristinsson and B. A. Rasco, “Fish protein hydrolysate: Production, biochemical, and functional properties,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 40, no. 1, pp. 43–81, 2000.

[6] G. Chabanon, I. Chevalot, X. Framboisier, S. Chenu, and I. Marc, “Hydrolysis of rapeseed protein isolated: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates,” *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 10, pp. 1419–1428, 2007.

[7] X. Guan, H. Yao, Z. Chen, L. Shan, and M. Zhang, “Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin,” *Food Chemistry*, vol. 101, no. 1, pp. 163–170, 2007.

[8] M. lomjabok, N. krasaechol, and S. saiut, “Effect of pepsin and hydrolysis time on antioxidative activity of collagen hydrolysate from chicken feet through response surface methodology,” *The Journal of KMUTNB*, vol. 31, no. 2, pp. 367–377, 2021 (in Thai).

[9] J. Y. Hwang, Y. S. Shyu, Y. T. Wang, and C. H. Hsu, “Antioxidative properties of protein

hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esterase," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 43, no. 2, pp. 285–290, 2010.

[10] X. Tong, Z. Lian, L. Miao, B. Qi, S. Zhang, Y. Li, H. Wang, and L. Jiang, "An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 134, pp. 1–9, 2020.

[11] A. Chodnakarin, K. Taruean, P. Phrigbooncha, and T. Rimlumduan, "Effect of collagen hydrolysates from clown featherback (*Chitala ornata*) skin on angiotensin I - converting enzyme inhibitory and antioxidant activities," *Burapha Science Journal*, vol. 23, no. 1, pp. 347–363, 2018 (in Thai).

[12] G. B. Voss, H. Osorio, L. M. P. Valente, and M. E. Pintado, "Impact of thermal treatment and hydrolysis by Alcalase and *Cynara cardunculus* enzymes on the functional and nutritional value of Okara," *Process Biochemistry*, vol. 83, no. 4, pp. 137–147, 2019.

[13] AOAC, "Official method of analysis of Association of Official Analysis Chemists," The Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. Gaithersburg, MD, USA, 2005.

[14] P. M. Nielsen, D. Petersen, and C. Dambman, "Improved method for determining food protein degree of hydrolysis," *Journal of Food Science*, vol. 66, no. 5, pp. 642–646, 2001.

[15] A. L Waterhouse, "Handbook of Analytical Chemistry," in *Hoboken*, John Wiley and Sons, 2008, pp. 463–464.

[16] J. H. Lee, B. Kim, C. E. Hwang, M. A. Haque, S. C. Kim, S. Lee, S. S. Kang, K. M. Cho, and D. H. Lee, "Changes in conjugated linoleic acid and isoflavone contents from fermented soymilks using Lactobacillus plantarum P1201 and screening for their digestive enzyme inhibition and antioxidant properties," *Journal of Function Foods*, vol. 43, pp. 17–28, 2018.

[17] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, 1996.

[18] J. Masuda and A. Yamamoto, "Principles and applications of the prominence amino acid analysis system," *Shimadzu HPLC Application Report*, no. 26, 2015.

[19] L. Gu, N. Peng, C. Chang, D. J. Mcclements, Y. Su, and Y. Yang, "Fabrication of surface-active antioxidant food biopolymers: Conjugation of catechin polymers to egg white proteins," *Food Biophysics*, vol. 12, no. 1, pp. 198–210, 2017.

[20] C. A. Yu, and C. Y. Yang, "Bio-ionic liquid pretreatment and ultrasound-promoted enzymatic hydrolysis of black soybean okara," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 127, no. 6, pp. 767–773, 2019.

[21] A. B. Shazly, Z. He, M. A. E. Aziz, M. Zeng, S. Zhang, F. Qin, and J. Chen, "Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates," *Food Chemistry*, vol. 232, pp. 753–762, 2017.

[22] J. A. D. Evangelho, J. D. J. Berrios, V. Z. Pinto, M. D. Antunes, N. L. Vanier, and E. D. R. Zavareze, "Antioxidant activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates," *Food Science and Technology*, vol. 36, no. 1, pp. 23–27, 2016.

[23] A. B. Shazly, Z. He, M. A. E. Aziz, M. Zeng, S. Zhang, F. Qin, and J. Chen, "Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates," *Food Chemistry*, vol. 232, pp. 753–762, 2017.

[24] H. Agrawal, R. Joshi, and M. Gupta, "Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate," *Food Research International*, vol. 120, pp. 697–707, 2019.

[25] Y. Y. Wang, C. Y. Wang, S. T. Wang, Y. Q. Li, and H. Z. Mo, "Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa Andr.*) seed protein hydrolysates obtained with different proteases," *Food Chemistry*, vol. 345, pp. 1–12, 2021.

[26] Y. Li, B. Jiang, T. Zhang, W. Mu, and J. Liu, "Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 2, pp. 444–450, 2008.

[27] D. W. Barreto and M. A. Z. Coelho, "Enzyme-enhanced extraction of phenolic compounds and proteins from flaxseed meal," *Biotechnology*, vol. 2013, pp. 1–6, 2012.

[28] A. Noman, Y. Xu, W. Q. Bukhaiti, S. M. Abed, A. H. Ali, A. H. Ramadhan, and W. Xia, "Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme," *Process Biochemistry*, vol. 67, pp. 19–28, 2018.

[29] A. Sarker, S. Chakraborty, and M. Roy, "Dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates inhibit the growth of oxidizing substances in plain yogurt," *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 2, pp. 1–6, 2020.

[30] H. M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, and K. Nokihara, "Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 9, pp. 2619–2623, 1996.

[31] W. Tarky, O. P. Agawara, and G. M. Pigott, "Protein hydrolysate from waste," *Journal of Food Science*, vol. 38, pp. 917–918, 1973.

[32] M. Wang, Z. Zheng, C. Liu, H. Sun, and Y. Liu. "Investigating on the calcium binding characteristics of black bean protein hydrolysate," *Food and Function*, vol. 10, pp. 1–38, 2020.