



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของดีแอมิเดชันด้วยเอนไซม์ protein-glutaminase ต่อ
สมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าว

(Effect of enzymatic deamidation by protein-
glutaminase on flavor-binding property of cocont
(*Cocos nucifera* L.) protein)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

มกราคม 2561

สัญญาเลขที่ TRG5880229

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของดีแอมิเดชันด้วยเอนไซม์ protein-glutaminase ต่อ
สมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าว

(Effect of enzymatic deamidation by protein-
glutaminase on flavor-binding property of cocont
(*Cocos nucifera* L.) protein)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG5880229

(รหัสโครงการ)

Project Title : ผลของดีแอมิเดชันด้วยเอนไซม์ protein-glutaminase ต่อสมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีนมะพร้าว (Effect of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on flavor-binding property of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein)

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : inthawoot.s@chula.ac.th

Project Period : 1 ก.ค. 58 – 31 ธ.ค. 60

(ระยะเวลาโครงการ)

มะพร้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อบริโภคได้หลากหลาย ในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวจะนำกะทิมาแยกส่วนของน้ำมันออก และเหลือหางกะทิไว้ โดยพบว่าหางกะทิมีสัดส่วนของโปรตีนที่สูง จึงสามารถนำมาสกัดโปรตีนต่อได้ แต่โปรตีนที่สกัดได้มีมากข้อจำกัดในการนำไปใช้ เช่น มีความสามารถในการละลายในสภาวะกรดอ่อนต่ำ และมีความสามารถในการจับกับสารให้กลิ่นรสเป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์ protein-glutaminase (PG) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกดัดแปร โดยสกัดโปรตีนจากหางกะทิที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม การผลิตน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนที่จุด isoelectric point (pH = 3.9) และหาสภาวะในการดัดแปรด้วย response surface methodology (RSM) จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยเอนไซม์ PG คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนเป็น 36 U/g protein, อุณหภูมิ 50 °C และ pH = 7 เมื่อดัดแปรโปรตีนด้วยสภาวะดังกล่าวที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (15 min, 6 และ 12h) เพื่อนำมาศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ พบว่าสมบัติการละลายที่ pH = 3 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการดัดแปร

($p \leq 0.05$) ในขณะที่ $\text{pH} = 5$ ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วน $\text{pH} = 7$ มีค่าลดลงในตัวอย่างที่ถูกตัดแปรเป็นเวลา 15 min และ 6 h เมื่อพิจารณาความสามารถในการอู้น้ำและน้ำมัน พบว่าทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม สำหรับสมบัติการเกิดอิมัลชัน พบว่าค่า emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปร 15 นาที มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่โปรตีนที่ผ่านการตัดแปรเป็นเวลา 6 และ 12 h ไม่มีความแตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) ค่า emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรทุกตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($p \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาสมบัติการเกิดโฟม พบว่าตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีค่า foaming capacity (FC) สูงขึ้น ($p \leq 0.05$) แต่ foaming stability (FS) มีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) molecular weight distribution ของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรมีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้น และองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรมีลักษณะคล้ายคลึงกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร เมื่อศึกษาสมบัติการจับลิพิดของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปร พบว่าความสามารถในการจับลิพิดของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วย PG ลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร โดยการตัดแปรโปรตีนด้วย PG ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับโปรตีน ซึ่งได้แก่ van der Waals force หรือ hydrogen bonding เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าค่า best estimate threshold (BET) ของวานิลลินในตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร (33.17 ppm) สูงกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย PG (14.11 ppm) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับลิพิดโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรมีค่าลดลง

Coconut is an economical crop that widely processed and used in many ways. In order to produce coconut oil, the coconut milk is used as a raw material for oil extraction and coconut skimmilk is left behind as a by-product. Due to high protein content in coconut skimmilk, it has a potential for protein extraction. However, the extracted protein usually has limitation for using due to its low solubility in acidic condition and its ability to bind with flavor compounds. The objective of this study was to optimize of the enzymatic deamidation of coconut protein by protein-glutaminase (PG) and to study functional and flavor-binding properties of deamidated coconut protein. The extraction of protein was performed by conventional isoelectric precipitation ($\text{pH} 3.9$). The modified condition was optimized by using response surface methodology (RSM). The optimization was performed based on the condition, which contained high degree of deamidation ($\text{DD} > 30\%$) and low degree of hydrolysis ($\text{DH} < 5\%$). It was found that the optimum

condition were enzyme:substrate ratio (E/S) of 36 U/g protein, temperature of 50°C and pH of 7.0. The functional properties of deamidated coconut proteins (deamidation by PG for 15 min, 6 h, and 12 h) were determined, including solubility, water- and oil-holding capacity, emulsifying properties and foaming properties. In comparison to control sample (same condition as deamidated ones, but without PG), the solubility of deamidated coconut protein was improved at pH = 3.0 ($p \leq 0.05$). At pH = 5.0, there was no difference in solubility among treatments ($p > 0.05$). At pH = 7.0, the solubility of coconut proteins, which deamidated for 15 min and 6 h, were decreased ($p \leq 0.05$). Water holding capacity and oil holding capacity were not different from control after deamidation by PG ($p > 0.05$). Emulsifying activity index (EAI) of 15 min deamidated coconut protein was decreased ($p \leq 0.05$) while EAIs of 6 and 12 h deamidated protein were not different from control ($p > 0.05$). Emulsifying stability index (ESI) of all deamidated protein samples were increased ($p \leq 0.05$). Foaming capacity (FC) was increased after deamidation by PG ($p \leq 0.05$), while the foaming stability (FS) was decreased ($p \leq 0.05$). From the results of molecular weight distribution, the small molecular proteins were increased during deamidation. And amino acid profile of deamidated coconut protein was similar to untreated coconut protein. For flavor binding property of deamidated and non-deamidated coconut proteins, it was found that the ability of coconut protein to bind with vanillin was decreased after deamidation by PG. However, the types of interaction were not changed from van der Waals force or hydrogen bonding. Sensory study was done to observe best estimate threshold (BET) of vanillin in proteins (both deamidated and non-deamidated samples). The result showed higher BET of vanillin in non-deamidated coconut protein (33.17 ppm) than of vanillin in deamidated sample (14.11 ppm).

Keywords : deamidation, coconut protein, flavor-binding, protein-glutaminase

(คำหลัก)

บทที่ 1

บทนำ

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

กระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวในปัจจุบัน มักเป็นการสกัดน้ำมันมะพร้าวแบบเย็นซึ่งจะทำให้เกิดของเสียคือ หางกะทิที่มีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 3 อยู่ด้วย จากการศึกษาพบว่าโปรตีนมะพร้าวเป็นโปรตีนจากพืชที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทุกชนิด ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำหางกะทิดังกล่าวมาสกัดโปรตีน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนจากมะพร้าวยังน้อย และโปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้มีข้อจำกัดในการใช้งานคือ สมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่อาจนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย การดัดแปรโปรตีนเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนซึ่งการทำดีเอมิเดชันเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมวิธีหนึ่ง ปฏิกริยาดีเอมิเดชันคือการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนจากหมู่เอไมด์เป็นหมู่คาร์บอกซิลซึ่งจะทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป การทำดีเอมิเดชันสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และการใช้เอนไซม์ (Kwon et al., 1996; Schwenke, 1997) การทำดีเอมิเดชันสามารถใช้เอนไซม์ได้หลายชนิดในการเร่งปฏิกริยา เช่น เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (protein-glutaminase, PG) PG เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียในดิน PG สามารถเร่งให้เกิดปฏิกริยาดีเอมิเดชันได้ เอนไซม์ชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถเร่งปฏิกริยาดีเอมิเดชันกับกรดอะมิโนกลูตามีนในสายเปปไทด์เท่านั้น ไม่เกิดกับกลูตามีนอิสระ และมีปฏิกริยาข้างเคียง เช่น ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้ต่ำ นอกจากนี้ PG ยังเป็นเอนไซม์ที่พื้ค้นพบทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำมาใช้ในการดัดแปรโปรตีนน้อยอีกด้วย (Yamaguchi et al., 2001) การดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยการทำดีเอมิเดชันโดยใช้ PG อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน และทำให้โปรตีนจากมะพร้าวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

ปัจจุบันอาหารประเภทโปรตีนสูงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากผู้บริโภคมีความต้องการที่จะลดอาหารประเภทไขมันและน้ำตาลสูงลง แต่อาหารประเภทโปรตีนสูงมักมีปัญหาเกี่ยวกับการจางลงของกลิ่นรส กล่าวคือเมื่อมีการเติมสารให้กลิ่นรสลงไปในผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โปรตีนจะสามารถเกิดอันตรกริยากับสารให้กลิ่นรสได้ ซึ่งการเกิดอันตรกริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ คือปฏิกริยาแบบผันกลับได้ (reversible) และแบบผันกลับไม่ได้

(irreversible) หากเกิดปฏิกิริยาแบบผันกลับไม่ได้ระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน จะทำให้เกิดปัญหา กลิ่นรสที่เต็มลงไปในการอาหารจางลง (flavor fade) และจะทำให้กลิ่นรสโดยรวมของอาหารเปลี่ยนแปลงไป อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอมิเดชัน เป็นวิธีหนึ่งซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านการจับกลิ่นรส ระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมลดลง โดยเอนไซม์ PG เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษามากแล้วอ้างว่าสามารถลดความสามารถในการจับกลิ่นรสของโปรตีนถั่วเหลืองได้อีกด้วย (Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) ถึงแม้ปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะนำโปรตีน มะพร้าวมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมทางอาหารมากขึ้น แต่การใช้โปรตีนจากมะพร้าวอาจเกิด ปัญหาการจางลงของกลิ่นรสได้เช่นเดียวกันกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการดัดแปร โปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์ PG จะสามารถทำให้โปรตีนมะพร้าวดัดแปรลด ความสามารถในการจับกับกลิ่นรสได้เช่นกัน

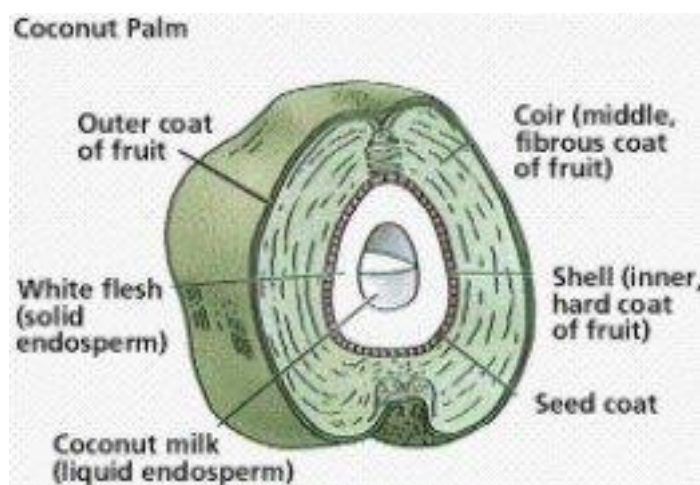
งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวโดยใช้ PG ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ และศึกษาสมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีนจากมะพร้าวที่ถูกดัดแปร เปรียบเทียบกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 มะพร้าว

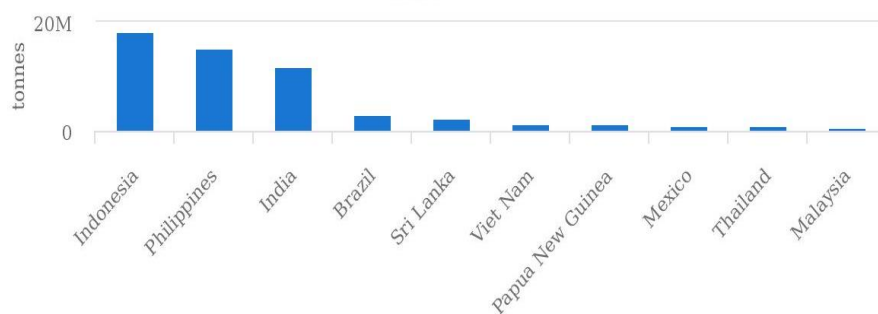
มะพร้าวหรือ *Cocos nucifera*, Linn. เป็นพืชในตระกูล *Palmaceae* ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ ปาล์ม จาก และตาล เป็นไม้ยืนต้นสูง มีผลที่สามารถบริโภคได้โดยมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือทรงรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-23 เซนติเมตร มีผิวเรียบ ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล ภายในมีชั้นที่เป็นเส้นใยอ่อนนุ่มและชั้นในที่แข็ง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



รูปที่ 2.1 ภาพจำลองการตัดตามแนวยาวของผลมะพร้าว

ที่มา: Pyngthyngs (2012)

มะพร้าวถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกชนิดหนึ่ง มีกำลังการผลิตมะพร้าวทั่วโลกประมาณ 62 ล้านตัน ในปีพ.ศ.2556 โดยประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตมะพร้าวอันดับที่ 9 ของโลก มีกำลังการผลิตอยู่ที่ 1 ล้านตันต่อปี ดังแสดงในรูปที่ ทั้งนี้ในอดีตประเทศไทยเคยเป็นผู้ผลิตมะพร้าวอันดับ 6 ของโลก เช่น ในปีพ.ศ. 2543 ที่ประเทศไทยมีกำลังการผลิตอยู่ที่ 1.8 ล้านตัน ปริมาณการผลิตมะพร้าวที่ลดลงเป็นผลมาจากปัญหาจากภัยทางธรรมชาติ เช่น ภัยแล้ง แมลงศัตรูพืชระบาด ประกอบการขยายตัวของอุตสาหกรรมส่งผลให้เกษตรกรมีความสนใจที่จะปลูกมะพร้าวลดลง แต่ปริมาณก็ยังเพียงพอให้นำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อยู่ (FAO, 2013; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559)



รูปที่ 2.2 ปริมาณการผลิตมะพร้าวทั่วโลกในปีพ.ศ. 2556

ที่มา: FAO (2013)

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

2.1.1 โปรตีนจากมะพร้าว

2.1.1.1 การสกัดโปรตีนมะพร้าว

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

Kwon et al. (1996) สกัดโปรตีนจากทางกะทิโดยใช้เทคนิค ultrafiltration โดยเลือกจากแผ่นกรองที่มี molecular weight cut-off (MWCO) 5,000 Da จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าตัวอย่างที่ได้มีปริมาณโปรตีน 51.8% ในทำนองเดียวกัน Onsaard et al. (2005) ใช้

ultrafiltration ที่ 10000 Da MWCO สกัดโปรตีนได้ตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนเพียง 45.6% อย่างไรก็ตาม ในปี 2006 นักวิจัยกลุ่มนี้ได้ทดลองสกัดโปรตีนมะพร้าวอีกครั้งด้วยกระบวนการ 2 รูปแบบ โดยวิธีแรกเป็นการตกตะกอนโปรตีนจากมะพร้าวด้วยกรดอะซิติกที่ pH 3.9 แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียสเพื่อแยกส่วนไขมันออก จากนั้นล้างตัวอย่างซ้ำด้วยเฮกเซนเพื่อกำจัดไขมันที่หลงเหลือ ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งคิดเป็น 88.94% อีกวิธีหนึ่งเป็นการนำหางกะทิไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกไขมันออก ล้างตัวอย่างซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซนก่อนจะนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า ได้ตัวอย่างที่ได้มีปริมาณโปรตีน 75.27% แต่ตัวอย่างโปรตีนที่ได้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตปนถึง 14.67% (Onsaard et al., 2006)

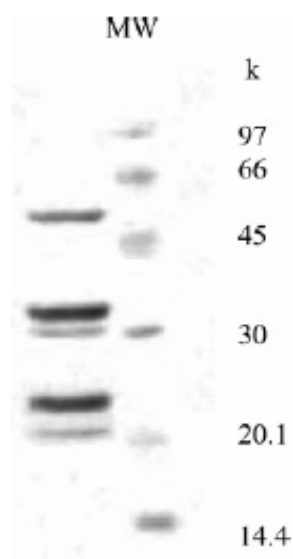
นอกจากกระบวนการสกัดจะมีผลแล้ว วัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ในการสกัดก็มีผลเช่นกัน เช่น Thaiphanit and Anprung (2013) ทดลองสกัดโปรตีนมะพร้าวจากกะทิสดและตัวอย่างหางกะทิจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนที่ pH 4.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของโปรตีน พบว่าตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากกะทิสดมีปริมาณโปรตีน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

2.1.1.2 ลักษณะของโปรตีนมะพร้าว

โปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดได้หลังจากการทำแห้งด้วยการทำเยือกแข็งจะมีสีขาวอมเหลือง มีกลิ่นกะทิจาง ๆ มีน้ำหนักเบา สีของโปรตีนมะพร้าวจะบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้

2.1.1.2.1 Molecular weight distribution

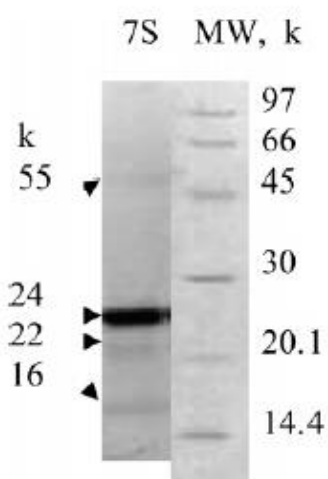
โปรตีนมะพร้าวส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนชนิดกลอบูลินซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 7 และ 11S โปรตีนกลุ่ม 11S กลอบูลินมีประมาณ 80% ของโปรตีนในกลุ่มกลอบูลินทั้งหมดโดยมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า cocosin โปรตีนกลุ่มนี้มีขนาดโมเลกุลดั้งเดิมอยู่ที่ 326,000 kDa แต่มีหน่วยย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีขนาด 24, 34 และ 55 kDa ซึ่งจะปรากฏในเจลเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังรูปที่ แถบโปรตีนที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับโปรตีนกลุ่ม 11S กลอบูลินที่สกัดได้จากา



รูปที่ 2.3 การกระจายตัวของโปรตีน cocosin จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

ที่มา: Garcia et al. (2005)

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



รูปที่ 2.4 การกระจายตัวของโปรตีน 7S กลอบูลิน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

ที่มา: Garcia et al. (2005)

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

2.1.1.2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

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

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนจากมะพร้าว

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

^a Average result from two independent samples.

ที่มา: Thaiphanit and Anprung (2013)

2.2 โปรตีน

โปรตีนเป็นสารประกอบของโมเลกุลขนาดใหญ่โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน และอาจจะพบซัลเฟอร์ในบางครั้ง หน่วยย่อยของโปรตีนหรือกรดอะมิโนจึงเกิดจากการรวมตัวของสารข้างต้นนี้ โดยมีโครงสร้างหลักเป็นเป็นหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) ต่อกันที่คาร์บอนในตำแหน่งแอลฟา และมีหมู่ฟังก์ชันหรือหมู่โซ่ข้าง ($-R$) ที่แตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโน กรดอะมิโนจึงมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $H_2N-CH(R)-COOH$ ในธรรมชาติจะพบกรดอะมิโน 20 ชนิดดังแสดงตารางที่ 2.2 ซึ่งเมื่อแบ่งตามหมู่โซ่ข้างแล้วจะแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม (Yada, 2004) ได้แก่

1. Acidic ประกอบไปด้วยแอสปาทิกแอซิด และกลูตามิกแอซิด
2. Basic ประกอบไปด้วยอาร์จินีน, ฮิสติดีน และไลซีน
3. Aliphatic ประกอบไปด้วย อะลานีน, ไอโซลิวซีน, ลิวซีน และวาลีน
4. Aromatic ประกอบไปด้วยฟีนิลอะลานีน, ไทโรซีน และทริปโตเฟน
5. Polar ประกอบไปด้วย เซอรีน และทรีโอนีน
6. Thiol-containing ประกอบไปด้วย ซิสเตอีน และเมตไทโอนีน
7. Amide ประกอบไปด้วย แอสปารากีน และกลูตามีน
8. กลุ่มพิเศษที่มีการจับของหมู่โซ่ข้างที่แตกต่างจากกรดอะมิโนตัวอื่น ได้แก่ ไกลซีน และ โพรลีน

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติ 20 ชนิด

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

ที่มา: Yada (2004)

กรดอะมิโนจะเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเปปไทด์ในตำแหน่งของกลุ่มคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวแรกกับหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนตัวที่สอง และมีชื่อเรียกตามจำนวนพันธะเปปไทด์ เช่น เปปไทด์ คือกรดอะมิโนสองตัวต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ 1 พันธะ ไตรเปปไทด์ คือกรดอะมิโนสามตัวต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์สองพันธะ และโพลีเปปไทด์เกิดจากกรดอะมิโนหลายตัวต่อกันเป็นสายยาว กรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นสายยาวจะทำให้เกิดอันตรกิริยาต่าง ๆ ทั้งภายในสารและภายนอกสายจนเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโครงสร้างระดับต่าง ๆ (นิสานารถ กระแสร์ชล, 2540) ดังนี้

โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโครงสร้างที่มีกรดอะมิโนองค์ประกอบ กรดอะมิโนจะเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์

โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เกิดจากสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนเกิดการขดเป็นเกลียวแบบแอลฟาเฮลิคส์หรือเบตาชีทและยึดเหนี่ยวด้วยพันธะไฮโดรเจน

โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้างของสายโพลีเปปไทด์ที่ขดพับและจับกันแน่นเป็นก้อนกลมด้วยอันตรกิริยาต่าง ๆ

โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากสายโพลีเปปไทด์มากกว่าหนึ่งสายรวมตัวกัน

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

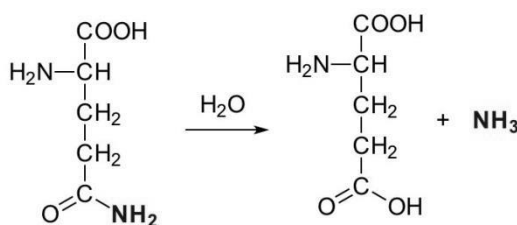
2.2.1 การดัดแปรโปรตีน

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

2.2.1.1 ดีแอมิเดชัน

ดีแอมิเดชันเป็นกระบวนการดัดแปรโปรตีนวิธีหนึ่งด้วยวิธีการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนจากหมู่เอไมด์เป็นหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนซึ่งเป็นผลมา

จากการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีนที่ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป โดยกรดอะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้จะต้องมีหมู่เอไมด์ซึ่งได้แก่ แอสปาราจิน (Asn) และกลูตามีน (Gln) โดยจะปลดปล่อยแอมโมเนียตามรูปที่ 2.6 ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่ถูกปลดปล่อยมานี้ถือเป็นตัวบ่งชี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของดีแอมิเดชันได้ (Hamada, 1992)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดดีแอมิเดชันของกลูตามีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hamada (1992)

การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีแอมิเดชันสามารถทำได้ทั้งการวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และการใช้เอนไซม์

2.2.1.1.1 ดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีทางกายภาพ

สำหรับวิธีทางกายภาพนั้นทำได้หลากหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การใช้ความดัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Metwalli and Van Boekel (1998) ที่ได้ทดลองดัดแปรโปรตีนเคซีนจากนมด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้ความร้อน 110 และ 145 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0-120 นาที พบว่า เป็นวิธีที่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเป็นจำนวนมาก เมื่อตรวจวัดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาพบว่ามีเพียง 10-15% ที่เป็นแอมโมเนียที่คาดว่าจะเกิดจากปฏิกิริยาดีแอมิเดชัน

