



## การดัดแปรสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสและการประยุกต์ใช้ Protein Modification Using Proteases and its Applications

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย<sup>1,2\*</sup> และ ปุรฉัตร ศรีทองแท้<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในการเร่งการตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีน ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นโอลิโกเพปไทด์ เพปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งจะมีผลให้โปรตีนที่ได้มีสมบัติเปลี่ยนแปลงไป ถือเป็น การดัดแปรสมบัติของโปรตีนวิธีหนึ่ง การควบคุมระดับการย่อยจะส่งผลต่อสมบัติของโปรตีนที่ได้ การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ขนาดโมเลกุล ความเสถียร ความยืดหยุ่น และสมบัติระหว่างพื้นผิว ซึ่งมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านสมบัติการละลาย สมบัติในการอุ้มน้ำ สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนที่ได้ ส่วนการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงผลิตภัณฑ์ที่ได้คือเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ นอกจากคุณค่าทางอาหารแล้วเพปไทด์หลายชนิดที่ไ้ยังมีสมบัติในการควบคุมการทำงานของระบบภายในร่างกายมนุษย์ให้เป็นปกติ การประยุกต์ใช้โปรตีนที่ผ่านการย่อยที่ระดับการย่อยต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารจะแตกต่างกันขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

<sup>2</sup>กลุ่มวิจัยการทำแห้งอาหารและวัสดุชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

\*Corresponding Author, E-mail: Kiattisak.d@chula.ac.th

## ABSTRACT

Proteolytic enzymes catalyse hydrolysis of peptide bond in proteins resulting in oligopeptides, peptides and amino acids. The functional properties of modified protein are different from those of native proteins. The properties of modified protein can be monitored through degree of hydrolysis (DH). Limited proteolysis, partial hydrolysis at low DH, causes a change in conformation, molecular weight distribution, stability, flexibility and interfacial properties of modified protein. These changes affect solubility, water holding capacity, emulsifying properties and foaming properties. Extensive proteolysis occurs at high DH. The obtained product contains a large amount of peptides and free amino acids compared to limited proteolysis. Some of these peptides not only improve nutritional value but also possess regulatory functions in humans and health benefits. Thus, applications of modified protein with different degree of hydrolysis in food product is dependent on its functional properties and the objective of utilization.

**คำสำคัญ:** โปรตีนไฮโดรไลเสต, การดัดแปรสมบัติของโปรตีน, ระดับการย่อย, สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

**keywords:** protein hydrolysate, protein modification, degree of hydrolysis, protein functionality

### 1. บทนำ

โปรตีนเป็นสารประกอบชีวโมเลกุลที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนที่อยู่ติดกัน กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนนั้นมีความหลากหลายมากกว่า 20 ชนิด โดยโปรตีนจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อสมบัติของโปรตีนในด้านต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน (Damodaran, 1996)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งโปรตีน และให้สมบัติหลักในด้านโครงสร้างและเนื้อสัมผัสของอาหาร รวมถึงช่วยในการปรับปรุงสมบัติของอาหาร เนื่องจากโปรตีนมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญหลายประการ เช่น ด้านการละลาย ด้านการอุ้มน้ำ การเกิดเจล การเกิดอิมัลชัน

และการเกิดโฟม เป็นต้น (Damodaran, 1996) โปรตีนทำหน้าที่ในอาหารแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของโปรตีน ชนิดของอาหาร รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการผลิต ดังนั้นการเลือกใช้โปรตีนชนิดใดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจะต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย

โปรตีนจากแหล่งธรรมชาติส่วนใหญ่มักมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสม ต้องผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผ่านการดัดแปรก่อน (Moure et al., 2006) ซึ่งการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจะช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์

การดัดแปรโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การดัดแปรโดยใช้วิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางเอนไซม์ โดยวิธีการที่นำเสนอในนี้จะเป็นการดัดแปรด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากมีสภาวะที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูง และสามารถควบคุมระดับการย่อยได้

(Kristinsson and Rasco, 2000) ดังนั้นในบทความนี้จะขอกล่าวถึงการตัดแปรรูปโปรตีนด้วยวิธีการใช้เอนไซม์โปรติเอสต่อสมบัติและการประยุกต์ใช้โปรตีนที่ได้ภายหลังจากการตัดแปรรูป

## 2. การตัดแปรรูปสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส

### 2.1 การทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเร่งการตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีนด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) หรือที่เรียกว่าการแยกสลายด้วยน้ำ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ถูกตัดเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดสั้นลง และเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ผลิตภัณฑ์จากการแยกสลายโปรตีนนิยมเรียกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต การแยกสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และมีสภาพในการย่อยที่ไม่รุนแรง การใช้เอนไซม์ยังมีระดับการย่อยของโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง รวมถึงช่วยลดข้อจำกัดจากการใช้กรดและด่างในการแยกสลายโปรตีน โดยการแยกสลายโปรตีนด้วยกรดมีผลให้ทรูปโตเฟนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นถูกทำลาย ในขณะที่การแยกสลายโปรตีนด้วยด่างหากย่อยในสภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (racemization) ของกรดอะมิโน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน จากรูปแบบแอล (L-form) ไปเป็นรูปแบบดี (D-form) ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังเกิดการสูญเสียซิสเตอีน ซีรีน และทรีโอนีนจากปฏิกิริยาบีต้า-อีลิมีเนชัน ( $\beta$ -elimination) และยังก่อให้เกิดสารพิษบางชนิด เช่น ไลซิโนอะลานีน (lysinoalanine) ในอาหารอีกด้วย (Kristinsson and Rosco, 2000)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ

เพปไทด์ของโปรตีน เอนไซม์โปรติเอสสามารถจำแนกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ขึ้นกับลักษณะการจำแนก ดังนี้

1. จำแนกตามแหล่งกำเนิด เช่น จากจุลินทรีย์ จากสัตว์ และจากพืช

2. จำแนกตามตำแหน่งของการตัดพันธะเพปไทด์ เช่น ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีน (endo-peptidase) และตัดพันธะเพปไทด์จากปลายสายโปรตีน (exo-peptidase)

3. จำแนกตามความแตกต่างของบริเวณเร่ง เช่น (1) โปรติเอสประเภทที่มีซีรีน (serine protease) (2) โปรติเอสประเภทที่มีหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl protease) (3) โปรติเอสประเภทที่มีโลหะช่วยเร่งปฏิกิริยา (metal-containing protease) และ (4) โปรติเอสประเภททำงานได้ในสภาพกรด (acid protease) (Nielsen, 2010)

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าชนิดต่าง ๆ ในการแยกสลายโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสลายโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้า เช่น (1) Alcalase<sup>®</sup> เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformis* (2) Flavourzyme<sup>®</sup> เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* (3) Neutrase<sup>®</sup> เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus amyloliquefaciens* (Nielsen, 2010)

การตัดพันธะเพปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สามประการ ดังนี้

1. การเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน และคาร์บอกซิลที่สามารถแตกตัวได้ ซึ่งจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความชอบน้ำ และปริมาณประจุของโปรตีน

2. การลดความยาวของสายพอลิเพปไทด์ ซึ่งมีผลในการลดความเป็นแอนติเจนของโปรตีน (Clemente et al., 1999a)

3. โครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้เกิดการเผยหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีน ให้ออกมาอยู่บริเวณผิวหน้าของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน (Sarmadi and Ismail, 2010)

## 2.2 ระดับการแยกสลายด้วยน้ำของโปรตีน

ระดับการแยกสลายด้วยน้ำ (degree of hydrolysis, DH) ของโปรตีน ในที่นี้จะเรียกว่า "ระดับการย่อย" เป็นดัชนีที่ใช้อธิบายปฏิกิริยาการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ โดยทั่วไปสามารถคำนวณได้ตั้งสมการที่ 1 (Kristinsson and Rasco, 2000)

$$\%DH = \left( \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ %DH หมายถึงร้อยละของระดับการย่อย

$L_0$  หมายถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น

$L_t$  หมายถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ระยะเวลาการย่อยใด ๆ

$L_{max}$  หมายถึงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่เรียกว่าการทำ "acid hydrolysis"

การติดตามค่าระดับการย่อยอาศัยหลักการที่แตกต่างกัน เช่น อาศัยหลักการเกิดขึ้นของหมู่อะมิโนอิสระ อาศัยหลักการของความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น และอาศัยการติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านอื่น ๆ ของโปรตีนเมื่อสายพอลิเพปไทด์ถูกตัดให้สั้นลง (Nielsen, 1997) วิธีการในการวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยนั้นจะแตกต่างกันขึ้นกับหลักการที่ใช้ในการติดตาม สรุปได้ดังตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามวิธีการที่เป็นที่นิยมใช้ใน

งานวิจัยส่วนใหญ่ ได้แก่ pH-stat, formol titration, trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) และ o-phthalaldehyde (OPA) (Nielsen, 1997; Rutherford, 2010)

การตัดแปรโปรตีนด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถแบ่งตามระดับการย่อยออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ

2.2.1 การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำ (limited hydrolysis)

วิธีการนี้เป็นการตัดพันธะเพปไทด์เพียงบางส่วนของสายพอลิเพปไทด์ โดยส่วนใหญ่จะมีระดับการย่อยอยู่ในช่วงร้อยละ 1-20 ซึ่งการย่อยในลักษณะนี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน และสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ได้หลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ขนาดโมเลกุล ความเสถียร ความยืดหยุ่น และการกระจายส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วบริเวณผิวหน้าของโปรตีน กระบวนการตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีการนี้สามารถทำได้โดยนำโปรตีนที่ต้องการตัดแปรผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ โดยเอนไซม์ที่นำมาใช้อาจเป็นได้ทั้ง endo-protease และ exo-protease และหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ระยะเวลาที่เหมาะสม (Panyam and Kilara, 1996)

2.2.2 การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูง (extensive hydrolysis)

เป็นการตัดพันธะเพปไทด์ของสายพอลิเพปไทด์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้ระดับการย่อยสูงขึ้น ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ กระบวนการตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีการนี้ทำได้โดยนำโปรตีนที่ต้องการตัดแปรมาผ่านกระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นสูงหรือย่อยที่ระยะเวลาานานเพื่อให้ได้ระดับการย่อยสูง การแยกสลายโปรตีนที่ระดับสูงนั้นโดยส่วนใหญ่จะมี

ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 20 (Amiza, Kong and Faazaz, 2012; Clemente, 2000; Vioque et al. 1999; You et al., 2009)

การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำและระดับการย่อยสูง จะมีผลในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนในพืชชนิดต่าง ๆ ที่ระดับการย่อยต่างกัน รายละเอียดของสมบัติของโปรตีนที่ถูกตัดแปรรูปอธิบายเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.3

### ตารางที่ 1 หลักการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน

วิธีการวิเคราะห์	หลักการในการวิเคราะห์
<b>อาศัยหลักการเกิดขึ้นของหมู่อะมิโนอิสระ</b>	
O-phthaldialdehyde (OPA)	O-phthaldialdehyde ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน เกิดสารประกอบที่มีสีที่ตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 340 nm (Nielsen, Pedersen and Dambmann, 2001)
Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)	2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน เกิดสารประกอบที่มีสีที่ตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 340 nm (Adler-Nissen, 1979)
Ninhydrin	Ninhydrin ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีที่ตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 570 nm (Adler-Nissen, 1986)
Formol titration	ไทเทรตหมู่อะมิโนด้วยฟอร์มาดีไฮด์ (Adler-Nissen, 1986)
<b>อาศัยหลักการของความเป็นกรดที่เกิดขึ้น</b>	
pH-stat	ติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับ pH โดยรักษาระดับ pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการย่อยด้วยการเติมต่าง โดยปริมาณต่างที่ใช้จะสัมพันธ์กับค่า DH (Adler-Nissen, 1986)
<b>อาศัยหลักการอื่น ๆ</b>	
Osmometry	วิเคราะห์จุดเยือกแข็งที่ลดลง ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่า DH (Adler-Nissen, 1986)
<sup>o</sup> Brix	ค่า refractive index จะสัมพันธ์กับปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการแยกสลายโปรตีน (Adler-Nissen, 1986)
Soluble nitrogen	วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ ซึ่งเพิ่มขึ้นในระหว่างการแยกสลายโปรตีน (Margot, Flaschel and Renken, 1994)
Trichloroacetic acid (TCA) index	วิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์ที่สามารถละลายได้ใน trichloroacetic acid (Adler-Nissen, 1986)
การวัดการกระจายขนาดของสายเพปไทด์	วิเคราะห์ขนาดโมเลกุล โดยอาศัยหลักของ permeation chromatography ซึ่งอาจใช้ HPLC หรือ column chromatography (Adler-Nissen, 1986)
การวัดความหนืด	ติดตามการเปลี่ยนแปลงความหนืดในระหว่างการแยกสลายโปรตีน (Adler-Nissen, 1986)

## 2.3 การตัดแปรรูปสมบัติของโปรตีนด้วยการย่อยที่ระดับต่ำ และการประยุกต์ใช้

### 2.3.1 ผลของการย่อยที่ระดับต่ำต่อสมบัติของโปรตีนที่ได้

• สมบัติด้านการละลายเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีน เนื่องจากความสามารถในการละลายจะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่น ๆ เช่น การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่ระดับการย่อยต่ำจะสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยมากขึ้น (Nielsen, 1997)

- สมบัติในการอุ้มน้ำของโปรตีน คือ ความสามารถของโปรตีนในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ โมเลกุลของน้ำ และยึดเหนี่ยวโมเลกุลน้ำไว้ในโครงสร้าง การแยกสลายโปรตีนจะทำให้จำนวนหมู่ที่มีขั้วในระบบ เช่น หมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอมีโนมีปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้โปรตีนที่ผ่านการย่อยที่ระดับการย่อยต่ำที่ได้มีความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดีขึ้น จึงมีสมบัติด้านการอุ้มน้ำสูงขึ้นกว่าโปรตีนก่อนการย่อย (Kristinsson and Rasco, 2000)

- โปรตีนบางชนิดสามารถทำหน้าที่เป็น อิมัลซิไฟเออร์ของระบบ โดยมีการจัดเรียงส่วนที่ไม่มีขั้ว เข้าหาวัฏภาค น้ำมัน และหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาวัฏภาค น้ำ ทำให้เกิดเป็นสภาพอิมัลชันขึ้น สมบัติในการเป็น อิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะสัมพันธ์กับสมบัติระหว่าง พื้นผิว (interfacial properties) หรือความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างส่วนที่ชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำ ในระบบอาหาร (McClements, 1999) การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำจะส่งผลให้สมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนที่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ความมีขั้ว และความชอบน้ำมากขึ้น น้ำหนักโมเลกุลน้อยลง และโครงสร้างของโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลต่อสมบัติในการเป็น อิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนที่ผ่านการย่อยที่ระดับต่ำ (Zayas, 1997)