2.2.1.1.2 ดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีทางเคมี

การดัดแปรด้วยวิธีดีแอมิเดชันอีกวิธีหนึ่งที่มีความนิยมคือวิธีทางเคมี เช่นการใช้กรด และการใช้ด่าง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปฏิกิริยาดีแอมิเดชันมีหลายประการ เช่น ชนิดของกรดที่ใช้ เป็นต้น ซึ่งกรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซิตริก กรดซัลฟูริก และกรดมาลิก Liao et al. (2010) ศึกษาการดัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีด้วยกรดซัลฟูริกและกรดซิตริก พบว่า ในช่วง 10 นาทีแรกของการทำปฏิกิริยา กรดซัลฟูริกสามารถเร่งให้เกิดดีแอมิเดชันได้เร็วกว่ากรดซิตริก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที ค่า degree of deamidation (DD) ของโปรตีนที่ใช้กรดทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่า DD มากกว่า 50% นอกจากนี้ Lei et al. (2015) ศึกษาการใช้กรดซิตริกและกรดมาลิกในการดัดแปรกลูเตลินจาก *Akebia*

trifoliata ผลปรากฏว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ตัดแปรด้วยกรดซิตริกมีค่า DD มากกว่า 55% ซึ่งสูงกว่าการตัดแปรด้วยกรดมาลิกอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นจากการตัดแปรด้วยกรดซิตริกมีค่าสูงกว่ากรดมาลิกด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลจากการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการตัดแปรกลูเตลินจากข้าวบาร์เลย์ พบว่า DD มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของด่าง และระยะเวลาการตัดแปรเพิ่มขึ้น โดยมีค่า DD เท่ากับ 43% เมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 M ตัดแปรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Zhao et al., 2011)

อย่างไรก็ตามการตัดแปรด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมีมีข้อเสียคือทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นต้น รวมทั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นค่อนข้างรุนแรง และไม่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น การตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอ็นเอมิเตชันด้วยการใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ

2.2.1.1.3 ดีเอ็นเอมิเตชันโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ที่สามารถใช้ในการตัดแปรโปรตีนด้วยปฏิกิริยาดีเอ็นเอมิเตชันมีหลายชนิดซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะและมีปฏิกิริยาข้างเคียงแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์สำหรับตัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอ็นเอมิเตชันได้แก่ โปรติเอส เปปติโดกลูตามิเนส ทรานส์กลูตามิเนส และโปรตีนกลูตามิเนส เป็นต้น

2.2.1.1.3.1 โปรติเอส (protease)

เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสมีหลายชนิด เช่น ปาเปน ทริปซิน และไคโมทริปซิน ซึ่งในสภาวะกรดหรือกลาง ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากการเร่งโดยเอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่ในสภาวะด่าง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดได้น้อยมาก ในขณะที่เดียวกันจะสามารถเกิดปฏิกิริยาชนิดอื่นแทน เช่น ดีเอ็นเอมิเตชัน Kato et al. (1987) ศึกษาการเกิดดีเอ็นเอมิเตชันโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสข้างต้นในสภาวะต่าง พบว่าเอนไซม์ปาเปน และไคโมทริปซินสามารถเร่งการเกิดดีเอ็นเอมิเตชันได้ในช่วง pH 10.0 และช่วงอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยมี DD ไม่เกิน 20% และ degree of hydrolysis (DH) ไม่เกิน 10% ส่วนเอนไซม์ทริปซินสามารถเร่งปฏิกิริยาดีเอ็นเอมิเตชันได้ในช่วง pH เดียวกัน แต่ DD และ DH มีค่าไม่เกิน 5%

2.2.1.1.3.2 เปปติโดกลูตามิเนส (peptidoglutaminase)

เปปติโดกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดดีเอ็นเอมิเตชันได้ในกลูตามีนและแอสปารากีนซึ่งอยู่ในสายเปปไทด์สั้น ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการตัดแปรตัวอย่างที่ผ่านการตัดสายโปรตีนมาแล้ว Hamada (1992) ศึกษาความเป็นไปได้ดังกล่าวในตัวอย่างโปรตีนจากถั่ว

เหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อนเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย ผลปรากฏว่า DD ของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อน มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย

2.2.1.1.3.3 ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase)

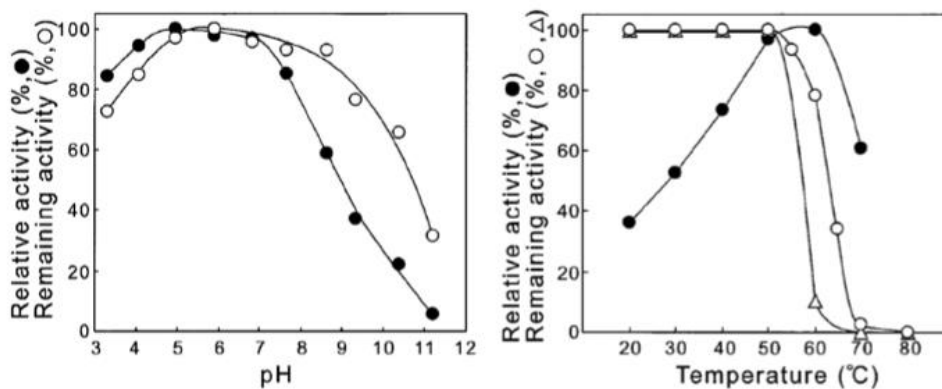
เอนไซม์ที่ได้รับความนิยมใช้ในการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอมิเดชันมากที่สุดคือเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส แต่เอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งการเกิดการจับกันระหว่างกลูตามีนและหมู่เอมีโนบางกลุ่มได้ด้วยเช่นกัน Motoki et al. (1986) ศึกษาการเกิดดีเอมิเดชันในเคซีนโดยควบคุมไม่ให้เกิดการจับกันของกลูตามีนกับหมู่เอมีโน ทางคณะผู้วิจัยได้ใช้กระบวนการ citraconylation เพื่อจับกับหมู่เอมีโนอิสระที่สามารถจับกับกลูตามีนได้ Agyare et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการดัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีโดยใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส พบว่า ความสามารถในการละลายในช่วง pH = 4.0 – 7.0 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำการดัดแปรโปรตีนเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และยังมีการศึกษาการดัดแปรโปรตีนจากถั่วเหลืองโดย Babiker (2000) ซึ่งได้ดัดแปรโดยใช้เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันและโฟมของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

2.2.1.1.3.4 โปรตีนกลูตามิเนส (PG)

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

โปรตีนกลูตามิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดดีเอมิเดชันในกลูตามีนที่อยู่ในสายโปรตีนได้ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับกลูตามีนอิสระ แอสปาราจีน และเอไมด์ตัวอื่น ๆ เอนไซม์ชนิดนี้มีค่า pI = 10.0 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kDa จากงานวิจัยของ Yamaguchi et al. (2001) ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของโปรตีนกลูตามิเนสในช่วง pH และช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าช่วง pH ที่

เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือระหว่าง 5-7 และช่วงอุณหภูมิคือ 50-60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 5-9 และช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (แสดงในรูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.6 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส

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

ที่มา: Yamaguchi et al. (2001)

นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีเอมิเดชันของโปรตีนกลูตามิเนสยังขึ้นกับชนิดของสารตั้งต้นอีกด้วย โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในโปรตีนกลุ่มเคซีนและโปรตีนสายยาวมากกว่าสายสั้นดังแสดงในรูปที่ 2.8 (Yamaguchi et al., 2001)

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

^a Assays were carried out in triplicate. ^b A suspension of proteins in the reaction mixture was used.

รูปที่ 2.7 specific activity ของโปรตีนกลูตามิเนสในสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Yamaguchi et al. (2001)

2.2.1.2 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นอีกปฏิกิริยาที่มีสำคัญในโปรตีนเนื่องจากส่งผลถึงคุณภาพของโปรตีนนั้น ๆ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้เกิดการทำลายพันธะเปปไทด์ในโครงสร้างระดับปฐมภูมิ โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของโปรตีนในระดับอื่น ๆ จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน ซึ่งส่งผลให้สมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสสามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาชนิดนี้ได้ เช่น การตัดแปรโปรตีนจากถั่วโดยใช้โปรติเอสจะทำให้ความสามารถในการละลายและความสามารถในการเกิดอิมัลชันดีขึ้น แต่ความเสถียรในการเกิดอิมัลชันลดลง เป็นต้น (ทัพพสาร ใจแก้ว, 2556; Thaiphanit and Anprung, 2016)

2.2.1.3 การเสียสภาพด้วยความร้อน

ความร้อนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลถึงคุณภาพของโปรตีนเนื่องจากความร้อนสามารถทำลายอันตรกิริยาภายในและภายนอกโมเลกุลของโครงสร้างโปรตีนในระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงและจัดเรียงตัวใหม่ โครงสร้างของโปรตีนจะเปิดเผยพื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำ และ

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

2.2.1.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีน

ในการดัดแปรโปรตีนจะมีปัจจัยที่ส่งผลถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาอยู่หลายปัจจัยขึ้นกับวิธีการดัดแปร เช่น การดัดแปรโดยใช้กรดจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาเกิดปฏิกิริยา เป็นต้น การดัดแปรโดยใช้เอนไซม์จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน อุณหภูมิ pH และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อทุกวิธีการดัดแปร คือ ชนิดและความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ในการดัดแปร

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

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

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

เมื่อ x_i คือ ปัจจัยที่หนึ่ง

x_j คือ ปัจจัยที่สอง

β_0 คือ จุดตัดหรือค่าคงที่

β_i คือ ผลเชิงเส้นตรง

β_{ii} คือ ผลเชิงเส้นโค้ง

β_{ij} คือ ผลเชิงของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของตัวแปร

ε คือ เทอมของความคลาดเคลื่อนสุ่ม

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

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

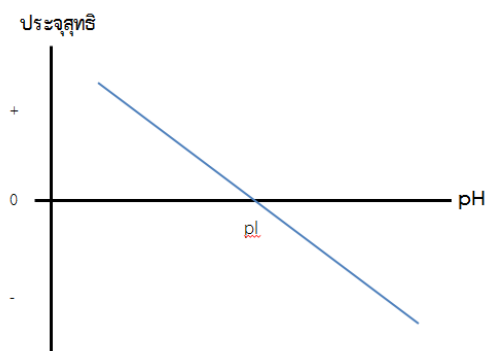
2.2.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

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

2.2.2.1 สมบัติการละลาย

ในการนำโปรตีนไปใช้ในผลิตภัณฑ์ ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากโปรตีนที่สามารถละลายได้ดีจะสามารถนำไปใช้ได้ง่ายและหลากหลาย นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นสมบัติที่สำคัญเนื่องจากส่งผลถึงสมบัติเชิงหน้าที่อื่น ๆ เช่น สมบัติการเกิดอิมัลชัน สมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนมีหลายประการ เช่น ชนิดของโปรตีนซึ่งมีความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุล ชนิดและการจัดเรียงตัวของโปรตีน และสภาวะของสารละลาย เช่น ความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ionic strength ชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย การละลายของโปรตีนจะเกิดจากการที่โปรตีนสร้างอันตรกิริยากับน้ำ โดยจะมี

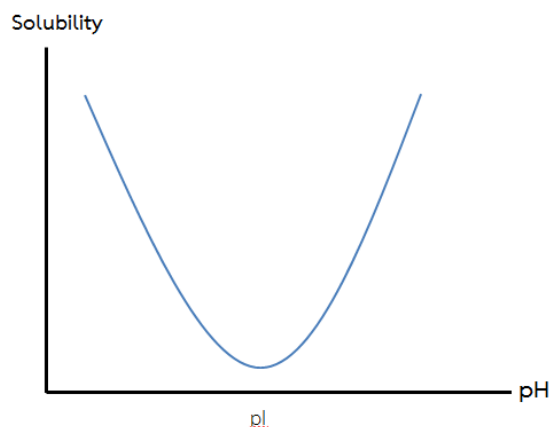
อันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องของอยู่สองชนิด คือ hydrophobic interaction อันตรกิริยาชนิดนี้จะเกิดระหว่างโปรตีนและโปรตีน ทำให้โปรตีนสามารถสร้างอันตรกิริยากับน้ำได้น้อยลง ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงลดลงเมื่ออันตรกิริยาชนิดนี้เพิ่ม และ ionic interaction ซึ่งจะเป็นอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำ เมื่ออันตรกิริยาชนิดนี้เพิ่ม ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Sikorski, 2006; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 2.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประจุสุทธิของโปรตีนกับ pH

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sikorski (2006)

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



รูปที่ 2.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการละลายของโปรตีนกับ pH

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sikorski (2006)

2.2.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

ความสามารถในการอุ้มน้ำจะส่งผลถึงเนื้อสัมผัสของอาหาร เช่น ทำให้อาหารมีความฉ่ำน้ำ และสามารถกักเก็บน้ำเมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ ไปได้ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำคือ ชนิด ขนาด และความมีขั้วของโปรตีนที่ส่งผลถึงการเกิดอันตรกิริยากับน้ำ จากงานวิจัยในโปรตีนจากคาคาโอ พบว่าเมื่อโปรตีนมีขนาดที่เล็กลงจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้มากขึ้น เนื่องจากเปปไทด์สายสั้นจะมีพื้นที่ที่ขบบน้ำมากกว่าเปปไทด์สายยาว นอกจากนี้ชนิดของโปรตีนมีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำเช่นเดียวกัน จากตารางที่ 2.3 แสดงถึงความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับน้ำของกรดอะมิโนแต่ละชนิด พบว่ากรดอะมิโนในโครงสร้างที่มีประจุจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีกว่า โดยถ้าสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีจะสามารถอุ้มน้ำได้ดีเช่นกัน (Damodaran et al., 2007; Cumby et al., 2008)

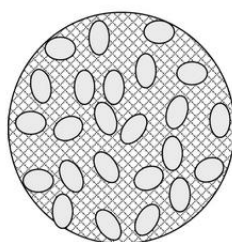
ตารางที่ 2.3 ความสามารถในการจับกับน้ำของกรดอะมิโน

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

ที่มา: Damodaran et al. (2007)

ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของโปรตีนจะส่งผลถึงเนื้อสัมผัสเช่นกัน โดยส่งผลถึงความเนียนของผลิตภัณฑ์ ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำมันมีลักษณะคล้ายคลึงกับความสามารถในการอุ้มน้ำ คือ ขนาด และความมีขั้วของโปรตีน แต่ปัจจัยที่มีผลกับความสามารถในการอุ้มน้ำมันมากที่สุดคือ

ความสามารถในการดักจับกับน้ำมันทางกายภาพ (physical entrapment) ซึ่งได้แสดงในรูปที่ 2.11 การดักจับน้ำมันทางกายภาพคือการตรึงน้ำมันโดยไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวอย่างกับน้ำมัน เช่น การตรึงไว้ที่ช่องว่างระหว่างตัวอย่าง ดังนั้นความหนาแน่นรวม (bulk density) จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งส่งผลถึงสมบัตินี้ เนื่องจากความหนาแน่นรวมจะบ่งชี้ถึงพื้นที่หรือช่องว่าง (void) ที่สามารถดักจับน้ำมันทางกายภาพได้ Mirmoghtadaie et al. (2009) ทำการทดลองตัดแปรโปรตีนจาก okara ด้วยการทำดีเอมิดีชัน พบว่าความสามารถในการอุ้มน้ำมันเพิ่มขึ้น โดยเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการดักจับน้ำมันทางกายภาพที่เพิ่มมากขึ้นมากกว่าผลจากการทำดีเอมิดีชัน

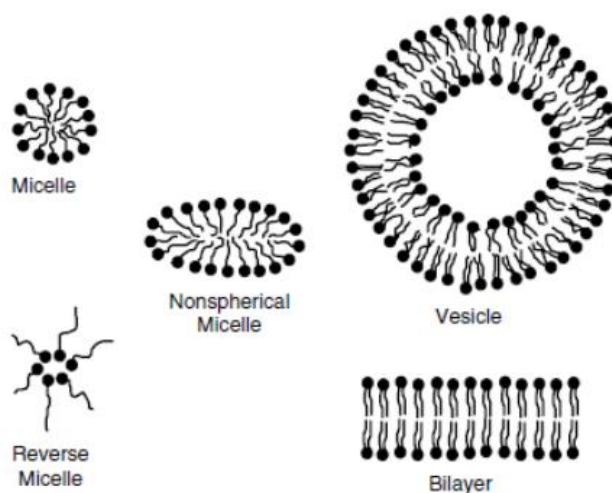


รูปที่ 2.10 การดักจับทางกายภาพ (physical entrapment)

ที่มา: Nedovic et al. (2001)

2.2.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นอิมัลชันทำให้สมบัติการเกิดอิมัลชันมีความสำคัญมากขึ้น สมบัติการเกิดอิมัลชันคือความสามารถของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในระบบอิมัลชันเพื่อให้อิมัลชันเกิดความเสถียร โปรตีนสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้เนื่องจากมีลักษณะเป็น amphiphilic คือประกอบไปด้วยบริเวณที่ชอบและไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถจัดโครงสร้างในลักษณะชั้นฟิล์มที่ครอบคลุมหนึ่งได้ ดังรูปที่ 2.12 อย่างไรก็ตาม การเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ โดยเฉพาะชนิดของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงความชอบและไม่ชอบน้ำ รวมถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอีกด้วย ชั้นฟิล์มของโปรตีนเกิดจากอันตรกิริยาสองกลุ่ม คือ hydrophobic interaction และ ionic interaction โดย hydrophobic interaction จะเกิดในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ หากเกิดอันตรกิริยานี้มากเกินไปจะทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน ซึ่งจะทำให้ชั้นฟิล์มไม่สมบูรณ์ แต่ถ้ามีค่า electrostatic repulsion ที่มากเกินไป หรือเกิด ionic interaction ได้ดี จะทำให้โปรตีนเกิดการผลักกันจนเกิดเป็นชั้นฟิล์มที่บางและไม่เสถียร จึงจำเป็นต้องสร้างความสมดุลระหว่างอันตรกิริยาทั้งสองซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ค่า HLB จะบ่งชี้ถึงอัตราส่วนของพื้นที่ที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของอิมัลซิไฟเออร์ชนิดนั้น ๆ ทำให้สามารถเลือกใช้อิมัลซิไฟเออร์ที่เหมาะสมกับระบบอิมัลชันนั้น ๆ (Pearce and Kinsella, 1978; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 2.11 การจัดเรียงตัวของอิมัลซิไฟเออร์ในรูปแบบต่าง ๆ

ที่มา: McClements (2015)

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

Lei et al. (2015) ศึกษาผลของการดัดแปรกลูเตลินที่สกัดจากเมล็ด *Akebia trifoliata* var. *australis* ด้วยวิธีดีเอมิเดชัน พบว่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดมาลิกมีค่าเพิ่มขึ้นในสภาวะกรด แต่มีค่าลดลงในสภาวะต่าง ในขณะที่กลูเตลินที่ผ่านการดัดแปรด้วยกรดซิตริกมีค่า EAI เพิ่มขึ้นทั้งในช่วงกรดและด่าง เมื่อพิจารณาค่า ESI ปรากฏว่าการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันทำให้ความเสถียรของอิมัลชันลดลงโดยเฉพาะเมื่อดัดแปรด้วยกรดซิตริก

2.2.2.4 สมบัติการเกิดโฟม

สมบัติการเกิดโฟมจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับสมบัติการเกิดอิมัลชัน โดยสมบัติการเกิดโฟมคือความสามารถในการห่อหุ้มอากาศที่บริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว และคงรูปโฟมดังกล่าวไว้ได้ ในขณะที่อิมัลชันคือการสร้างชั้นฟิล์มห่อหุ้มของเหลว แต่อย่างไรก็ตาม สมบัติการเกิดโฟมจะมีอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด คือ hydrophobic interaction และ ionic interaction เช่นเดียวกัน โดย hydrophobic interaction จะทำให้เกิดการสร้างชั้นฟิล์มที่ดีซึ่งถือเป็นการเพิ่มความสามารถในการเกิด

โฟม ในขณะที่ hydrophobic interaction จะทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและโปรตีนซึ่งเป็นการเพิ่มความหนืดของฟิล์มและทำให้โฟมที่เกิดขึ้นมีความเสถียร ทำให้ชนิดและการจัดเรียงตัวของโปรตีนเป็นปัจจัยที่สำคัญของการเกิดโฟม นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีนยังเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลถึงสมบัติการเกิดโฟมเนื่องจากโปรตีนที่ละลายได้ดีจะทำให้ความหนืดของชั้นฟิล์มเพิ่มขึ้น โฟมที่ได้จึงมีความเสถียร (ศุภกิจจิตต์ เอี่ยมนเรพร, 2551; Damodaran et al., 2007)

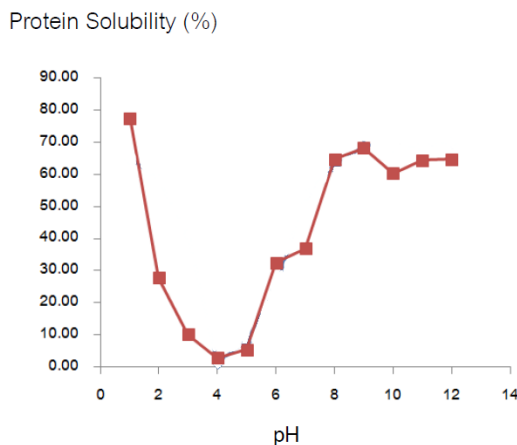
สมบัติการเกิดโฟมจะพิจารณาจากความสามารถในการเกิดโฟม (foaming capacity, FC) และความเสถียรของโฟมที่เกิดขึ้น (foaming stability, FS) การดัดแปรโปรตีนส่งผลต่อสมบัติการเกิดโฟม เช่น การดัดแปรโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิธีดีเอมิดชันจะทำให้ FC มีค่าเพิ่มขึ้น แต่ความเสถียรของโฟมมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Suppavorasatit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

2.2.2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนมะพร้าวอย่างจำกัด โดยมีการศึกษาถึงสมบัติเชิงหน้าที่แค่บางประการ เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับน้ำและน้ำมัน และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น

2.2.2.5.1 ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวจะขึ้นกับวิธีการสกัดโปรตีน แต่ pH ประมาณ 4.0 จะเป็นสถานะที่โปรตีนสามารถละลายได้น้อยที่สุด ซึ่งถือเป็น pI ของโปรตีนมะพร้าว Onsaard et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดวิธีที่แตกต่างกัน คือ การสกัดด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด และการสกัดโปรตีนด้วยการใช้ความร้อนและความเย็น (freeze-warm cycle) พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 7.0 ที่สกัดด้วยการใช้ความร้อนและความเย็นสูงกว่า (45 %) การสกัดด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด (20%) นอกจากนี้ Thaiphanit and Anprung (2013) ได้ทำการสกัดโปรตีนมะพร้าวด้วยการตกตะกอนด้วยกรด เช่นเดียวกัน พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่เปลี่ยนแปลงไปตาม pH เป็นดังรูปที่ 2.13 โดยมีความสามารถในการละลายต่ำในช่วง pH = 3.0-7.0 และสามารถละลายได้ดีต่ำสุดที่ pH = 4.0 หรือที่ pI



รูปที่ 2.12 pH solubility profile ของโปรตีนมะพร้าว

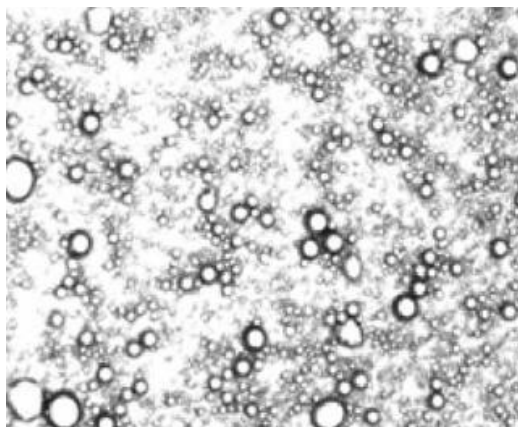
ที่มา: Thaiphanit and Anprung (2013)

2.2.2.5.2 ความสามารถในการจับกับน้ำและน้ำมัน

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

2.2.2.5.3 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน

อิมัลชันที่เกิดจากการใช้โปรตีนมะพร้าวเป็นอิมัลซิไฟเออร์มักเป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) โดยความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับชนิดของน้ำมันที่ใช้ทำอิมัลชันด้วย เช่น Thaiphanit and Anprung (2016) ได้ศึกษาการเกิดอิมัลชันของโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมัน 2 ชนิด คือ น้ำมันมะกอก และน้ำมันดอกทานตะวัน พบว่า ค่า EAI ของอิมัลชันทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ $40 \text{ m}^2/\text{g}$ ในขณะที่ค่า ESI มีความแตกต่างกัน โดยอิมัลชันที่ใช้น้ำมันมะกอกมีค่า ESI = 120 min และอิมัลชันที่ใช้น้ำมันดอกทานตะวันมีค่า ESI = 15 min นอกจากนี้ Onsaard et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการทำอิมัลชันจากโปรตีนมะพร้าวโดยใช้น้ำมันข้าวโพด พบว่าอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีลักษณะดังรูปที่



รูปที่ 2.13 Photomicrographs ของอิมัลชันจากโปรตีนมะพร้าวและน้ำมันข้าวโพด

ที่มา: Onsaard et al. (2006)

2.2.3 สมบัติการจับกลิ่นรสของโปรตีน

ปัจจุบัน อาหารประเภทโปรตีนสูงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากผู้บริโภคมีความต้องการที่จะลดอาหารประเภทไขมันและน้ำตาลสูงลง แต่อาหารประเภทโปรตีนสูงมักมีปัญหาเกี่ยวกับการจางลงของกลิ่นรส กล่าวคือเมื่อมีการเติมสารให้กลิ่นรส (flavor compound) ลงไปในผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โปรตีนจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารให้กลิ่นรสได้ (Guichard, 2002; Suppavorasatit และ Cadwallader, 2010) ทำให้ปริมาณกลิ่นรสที่ผู้บริโภคสามารถรับรู้ได้ขณะบริโภค ลดลงหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่งการที่กลิ่นรสของอาหารจางลงอาจส่งผลให้การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้น ๆ ลดลงด้วย (Gkionakis และคณะ, 2007) การเกิดอันตรกิริยาหรือการจับกันระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ คือปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ (reversible) และแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของโปรตีนและสารให้กลิ่นรสแต่ละชนิด (Kühn และคณะ, 2008) ปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ เช่นการเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) พันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) และ พันธะไอออนิก (ionic bond) ส่วนปฏิกิริยาแบบผันกลับไม่ได้ เป็นการเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของสารให้กลิ่นรสกับหมู่เอมีน (amine group) ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของโปรตีน หรือเรียกอีกอย่างว่าการเกิด Schiff base (Schiff base) (Kühn และคณะ, 2006; Suppavorasatit และ Cadwallader, 2012) ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาแบบผันกลับไม่ได้ระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน จะทำให้เกิดปัญหากลิ่นรสที่เติมลงไปในการจางลง (flavor fade) (Suppavorasatit และ Cadwallader, 2012) ซึ่งจะทำให้กลิ่นรสโดยรวมของอาหารเปลี่ยนแปลงไป อันอาจส่งผลให้เกิดปัญหากับผู้ผลิตอาหารประเภทโปรตีนสูงในการเลือกชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของสารให้กลิ่นรสที่จะเติมลงไปในการนั้น ๆ

อันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีน การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอ็นเอมิเตชัน จากการศึกษาพบว่า การดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอ็นเอมิเตชันนั้น นอกจากจะสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้ดีขึ้นได้เช่น ความสามารถในการละลาย (solubility) การเกิดโฟม (foaming capacity) และการเกิดอิมัลชัน (emulsification properties) (Hamada, 1994; Miwa และคณะ, 2010; Liu และคณะ, 2011; Suppavorasatit และคณะ, 2013; Jiang และคณะ, 2015) แล้ว ยังสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านการจับกลิ่นรส (flavor-binding property) ระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวม (overall flavor binding affinity) ระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนลดลงอีกด้วย โดยพบว่าสามารถทำให้ชนิดของพันธะระหว่างโปรตีนและสารให้กลิ่นรส (vanillin และ maltol) เปลี่ยนจาก covalent bond ไปเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงน้อยลง เช่น hydrogen bonding เป็นต้น (Suppavorasatit และ Cadwallader, 2012; Suppavorasatit และคณะ, 2013)

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

หางกะทิจากอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบสกัดเย็น (วิสาหกิจชุมชนกลุ่ม 100 พันมะพร้าวไทย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์)

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

น้ำมันปาล์ม ตรามรกต (บริษัท มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด)

3.1.2 สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) (A.R.)

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) (A.R.)

กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) (A.R.)

กรดบอริก (boric acid) (A.R.)

Kjeldahl tablet (A.R.)

Methyl red (A.R.)

Methylene blue (A.R.)

เอทานอล (ethanol) (A.R.)

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

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

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

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

กรดซิตริก (citric acid) (A.R.)

Trichloroacetic acid (TCA) (A.R.)

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

3.1.3 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S, Switzerland)
Refrigerate centrifuge (Hermle รุ่น Z36HK, Germany)
pH meter (Mettler Toledo รุ่น Sevencompact, Switzerland)
Digester (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)
Scrubber (Buchi รุ่น B-414, Switzerland)
Distillation Unit (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)
Freeze dryer (Heto Drywinner, Thermo Fisher Scientific, Inc., US)
Test sieve 20 Mesh (Endecotts, UK)
Water bath (GFL รุ่น 1083, Germany)

Hot air oven (GenLab รุ่น PRIME, UK)

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

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

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

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

Incubator (Heraeus รุ่น B5042, Germany)

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

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

Microwave (LG รุ่น MC766YS, South Korea)

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

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

การสกัดโปรตีนจากมะพร้าวดัดแปลงจากวิธีของ Thaiphonit and Anprung (2013) โดยสกัดโปรตีนจากหางกะทิโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N ที่ pH ของโปรตีนมะพร้าว (pH = 3.9) แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,900xg เป็นระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 150 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH = 3.9 และปั่นเหวี่ยงซ้ำทั้งหมด 4 รอบ หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Kjeldahl (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.2) โดยใช้ conversion factor เป็น 6.25 (AOAC, 2000) โปรตีนที่ได้จะต้องมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงถือว่าเป็น protein concentrate จากนั้นทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีนและไขมัน (แสดงวิธีในภาคผนวก ก.1-ก.3) บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 Mesh จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในถุงบรรจุแบบทึบแสง จนกว่าจะทำการศึกษาในขั้นถัดไป

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส

3.2.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง

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

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองในการศึกษาการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยวิธีดีแอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (ค่าสมมติและค่าจริง)

Design point	code			actual value		
	x_1	x_2	x_3	E/S ratio (unit/ g protein)	T (°C)	pH
1	-1	-1	-1	14	44	5.8
2	1	-1	-1	41	44	5.8
3	-1	1	-1	14	56	5.8
4	1	1	-1	41	56	5.8
5	-1	-1	1	14	44	8.2
6	1	-1	1	41	44	8.2
7	-1	1	1	14	56	8.2
8	1	1	1	41	56	8.2
9	-1.68	0	0	5	50	7
10	1.68	0	0	50	50	7
11	0	-1.68	0	22.5	40	7
12	0	1.68	0	22.5	60	7
13	0	0	-1.68	22.5	50	5

14	0	0	1.68	22.5	50	9
15	0	0	0	22.5	50	7
16	0	0	0	22.5	50	7
17	0	0	0	22.5	50	7
18	0	0	0	22.5	50	7
19	0	0	0	22.5	50	7
20	0	0	0	22.5	50	7

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

3.2.2.1.1 Degree of deamidation (ดัดแปลงวิธีจาก Suppavorasatit et al. (2011))

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

3.2.2.1.2 Degree of hydrolysis (ดัดแปลงจากวิธีของ Cabra et al. (2007))

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

3.2.2.1.1

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

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

เมื่อ $\hat{y}$ คือ ตัวแปรตาม (DD และ DH)

$x_{i,j}$ คือ ตัวแปรต้น (อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน อุณหภูมิ และ pH)

β_0 คือ ค่าคงที่

β_i คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเชิงเส้น

β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสอง

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

การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) ทำการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวในสภาวะต่าง ๆ จำนวน 6 สภาวะ แล้ววิเคราะห์ค่า DD และ DH ของตัวอย่าง จากนั้นพิจารณาค่า DD และ DH จากการทดลองเทียบกับค่าที่ได้จากสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชัน

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

3.2.2.2.1 Degree of deamidation

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.1

3.2.2.2.2 Degree of hydrolysis

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.2

3.2.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

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

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

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่ระยะเวลาต่าง ๆ และตัวอย่างควบคุมดังนี้

3.2.3.1.1 Degree of deamidation

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.1

3.2.3.1.2 Degree of hydrolysis

วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.2.2.1.2

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

3.2.3.2 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าวศึกษาในโปรตีนตัวอย่าง 5 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร ตัวอย่างโปรตีนควบคุม ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมง

3.2.3.2.1 สมบัติการละลายและ pH solubility profile

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

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

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

เมื่อ PS คือ ความสามารถในการละลายของโปรตีน

PN คือ ปริมาณโปรตีนที่ละลาย

TP คือ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

วางแผนการทดลองแบบ 3x5 Factorial in completely randomized designs (CRD) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.3.2.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

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

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

เมื่อ LHC คือ WHC หรือ OHC

Pi คือ น้ำหนักโปรตีนเริ่มต้น

Pf คือ น้ำหนักโปรตีนหลังปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13600xg

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

3.2.3.2.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

วิเคราะห์ค่า emulsifying activities index (EAI) และค่า emulsifying stability index (ESI) โดยดัดแปลงวิธีของ Pearce and Kinsella (1978) ละลายโปรตีนจากมะพร้าว 0.5% (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นผสมสารละลายโปรตีน 30 มิลลิลิตร กับน้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็ว 22,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เจือจางอิมัลชันที่เวลา 0 และ 10 นาทีด้วยอัตราส่วนอิมัลชัน 100 ไมโครลิตรต่อสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 0.1%(w/v) 10 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรและคำนวณหาค่า EAI และ ESI จากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

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

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

เมื่อ	T	คือ ค่าความขุ่น
	A_0	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้น
	A_{10}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 10 นาที
	c	คือ น้ำหนักโปรตีนต่อปริมาตร
	Φ	คือ สัดส่วนของน้ำมันต่ออิมัลชันโดยปริมาตร
	t	คือ ระยะเวลา

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

3.2.3.2.4 สมบัติการเกิดโฟม

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

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

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

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

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

3.2.3.2.5 Molecular weight distribution

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

3.2.3.2.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

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

3.2.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลืนรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

3.2.4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

การสกัดโปรตีนจากหางกะทิที่ดัดแปลงจากวิธีของ Thaiphani and Anprung (2013) ทำโดยปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N ให้เป็น 3.9 เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนตามวิธีที่อธิบายแล้วในขั้นต้น จากนั้นสกัดไขมันออกด้วยวิธี soxhlet (AOAC, 2000) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) โดยใช้ conversion factor เป็น 6.25 (Thaiphani และคณะ, 2016) วัดปริมาณความชื้นของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดได้ (AOAC, 2000) ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 Mesh และเก็บรักษาตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ที่ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปร

ละลายโปรตีนมะพร้าวที่เตรียมในข้อ 3.2.4.1 ในโซเดียมฟอสเฟตบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 M (pH = 7) อัตราส่วน 1:3 กวนผสมตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วเติมเอนไซม์ PG ให้มีความเข้มข้น 36 U/g protein (สุพิชชา, 2559) กวนผสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °C และคงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ค่า %DD และ %DH ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บรักษาตัวอย่างโปรตีนที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นถัดไป

3.2.4.3 Molecular weight distribution

Molecular weight distribution ของโปรตีนศึกษาโดยการทำตามวิธีในข้อ 3.2.3.2.5

3.2.4.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

ศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรโดยวิธีดีเอมิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร โดยสารให้กลิ่นรสที่เลือกมาศึกษาได้แก่วานิลลิน (vanillin) ซึ่งมีโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบ

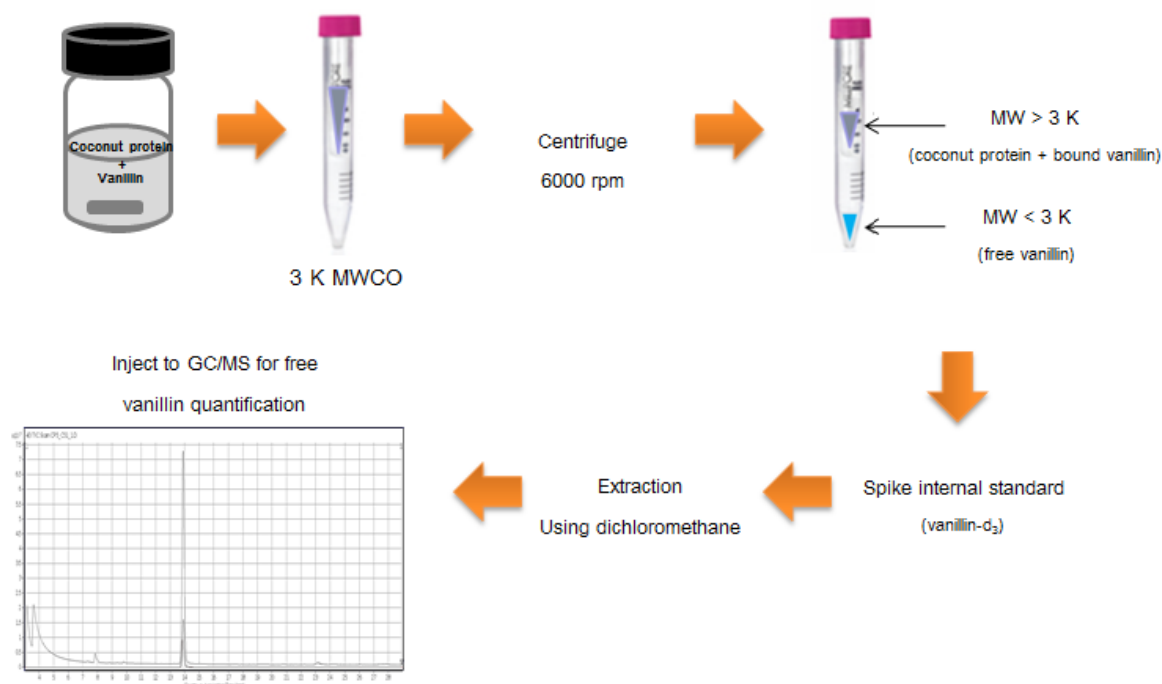
3.2.4.4.1 การแยกและหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ (free [unbound] flavor compound)

การแยกและหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ ทำตามวิธีของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) แสดงในรูปที่ 3.1 โดยนำสารละลายผสมระหว่างโปรตีนและสารให้กลิ่นรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 3 mL ใส่ใน Amicon Ultra-4 centrifugal filter tube ที่มี molecular weight cutoff เท่ากับ 3 K (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill Co., IRELAND) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 40 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (เช่น 5, 15 และ 25 °C) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง (permeate) 0.5 mL มาเติม vanillin-d₃ (internal standard; i.s.) ที่มีความเข้มข้น 920 ppm ปริมาตร 10 µL ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปสกัดด้วย dichloromethane ปริมาตร 0.25 mL นำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) และคำนวณหาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระจากสูตรดังแสดงในสมการที่ 3.8

$$\text{Mass of flavor compound} = \text{mass of i.s.} \times f_i \times \frac{\text{peak area of flavor compound}}{\text{peak area of i.s.}} \quad (3.8)$$

เมื่อ f_i คือ MS response factor

i.s. คือ internal standard



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการแยกและหาปริมาณวานิลลินอิสระ

ดัดแปลงจาก: Suppavorasatit และ Cadwallader (2012)

3.2.4.4.2 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

การวิเคราะห์ปริมาณวานิลลินอิสระ ตามวิธีของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) ทำโดยฉีดตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 2 μL ลงในเครื่อง GC-MS โดยใช้ hot splitless mode (250°C) ซึ่งต่อกับคอลัมน์ชนิด DB-WAX (30 m x 250 μm i.d. x 0.25 μm film thickness) ตั้งค่าโปรแกรมของ oven ให้เพิ่มอุณหภูมิจาก 150°C ไป 220°C ที่อัตรา 10 °C/min โดยมี initial และ final holding time เป็น 2 และ 20 นาทีตามลำดับ สภาวะของ mass selective detector (MSD) เป็นดังนี้ อุณหภูมิของ transfer line คือ 250°C; ionization voltage คือ 70 eV; ช่วงของ mass (scan mode) คือ 35-400 amu; scan rate คือ 4.2 cycle/s

3.2.4.4.3 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส (flavor binding equilibration time)

ตามวิธีของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 3 % (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M (pH = 7.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นเติมสารละลายวานิลลินให้มีความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ในขวดแก้วที่ผ่านการ

กำจัดความมีขี้ขนาด 20 mL จากนั้นปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มและกวนผสมตลอดเวลาที่อุณหภูมิคงที่ (5, 15 และ 25 °C) ชักตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระ (ตามวิธีในข้อ 3.2.4.4.1) พิจารณาเวลาที่จุดสมดุล ของแต่ละอุณหภูมิจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระกับเวลาที่อุณหภูมิคงที่นั้น ๆ

3.2.4.4.4 การหาสมบัติในการจับกลิ่นรส (flavor binding properties)

หา binding properties ตามวิธีของ Li และคณะ (2000) และ Chobpattana และคณะ (2002) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 3 % (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M (pH = 7.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน จากนั้นเติมสารละลายวานิลลินให้มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80, และ 100 µg/mL ในขวดแก้วที่ผ่านการกำจัดความมีขี้ขนาด 20 mL จากนั้นปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มและกวนผสมที่อุณหภูมิคงที่ที่ 5 °C จนถึงจุดสมดุล หาปริมาณสารให้กลิ่นรสอิสระที่จุดสมดุล จากนั้นทำการทดลองที่อุณหภูมิคงที่อีก 2 อุณหภูมิ (15 และ 25 °C)

คำนวณหาปริมาณของพื้นที่ที่โปรตีนจับกับสารให้กลิ่นรส (number of binding site, n) และค่าคงที่ของการจับ (binding constant, K) จากกราฟ Klotz plot ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของจำนวนโมลของสารให้กลิ่นรสที่ถูกจับต่อจำนวนโมลของโปรตีนทั้งหมด ($\frac{1}{V}$) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระ ($\frac{1}{[L]}$) โดย Klotz plot แสดงในสมการที่ 3.9

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{n} + \frac{1}{Kn [L]} \quad (3.9)$$

เมื่อ V คือ จำนวนโมลของสารให้กลิ่นรสที่ถูกจับต่อจำนวนโมลของโปรตีนทั้งหมด
 $[L]$ คือ ความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสอิสระ

3.2.4.4.5 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic parameters)

คำนวณค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์จากค่าคงที่ของการจับกัน (K) ที่ได้ด้วยวิธีจากข้อ 3.2.4.4.4

3.2.4.4.5.1 ค่าพลังงานอิสระที่ใช้ในการจับกัน (Gibb's free energy of binding, ΔG°)

คำนวณได้จากสมการที่ 3.10

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K \quad (3.10)$$

เมื่อ R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส ($1.9859 \text{ calK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (absolute temperature; Kelvin, K)

3.2.4.4.5.2 ค่าเอนทัลปีของการจับกัน (enthalpy of binding, ΔH°) คำนวณได้จากสมการ van't Hoff ดังแสดงในสมการที่ 3.11

$$\Delta H^\circ = \frac{-R d \ln K}{d(1/T)} \quad (3.11)$$

เมื่อ K คือ ค่าคงที่ในการจับกัน

3.2.4.4.5.3 ค่าเอนโทรปีของการจับกัน (entropy of binding, ΔS°) คำนวณได้จากสมการที่ 3.12

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad (3.12)$$

3.2.4.4.6 การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

ศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีน โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น (odor detection thresholds) ตามวิธีของ ASTM E697-04 (2004) โดยเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรและไม่ผ่านการดัดแปร เตรียมตัวอย่างโดยละลายโปรตีนมะพร้าวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M (pH 7.0) ในดมกลิ่น (sniff bottle) จากนั้นเติมสารให้กลิ่นรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ความเข้มข้น (แสดงในภาคผนวก ฉ.1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้งไว้ข้ามคืน ก่อนทดสอบทางประสาทสัมผัส ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในการทดสอบใช้ผู้ทดสอบจำนวน 27 คน (ชายและหญิงอายุระหว่าง 20-60 ปี) โดยใช้การทดสอบแบบ three alternative forced choice (3-AFC) โดยผู้ทดสอบดมกลิ่นตัวอย่าง 6 ชุดที่มีความเข้มข้นของสารให้กลิ่นรสแตกต่างกัน ชุดละ 3 ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดตัวอย่างจะประกอบไปด้วยตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารให้กลิ่นลงไป (blank) 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีการเติมสารให้กลิ่นลงไป 1 ตัวอย่าง แล้วให้ผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างที่สามารถรับรู้กลิ่นได้เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น โดย

ลำดับการดม เริ่มจากชุดที่มีความเข้มข้นของสารให้กลิ่นต่ำไปสูง จากนั้นคำนวณค่า best estimate threshold (BET) โดยคำนวณและแสดงค่าเป็นค่า BET ของกลุ่มผู้ทดสอบ (เฉลี่ยจากผู้ทดสอบแต่ละคน)

บทที่ 4

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดโปรตีนจากมะพร้าว

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

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ

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

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีเอมิเดชันของโปรตีนมะพร้าวด้วยโปรตีนกลูตามีน

ในการดัดแปรโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีนและเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน (E/S ratio) อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา ตัวทำละลายและสิ่งเจือปน เช่น ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยปัจจัยที่นำมาศึกษาคือ E/S ratio อุณหภูมิ pH และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา (Whitaker, 1993)

4.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำดีแอมิเดชันโดยใช้วิธีผิวตอบสนอง

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

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

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

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

เมื่อ	x_1	คือ E/S ratio
	x_2	คือ อุณหภูมิ
	x_3	คือ pH

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

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

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

วิธีแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างผิวเป็นการแสดงผลออกมาจากการพิจารณาปัจจัยหลักที่ 2 ปัจจัย จึงต้องเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญ 2 ปัจจัยมาสร้างกราฟเพื่อพิจารณาหาสภาวะที่เหมาะสม โดยคัดเลือกจากปัจจัยหลักซึ่งได้แก่ E/S ratio อุณหภูมิ และ pH สำหรับค่า DD พบว่า ปัจจัยหลักทั้งสามไม่ได้มีผลต่อ DD อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จึงต้องพิจารณาปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่า DH ร่วมด้วย พบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า DH อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ E/S ratio ถือเป็นปัจจัยที่ไม่ส่งผลต่อค่า DH มากที่สุด จึงกำหนดให้ค่า E/S ratio เป็นค่าคงที่