- การเกิดโฟมคล้ายกับการเกิดอิมัลชัน คือ เมื่อโปรตีนที่ละลายอยู่ในของเหลวเคลื่อนที่มาบริเวณที่ ผิวยอต่อระหว่างอากาศและน้ำ (หรือของเหลวที่มีขั้ว) โปรตีนคลายตัวเกิดเป็นฟิล์มบาง จัดเรียงตัวในลักษณะ เป็นสายยาว (chain) ห่วง (loop) และหาง (tail) โดย หันส่วนที่ไม่มีขั้วสู่อากาศ และหันส่วนที่มีขั้วสู่น้ำ ส่งผลให้โปรตีนสามารถกักเก็บฟองอากาศไว้ภายใน โครงสร้าง และฟองอากาศกระจายตัวอยู่ภายในส่วน ของเหลวได้ ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโฟมและ

ความคงตัวของโฟม ได้แก่ ค่า pH ปริมาณไขมัน ความเข้มข้นของโปรตีน ประจุ และโครงสร้างของโปรตีน (Damodaran, 1996; Kristinsson and Rasco, 2000) ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนที่ได้จะ ขึ้นอยู่กับสมบัติระหว่างพื้นผิวของโปรตีนภายหลังการ ย่อย ว่ามีความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับ วัฏภาคทั้งสองได้มากน้อยอย่างไร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงสมบัติเชิง หน้าที่ของโปรตีนที่ผ่านการแยกสลายโปรตีนที่ระดับ การย่อยต่ำ ในที่นี้จะกล่าวถึงโปรตีนจากธัญพืช โปรตีน จากน้ำมัน และโปรตีนจากปลา

- การตัดแปรโปรตีนจากธัญพืชด้วยวิธีทาง เอนไซม์ จะช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ของโปรตีนจากธัญพืช เช่น สมบัติด้านการละลาย สมบัติด้านการอุ้มน้ำสมบัติด้านการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติด้านการเกิดโฟม ให้มีสมบัติที่ดีขึ้นได้ Guan et al. (2007) ศึกษาการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของ โปรตีนไฮโดรไลสเสตจากรำข้าวโอ๊ต ที่เตรียมจากโปรตีน เข้มข้นจากรำข้าวโอ๊ตด้วยเอนไซม์ Trypsin<sup>®</sup> PTN 6.0S ที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 1.5:100 (w/w) พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยจากร้อยละ 4.1 เป็นร้อยละ 8.3 จะช่วยให้โปรตีนรำข้าวโอ๊ตที่ได้มีค่าความสามารถในการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิด โฟมของโปรตีนที่ได้ภายหลังการย่อยมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Kong, Zhou and Qian (2007) ที่ ศึกษาการตัดแปรโปรตีนต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน กลูเตนข้าวสาลีที่เตรียมจากการย่อยกลูเตนข้าวสาลี ด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L ที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น เท่ากับ 1:100 (w/w) แปรระดับการย่อยที่ร้อยละ 0-15 ตามลำดับ พบว่าเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น

(ร้อยละ 5-15) มีผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ในช่วง pH ระหว่าง 2-12 มีความสามารถในการละลายมากกว่าร้อยละ 60 โดยที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 จะส่งผลให้โปรตีนกลูเตนข้าวสาลีที่ได้มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิดโฟมสูงขึ้นร้อยละ 83 และ 84 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลูเตนข้าวสาลีก่อนการย่อย นอกจากนี้ Yust et al. (2010) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วลูกไก่ (chickpea) ที่เตรียมมาจากการแยกสลายโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วลูกไก่ (chickpea

protein isolate, CPI) ด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L ที่ pH 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 1.14 มิลลิกรัมต่อกรัม แปรระดับการย่อยที่ร้อยละ 0-10 พบว่าเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น ค่าความสามารถในการละลายของ CPI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับการย่อยร้อยละ 2.9 และ 4.9 จะช่วยให้ CPI มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิดโฟม สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการย่อย

ตารางที่ 2 ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนในพืชที่ระดับการย่อยต่างกัน

วัตถุดิบ	ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้	ระดับการย่อย (ร้อยละ)	ช่วยปรับปรุงสมบัติในด้าน	เอกสารอ้างอิง
<b>ระดับการย่อยต่ำ</b>				
โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วลูกไก่	Alcalase <sup>®</sup> 2.4L	2.9-4.9	-ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ -ความสามารถในการเกิดโฟม	Yust et al. (2010)
		1-10	-ความสามารถในการละลาย (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.3.1)	
โปรตีนเข้มข้นจากรำข้าวโอ๊ต	Trypsin <sup>®</sup> PTN 6.0S	4.1-8.3	-ความสามารถในการละลาย -ความสามารถในการอูม่น้ำ -ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.3.1)	Guan et al. (2007)
โปรตีนกลูเตนจากข้าวสาลี	Alcalase <sup>®</sup> 2.4L	5	-ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์	Kong, Zhou and Qian (2007)
		5-15	-ความสามารถในการเกิดโฟม -ความสามารถในการละลาย (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.3.1)	
<b>ระดับการย่อยสูง</b>				
โปรตีนไฮโดรไลสจากข้าวโพด	Neutral protease จาก <i>Bacillus subtilis</i>	24.5	-สมบัติในการต้านออกซิเดชัน	Zhou, Sun and Canning (2012)
	Validase จาก <i>Aspergillus oryzae</i>	21.7	-สมบัติในการต้านออกซิเดชัน	
	Alkaline protease จาก <i>Bacillus licheniformis</i>	32.3	-สมบัติในการต้านออกซิเดชัน	
โปรตีนเข้มข้นจากกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	Trypsin (Sigma Aldrich)	30-50	-สมบัติในการต้านออกซิเดชัน	Ng et al. (2013)
โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วลูกไก่	Alcalase <sup>®</sup> 2.4L+	70	-สมบัติในการต้านออกซิเดชัน	Yust et al. (2012)
	Flavourzyme		(ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.4.3) -สมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอล	