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

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

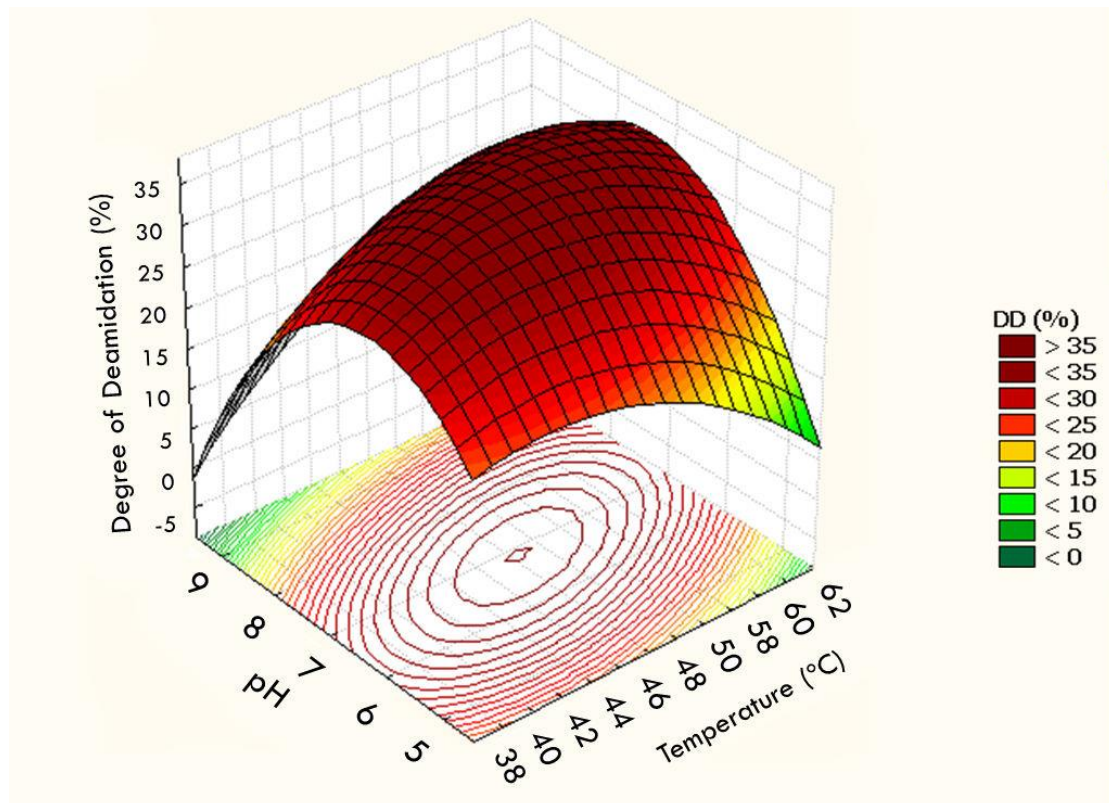
ค่าคงที่ของอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนพิจารณาจากค่าที่ทำให้ได้ DD สูงที่สุดคือ 36 unit/g protein จึงนำไปแทนในตัวแปร x_1 ในสมการที่ 4.1 และ 4.2 และได้ออกมาเป็นสมการที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ สมการการทำนาย DD ที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีนมีค่า 36 unit/g protein แสดงในสมการที่ 4.3 มีค่า r^2 = 0.729 และมีค่า lack of fit = 0.894 ซึ่งถือว่ามีความเหมาะสม ส่วนสมการทำนายค่า DH แบบสองปัจจัย (สมการที่ 4.4) มีค่า r^2 = 0.807 และมีค่า lack of fit = 0.403 ซึ่งถือว่ามีความเหมาะสมเช่นกัน

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

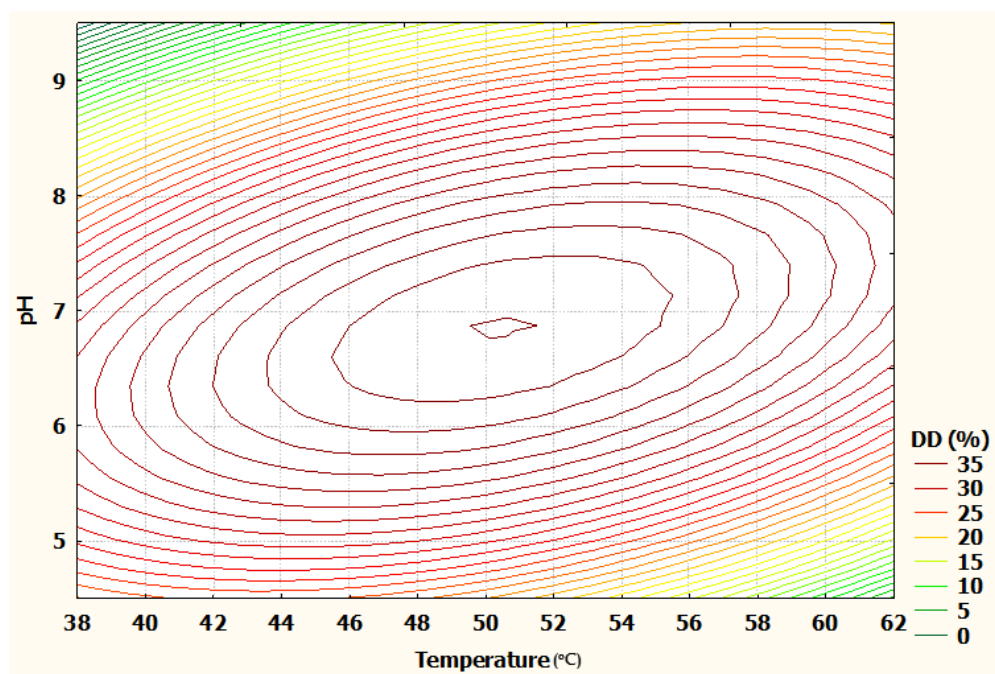
$$\begin{aligned} \text{DH (\%)} = & 24.594 - 0.8791x_2 - 0.4317x_3 \\ & + 0.012x_2^2 + 0.093x_3^2 - 0.024x_2x_3 \end{aligned} \quad (4.4)$$

เมื่อ x_2 คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
 x_3 คือ pH

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



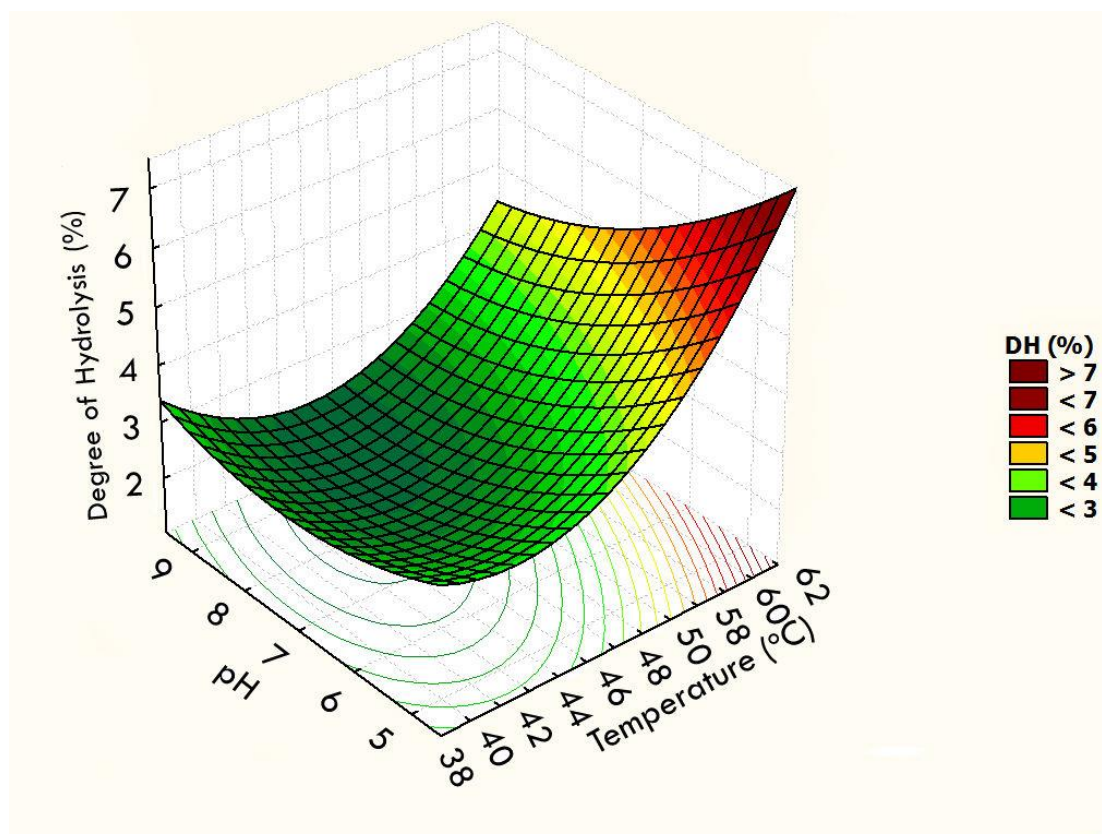
รูปที่ 4.1 surface plot จากสมการ degree of deamidation ($E/S = 36$ unit/g protein)



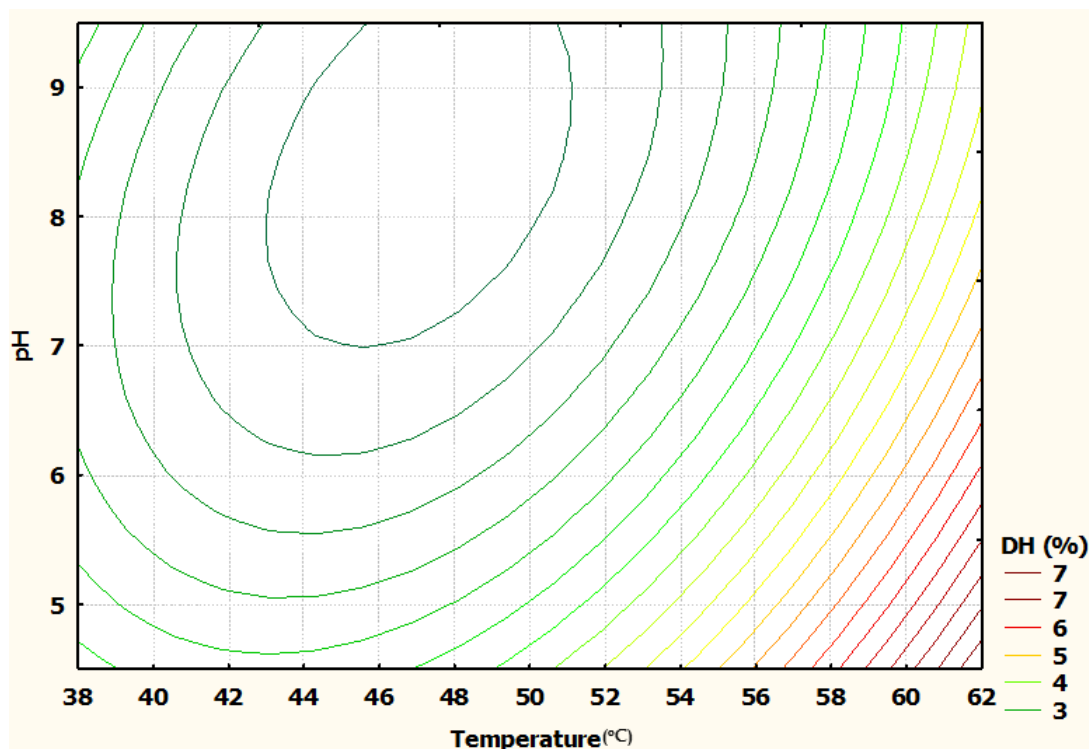
รูปที่ 4.2 contour plot จากสมการ degree of deamidation ($E/S = 36$ unit/g protein)

การแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวโดยมี E/S ratio เป็นค่าคงที่ที่ 36 unit/g protein ของสมการการทำนาย DH (สมการที่ 4.4) นำเสนอในรูปแบบ surface และ contour plot ดังแสดงในรูปที่

4.3 และ 4.4 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา DH มีค่าลดลงเล็กน้อยจนมีค่าต่ำสุดคือ มีค่าน้อยกว่า 3% ที่ช่วงอุณหภูมิ 46-50 องศาเซลเซียส และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มค่า pH พบว่า DH มีค่าลดลงเล็กน้อย จนมีค่าต่ำที่สุดที่ช่วง pH = 7.0-9.0 อย่างไรก็ตามค่า pH ถือเป็นปัจจัยที่มีผลน้อย เนื่องจากมีค่า p-value สูง (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544) เมื่อ pH มีการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้ DH มีค่าที่เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย

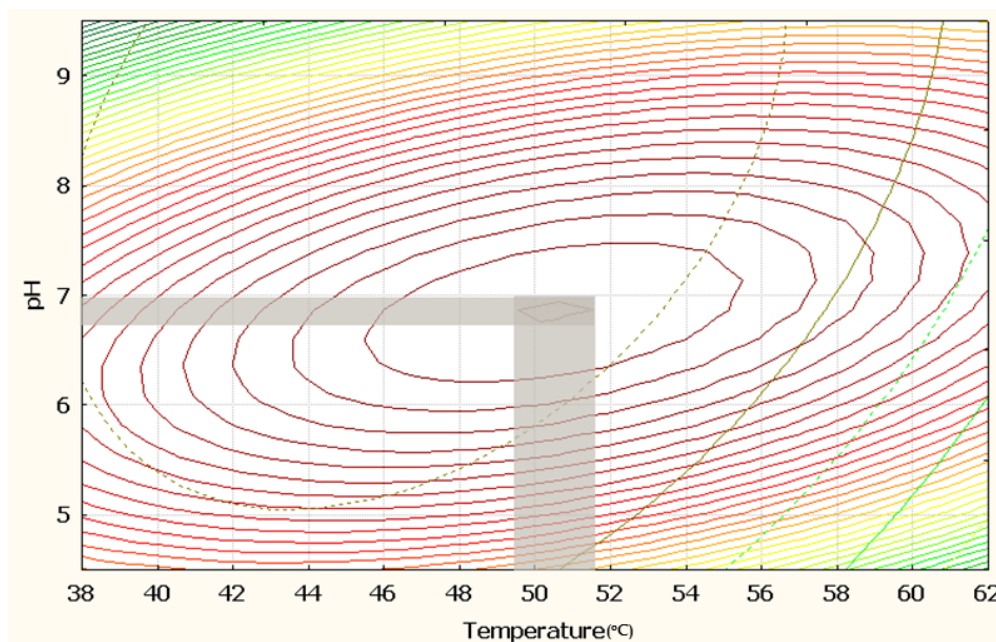


รูปที่ 4.3 surface plot จากสมการ degree of hydrolysis ($E/S = 36$ unit/g protein)



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

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



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

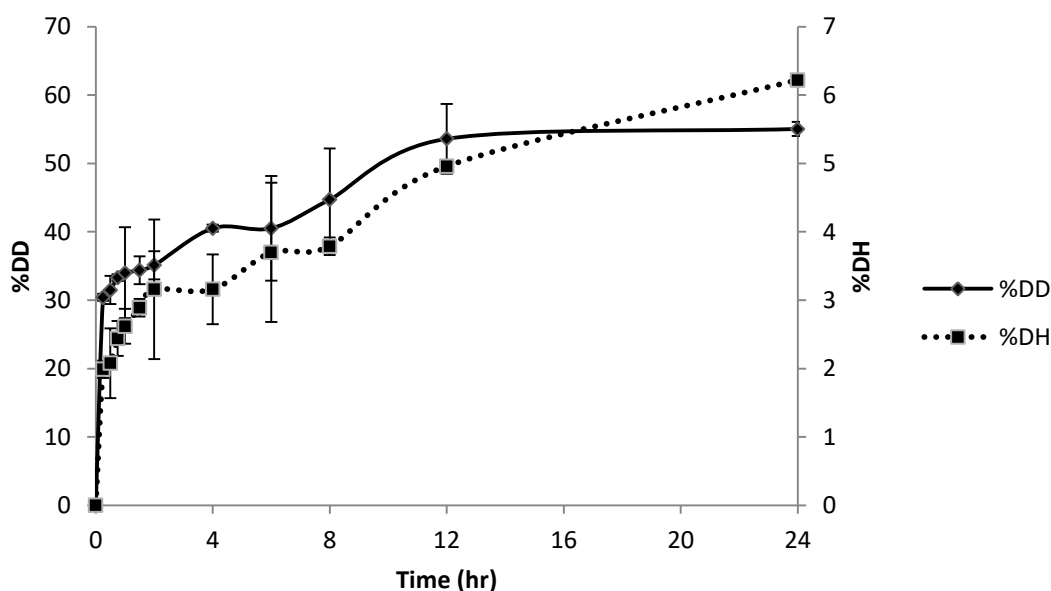
การตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) พบว่า ค่า DD และ DH ที่ได้จากการทดลอง ไม่มีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากการคำนวณจากสมการ

4.2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีเอดัมเดชัน

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

เมื่อพิจารณาค่า DH ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรในรูปที่ 4.6 พบว่าค่า DH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาโดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3% ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และที่ระยะเวลาการดัดแปร 24 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่า 6% นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ เช่น การให้ความร้อน หรือการที่อาจมีเอนไซม์ที่เจือปนในเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสที่นำมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากเป็นเอนไซม์ทางการค้า จึงมีความเป็นไปได้ที่

จะมีโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) ตัวอื่นปนอยู่ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ในส่วนของโปรตีนมะพร้าวที่สกัดมาดัดแปรนั้น ไม่ได้มีขั้นตอนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดั้งเดิมภายในมะพร้าว จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปร (Panicker et al., 2009; Suppavorasatit et al., 2011)



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

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

4.3 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากมะพร้าว

เนื่องจากการดัดแปรเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเป็นการดัดแปรระดับหลอดทดลอง แต่การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ต้องมีการขยายขนาดการผลิต ค่า DD และ DH จึงมีความแตกต่างจากการทำในปริมาณน้อย ผลของการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าตัวอย่างควบคุมมี DD = 10.46% โปรตีนมะพร้าวที่ถูกดัดแปรโดยวิธีดีเอมิเดชันเป็นระยะเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมงมีค่า DD = 32.21, 42.57 และ 49.61% ตามลำดับ ทั้งนี้ค่า DD ที่มีความแตกต่างจากการทดลองในข้อ 4.2.2 เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารตั้งต้นซึ่งจากเดิมใช้สารละลายโปรตีน

ความเข้มข้น 10 mg/ml เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น 200 mg/ml ซึ่งส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไปด้วย ส่วน DH ของตัวอย่างควบคุมมีค่า 5.01% ในขณะที่โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 และ 12 ชั่วโมงมีค่า DH = 2.50, 5.23 และ 5.58% ตามลำดับ ซึ่งค่า DH ที่สูงกว่าในข้อ 4.2.2 เป็นผลมาจากปริมาณสารตั้งต้นที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เอนไซม์อื่น ๆ ที่เจือปนมาสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน (Whitaker, 1993; Suppavorasatit et al., 2011)

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

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

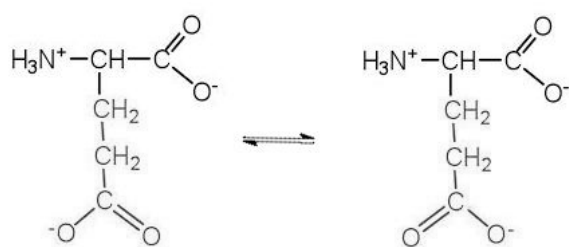
*Control คือ โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการแช่ใน buffer ที่ pH = 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงโดยไม่ใช้เอนไซม์ แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.3.1 สมบัติการละลาย

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติที่สำคัญของโปรตีนสมบัติหนึ่ง นอกจากจะเป็นสมบัติที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการนำไปใช้งานแล้ว ยังส่งผลต่อสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีนอีกด้วย เช่น สมบัติการเกิดอิมัลชันและการเกิดโฟม เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 3.0, 5.0 และ 7.0 แสดงในตารางที่ 4.5 – 4.7 ตามลำดับ การละลายของโปรตีนที่ pH = 7.0 มีค่าสูงสุดคือมีค่ามากกว่า 66% และมีค่าต่ำสุดที่ pH = 5.0 คือมีค่าน้อยกว่า 25% การที่โปรตีนจากมะพร้าวมีความสามารถในการละลายน้อยที่ pH = 5.0 เป็นผลมาจากเป็น pH ที่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กตริก (pI) ของมะพร้าวซึ่งมีค่าประมาณ 3.9-4.0 นอกจากนี้ในช่วง pH = 4.0-6.0 ยังเป็นช่วงที่โปรตีนมะพร้าวมีพฤติกรรมการละลายต่ำซึ่งพบผลเช่นเดียวกันในงานวิจัยของ Thaiphantit and Anprung (2013) ที่ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH ต่าง ๆ พบว่าที่ pH = 5.0 ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวต่ำกว่าที่ pH = 3.0

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายในแต่ละช่วง pH พบว่า ที่ pH = 3.0 (ตารางที่ 4.5) ตัวอย่างควบคุมมีความสามารถในการละลายต่ำ (42.92 %) กว่าตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญซึ่งเป็นผล

จากการใช้ความร้อนในการเตรียมตัวอย่าง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนมะพร้าวกลุ่มกลอบูลินซึ่ง (Kwon et al., 1996) จึงทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนบางส่วน ทำลายอันตรกิริยาทั้งภายในและภายนอกโมเลกุล โปรตีนจึงเกิดการจัดเรียงตัวใหม่และส่งผลให้ surface hydrophobicity มีค่าเพิ่มขึ้น อันตรกิริยาภายในโปรตีนจึงเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเกิดอันตรกิริยากับน้ำลดลง ความสามารถในการละลายจึงลดลง นอกจากนี้โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการทำดีเอมิเดชันมีความสามารถในการละลายสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม เนื่องจากดีเอมิเดชันจะเปลี่ยนกลูตามีนให้เป็นกลูตามิกแอซิดซึ่งมีความเสถียรในโครงสร้างที่เป็นประจุรูปที่ 4.7 และโครงสร้างนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดี ความสามารถในการละลายของโปรตีนจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Hamada, 1992; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 4.7 โครงสร้างประจุของกลูตามิกแอซิด
ที่มา: ดัดแปลงจาก Hamada (1992)

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 3.0

Treatment	Solubility (%)
Untreated	54.90 ^a ± 1.79
Control	42.92 ^b ± 4.05
15 min	51.72 ^a ± 2.66
6 h	56.11 ^a ± 7.01
12 h	51.85 ^a ± 4.17

a, b, c ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.6 แสดงความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 5.0 พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร ตัวอย่างโปรตีนควบคุม และตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรไม่มีความแตกต่างกันเนื่องจากเป็น pH มีค่าใกล้กับ pI ซึ่งประจุรวมของโปรตีนมีค่าใกล้ 0 ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน และมีความสามารถในการละลายของโปรตีนต่ำ

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 5.0

Treatment	Solubility ^{ns} (%)
Untreated	20.03 ^C ± 2.94
Control	19.85 ^C ± 6.20
15 min	20.63 ^C ± 2.50
6 h	22.27 ^C ± 3.58
12 h	24.36 ^C ± 5.33

ns ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

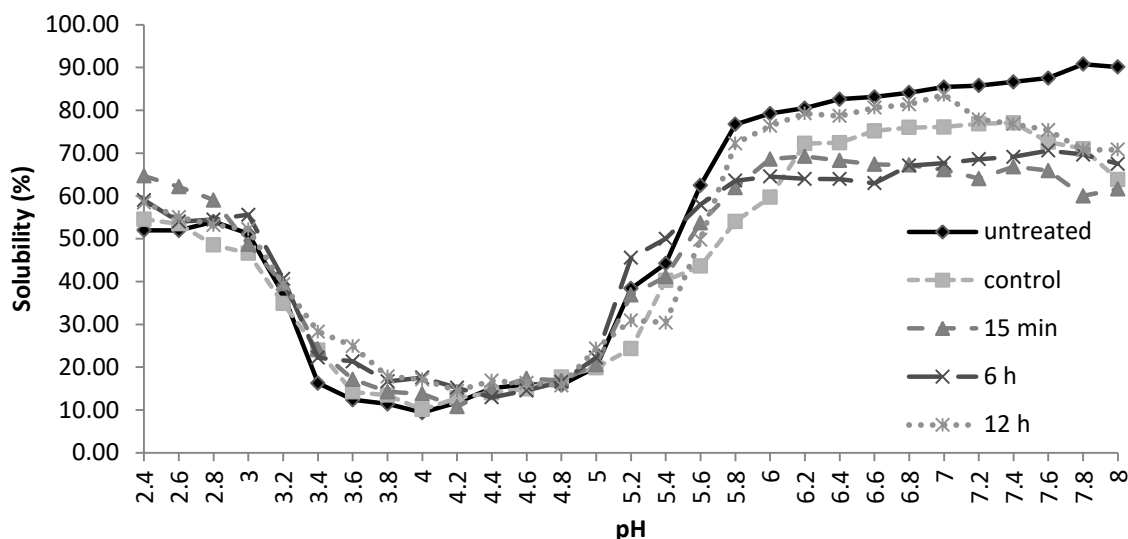
ความสามารถในการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่ pH = 7.0 แสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุมมีความสามารถในการละลายต่ำกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรเนื่องจากเหตุผลเดียวกับที่ pH = 3.0 ตามทฤษฎีของการเกิดดีเอมิเดชัน ตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันควรมีความสามารถในการละลายสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่จากตารางที่ 4.7 พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 15 นาที และ 6 ชั่วโมงมีค่าต่ำกว่าความสามารถในการละลายของตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปร 12 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่า DH ที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการดัดแปร ความสามารถในการละลายที่ต่ำลงในช่วง pH สูงเป็นผลมาจากการทำดีเอมิเดชันและการใช้ความร้อนควบคู่กันซึ่งมีผลทำให้ค่า pI เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากกลูตามิกแอซิดที่เกิดขึ้นจะเสถียรในโครงสร้างที่เป็นประจุลบ (รูปที่ 4.7) ทำให้ pI มีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้เคยพบในงานวิจัยของ Yong et al. (2006) ที่ทำการดัดแปรกลูเตนจากข้าวสาลีด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ pH = 7.0 จะลดลงเมื่อ DD มีค่ามากกว่า 10% และจะเพิ่มขึ้นเมื่อ DD มีค่ามากกว่า 70% (Hamada, 1992; Damodaran et al., 2007)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการละลาย (%) ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ pH = 7.0