• การดัดแปรโปรตีนจากน้ำนมด้วยเอนไซม์ จะช่วยส่งเสริมสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากน้ำนมได้หลายประการ เช่น สมบัติด้านการละลาย สมบัติด้านการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สมบัติด้านการเกิดโฟม และสมบัติด้านการอุ้มน้ำ เป็นต้น Severin and Xia (2005) ดัดแปรสมบัติของเวย์โปรตีนโดยการแยกสลายโปรตีนจากเวย์โปรตีนเข้มข้น (whey protein concentrate, WPC) ด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L และ Protamex<sup>®</sup> ใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.40 และ 0.64 AU g<sup>-1</sup>WPC ตามลำดับ แปรระดับการย่อยเป็นร้อยละ 5-20 พบว่าเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้นความสามารถในการละลายของ WPC ที่ผ่านการย่อยด้วย Alcalase<sup>®</sup> 2.4L และ Protamex<sup>®</sup> จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ร้อยละ 75.5-85.8 และ 75.5-86.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนก่อนการย่อย การย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L ที่ระดับการย่อยร้อยละ 5 จะช่วยให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ WPC มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ผลไม่แตกต่างทางสถิติ ( $p>0.05$ ) และยังช่วยให้ความสามารถในการเกิดโฟมสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ WPC เริ่มต้น ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex<sup>®</sup> จะมีผลให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิดโฟมของ WPC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p<0.05$ ) แม้เอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L และ Protamex<sup>®</sup> จัดเป็นเอนไซม์ประเภทเอนโดเพปติเดส เช่นเดียวกัน แต่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น อัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยา และสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน จึงมีผลให้สมบัติด้านการเกิดอิมัลชัน และการเกิดโฟมของโปรตีนที่ได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sinha et al. (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของ WPC ที่ผ่านการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา pH 7.6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเตรียมด้วยเอนไซม์ papain (จาก

บริษัท Enzochem Company, India) ที่ pH 6.2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 1:60 (w/w) แปรระยะเวลาการย่อยเป็น 20 40 และ 60 นาที พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นความสามารถในการอุ้มน้ำของ WPC ที่ผ่านการแยกสลายด้วยโปรติเอสจากเชื้อรา และ papain จะมีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 60-225 และ 80-240 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ระยะเวลาการย่อยที่ 60 นาที ความสามารถในการเกิดโฟมของ WPC ที่ผ่านการแยกสลายด้วย papain มีค่าลดลงร้อยละ 20 ในขณะที่การแยกสลายด้วยโปรติเอสจากเชื้อราไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความสามารถในการเกิดโฟมของ WPC

• การดัดแปรโปรตีนจากปลาด้วยเอนไซม์ จะช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนด้านต่าง ๆ ได้ เช่น งานวิจัยของ Souissi et al. (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากปลาซาร์ดีนที่เตรียมจากหัวและเครื่องในของปลาซาร์ดีน โดยการแยกสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L ที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50°C อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 727.26 U g<sup>-1</sup> แปรระดับการย่อยเป็นร้อยละ 6.62 9.31 และ 10.16 ตามลำดับ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับการย่อย โดยที่ระดับการย่อยร้อยละ 10.16 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะมีความสามารถละลายได้ใกล้เคียงร้อยละ 100 ในขณะที่ระดับการย่อยที่ร้อยละ 6.62 ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟม และความสามารถในการเกิดอิมัลชันมีแนวโน้มสูงขึ้นประมาณร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับโปรตีนก่อนการย่อย นอกจากนี้ Geirsdottir et al. (2011) ยังศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาบลูไวต์ทิง (blue whiting) ที่เตรียมจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาปลาบลูไวต์ทิงด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L ที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของเอนไซม์

ต่อสารตั้งต้นที่ใช้จะแตกต่างกันตามระดับการย่อยสลายที่ต้องการ ดังนี้ 1:1000 (w/w) สำหรับระดับการย่อยร้อยละ 2.5 1:500 (w/w) สำหรับระดับการย่อยร้อยละ 5 และ 1:50 (w/w) สำหรับระดับการย่อยร้อยละ 10 และ 15 ตามลำดับ พบว่าเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น ความสามารถในการละลาย และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มระดับการย่อยนั้นไม่มีผลต่อความสามารถในการอ้วนน้ำของโปรตีนที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

2.3.2 การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยที่ระดับต่ำในผลิตภัณฑ์อาหาร

แนวทางการประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากธัญพืช จากน้ำนม และจากปลา เช่น