Treatment	Solubility (%)
Untreated	85.43 ^a ± 1.83
Control	76.11 ^b ± 1.54
15 min	66.12 ^c ± 2.19
6 h	67.68 ^c ± 2.46
12 h	83.63 ^a ± 1.22

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

ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่เปลี่ยนตาม pH ตั้งแต่ 2.4-8.0 แสดงในรูปที่ 4.8 โปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (เส้นทึบสีดำ) มีช่วงการละลายต่ำที่ช่วง pH 3.4-5.0 ซึ่งมีความสามารถในการละลายไม่เกิน 20% และมีค่าต่ำสุดที่ pH 4.0 คือมีความสามารถในการละลาย 9.41% และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น โดยมีความสามารถในการละลายมากกว่า 80% ที่ pH มากกว่า 6.2 (80.25%) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของตัวอย่างพบว่า ที่ pH น้อยกว่า 4.2 ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรในทุกช่วงระยะเวลามีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรและโปรตีนควบคุม ช่วง pH 4.2-5.0 ไม่มีความแตกต่างของสมบัติการละลายของโปรตีนในตัวอย่างที่แตกต่างกัน และช่วง pH มากกว่า 5.0 ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรสูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น ลักษณะของ pH solubility profile ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำดีเอมิดชันควบคู่กับการใช้ความร้อน ซึ่งส่งผลให้ pI มีค่าเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายในสภาวะกรดจึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Yong et al., 2006; Suppavorasatit et al., 2011) นอกจากนี้ ความสามารถในการละลายที่แสดงในรูปที่ 4.7 เป็นการสนับสนุนสมบัติการละลายของโปรตีนมะพร้าวที่วิเคราะห์ได้ในตารางที่ 4.5 ค่า pI ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรเท่ากับ 3.9 แต่เมื่อดัดแปรแล้วจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือมีค่าประมาณ 4.2-4.4



รูปที่ 4.8 pH solubility profile ของโปรตีนจากมะพร้าว

4.3.2 สมบัติการอุ้มน้ำและน้ำมัน

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

สมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยวิธีดีเอมิตชันมีค่าสูงกว่าโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระยะเวลาการตัดแปรรูปที่แตกต่างกันไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของสมบัติการอุ้มน้ำ ความสามารถในการอุ้มน้ำที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเสียสภาพของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีนซึ่งเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและน้ำ จากงานวิจัยของ Kinsella (1979) และ Mune et al. (2014) รายงานว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำคือการเสียสภาพของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและเปิดเผยบริเวณที่มีประจุหรือมีขั้วมากขึ้น ส่งผลให้สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ดีขึ้น จากตารางที่ 4.8 พบว่าค่า WHC ของตัวอย่างควบคุมมีแนวโน้มที่จะมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูป ทั้งนี้อาจเกิดจากการเตรียมโปรตีนของตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรรูปมีการให้ความร้อน ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัว และส่งผลให้ความสามารถในการจับกับน้ำสูงขึ้น การเกิดดีเอมิตชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสจะเป็นการเปลี่ยนจากกลูตามีนเป็นกลูตามิกแอซิดซึ่งจะอยู่ในรูปที่เป็นประจุที่มีความเสถียรสูงกว่า โครงสร้างแบบนี้จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้มากกว่าโครงสร้างของกลูตามีน ทำให้ WHC มีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นการลดขนาดของโปรตีนยังส่งเสริมการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวอีกด้วย

ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนจึงเพิ่มขึ้น (Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009)

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

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของโปรตีนจากมะพร้าว

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

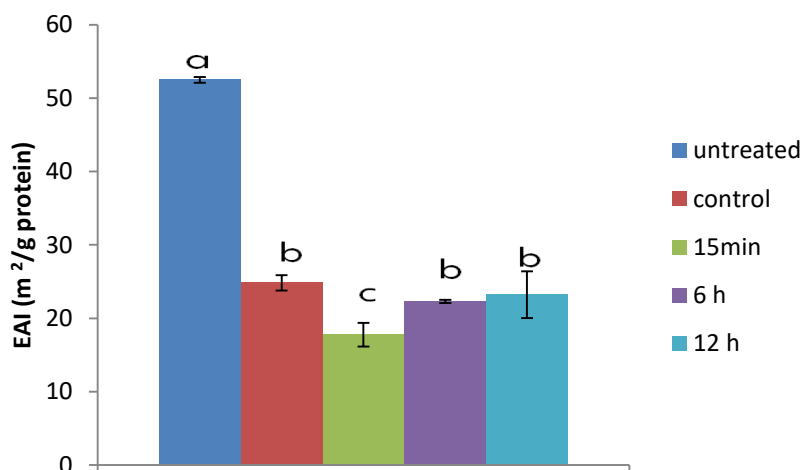
a, b ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.3.3 สมบัติการเกิดอิมัลชัน

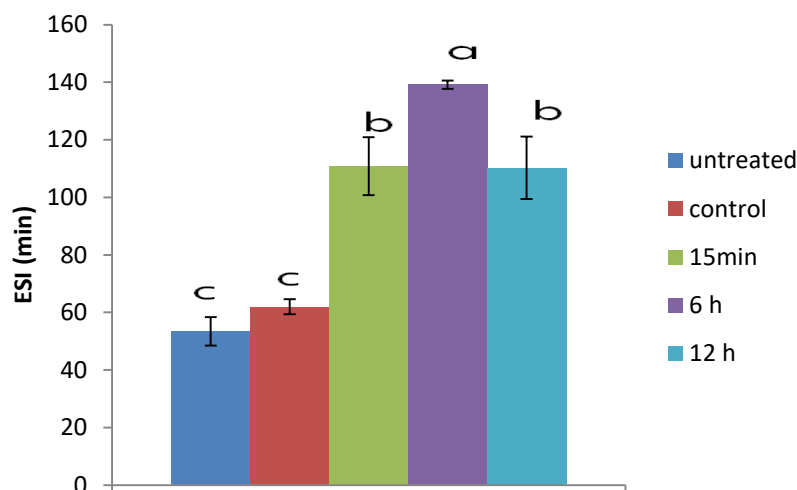
สมบัติการเกิดอิมัลชันที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้คือค่า emulsifying activity index (EAI) และ emulsifying stability index (ESI) ค่า EAI และ ESI แสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) ซึ่งจะโปรตีนจะสร้างชั้นฟิล์มหุ้มหยดน้ำมันที่รอยต่อระหว่างน้ำมันกับน้ำ

ค่า EAI ของโปรตีนมะพร้าวแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า โปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่า EAI สูงที่สุด ($52.46 \text{ m}^2/\text{g protein}$) ส่วนโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสเป็นเวลา 15 นาทีมีค่าต่ำที่สุด ($17.76 \text{ m}^2/\text{g protein}$) จากการศึกษาพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า EAI คือความสามารถในการละลายของโปรตีน โปรตีนที่สามารถละลายได้มาก จะสามารถสร้างฟิล์มครอบหุ้มไขมันได้ดีด้วยเช่นกัน (Boye et al., 1997) จากตารางที่ 4.5 ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรที่ $\text{pH} = 7.0$ มีค่าสูงที่สุด ซึ่งอิมัลชันที่ศึกษาเป็นอิมัลชันที่ $\text{pH} = 7.0$ จึงทำให้ค่า EAI ของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่าสูงที่สุดด้วย จากการศึกษา พบว่า ความร้อนและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้เกิดการคลายตัวของโปรตีนและเปิดเผยพื้นที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งยังเพิ่มจำนวนเปปไทด์สายสั้น พื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นการเพิ่ม hydrophobic interaction ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน ชั้นฟิล์มที่หุ้มหุ้มไขมันจึงเกิดไม่สมบูรณ์ ซึ่งส่งผลให้ค่า EAI มีค่าลดลงได้ ค่า EAI ของตัวอย่างโปรตีนควบคุมและโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรจึงมีค่าต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร (Schwenke, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำดีแอมิเดชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุของโปรตีน ส่งผลให้ความชอบน้ำเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายจึงเพิ่มขึ้นและทำให้ค่า EAI ของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการดัดแปรโปรตีนพบว่า เมื่อระยะเวลาการดัดแปรเพิ่มขึ้น EAI มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากระยะเวลาการดัดแปรที่นานขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ประจุของโปรตีนและ surface hydrophobicity ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลถึง hydrophilic-lipophilic balance ซึ่งมีความเหมาะสมกับระบบอิมัลชันที่ใช้มากขึ้น ค่า EAI ของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรที่ 6 และ 12 ชั่วโมงจึงมีค่าสูงกว่าการดัดแปรที่เวลา 15 นาที (Chan and Ma, 1999; Damodaran et al., 2007)



รูปที่ 4.9 Emulsifying activity index (EAI) ของโปรตีนมะพร้าว

ค่า ESI ของโปรตีนจากมะพร้าวแสดงในรูปที่ 4.10 โปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรมีค่า ESI สูงกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรรวมทั้งตัวอย่างโปรตีนควบคุม การเกิดดีเอมิดชันจะเพิ่มพื้นที่ที่ชอบน้ำทำให้สามารถเกิด hydrophobic interaction ได้น้อยลง ชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้นจึงมีความสมบูรณ์มากขึ้น ส่งผลให้อิมัลชันมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น ค่า ESI จึงมีค่าเพิ่มขึ้น (Chan and Ma, 1999) เมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการตัดแปรรวมทั้งโปรตีนต่อ ESI พบว่าการทำดีเอมิดชันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ค่า ESI มากที่สุด คือประมาณ 139 นาที่ จากนั้นค่า ESI ลดลงเมื่อเวลาการตัดแปรรวมทั้งโปรตีนเป็น 12 ชั่วโมง การลดลงของ ESI ที่การตัดแปรรวมทั้งโปรตีน 12 ชั่วโมงเป็นผลมาจากการทำดีเอมิดชันที่มากเกินไปจะเพิ่ม electrostatic repulsion ซึ่งการที่ electrostatic repulsion มีค่ามากเกินไปจะทำให้เกิดการผลักกันของโปรตีน และทำให้ฟิล์มที่หุ้มหยดไขมันบางลง และส่งผลให้ความเสถียรของอิมัลชันลดลง การลดลงของ ESI ยังพบในงานวิจัยอื่น ๆ เช่น การตัดแปรรวมทั้งโปรตีนจากโอ๊ตที่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และกลูเตลินจาก *Akebia trifoliata* ที่ผ่านการตัดแปรรวมทั้งกรดมาลิกและกรดซิตริกอีกด้วย (Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009; Liao et al., 2010; Lei et al., 2015)



รูปที่ 4.10 Emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีนมะพร้าว

4.3.4 สมบัติการเกิดโฟม

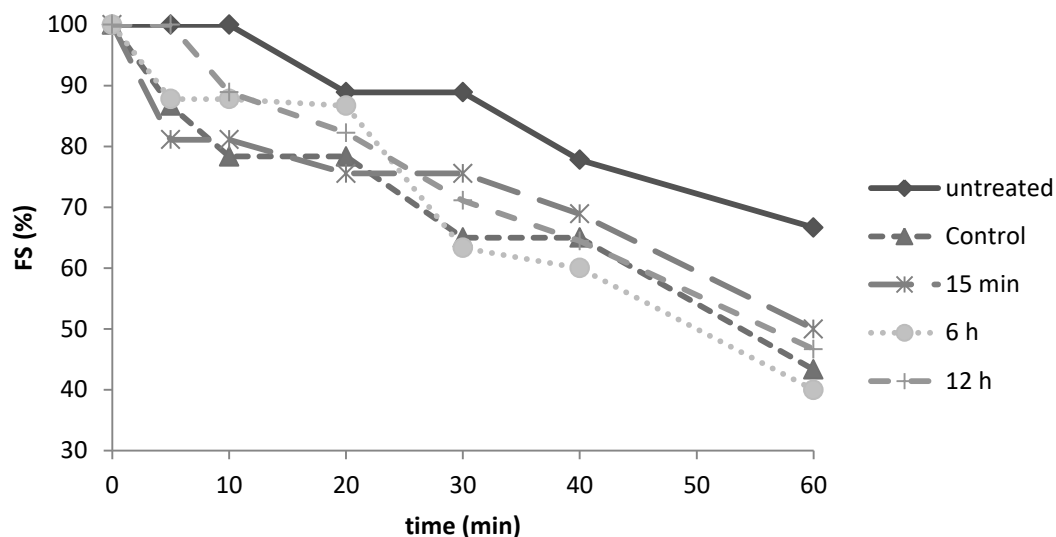
สมบัติการเกิดโฟมที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ ค่า foaming capacity (FC) และ foaming stability (FS) ที่ระยะเวลาตั้งแต่ 0-60 นาที ตารางที่ 4.9 แสดงค่า FC ของโปรตีนจากมะพร้าวดั้งเดิม และผ่านการดัดแปร ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่า FC สูงกว่าตัวอย่างควบคุมและโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 15 นาทีและ 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการให้ความร้อนในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างส่งผลให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนบางส่วน และยังทำให้พื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิด ionic interaction ลดลง FC จึงมีค่าลดลง ทำให้ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน (ตัวอย่างโปรตีนควบคุมและโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร) มีค่า FC ต่ำกว่าโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร นอกจากนี้ความสามารถในการละลายยังเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ตัวอย่างโปรตีนดั้งเดิมมีค่า FC สูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ (ตารางที่ 4.7) โปรตีนที่สามารถละลายได้ดีจะสามารถสร้างชั้นฟิล์มเพื่อกักเก็บอากาศไว้ได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า FC สูงขึ้น (Boye et al., 1997; Damodaran et al., 2007) ตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงมีค่า FC 5.91% ซึ่งมีค่าสูงกว่าตัวอย่างโปรตีนควบคุม (4.67%) อย่างมีนัยสำคัญ การทำดีแอมิเดชันทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ionic interaction มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมดีขึ้นจึงทำให้มีค่า FC เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองลักษณะนี้พบในตัวอย่างโปรตีนกลูเตนจากข้าวสาลีที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (Agyare et al., 2009)

ตารางที่ 4.9 Foaming capacity (FC) ของโปรตีนจากมะพร้าว

Treatment	FC (%)
Untreated	6.86 ^a ±1.27
Control	4.67 ^c ±0.58
15 min	5.08 ^{bc} ±0.14
6 h	5.15 ^{bc} ±0.18
12 h	5.91 ^{ab} ±0.13

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

Foaming stability ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ระยะเวลาต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 4.11 ค่า FS ของทุกตัวอย่างลดลงเมื่อระยะเวลาการเกิดดีเอมิเดชันเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 นาที ค่า FS ของตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่าสูงที่สุด (66.67%) ตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีค่า FS ลดลงเร็วกว่าตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปรซึ่งเป็นผลมาจากการให้ความร้อน และการทำดีเอมิเดชันซึ่งจะเพิ่ม electrostatic repulsion ค่า electrostatic repulsion ที่มากเกินไปจะขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนที่ก่อให้เกิดชั้นฟิล์มที่หุ้มอากาศ ฟิล์มที่ได้จึงบางลง ความเสถียรของโฟมจึงลดลง ผลการทดลองในลักษณะนี้พบในงานวิจัยอื่น ๆ เช่น การดัดแปรโปรตีนจาก okara ที่ FS ลดลงตามระยะเวลาในอัตราที่ใกล้เคียงกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร และโปรตีนจากโอ๊ตที่พบว่าความเสถียรของโฟมของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปลดลงเร็วกว่าโปรตีนดั้งเดิม (Chan and Ma, 1999; Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009)



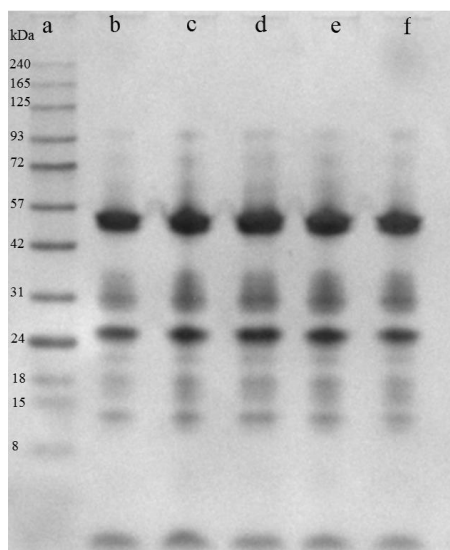
รูปที่ 4.11 Foaming stability (FS) ของโปรตีนจากมะพร้าว

4.3.5 Molecular weight distribution

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

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรจะมีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่นโดยเป็นผลมาจากขั้นตอนการให้ความร้อน โปรตีนในแถบน้ำหนักที่ต่ำกว่า 22 kDa ของตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปร (แถว c-f) จะมีมากกว่าที่ปรากฏในตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร (แถว b) คือมีประมาณ 13.44% (แสดงค่าในภาคผนวก ง) ในขณะที่

ตัวอย่างควบคุม, ตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนในช่วงขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 22 kDa เป็น 15.47, 17.11, 19.38 และ 22.09% ตามลำดับ โดยมีปริมาณโปรตีนสูงในช่วงน้ำหนัก 12 และ 16 kDa ซึ่งบ่งชี้ว่ามีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa ของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรร (แถบ b) ยังมีความเข้มมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ อย่างชัดเจน โดยมีปริมาณโปรตีน 40.67% ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม, ตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แอมิเดชันเป็นเวลา 15 นาที, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีน 31.79, 29.82, 22.25 และ 25.42% ตามลำดับ การที่ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรรมีปริมาณโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นที่ 55 kDa มากกว่าตัวอย่างชนิดอื่นและมีปริมาณโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 22 kDa ต่ำกว่านั้นเป็นผลมาจากการใช้ความร้อนและการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ความร้อนจะทำให้ลายอันตรกิริยาต่าง ๆ โปรตีนจึงเกิดการคลายตัวและปลดปล่อยโปรตีนสายสั้น เมื่อรวมกับการเกิดไฮโดรไลซิสที่ทำให้ลายพันธะเปปไทด์และได้เป็นโปรตีนสายสั้นจึงทำให้แถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงของโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปรรมีปริมาณมาก และโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยมีปริมาณน้อยกว่าโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรร การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในลักษณะนี้ยังพบในตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรรชนิดอื่น เช่น โปรตีนจากข้าวโพด และถั่วเหลือง เป็นต้น (Yong et al., 2004; Suppavorasatit et al., 2011)



รูปที่ 4.12 Molecular weight distribution ของโปรตีนมะพร้าว

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

4.3.6 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่สกัดจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูป และผ่านการตัดแปรรูปด้วยวิธีดีเอมิเดชันเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแสดงในตารางที่ 4.10 โปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปมีปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนสูงที่สุดเป็นสองอันดับแรก (16.87 และ 10.94 mg/100 mg ตามลำดับ) หลังจากการตัดแปรรูปโปรตีนแล้วพบว่า ปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนมีค่าเป็น 16.41 และ 10.62 mg/100 mg ตามลำดับ และกรดอะมิโนตัวอื่นยังมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปจึงมีความเป็นไปได้ว่า การทำดีเอมิเดชันไม่ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม การทำดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสเป็นการเปลี่ยนหมู่เอไมด์ของกลูตามีนเป็นคาร์บอกซิลซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกลูตามิกแอซิด ดังนั้น องค์ประกอบของกรดอะมิโนจึงควรมีการเปลี่ยนแปลง กล่าวคือ มีปริมาณกลูตามีนลดลง และมีปริมาณกลูตามิกแอซิดเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนมีการใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N ควบคู่กับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 22 ชั่วโมง เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนได้ (ภาคผนวก ค.1) ทำให้กลูตามีนในตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวเป็นกลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกแอซิด ไพโรกลูตามิกเป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของกลูตามีนและกลูตามิกแอซิด เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วย HPLC กลูตามีน กลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกจะออกมาในเวลาใกล้เคียงกันจนไม่สามารถแยกได้ ในการรายงานผลกลูตามิกแอซิดในตารางที่ 4.8 จึงเป็นการรวมปริมาณกลูตามีน กลูตามิกแอซิด และไพโรกลูตามิกไว้ด้วยกัน (Shih, 1985) ปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่ง Rasyid et al. (1992) รายงานว่ามีปริมาณกลูตามิกแอซิด 16.63-17.79%, อาร์จินีน 8.78-13.01% และแอสปาร์ติกแอซิด 9.36-11.12% ในขณะที่ Thaiphanit and Anprung (2016) รายงานว่ามีปริมาณกลูตามิกแอซิด 21.67 g/100 g, อาร์จินีน 12.22 g/100 g และแอสปาร์ติกแอซิด 8.65 g/100 g ซึ่งเมื่อพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโนยังพบอีกว่าในโปรตีนจากมะพร้าวมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบทั้ง 9 ชนิด

ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปร

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

การดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิจะเพิ่มความหลากหลายของสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำโปรตีนมะพร้าวไปใช้ในผลิตภัณฑ์เช่นกัน ทำให้โอกาสในการนำโปรตีนมะพร้าวไปใช้จริงในอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้โปรตีนมะพร้าวในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่เป็นอิมัลชัน แต่ไม่ต้องการให้เกิดโฟม เป็นต้น โปรตีนมะพร้าวยังสามารถพัฒนาเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคบางกลุ่ม เช่น การใช้แทนโปรตีนถั่วเหลืองที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้บริโภค และการใช้โปรตีนมะพร้าวเป็นโปรตีนเกษตรสำหรับผู้บริโภคกลุ่มที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ (มังสวิรัต) นอกจากนี้การใช้งานโปรตีนมะพร้าวยังเป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโปรตีนมะพร้าวที่ศึกษาสกัดมาจากหางกะทิที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันมะพร้าว การศึกษาและปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าวจึงถือเป็นงานวิจัยที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารและสิ่งแวดล้อม

4.4 การศึกษาสมบัติด้านการจับกับสารพิษของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนมะพร้าว

4.4.1 การสกัดและเตรียมตัวอย่างมะพร้าว

เนื่องจากการสกัดโปรตีนมะพร้าวในขั้นตอนแรก ได้โปรตีนที่มีปริมาณไขมันประมาณร้อยละ 20 ทำให้จำเป็นต้องสกัดโปรตีนใหม่อีกครั้ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น ซึ่งต้องการให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 เพื่อให้เหมาะในการศึกษาผลของการดัดแปรโปรตีนต่อสมบัติด้านการจับกับสารพิษ ซึ่งจากการสกัดพบว่าโปรตีนจากมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (pH = 3.9) แล้วสกัดไขมันออกโดยใช้ตัวทำละลายเป็น petroleum ether มีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 4.11 หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งพบว่าโปรตีนที่ได้มีค่าความชื้น ปริมาณโปรตีน และปริมาณไขมันเป็นร้อยละ 5.55, 92.97 และ 0.17 ตามลำดับ โดยมีปริมาณผลผลิตโปรตีน (yield) ร้อยละ 2.96

ตารางที่ 4.11 องค์ประกอบภายในโปรตีนมะพร้าวที่สกัดจากหางกะทิ

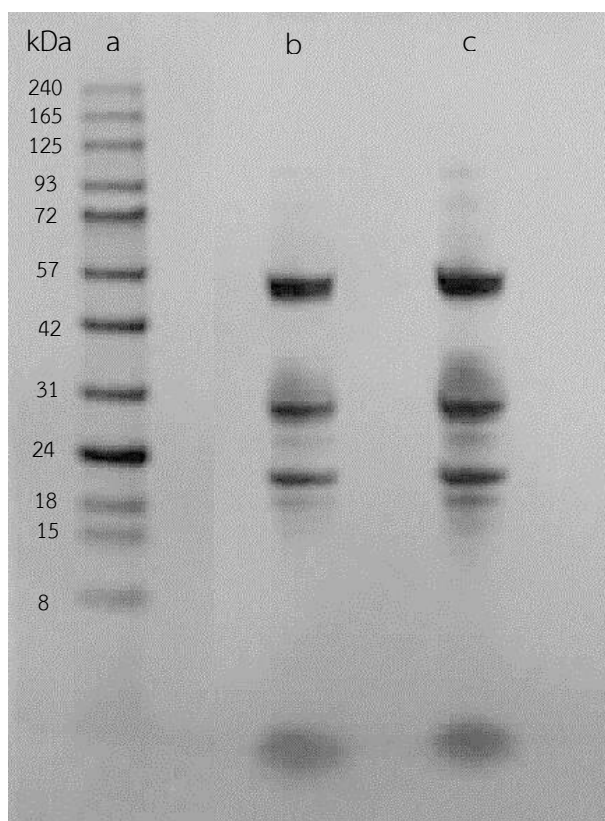
Constituents	Mean $\pm$ SD %(w/w)
Moisture	5.55 $\pm$ 0.27
Protein	92.97 $\pm$ 0.20
Fat	0.17 $\pm$ 0.02

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวดัดแปร

การดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้ PG ทำในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้โปรตีนที่ดัดแปร มีค่า DD สูง และมีค่า DH ต่ำ ตามสภาวะในการศึกษาชั้น 3.2.3.1 คือ E/S ratio เท่ากับ 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 7.0 ใช้เวลาในการดัดแปร 1 ชั่วโมงพบว่าโปรตีนที่ผ่านการดัดแปร มีค่า DD เท่ากับร้อยละ 36.12 และค่า DH เท่ากับร้อยละ 3.18 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาขั้นต้น

เมื่อศึกษาการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 4.13 จากรูปแสดง protein marker (แถว a), แถบโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (แถว b) และแถบโปรตีนของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (แถว c) โปรตีนทั้งสองชนิด (แถว b และ c) ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบหลักที่น้ำหนักโมเลกุล 18, 22, 30 และ 55 kDa ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเหล่านี้มาจากโปรตีนหลักในมะพร้าว โดยโปรตีนหลักในมะพร้าวประกอบไปด้วย โปรตีนกลุ่ม 11S (cocosin) และ 7S กลอบูลินโดยมีปริมาณร้อยละ 86 และ 14 ตามลำดับ โปรตีนจากมะพร้าวส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม 11S ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 326 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในการทำ SDS-PAGE ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 24, 34 และ 55 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 55 kDa เกิดจากการรวมตัวของแถบโปรตีนขนาด 24 และ 34 kDa (Garcia และคณะ, 2005) และโปรตีนกลุ่ม 7S มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 156 kDa ซึ่งจะแสดงแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 16, 22 และ 24 kDa ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodsamran และ Sothornvit (2018) ที่รายงานแถบโปรตีนหลักของโปรตีนจากมะพร้าวมีขนาด 14, 18, 34 และ 52 kDa นอกจาก DeMason และ Chandra Sekhar (1992) รายงานว่าโปรตีนจากมะพร้าวจะแสดงแถบโปรตีนในช่วง 17 – 55 kDa (17, 20, 22, 25, 31, 34 และ 55 kDa)



รูปที่ 4.13 Molecular weight distribution ของโปรตีนมะพร้าว

a: protein marker, b: untreated coconut protein (CP),

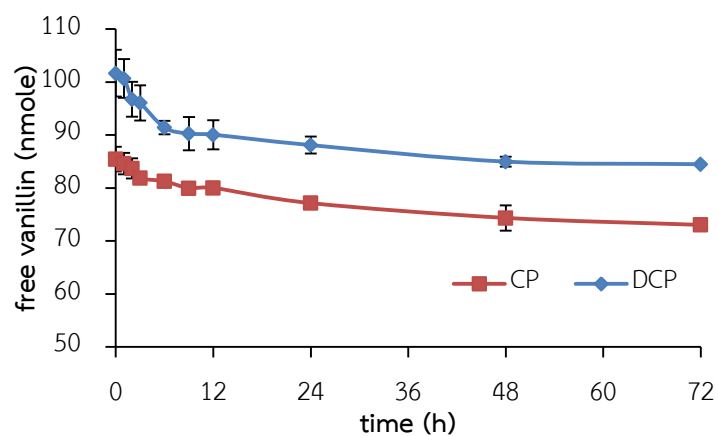
c: deamidated coconut protein (DCP)

การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปรและโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยจะพบว่าโปรตีนในแถบน้ำหนักที่ต่ำกว่า 22 kDa ของตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปร (แถบ c) จะมีมากกว่าที่ปรากฏในตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (แถบ b) คือมีประมาณร้อยละ 12.68 และ 8.97 ตามลำดับ การที่โปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีปริมาณของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 22 kDa สูงกว่านั้นเป็นผลมาจากขั้นตอนการให้ความร้อน ซึ่งจะเป็นการทำลายอันตรกิริยาต่าง ๆ โปรตีนจึงเกิดการคลายเกลียวและปลดปล่อยโปรตีนสายสั้น รวมทั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นการทำลายพันธะเปปไทด์และได้เป็นโปรตีนสายสั้นเกิดขึ้น

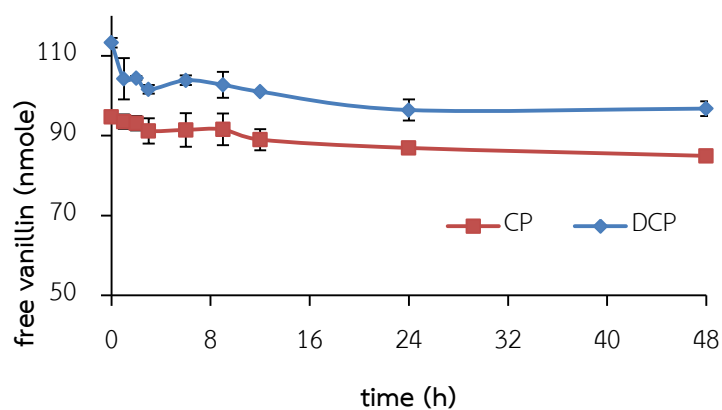
4.4.3 การหาเวลาที่จุดสมดุลของการจับกลิ่นรส (flavor binding equilibration time)

การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสโดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis นั้นจำเป็นต้องหาเวลาที่จุดสมดุลในการจับกลิ่นรสระหว่างโปรตีนกับสารให้กลิ่นรส ซึ่งหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวานิลลินอิสระที่เหลือจากการเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร (DCP) กับเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 5, 15 และ 25 °C (รูปที่ 4.14) โดยพิจารณาเวลาต่ำที่สุดที่ทำให้ปริมาณวานิลลินอิสระคงที่ พบว่าเวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็นดังนี้ 48, 24 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ และ เวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็นดังนี้ 48, 24 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าเวลาที่ทำให้ถึงจุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาทั้งหมดของ CP และ DCP สั้นลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C สอดคล้องกับการศึกษาของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) ที่ทำการศึกษาหาเวลาที่จุดสมดุลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับวานิลลินพบว่าเวลาที่จุดสมดุลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI) ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็นดังนี้ 48, 36 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ และเวลาที่จุดสมดุลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเตชัน (DSPI) ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็นดังนี้ 48, 24 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ

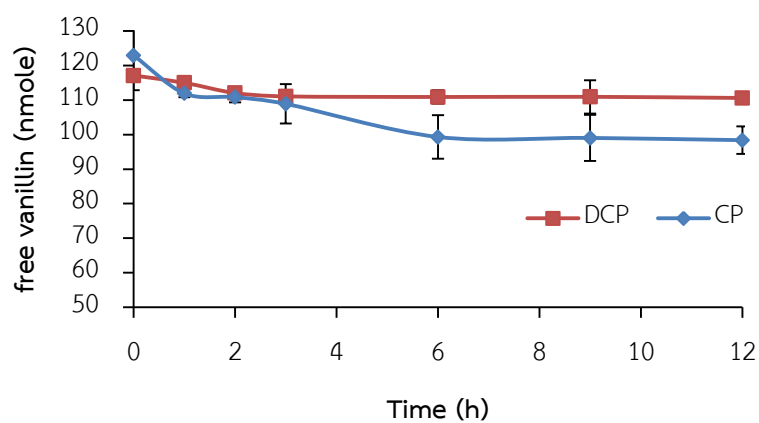
(a) 5 °C



(b) 15 °C



(c) 25 °C



รูปที่ 4.14 Equilibration curve ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการดัดแปร (CP) ผ่านการดัดแปร (DCP) ที่ 5 °C (a), 15°C (b), and 25 °C (c) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.12 Equilibration time ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าวที่ยังไม่ผ่านการดัดแปร (CP) และผ่านการดัดแปร (DCP)

Coconut protein	T (°C)	minimum time to reach equilibrium (h)
CP	5	48
	15	24
	25	6
DCP	5	48
	15	24
	25	2

4.4.4 สมบัติในการจับกลิ่นรส (flavor binding properties) ของโปรตีนมะพร้าว

การศึกษาสมบัติในการจับกลิ่นรสระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินจะทำการศึกษาโดยหาค่าตัวแปรต่างๆ ได้แก่ จำนวนพื้นที่ในการจับกับกลิ่นรส (binding site, n) และค่าคงที่ในการจับ (binding constant; K) ซึ่งคำนวณจากจุดตัดแกน y ($1/n$) และ ค่าความชัน ($1/Kn$) จากสมการเส้นตรงในตารางที่ 3 ตามลำดับซึ่งได้มาจากการสร้าง Klotz plot (รูปที่ 4.15) โดยค่า n , K และ nK ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับวานิลลินที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 4 ค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็น 0.81, 0.79 และ 1.48 ตามลำดับ ซึ่งที่ 25 °C พบว่ามีค่า n สูงสุดเมื่อเทียบกับที่ 5 และ 15°C ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็น 0.81, 0.96 และ 1.58 ตามลำดับ ซึ่งค่า n ที่ได้จากการทดลองของทั้ง CP และ DCP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Damodaran และ Kinsella (1981) ซึ่งศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองและสารให้กลิ่นรสกลุ่มคาร์บอนิล พบว่าค่า n ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง 2-nonanone กับโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C (เพิ่มจาก 2.00 เป็น 4.00) ในทำนองเดียวกัน Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) พบว่าค่า n ของการจับระหว่างมอลทอลกับ DSPI เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C โดยที่ 5, 15 และ 25 °C ค่า n ของ SPI มีค่า 4.01, 4.13 และ 29.5 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าค่า K ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 5 ไป 25 °C (ตารางที่ 4.14) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Damodaran และ Kinsella (1981) ซึ่งรายงานค่า K ของ 2-nonanone กับ SPI ลดลงจาก 2000 M^{-1} ที่ 5 °C เป็น

930 M^{-1} ที่ 25°C ในทำนองเดียวกัน Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) ยังรายงานว่าค่า K ของการจับกันระหว่างมอลทอลและ DSPI ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 5 ไป 25°C โดยที่ 5 , 15 และ 25°C ค่า K ของ SPI มีค่า 51.7 , 50.9 และ 2.69 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากการทดลองนี้กับค่าที่รายงานไว้ในการศึกษาของ Damodaran และ Kinsella (1981) และ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) มีค่าไม่ใกล้เคียงกันเนื่องจากโปรตีนที่ใช้เป็นคอนละชนิดกัน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าที่ 15°C ค่า n และ K ของ CP และ DCP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยค่า n ของ DCP สูงกว่าของ CP และค่า K ของ CP สูงกว่าของ DCP ในขณะที่ที่ 5 และ 25°C ค่า n และ K ของ CP และ DCP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

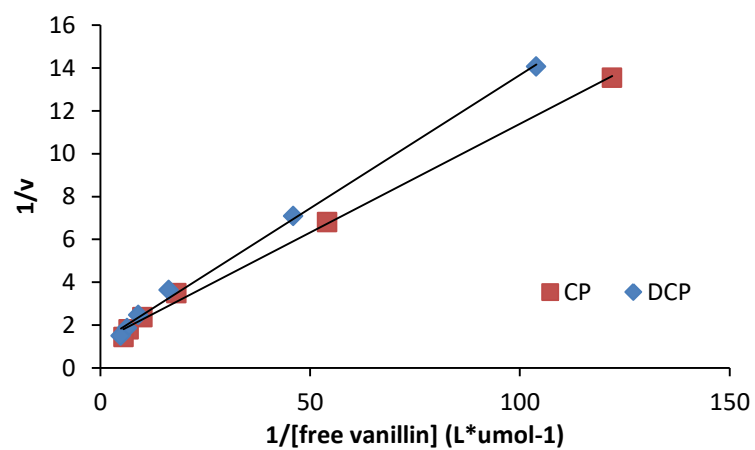
จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนมะพร้าวทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรให้ผลเป็นแนวโน้มเดียวกัน คือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 5 ไป 25°C ค่า n จะเพิ่มขึ้นและค่า K จะลดลง ซึ่งการอธิบายด้วยค่า n หรือ K เพียงอย่างเดียวอาจจะไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนความสามารถในการจับกลืนรสโดยรวม (overall binding affinity) ของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนได้ ดังนั้นเพื่อให้มีความถูกต้องมากขึ้นจึงใช้ค่า nK ในการอธิบายความสามารถในการวัดความสามารถในการจับกลืนรสโดยรวม (Kühn และคณะ, 2008; Suppavorasatit และ Cadwallader, 2012) ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ได้จาก Klotz plots (ตารางที่ 4.13) ซึ่งพบว่าค่า nK ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP ที่ 5 , 15 และ 25°C เป็น 985.36×10^4 , 853.61×10^4 และ 586.54×10^4 ตามลำดับ และ ค่า nK ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ DCP ที่ 5 , 15 และ 25°C เป็น 803.23×10^4 , 534.04×10^4 และ 434.98×10^4 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า nK ของ CP สูงกว่าของ DCP ที่ทุกอุณหภูมิแสดงให้เห็นว่าการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส (PG) ส่งผลต่อการจับกับสารให้กลิ่นรสวานิลลินอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่โปรตีนมะพร้าวถูกดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิชันโดยเอนไซม์ PG สามารถลดความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีนมะพร้าวกับสารให้กลิ่นรสกลุ่มที่มีหมู่คาร์บอนิลได้ เนื่องจากการดัดแปรโปรตีนดังกล่าว เป็นการเปลี่ยนหมู่เอไมด์ในกลูตามีนให้เป็นกรดกลูตามิก ซึ่งการสูญเสียหมู่เอไมด์ทำให้ความสามารถในการที่จะเกิดพันธะโควาเลนต์หรือการเกิด Schiff base (Schiff base) กับหมู่คาร์บอนิลของวานิลลินลดลง ส่งผลให้โปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรมีความสามารถในการจับกับวานิลลินลดลงด้วย และอาจเป็นไปได้ว่าการจับกันระหว่าง DCP และวานิลลิน อาจเกิดผ่านพันธะไฮโดรเจน หรือเกิดจากอันตรกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจง ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) ซึ่งศึกษาผลของการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองโดยเอนไซม์ PG ต่อสมบัติการจับกลืนรสโดยใช้เทคนิค equilibrium dialysis พบว่าความสามารถในการจับกลืนรสโดยรวม (overall binding affinity) ของวานิลลินกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านการดัดแปรมีค่าลดลง โดยพบว่าความสามารถในการจับของวานิลลินกับ SPI ที่อุณหภูมิ 5 , 15 และ 25°C สูงกว่า การจับของวานิลลินกับ DSPI ถึงประมาณ $7 - 9$ เท่า

นอกจากนี้ยังพบว่าค่า nK ของทั้ง CP และ DCP ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 5 ไป 25 °C ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารให้กลิ่นรสและโปรตีนโดยที่อุณหภูมิ 5 °C มีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินและโปรตีนมะพร้าวมากที่สุดเมื่อเทียบกับที่ 15 และ 25 °C ทั้งนี้ อาจเกิดจากที่อุณหภูมิต่ำ (5°C) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ภายในโครงสร้างของโปรตีนอ่อนแอ ส่งผลให้หน่วยย่อยของโปรตีนเกิดการจับเรียงตัวกันใหม่ภายในโมเลกุลของโปรตีนเอง สายโซ่ของโปรตีนที่เกิดการคลายเกลียวจึงเผย hydrophobic binding sites ออกมาด้านนอกมากขึ้น เป็นผลทำให้ความสามารถในการจับกลิ่นรสดังกล่าวเพิ่มขึ้นด้วย

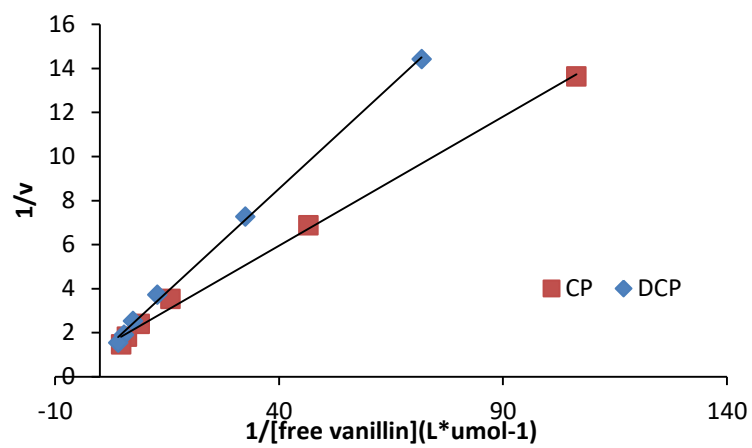
ตารางที่ 4.13 สมการเส้นตรงจาก Klotz plots สำหรับอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าว ที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรรูป (CP) และผ่านการตัดแปรรูป (DCP) จากการทดลอง 2 ซ้ำ

protein	T (°C)	replication 1		replication 2	
		equation	r^2	equation	r^2
CP	5	$y = 0.1003x + 1.2897$	0.9963	$y = 0.1027 + 1.1892$	0.9972
	15	$y = 0.1170x + 1.2525$	0.9969	$y = 0.1173 + 1.2909$	0.9963
	25	$y = 0.1718x + 0.6217$	0.9978	$y = 0.1692x + 0.7451$	0.9973
DCP	5	$y = 0.1271x + 1.2271$	0.9973	$y = 0.1220x + 1.2340$	0.9973
	15	$y = 0.1843x + 1.0383$	0.9980	$y = 0.1903x + 1.0449$	0.9971
	25	$y = 0.2290x + 0.6552$	0.9983	$y = 0.2308x + 0.6138$	0.9977

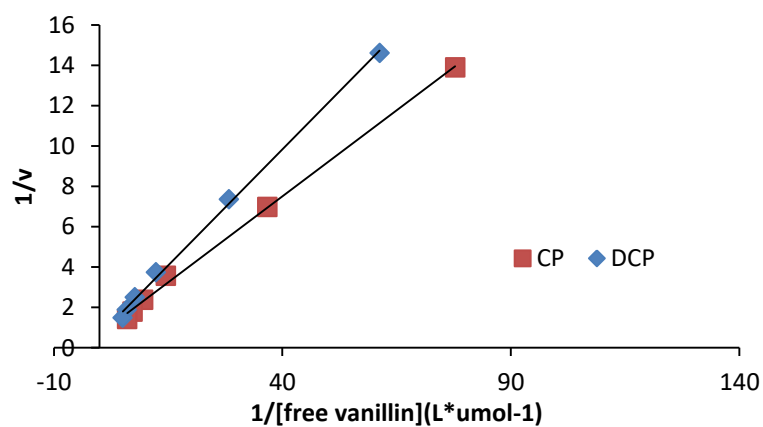
(a) 5 °C



(b) 15 °C



(c) 25 °C



รูปที่ 4.15 Klotz plots สำหรับอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าวที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรรูป (CP) และผ่านการตัดแปรรูป (DCP) ที่ 5 °C (a), 15°C (b), and 25 °C (c)

ตารางที่ 4.14 ค่า Binding parameters สำหรับอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าวที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรรูป (CP) และผ่านการตัดแปรรูป (DCP)

parameter	T (°C)	CP	DCP
n	5	0.81 ± 0.05 b A	0.81 ± 0.00 c A
	15	0.79 ± 0.02 b B	0.96 ± 0.00 b A
	25	1.48 ± 0.19 a A	1.58 ± 0.07 a A
K (x 10 ⁴) (M ⁻¹)	5	1221.89 ± 90.44 a A	988.47 ± 32.54 a A
	15	1085.51 ± 21.21 a A	556.23 ± 10.11 b B
	25	401.12 ± 55.50 b A	276.03 ± 14.26 c A
nK (x 10 ⁴) (M ⁻¹)	5	985.36 ± 16.47 a A	803.23 ± 23.26 a B
	15	853.61 ± 1.55 b A	534.04 ± 12.10 b B
	25	586.54 ± 6.32 c A	434.93 ± 2.41 c B

a, b, c ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

A,B ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

4.4.3 การหาค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic parameters)

ค่าตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวานิลลिनกับ CP และ DCP แสดงดังตารางที่ 4.15 พบว่าค่าพลังงานอิสระที่ใช้ในการจับกัน (Gibb's free energy of binding, ΔG°) ของวานิลลिनกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ แสดงว่าเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous) โดยค่า ΔG° ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่รายงานของ Suppavorasatit และ Cadwallader (2012) ที่รายงานค่า ΔG° ของวานิลลिनกับ SPI ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็น -5.99, -7.21 และ -8.54 kcal mol⁻¹ ตามลำดับ และกับ DSPI ที่ 5, 15 และ 25 °C เป็น -6.69, -6.84 และ -7.09 kcal mol⁻¹ ตามลำดับ โดยค่า ΔG° ที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับ (binding affinity) ของวานิลลिनกับ DCP ที่ 5 °C มีค่าสูงกว่าที่ 15 และ 25 °C ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Li และคณะ (2000) ที่รายงานค่า ΔG° ของวานิลลिनกับเคซีนที่ 4 และ 12 °C เป็น -3.58 และ -3.33 kcal mol⁻¹ ตามลำดับ

ค่าเอนทาลปีของการจับกัน (enthalpy of binding, ΔH°) ของวานิลลिनกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ (-9.19 และ -10.59 kcal mol⁻¹ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาระหว่าง CP และ DCP กับวานิลลिनเป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อน (exothermic) นอกจากนี้ค่าเอนโทรปีของการจับกัน