- โปรตีนไฮโดรไลเสตจากธัญพืช นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ และอาหารฟังก์ชันต่าง ๆ เนื่องจากโปรตีนจากธัญพืชมีราคาไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนสัตว์ โดยโปรตีนจากธัญพืชจะช่วยปรับปรุงลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส รวมถึงความฉ่ำน้ำของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังมีสมบัติเป็นองค์ประกอบที่ช่วยในด้านการคงตัว (stabilizing ingredient) ในผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกอิมัลชัน ใช้ทดแทนการใช้ไข่ขาวในการขึ้นรูปโฟมในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และขนมอบ (Hoogenkamp, 2004)

- การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากน้ำนม จะใช้ส่วนของเวย์โปรตีน ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง เวย์โปรตีนเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Sinha et al., 2007) นิยมใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหารประเภทไขมันต่ำ โดยเวย์โปรตีนจะช่วยส่งเสริมลักษณะความเป็นครีม

(creaminess) ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดี และความสามารถในการอ้วนน้ำของผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่น ชูบ ซอส น้ำสลัด และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นต้น ซึ่งสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ของเวย์โปรตีนนี้สามารถปรับปรุงให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์

- การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา เนื่องจากในกระบวนการแปรรูปเนื้อปลาในทางการค้า จะมีส่วนที่เหลือทิ้งในกระบวนการผลิตมากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก จึงมีการศึกษาเพื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือทิ้งจากปลาไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารด้านต่าง ๆ เช่น นำมาใช้ทดแทนการใช้ไขมัน (milk replacers) ใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม และช่วยเสริมกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว (Kristinsson and Rasco, 2000)

อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ของอาหารนั้น ในทางปฏิบัติสามารถใช้วิธีการอื่น ๆ เช่น การใช้สารเคมี การเติมส่วนผสมต่าง ๆ หรือการควบคุมกระบวนการในการผลิต ด้วยเหตุนี้ทำให้การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านต่าง ๆ ด้วยวิธีทางเอนไซม์จึงยังไม่ได้รับความนิยมมากนักในทางอุตสาหกรรมอาหาร

## 2.4 การดัดแปรสมบัติของโปรตีนด้วยการย่อยที่ระดับสูง และการประยุกต์ใช้

2.4.1 ผลของการย่อยที่ระดับสูงต่อสมบัติของโปรตีนที่ได้

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงนั้นจะประกอบด้วยเพปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระปริมาณมาก ซึ่งนอกจากจะมีผลให้โปรตีนที่ได้มีสมบัติในด้านการละลายสูงขึ้นแล้ว ยังมีความสำคัญในแง่ของการปรับปรุงรสชาติ และให้สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น รวมถึงมีผลดีต่อระบบการทำงานต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์

ดังนั้นจึงสามารถนำโปรตีนที่ได้จากการย่อยที่ระดับสูงไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายทั้งในทางอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป และการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน

2.4.2 การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยที่ระดับสูงในผลิตภัณฑ์อาหาร

กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธีการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงในทางอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปนั้นจะนิยมใช้ในกระบวนการผลิตซอสปรุงรส เช่น ซอสถั่วเหลือง การผลิตซีอิ้ว การผลิตน้ำปลา และใช้ในการช่วยลดความขมของผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งรสบางชนิด ในขั้นตอนการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลง มีการเผยกรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำออกสู่บริเวณผิวหน้า และได้สายเพปไทด์ที่สั้นลง การย่อยที่ระดับสูงจะมีผลทำให้เกิดการตัดสายเพปไทด์ดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนอิสระได้มากขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนอิสระนี้จะมีระดับความขมน้อยลงเมื่อเทียบกับเมื่อมีการจัดเรียงเป็นสายพอลิเพปไทด์ ดังนั้นการย่อยที่ระดับสูงจึงมีผลในการช่วยลดความขมของโปรตีนไฮโดรไลเสตลงได้ (Saha and Hayashi, 2001; Nielsen, 2010)

2.4.3 การประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นอาหารฟังก์ชัน

ในปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์ของโปรตีนที่ผ่านการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงทางด้านอาหารฟังก์ชัน ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแยกสลายโปรตีนจะเกิดเพปไทด์หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีผลในการควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกายมนุษย์ให้เป็นปกติ (Hartmann and Meisel, 2007) ตัวอย่างสมบัติที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเสตในกลุ่มนี้ เช่น

• ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ  
ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน จะขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน โดยกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีจะมีหมู่ซัลฟิวเรียมที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (nucleophilic sulfur-containing side chain) เช่น ซิสทีอีน และเมทไทโอนีน หรือมีหมู่ซัลฟิวเรียมที่มีวงแหวน (aromatic side chain) เช่น ทริปโตเฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน ซึ่งมีไฮโดรเจนอะตอมที่สามารถถูกดึงออกได้ง่าย นอกจากนี้หมู่อิมิดาโซล (imidazole groups) ของฮิสทีดีนก็มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน แต่ปัญหาอย่างหนึ่งที่จำกัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนคือ การมีโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน ดังนั้นการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จึงเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตติยภูมิ มีผลให้หมู่ซัลฟิวเรียมของกรดอะมิโนที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเผยออกมา ทำให้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่ได้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Elias, Kellerby and Decker, 2008) Yust et al. (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไอโซเลตจากถั่วลูกไก่ที่ผ่านแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูง ด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme<sup>®</sup> เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระดับการย่อยร้อยละ 70 พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่วิเคราะห์ด้วยวิธี  $\beta$ -carotene bleaching, reducing power และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity มีค่าสูงกว่าโปรตีนก่อนการย่อยอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Khantaphant, Benjakul and Ghomi (2011) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อปลากะพงแดงข้างแฉวง

(brownstripe red snapper) ที่ผ่านการแยกสลายโปรตีนด้วยโปรติเอสที่แยกได้จากไส้ติ่ง (pyloric caeca) ของปลาชนิดเดียวกัน แปรระดับการย่อยร้อยละ 20-40 พบว่าเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้นฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power และ metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

- การควบคุมความดันโลหิต อธิบายโดยการตรวจวัดความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสตในการยับยั้งการทำงานของ Angiotensin-converting enzyme (ACE) ซึ่งปกติเอนไซม์ตัวนี้จะทำหน้าที่เปลี่ยนสาร decapeptide angiotensin I ให้อยู่ในรูป octapeptide angiotensin II ซึ่งสาร octapeptide angiotensin II จะมีผลให้หลอดเลือดหดตัว และความดันโลหิตสูงขึ้น การยับยั้งการทำงานของ ACE จะมีผลในการช่วยลดความดันโลหิต เพปไทด์ที่มีสมบัติในการยับยั้ง ACE (ACE inhibitory peptides) เป็นที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูง ทั้งนี้เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าสารยับยั้ง ACE สังเคราะห์ และไม่มีผลข้างเคียง (Messerli, 1999) Jamdar et al. (2010) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสง (peanut protein hydrolysate, PPH) ที่เตรียมจากโปรตีนไอโซเลตจากถั่วลิสง (peanut protein isolate, PPI) โดยการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase<sup>®</sup> 2.4L แปรระดับการย่อยร้อยละ 10-40 พบว่า PPH ที่ได้จะมีความสามารถในการยับยั้งสูงกว่า PPI อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยระดับการย่อยที่ร้อยละ 40 จะให้ค่าการยับยั้งสูงถึงร้อยละ 97

- การควบคุมระดับคอเลสเตอรอล เพปไทด์บางชนิดมีผลในการช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด โดยเพปไทด์ดังกล่าวจะมีความสามารถในการยับยั้งการดูดซึมกรดไขมันในลำไส้เล็ก และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลที่อยู่ในอาหารที่รับประทานเข้าไป นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลภายในเซลล์ตับ โดยความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลของเพปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตจะแตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโน ตัวอย่างโปรตีนที่มักนิยมนำมาศึกษาฤทธิ์ในด้านการลดระดับคอเลสเตอรอลได้แก่ โปรตีนจากถั่วเหลือง (Cho, Juillerat and Lee, 2007) และโปรตีนจากนม (Zhong et al., 2007) เป็นต้น Yang et al. (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในตับของหนูทดลอง โดยให้หนูทดลองบริโภคอาหารสูตรที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองที่เตรียมจากการแยกสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เพปซิน จาก porcine gastric mucosa เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสูตรอาหารที่ใช้จะมีองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลืองอยู่ร้อยละ 5 ภายหลังจากการบริโภคเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในตับลดลงร้อยละ 21.3 และ 21.6 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่บริโภคอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสต

- การใช้เป็นอาหารเสริม โดยมีรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการผลิตจากการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูง มีความเหมาะสมในการเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสำหรับร่างกายมนุษย์ เนื่องจากเพปไทด์เหล่านี้สามารถถูกดูดซึมได้ง่ายในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้เพปไทด์และไตรเพปไทด์ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่าน

กระบวนการนี้จึงนิยมนำมาใช้ในสูตรอาหารเฉพาะ บางอย่าง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (Clemente et al., 1999b)

- การลดโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงสามารถช่วยลดโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ในอาหารได้ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนบางชนิดอาจมีบางตำแหน่งบนสายพอลิเพปไทด์ที่มีลำดับของกรดอะมิโน และการจัดเรียงโครงสร้างสามมิติที่มีความจำเพาะที่สามารถกระตุ้นอาการแพ้ได้ การแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงจะเป็นการทำลายโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนดังกล่าว จึงเป็นการช่วยลดอาการแพ้ที่เกิดจากโปรตีนได้ (Ansaloni et al, 1997) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปใช้ในสูตรอาหารพิเศษสำหรับคนที่มีอาการแพ้ อาหารโปรตีน (hypoallergenic formular) หรือใช้สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงทารกได้ (Szajewska, 2007)