(entropy of binding, ΔS°) ของวานิลลินกับโปรตีนทั้งสองมีค่าเป็นลบด้วยเช่นกัน ซึ่งค่า ΔH° และ ΔS° นี้สามารถช่วยในการระบุประเภทของอันตรกิริยาของการจับกันได้ (Wang และ Li, 2011) Ross และ Subramanian (1981) ทำการจำแนกเครื่องหมายของตัวแปรอุณหพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาแต่ละประเภทของโปรตีนไว้ว่า $\Delta H^\circ > 0$ และ $\Delta S^\circ > 0$ หมายถึงเกิดอันตรกิริยา hydrophobic ถ้า $\Delta H^\circ < 0$ และ $\Delta S^\circ < 0$ หมายถึงการเกิดแรง van der Waals หรือ พันธะไฮโดรเจน และถ้า $\Delta H^\circ \approx 0$ และ $\Delta S^\circ > 0$ จะเป็นการเกิดอันตรกิริยาแบบ electrostatic จากการทดลองนี้พบว่า ค่า ΔH° และ ΔS° ของอันตรกิริยาระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP มีค่าเป็นลบ ซึ่งหมายความว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับ CP และ DCP เป็นแรง van der Waals หรือพันธะไฮโดรเจน (Ross และ Subramanian, 1981; Ross และ Rekharsky, 1996; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012) และการเกิดอันตรกิริยาเป็นกระบวนการขับเคลื่อนแบบเอนทัลปี (enthalpy driven process) (Ross และ Subramanian, 1981; Ross และ Rekharsky, 1996; Li และคณะ, 2000; Suppavorasatit and Cadwallader, 2012)

ตารางที่ 4.15 Thermodynamic parameter สำหรับอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าวที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรรูป (CP) และผ่านการตัดแปรรูป (DCP)

parameter	T (°C)	CP	DCP
ΔG° (kcal mol ⁻¹)	5	-9.01 ± 0.04 a A	-8.90 ± 0.01 b A
	15	-9.27 ± 0.01 b B	-8.88 ± 0.01 b A
	25	-9.00 ± 0.08 a A	-8.78 ± 0.03 a A
ΔH° (kcal mol ⁻¹)	5-25	-9.19 ± 1.75 A	-10.59 ± 0.29 A
ΔS° (cal K ⁻¹ mol ⁻¹)	5	-30.81 ± 5.88 *	-35.52 ± 0.98 *
	15	-30.81 ± 5.88 *	-35.52 ± 0.98 *
	25	-30.81 ± 5.88 *	-35.52 ± 0.98 *

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

A,B ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

* ตัวเลขในคอลัมน์และแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.4.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

การศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสกับโปรตีนด้วยวิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เปรียบเทียบข้อมูลกับการศึกษาสมบัติด้านการจับกลิ่นรสโดยวิธีการใช้เครื่องมือ เนื่องจากการทดสอบโดยการใช้เครื่องมือเพียงอย่างเดียวนั้นจะไม่สามารถวัดผลกระทบที่เกิดจากการรับรู้กลิ่นรสได้โดยตรง ในการทดลองนี้ใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารให้กลิ่นที่ผู้ทดสอบสามารถรับรู้ได้จากการดมกลิ่น (odor detection thresholds) ตามวิธีของ ASTM E697-04 (2004) เพื่อศึกษาผลของการตัดแปรรูปโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเคชันโดยเอนไซม์ PG ต่อสมบัติด้านการจับกลิ่นรสของวานิลลินกับโปรตีนมะพร้าว โดยแสดงผลการทดสอบเป็นค่า best estimate threshold (BET) ของกลุ่มผู้ทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.16 จากผลการทดลองพบว่าค่า BET ของวานิลลินในตัวอย่าง CP เป็น 33.17 ppm ซึ่งสูงกว่าในตัวอย่าง DCP ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.11 ppm แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับกลิ่นรสโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรรลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suppavorasatit และคณะ (2013) ที่พบว่าค่า BET ของวานิลลินในตัวอย่างน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการตัดแปรร (1.80 ppm) ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างน้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการตัดแปรร (9.61 ppm) อย่างไรก็ตามค่า BET ที่ได้จากการทดลองนี้ไม่ใกล้เคียงกับค่า BET ที่รายงานในการศึกษาของ Suppavorasatit และคณะ (2013) เนื่องจากโปรตีนที่ใช้ทดสอบเป็นคนละชนิดกัน และจากผลการทดสอบสมบัติด้านการจับกลิ่นรสด้วยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่ามีความสอดคล้องกับการทดสอบโดยการใช้เครื่องมือข้างต้น (ตารางที่ 4.14 และ 4.15)

ตารางที่ 4.16 ค่า Group best estimate thresholds (BET) สำหรับอันตรกิริยาระหว่าง vanillin และโปรตีนมะพร้าวที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรร (CP) และผ่านการตัดแปรร (DCP) (n=27)

Coconut protein	BET ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ Standard deviation
CP	33.17 $\pm$ 4.63
DCP	14.11 $\pm$ 3.27

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. สภาพที่เหมาะสมในการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส

- สภาพที่มีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และโปรตีน 36 unit/g protein อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH = 7.0

- ผลของระยะเวลาในการดัดแปรโปรตีนจากมะพร้าวด้วยด้วยการทำดีเอมิเดชันโดยใช้เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนสคือ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น DD และ DH มีค่าเพิ่มขึ้น

2. สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยโปรตีนกลูตามิเนส

- ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรมีค่าสูงสุดที่ pH = 7.0 และมีค่าต่ำสุดที่ pH = 5.0 การดัดแปรโปรตีนด้วยการทำดีเอมิเดชันส่งผลให้ความสามารถในการละลายที่ pH = 3.0 เพิ่มขึ้นในทุกช่วงระยะเวลาการดัดแปร ที่ pH = 5.0 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และที่ pH = 7.0 ความสามารถในการละลายลดลงในตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปรเป็นเวลา 15 นาที และ 6 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

- ความสามารถในการละลายของโปรตีนความสามารถในการละลายของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรที่ขึ้นกับ pH พบว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรในทุกช่วงเวลาในช่วง pH น้อยกว่า 4.2 มีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าน้อยลงในช่วง pH มากกว่า 5.0 เมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

- ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีค่าประมาณ 1.08-1.16 g water/g protein ซึ่งมีค่าสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

- ความสามารถในการอุ้มน้ำมันของตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรมีค่าประมาณ 1.19-1.43 g oil/g protein ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างไปจากตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการดัดแปร

- จากการศึกษาสมบัติในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนจากมะพร้าว พบว่า ตัวอย่างโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านดัดแปรมีค่า emulsifying activity index ลดลง และมีค่า emulsifying stability index เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร

- สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนมะพร้าวมีค่า foaming capacity ลดลงเมื่อทำการตัดแปรโปรตีนด้วยการทำดีเอมิเดชัน ค่า foaming stability ที่ลดลงตามระยะเวลามีการลดลงที่เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร

- Molecular weight distribution ของตัวอย่างโปรตีนมะพร้าวเมื่อทำการตัดแปรโปรตีน พบว่าโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากมีจำนวนลดลง และโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมีจำนวนเพิ่มขึ้น

- องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนจากมะพร้าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อตัดแปรด้วยเอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส โดยมีปริมาณกลูตามิกแอซิดและอาร์จินีนสูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น

3. การศึกษาสมบัติด้านการจับลิพิดของสารให้ลิพิดกับโปรตีนมะพร้าว

- ความสามารถในการจับลิพิดของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วย PG ลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร

- การตัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วย PG ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างวานิลลินกับโปรตีน ซึ่งได้แก่ van der Waals force หรือ hydrogen bonding

- เมื่อทดสอบทางประสารทสัมผัส พบว่าค่า best estimate threshold (BET) ของวานิลลินในตัวอย่างโปรตีนที่ไม่ผ่านการตัดแปร (33.17 ppm) สูงกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย PG (14.11 ppm) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับลิพิดโดยรวมของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรลดลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากมะพร้าวเนื่องจากการตัดแปรด้วยการทำดีเอมิเดชัน

2. ควรมีการศึกษาผลของการทำดีเอมิเดชันต่อ การเกิดการแพ้ เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง

3. ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้โปรตีนจากมะพร้าวในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ เพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- ทัฬหฬสาร ใจแก้ว (2556). สมบัติการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก ถั่วอะซูกิ *Vigna angularis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิสานารถ กระแสร์ชล (2540). การสกัดและสมบัติทางโภชนาการและการใช้งานของโปรตีนเข้มข้น จาก ใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. .
- ปิตินันต์ อักษร (2553). ผลของปริมาณกรดกำมะถันและสารละลายเอทานอลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพโรจน์ วิริยาริ (2544). การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. เชียงใหม่ ไทย, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศุภรจิตต์ เอี่ยมมนเรพร (2551). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากใบยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- โสภิสฐา มินมณี and อภิษฎา รัตนนุกรม (2557). ผลของการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธีดีเอมิเดชันแบบไม่ใช้ เอนไซม์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.). โครงการงานปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). "ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร." Retrieved 1 ตุลาคม, 2559, from <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/coconut.pdf>.
- สุพิชชา คุณารยกุล. (2559). สมบัติเชิงหน้าที่จากโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยวิธีดีเอมิเดชันโดยใช้ เอนไซม์โปรตีนกลูตามิเนส. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีทางอาหาร), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

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

- AOAC (2000). Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Md., AOAC International.
- ASTM. (2004). Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits. *ASTM E697-04*. 1-7.
- Babiker, E. E. (2000). "Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein." *Food Chemistry* 70(2): 139-145.
- Boye, J., C. Ma and V. Harwalkar (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. NY, MARCEL DEKKER.
- Cabra, V., R. Arreguin, R. Vazquez-Duhalt and A. Farres (2007). "Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the Z19 α -zein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(2): 439-445.
- Carr, H. J., G. W. Plumb, M. L. Parker, N. Lambert (1990). "Characterisation and crystallization of an 11S seed storage globulin from coconut (*Cocos nucifera*)."
Food Chemistry. 38: 11-20.
- Chan, W. M. and C. Y. Ma (1999). "Acid modification of proteins from soymilk residue (okara)." *Food Research International* 32: 119-127.
- Chobpattana, W., I. J. Jeon, J. S. Smith, T. M. Loughin (2002). "Mechanisms of interaction between vanillin and milk proteins in model systems." *Journal of Food Science*. 67: 973-977.
- Cumby, N., Y. Zhong, M. Naczki and F. Shahidi (2008). "Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates." *Food Chemistry* 109(1): 144-148.
- Damodaran, S., J. E. Kinsella (1981). "Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29: 1249-1253
- Damodaran, S., K. L. Parkin and O. R. Fennema (2007). Fennema's food chemistry, CRC press.

- Das, B., A. P. Roy, S. Bhattacharjee, S. Chakraborty and C. Bhattacharjee (2015). "Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology." Ecotoxicology and Environmental Safety 121: 244-252.
- De Mason, D. A., K. N. C. Sekhar (1990). "Electrophoretic characterization and immunological localization of coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm storage proteins." Botanical Gazette (Chicago). 151: 302-313.
- FAO. (2013). "Production." Retrieved 20 October, 2016, from http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E.
- Garcia, R. N., R. V. Arocena, A. C. Laurena and E. M. Tecson-Mendoza (2005). "11S and 7S Globulins of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and Characterization." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1734-1739.
- Gu, Y., Y. Matsumura, S. Yamaguchi and T. Mori (2001). "Action of protein-glutaminase on α -lactalbumin in the native and molten globule states." Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(12): 5999-6005.
- Hamada, J. S. (1992). "Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase." Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(5): 719-723.
- Kanu, P. J., J. B. Kanu, E. H. Sandy, J. B. Kandeh, P. Mornya and Z. HuiMing (2009). "Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate." American Journal of Food Technology 4(6): 226-240.
- Kato, A., A. Tanaka, N. Matsudomi and K. Kobayashi (1987). "Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH." Journal of Agricultural and Food Chemistry 35(2): 224-227.
- Kinsella, J. E. (1979). "Functional properties of soy proteins." Journal of the American Oil Chemists' Society 56(3): 242-258.
- Kühn, J., T. Considine, H. Singh (2008). "Binding of flavor compounds and whey protein isolate as affected by heat and high pressure treatments." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 10218-10224.

- Kwon, K., K. H. Park and K. C. Rhee (1996). "Fractionation and Characterization of Proteins from Coconut (*Cocos nucifera* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 1741-1745.
- Kwon, K. S., D. Bae, K. H. Park and K. C. Rhee (1996). "Aqueous Extraction and Membrane Techniques Improve Coconut Protein Concentrate Functionality." Journal of Food Science 61(4): 753-756.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227: 680-685.
- Lei, L., Q. Zhao, C. Selomulya and H. Xiong (2015). "The effect of deamidation on the structural, functional, and rheological properties of glutelin prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed." Food Chemistry 178: 96-105.
- Li, Z., I. U. Grun, L. N. Fernando (2000). "Interaction of vanillin with soy and dairy proteins in aqueous model systems: a thermodynamic study." Journal of Food Science. 65: 997-1001.
- Liao, L., T.-X. Liu, M.-M. Zhao, C. Cui, B.-E. Yuan, S. Tang and F. Yang (2010). "Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid." Food Chemistry 123(1): 123-130.
- McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques, CRC press.
- Metwalli, A. and M. Van Boekel (1998). "On the kinetics of heat-induced deamidation and breakdown of caseinate." Food Chemistry 61(1): 53-61.
- Mirmoghtadaie, L., M. Kadivar and M. Shahedi (2009). "Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate." Food Chemistry 114(1): 127-131.
- Miwa, N., K. Yokoyama, H. Wakabayashi and N. Nio (2010). "Effect of deamidation by protein-glutaminase on physicochemical and functional properties of skim milk." International Dairy Journal 20(6): 393-399.
- Mohammadi, R., M. A. Mohammadifar, A. M. Mortazavian, M. Rouhi, J. B. Ghasemi and Z. Delshadian (2016). "Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM)." Food Chemistry 190: 186-193.

- Motoki, M., K. Seguro, N. Nio and K. Takinami (1986). "Glutamine-specific deamidation of α S1-casein by transglutaminase." Agricultural and Biological Chemistry 50(12): 3025-3030.
- Mune, M., M. Alain, M. S. René and M. I. Lape (2014). "Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate." Food Chemistry 154: 32-37.
- Nedovic, V. A., B. Obradovic, I. Leskosek-Cukalovic and G. Vunjak-Novakovic (2001). Immobilized yeast bioreactor systems for brewing—recent achievements. Engineering and manufacturing for biotechnology, Springer: 277-292.
- Onsaard, E., M. Vittayanont, S. Srigam and D. J. McClements (2005). "Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Coconut Skim Milk Proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 5747-5753.
- Onsaard, E., M. Vittayanont, S. Srigam and D. J. McClements (2006). "Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate." Food Research International 39: 78-86.
- Östling, S. and P. Virtama (1946). "A modified preparation of the universal buffer described by Teorell and Stenhagen." Acta Physiologica Scandinavica 11(4): 289-293.
- Panicker, L. M., R. Usha, S. Roy and C. Mandal (2009). "Purification and characterization of a serine protease (CESP) from mature coconut endosperm." BMC research notes 2(1): 81.
- Pearce, K. N. and J. E. Kinsella (1978). "Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique." Journal of Agricultural and Food Chemistry 26(3): 716-723.
- Pyngthyngs. (2012). "Coconut Water Vs Coconut Milk VS Coconut Oil." Retrieved 20 October, 2016, from <http://hubpages.com/food/coconut-water-vs-coconut-milk-vs-coconut-oil>.
- Rasyid, F., M. Manullang and P. M. T. Hansen (1992). "Isolation and characterization of coconut protein." Food Hydrocolloids 6: 301-314.
- Ross, P. D., R. M. V. (1996). "Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes." Biophysical Journal. 71: 2144-2154.

- Ross, P. D., Subramanian, S. (1981). "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability." Biochemistry. 20: 3096-3102.
- Scheuplein, R. J., A. Mizutani and S. Yamaguchi (2007). "Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: Protein-glutaminase." Regulatory Toxicology and Pharmacology 49(2): 79-89.
- Schwenke, K. D. (1997). Enzyme and chemical modification of proteins. NEW YORK, MARCEL DEKKER.
- Segat, A., N. Misra, A. Fabbro, F. Buchini, G. Lippe, P. J. Cullen and N. Innocente (2014). "Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate." Food Research International 66: 365-372.
- Shih, F. (1985). "Analysis of glutamine, glutamic acid and pyroglutamic acid in protein hydrolysates by high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A 322: 248-256.
- Sikorski, Z. E. (2006). Chemical and functional properties of food components, CRC Press.
- Suppavorasatit, I., E. G. De Mejia and K. R. Cadwallader (2011). "Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein." Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(21): 11621-11628.
- Suppavorasatit, I., K. R. Cadwallader (2012). "Effect of enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase on the flavor-binding properties of the protein under aqueous conditions." Journal of Agricultural and Food chemistry. 60: 7817-7823.
- Sze-Tao, K. W. C. and S. K. Sathe (2000). "Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate." Food Chemistry 69: 153-160.
- Thaiphanit, S. and P. Anprung (2013). "Enzymatic modification of coconut protein I: its bioactive compounds and effect on pH-solubility profile of the modified protein." Thai Journal of Agricultural Science 44(2): 397-400.
- Thaiphanit, S. and P. Anprung (2016). "Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment." Food Hydrocolloids 52: 756-765.

- Thaiphanit, S., G. Schleining and P. Anprung (2016). "Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions." Food Hydrocolloids 60: 252-264.
- U.S. Food and Drug Administration. (2008). "GRN No. 267." GRAS Notices Retrieved 5 November, 2016, from http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=267&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=protein%20glutaminase.
- Whitaker, J. R. (1993). Principles of enzymology for the food sciences, CRC Press.
- Yada, R. (2004). Proteins in food processing. UK, Woodhead Publishing.
- Yamaguchi, S., D. J. Jeenes and D. B. Archer (2001). "Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins." European Journal of Biochemistry 268(5): 1410-1421.
- Yamaguchi, S. and M. Yokoe (2000). "A Novel Protein-Deamidating Enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a Newly Isolated Bacterium from Soil." Applied and Environmental Microbiology 66(8): 3337-3343.
- Yong, Y. H., S. Yamaguchi, Y. S. Gu, T. Mori and Y. Matsumura (2004). "Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(23): 7094-7100.
- Yong, Y. H., S. Yamaguchi and Y. Matsumura (2006). "Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(16): 6034-6040.
- Zhao, J., Z. Tian and L. Chen (2011). "Effects of deamidation on aggregation and emulsifying properties of barley glutelin." Food Chemistry 128(4): 1029-1036.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตามวิธีของ AOAC (2000))

อุปกรณ์

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

วิธีวิเคราะห์

1. อบถ้วยอลูมิเนียมและฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ จากนั้นชั่งน้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียม
2. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งและเย็นแล้ว
3. นำไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบและทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก
5. นำไปอบต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกมาทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่
6. คำนวณปริมาณความชื้นหรือน้ำที่หายไปจากสมการ

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

เมื่อ	W	คือ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
	W _i	คือ	น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะก่อนอบ (กรัม)
	W _f	คือ	น้ำหนักตัวอย่างและภาชนะหลังอบ (กรัม)

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

อุปกรณ์

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

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98%
2. กรดไฮโดรคลอริก 37% ความเข้มข้น 0.1 M
3. กรดบอริก ความเข้มข้น 4 % (w/v)
4. Indicator

- เตรียมโดยละลาย methy red 0.125 กรัม และ methylene blue 0.0825 กรัม ใน 90% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 35 %(w/v)
6. Kjeldahl tablet

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในหลอดย่อย
2. เติม Kjeldahl tablet 1 เม็ด เพื่อเร่งปฏิกิริยา และกรดซัลฟิวริก 20 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อย
3. ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
4. นำหลอดย่อยต่อเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีนที่มีการควบคุมอุณหภูมิการย่อย รอจนตัวอย่างมีสีเขียวอ่อน (ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที)
5. ปิดเตาย่อยและนำออกจากเครื่องย่อย และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรต

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

$$\%Nitrogen = \frac{(Vs - Vb) \times N \times 14 \times 100}{Wt.sample \times 1000}$$

- เมื่อ Vs คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)
- N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดย

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

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ตามวิธีของ AOAC (2000))

อุปกรณ์

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

สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้งแล้วให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
2. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วลงในทิมเบลและบรรจุในขวดสกัดที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
3. เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในขวดสกัด และต่อเข้ากับชุดสกัด ใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. ระเหยปีโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้
5. นำไขมันหรือน้ำมันที่ได้ในขวดสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่
6. ชั่งน้ำหนักของไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณหาปริมาณไขมันจากสมการ

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

เมื่อ W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_o คือ น้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)

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

อุปกรณ์

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

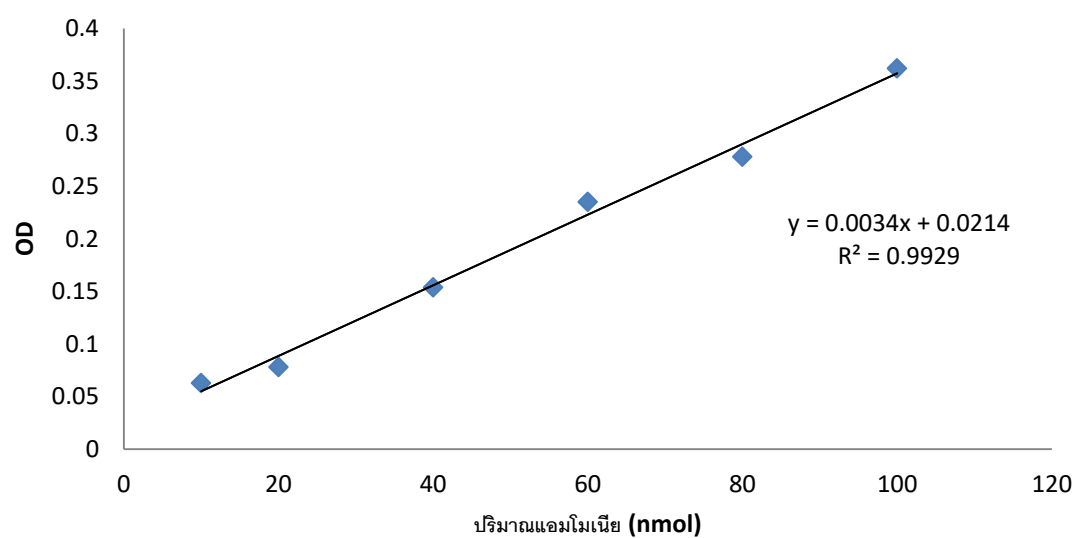
สารเคมี

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

วิธีวิเคราะห์

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

กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมโมเนีย

ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลาย (โดยใช้ DC protein assay)

อุปกรณ์

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

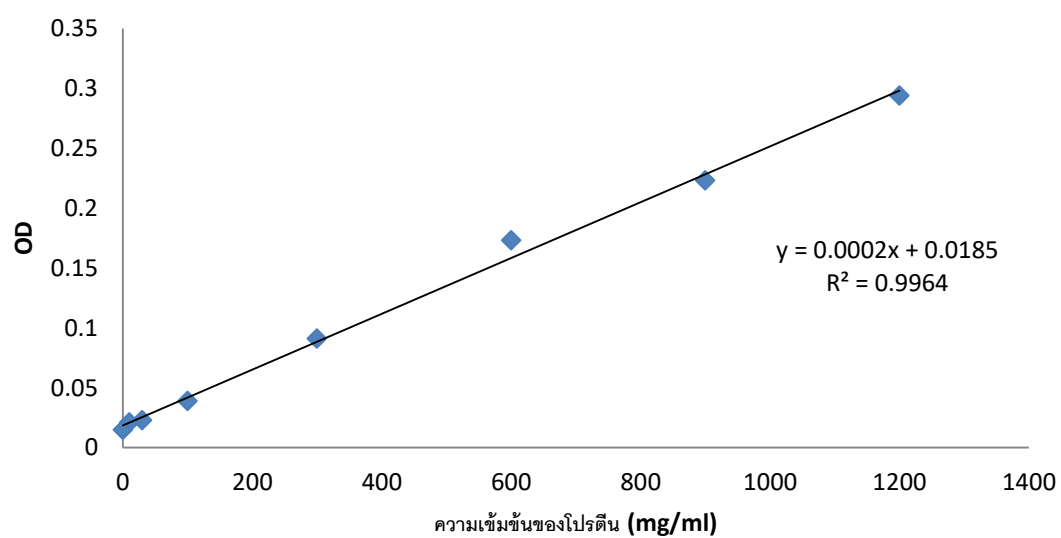
สารเคมี

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

วิธีวิเคราะห์

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

กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย

ภาคผนวก ข
การเตรียม buffer

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

สารเคมี

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

วิธีการเตรียม

การเตรียม buffer stock

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

การเตรียม buffer ที่ pH ต่างๆ

1. ผสม buffer stock ปริมาณ 20 มิลลิลิตร กับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 N ในปริมาณตามผิดพลาด! ไม่พบแหล่งอ้างอิง
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่เติมเพื่อให้สารละลายมี pH ต่าง ๆ