### 3. สรุป

การดัดแปรสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับการย่อยต่ำสามารถปรับปรุงสมบัติด้านการละลาย และสมบัติด้านการอุ้มน้ำของโปรตีนที่ได้ ในขณะที่ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และการเกิดโฟมจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเฉพาะที่ระดับการย่อยที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นของโปรตีนอาจสามารถทำได้หลายวิธี ทำให้การประยุกต์ใช้โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้เอนไซม์ที่ระดับการย่อยต่ำในอุตสาหกรรมอาหารยังไม่แพร่หลายมากนัก ในขณะที่การดัดแปรสมบัติของโปรตีนด้วยการแยกสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสูงนอกจากจะปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลาย และการลดความขมแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการ

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มาใช้ประโยชน์ในด้านอาหาร ฟังก์ชันกันมากในปัจจุบัน

### 4. เอกสารอ้างอิง

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27(6): 1256-1262.
- Alder-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein*. NY: Elsevier Applied Science Publishers.
- Amiza, M.A., Kong, Y.L. and Faazaz A.L. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal* 19(1): 199-206.
- Ansaloni, R., Incorvaria, C., Ispano, M., Pravettoni, V., Rotondo, F. Scibilia, J. and Vighi, G. (1997). Prevention of food allergy. In *Study of Nutritional Factors in Food Allergies and Food Intolerance*, C. Ortolani and E.A. Pastorello (Corporate authors). Luxembourg: Office for Publications of the European Communities. pp. 72-82.
- Cho, S.J., Juillerat, M.A. and Lee, C.H. (2007). Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26): 10599-10604.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 11: 254-262.
- Clemente, A., Vioque. J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J and Millán, F. (1999a). Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3776-3781.

- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J. and Millán, F. (1999b). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry* 67: 269-274
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. In *Food Chemistry*, O.R. Fennema (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. NY: Marcel Dekker. pp. 321-429.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S. and Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 430-441.
- Geirsdottir, M., Sigurgisladottir, S., Hamaguchi, P.Y., Thorkelsson, G., Johannsson, R., Kristinsson, H.G. and Kristjansson, M.M. (2011). Enzymatic hydrolysis of blue whiting (*Micromesistius poutassou*); functional and bioactive properties. *Journal of Food Science* 76: C14-C20.
- 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.
- Hartmann, R. and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169.
- Hoogenkamp, H.W. (2004). Soy protein essentials. In *Soy Protein and Formulated Meat Products*. Oxford, UK: CABI Publishing. pp. 7-18.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry* 121: 178-184.
- Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R. (2011). The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *LWT-Food Science and Technology* 44: 1139-1148.
- Kong, X., Zhou, H. and Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* 101: 615-620.
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(1): 43-81.
- Margot, A., Flaschel, E. and Renken, A. (1994). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochemistry* 29: 257-262.
- McClements, D.J. (1999). Emulsion ingredients. In *Food Emulsions: Principle, Practice and Techniques*. NY: CRC Press. pp. 95-144.
- Messerli, F.H. (1999). Combinations in the treatment of hypertension: ACE inhibitors and calcium antagonists. *American Journal of Hypertension* 12: 865-905.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., and Parajó, J.C. (2006). Functionality of oilseed protein product: A review. *Food Research International* 39: 945-963.
- Ng, K.L., Ayob, M.K., Said, M. Osman, M.A. and Ismail, A. (2013). Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. *Industrial Crops and Products* 43: 725-731.
- Nielsen, P.M. (1997). Functionality of protein hydrolysate. In *Food Protein and Their*

- Applications, S. Damodaran and A. Paraf (eds.). NY: Marcel Dekker. pp. 443-472.
- Nielsen, P.M. 2010. Enzymes in protein modification. In *Enzymes in Food Technology*, W.J. Robert and M.V. Oort (eds.). IA: Wiley-Blackwell. pp. 292-319.
- Nielsen, P.M., Pedersen, D. and Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 66(5): 642-646.
- Panyam, D. and Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology* 7: 120-125.
- Rutherford, S.M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysate: a review. *Journal of AOAC International* 93(5): 1515-1522.
- Saha, B.C. and Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances* 19: 355-370.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31: 1949-1956.
- Severin, S. and Xia, W.S. (2005). Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry* 30: 77-97.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. and Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry* 101: 1484-1491.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* 45: 187-194.
- Szajewska, H. (2007). Extensive and partial protein hydrolysate preterm formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 45: S183-S187.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. and Millan, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76(7): 819-823.
- Yang, S.C., Liu, S.M., Yang, H.Y., Lin, Y.H., Chen, J.R. (2007). Soybean protein hydrolysate improves plasma and liver lipid profiles in rats fed high-cholesterol diet. *Journal of the American College of Nutrition* 26(5): 416-423.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 235-240.
- Yust, M.D.M., Millán-Linares, M.D.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F. and Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1994-2001.
- Yust, M.D.M., Pedroche, J., Millán-Linares, M.D.C., Alcaide-Hidalgo, J.M. and Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry* 122: 1212-1217.
- Zayas, J.F. (1997). Emulsifying properties of proteins. In *Functionality of Protein in Food*. NY: Springer-Verlag. pp. 135-227.

- Zhong, F., Liu, J., Ma, J. and Shoemaker, C.F. (2007). Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Research International* 40: 661–667.
- Zhou, K., Sun, S. and Canning, C. (2012). Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry* 135: 1192-1197.