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

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

สารเคมี

1. โซเดียมอะซิเตด
2. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

วิธีการเตรียม

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

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

สารเคมี

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

วิธีการเตรียม

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

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน

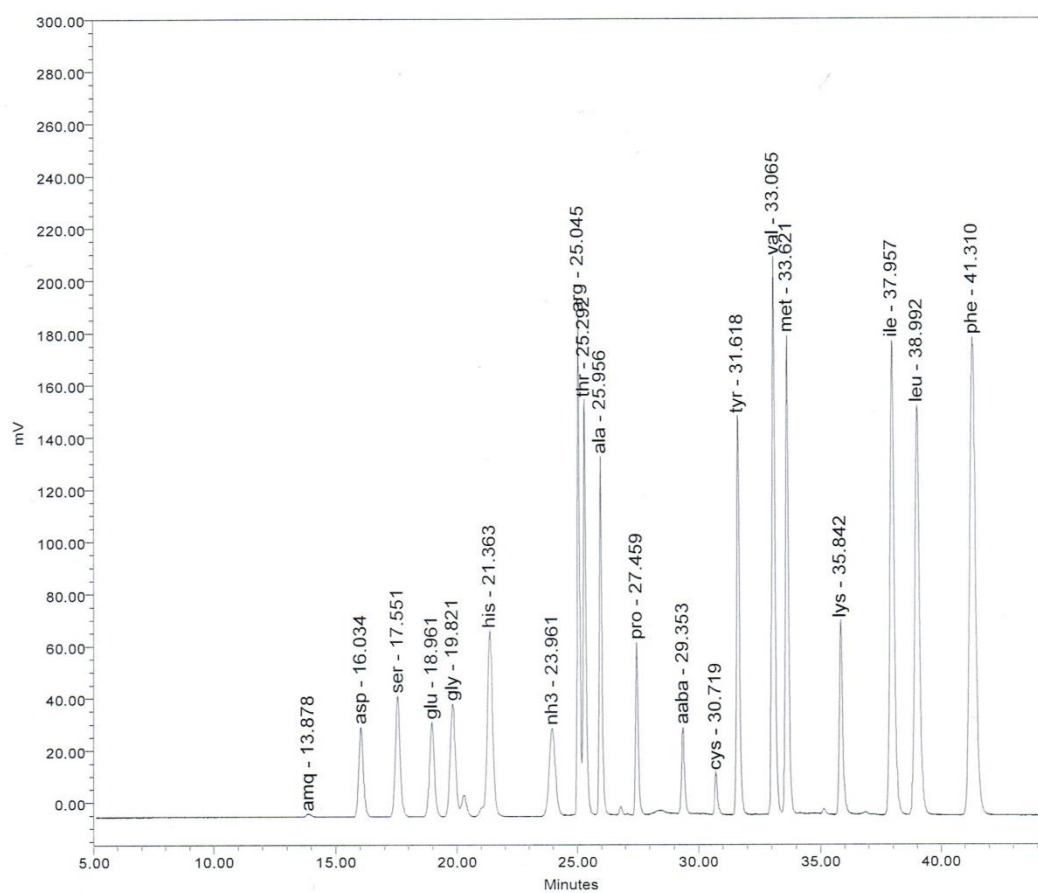
ค.1 การเตรียมตัวอย่าง

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

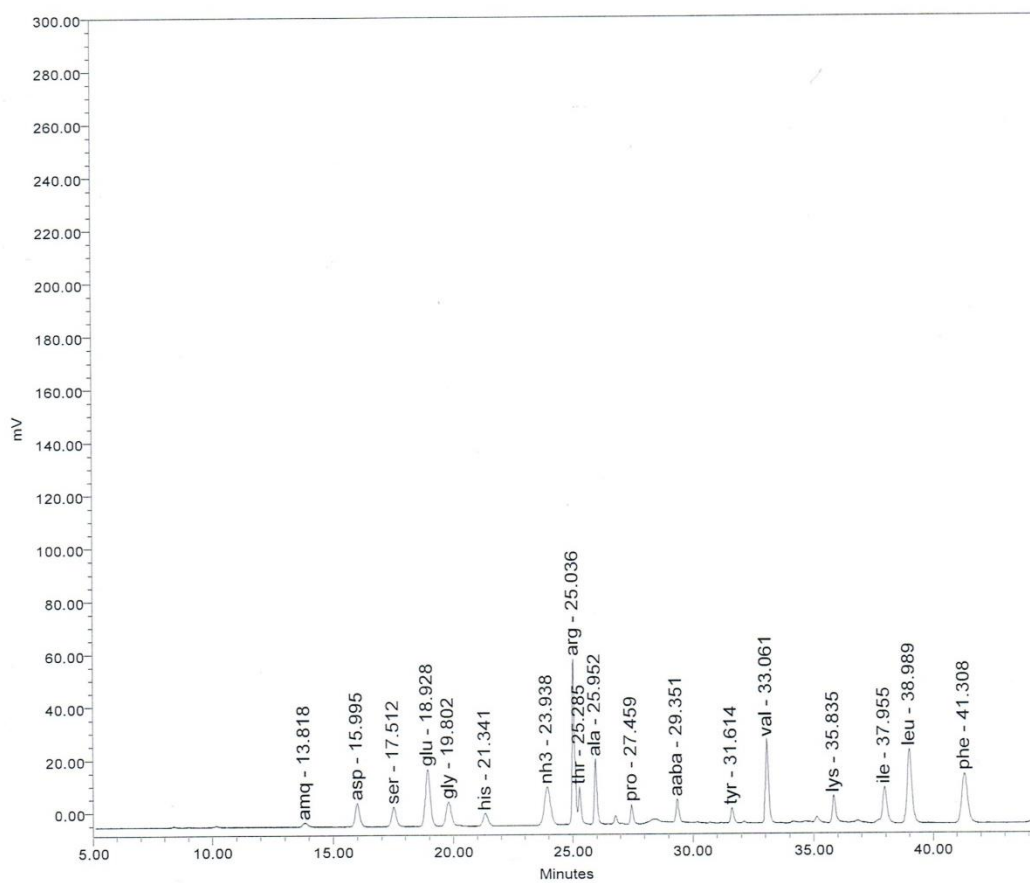
ค.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง HPLC

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

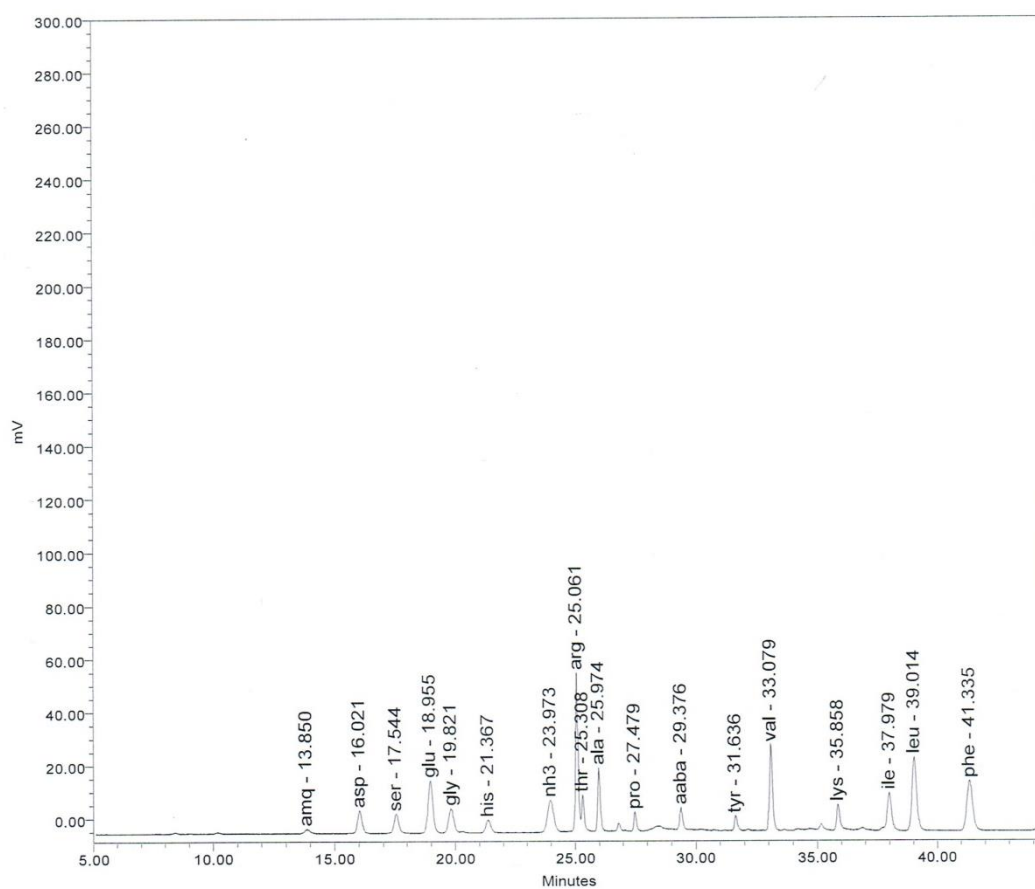
ค.3 Chromatogram



รูปที่ ค.1 Chromatogram ของกรดอะมิโนมาตรฐาน



รูปที่ ค.2 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร



รูปที่ ค.3 Chromatogram ของโปรตีนจากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ 6 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง

Molecular weight distribution

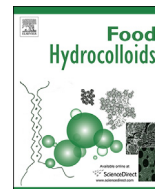
ง.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล

ตารางที่ ง.1 สัดส่วนการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมะพร้าว

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

ภาคผนวก จ**ผลงานตีพิมพ์**

Kunarayakul, S.; Thaiphanit, S.; Anprung, P.; Suppavorasatit, I. Optimization of coconut protein deamidation using protein-glutaminase and its effect on solubility, emulsification, and foaming properties of the proteins. *Food Hydrocolloid*. 2018, 79, 197-207.



Optimization of coconut protein deamidation using protein-glutaminase and its effect on solubility, emulsification, and foaming properties of the proteins

Supichcha Kunarayakul^a, Somruedee Thaiphani^b, Pranee Anprung^a,
Inthawoot Suppavorasatit^{a,*}

^a Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayatai Road, Wangmai, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

^b Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok, 10160, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2017

Received in revised form

28 November 2017

Accepted 23 December 2017

Available online 28 December 2017

Keywords:

Coconut protein

Enzymatic deamidation

Protein-glutaminase

Protein solubility

Emulsification property

Foaming property

ABSTRACT

The optimization of deamidation by protein-glutaminase (PG) on coconut protein (CP) and its effect on protein properties were studied. The optimum conditions were determined using response surface methodology (RSM). It was found that the optimum conditions were: enzyme:substrate ratio (E/S) of 36 U/g protein, temperature of 50 °C and pH of 7.0. The selected functional properties of treated CP subjected to deamidation for 15 min, 6 h, and 12 h, respectively were determined. Comparatively to control sample, the solubility of deamidated CP was improved at pH = 3.0 ($p \leq .05$). Water-holding and oil-holding capacities were not different from control after PG deamidation. Emulsifying activity index (EAI) of 15 min deamidated sample was decreased, while EAI of 6 and 12 h deamidated protein were not different from control. Emulsifying stability index of all deamidated samples were increased. Foaming capacity was increased after PG deamidation, while the foaming stability was decreased. It was also found that small molecular proteins were increased after PG deamidation.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coconut (*Cocos nucifera* L.) is one of important economic plants that is cultivated in most of tropical countries including Indonesia, Philippines, and Thailand. The world production of coconut in 2013 was about 62 million metric tons (FAO, 2013; Onsaard, Vittayanont, Srigan, & McClements, 2005). Nowadays, there are many products from coconut in the market such as coconut milk, coconut flour, and coconut oil. In addition, apart from using the coconut milk, it is also used for virgin coconut oil production. Increasing coconut oil production, especially of the virgin coconut oil, to be used as an components in food, medical, and cosmetic products, causes an increase in waste, which is the coconut skim milk containing high protein content (without protein denaturation by heat treatment) as reported by Hagenmaier, Cater, and Mattil (1972); Gunetileke and Laurentius (1974); Rosenthal, Pyle, and Niranjana (1996); Marina, Che Man, and Amin (2009). Thus, it may be possible to utilize these proteins as food and medical ingredients since the

coconut protein (CP) has high arginine content, which is beneficial to human health and disease prevention (DebMandal & Mandal, 2011; Mepba & Achinewhu, 2003; Remya, Chikku, Renjith, Arunima, & Rajamohan, 2013; Salil, Nevin, & Rajamohan, 2011).

The application of CP as an ingredient depends on protein's functional properties which are affected by protein pattern and amino acid composition. Peamprasart and Chiewchan (2006) reported that CP can act as emulsifier to stabilize fat globules. However, Patil and Benjakul (2017) found that water-soluble CP (albumin) exhibited low emulsifying properties, compared to salt-soluble proteins (globulin). In addition, protein solubility is one of the most important properties because it affects on other properties, including emulsification, foaming, and gelling properties (Kinsella & Melachouris, 1976; Vojdani, 1996). As well as other proteins, it has been reported that the use of CP is limited due to its low solubility, especially in slightly acidic condition (Samson, Cater, & Mattil, 1971; Thaiphani & Anprung, 2016). To improve plant protein solubility and other functional properties, deamidation is one of the popular methods to increase negative charge in the protein by changing amide to carboxyl group in glutamine and asparagine residues (Riha, Izzo, Zhang, & Ho, 1996; Wang, Gan,

* Corresponding author.

E-mail address: inthawoot.s@chula.ac.th (I. Suppavorasatit).

Zhou, Cheng, & Nirasawa, 2017). Among physical, chemical, and enzymatic deamidation methods, the enzymatic method is better than the others because of its substrate specificity, mild reaction condition, and less side-chain reaction (Hamada, 1994). From previous works, the functional properties such as solubility, emulsifying properties, and foaming properties were improved after deamidation in many kinds of protein sources, including soy, wheat, and maize. (Chan & Ma, 1999; Day, Xu, Lundin, & Wooster, 2009; Lei, Zhao, Selomulya, & Xiong, 2015; Liu et al., 2011; Mirmoghadaie, Kadivar, & Shahedi, 2009; Suppavorasatit, De Mejia, & Cadwallader, 2011; Wang et al., 2017; Yin, Wang, Liu, & Yao, 2017; Yong, Yamaguchi, Gu, Mori, & Matsumura, 2004).

Protein-glutaminase (PG) is an enzyme isolated from soil bacteria namely *Chryseobacterium proteolyticum* which can cause deamidation by changing amide group at glutamine residues even at high or low molecular weight of protein, but not free glutamine. Moreover, PG has no side reaction and has low susceptibility to hydrolysis when compared with other deamidation enzymes, such as protease, peptidoglutaminase, transglutaminase, and glutaminase (Gu, Matsumura, Yamaguchi, & Mori, 2001; Hamada, 1992; Kato, Tanaka, Lee, Matsudomi, & Kobayashi, 1987; Kato, Tanaka, Matsudomi, & Kobayashi, 1987; Yamaguchi & Yokoe, 2000; Yamaguchi, Jeenes, & Archer, 2001).

Response surface methodology (RSM), a mathematical and statistical technique, can be used as a tool to optimize deamidation conditions by prediction of dependent variable values using the mathematical models. The optimal models are evaluated from one or more factors and their interactions in order to reduce number of experiments, and thus reduce time-consumption. Therefore, RSM is widely used in optimization of processes or conditions in many food industries and research such as hydrolysis conditions of bovine plasma protein, extraction conditions of collagen from egg shell, high pressure processing conditions of mango pulp, and deamidation conditions of soy protein isolate (Kaushik, Rao, & Mishra, 2016; Mohammadi et al., 2016; Suppavorasatit et al., 2011).

To our knowledge, there is no study about deamidation of CP using PG. Therefore, the PG deamidation may be used to modify CP since CP contains high amount of glutamine/glutamic acid like soy proteins (Rasyid, Manullang, & Hansen, 1992; Samson et al., 1971; Thaiphonit & Anprung, 2016). The objectives of this research were to optimize the enzymatic deamidation of CP by PG and to study its effect on selected functional properties of deamidated CP, including solubility, water- and oil-holding capacity, emulsification, and foaming properties.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Coconut skimmilk for protein extraction was supplied by the 100 Phan Ma-phrau Thai group (Prachuapkhirkhan, Thailand), a virgin coconut oil manufacturer. Protein-glutaminase (PG) “Amano” 500 (515 U/g) was provided by Amano Enzyme, Inc. (Japan). All chemicals were analytical grade from Quality Reagent Chemical Co. Ltd. (New Zealand) and Sigma-Aldrich Co. (MO, USA).

2.2. Coconut protein extraction

Coconut protein (CP) was extracted from coconut skimmilk by conventional isoelectric precipitation method (Thaiphonit & Anprung, 2016) with some changes. HCl (1 N) was added to coconut skimmilk (initial pH = 4.38) in order to adjust pH to 3.9 (isoelectric point [pI] of CP), and then centrifuged at 5900×g for 20 min. The protein (precipitate) was dispersed in distilled water and re-extracted for 3 times. The extracted CP was dialyzed,

lyophilized, and kept at 4 °C prior further experiments and analyses. The protein content was determined by the Kjeldahl method using a nitrogen conversion factor of 6.25 (AOAC, 2000).

2.3. Optimization of PG deamidation on CP

The optimal condition for PG deamidation on CP was investigated using response surface methodology (RSM). A central composite design (CCD) with 3 factors (independent variables) including enzyme:substrate ratio (E/S; 5–50 U/g protein), temperature (40–60 °C), and pH (5–9) was selected based on available literature (Suppavorasatit et al., 2011; Yamaguchi et al., 2001) and recommendation from enzyme producer. The experimental design with 20 combinations is shown in Table 1.

Deamidation of CP was performed in 0.01 M citrate-phosphate-borate buffer (Suppavorasatit et al., 2011; Östling & Virtama, 1946) containing 10 mg/mL CP. The reaction was conducted with various factors as shown in Table 1 in 20 mL test tubes with lids. After deamidation, the temperature was raised to 80 °C and held for 10 min to inactivate enzyme. Degree of deamidation (DD) and degree of hydrolysis (DH) were used as dependent variables. The estimated response variables $\hat{y}$ (each dependent variable) can be described as a second-order mathematical model (Equation (1)):

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

where β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are constant, linear, quadratic, and interaction coefficients of the model, respectively, while x_i and x_j are independent variables. To generate the predicted models and calculate regression coefficients of the models, SPSS Statistics software version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was performed. The surface and contour plots were plotted using Statistica software version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

The additional experiments on the effect of deamidation on reaction times were conducted. The selected condition from RSM

Table 1

Experimental design (coded and actual values) for the degree of deamidation (DD, %) and degree of hydrolysis (DH, %) for the enzymatic deamidation of coconut protein using protein-glutaminase (PG).

design point	independent variables						dependent variables	
	code			actual value			DD	DH
	x_1	x_2	x_3	E/S ^a	T	pH		
1	−1	−1	−1	14	44	5.8	33.98	2.27
2	1	−1	−1	41	44	5.8	33.98	2.51
3	−1	1	−1	14	56	5.8	27.33	3.62
4	1	1	−1	41	56	5.8	30.58	4.28
5	−1	−1	1	14	44	8.2	23.75	2.51
6	1	−1	1	41	44	8.2	27.91	2.27
7	−1	1	1	14	56	8.2	24.83	3.74
8	1	1	1	41	56	8.2	34.61	2.76
9	−1.68	0	0	5	50	7	29.91	2.92
10	1.68	0	0	50	50	7	36.68	1.72
11	0	−1.68	0	22.5	40	7	31.61	2.71
12	0	1.68	0	22.5	60	7	31.61	5.26
13	0	0	−1.68	22.5	50	5	29.91	3.65
14	0	0	1.68	22.5	50	9	19.48	2.75
15	0	0	0	22.5	50	7	34.85	2.51
16	0	0	0	22.5	50	7	33.92	2.80
17	0	0	0	22.5	50	7	37.05	2.80
18	0	0	0	22.5	50	7	39.66	2.62
19	0	0	0	22.5	50	7	38.97	2.80
20	0	0	0	22.5	50	7	34.03	2.80

^a E/S is enzyme:substrate ratio.

(temperature of 50 °C, E/S ratio of 36 U/g protein, and pH of 7.0) was used to perform PG deamidation at various time periods from 0 to 24 h. A control sample was CP that treated under the same conditions for 24 h without addition of PG. The DD and DH were determined as a function of time.

2.4. Determination of molecular mass distribution by sodium dodecyl sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE of untreated, control, and deamidated CP samples were performed according to modified method of Laemmli (1970). In brief, loading sample was prepared by mixing 60 µL of protein sample (1 mg protein/1 mL deionized water) with 50 µL NuPAGE® LDS sample buffer (Life Technologies Cor., Carlsbad, CA) and 5 µL sample reducing agent. The sample was heated at 70 °C for 10 min, and then briefly spun in a centrifuge (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Five µL protein standard (SeeBlue® plus2 pre-stained protein markers) and 10 µL of each loading sample were loaded to precast polyacrylamide gel (NuPAGE® Novex® 4–12% Bis-Tris gel) with using NuPAGE® MES running buffer. The loaded gel was run at 80 V for 90 min. The gel was dyed in simple blue safe stain (Life Technologies Cor., Carlsbad, CA) for 20 min, and then de-stained in distilled water overnight. The molecular mass and band intensity of sample was determined by gel documentation and analysis software (SynGene Model InGeniusL, Frederick, MD, USA).

2.5. Determination of protein secondary structure by circular dichroism (CD)

The secondary structure of coconut protein was determined by the method described by Suppavorasatit et al. (2011). Coconut proteins were dispersed at a concentration of 10 µM in phosphate buffer (pH 7.0) at 20 °C. The CD spectra in the far UV region (190–250 nm) of each sample were determined using JASCO spectropolarimeter (Model J-715, Tokyo, Japan). The samples were analyzed using a 1-cm path length square quartz cuvette with a Teflon cap. The molar ellipticity values were calculated using the formula as shown in Equation (2)

$$[\theta]_{\text{molar},\lambda} (\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) = 100 \times \theta_{\lambda}/m \times d \quad (2)$$

where θ_{λ} is the observed ellipticity (degrees) at wavelength λ , m is molar concentration of a solute, and d is the pathlength (cm). The percentage of secondary structure production from CD spectra was obtained using software from webserver: perry.freeshell.org/raus-sens.html, based upon the method described by Raussens, Ruyschaert, and Goormaghtigh (2003).

2.6. Sample preparation for protein properties determination

PG deamidation of the protein was performed in 0.01 M citrate-phosphate-borate buffer (pH 7.0) containing 200 mg/mL CP and PG (E/S of 36 U/g protein). The mixture was incubated with continuously stirring (200 rpm) at different times (15 min, 6 h, and 12 h) at 50 °C in order to get deamidated CP samples with approximate 30, 40, and 50 %DD, respectively. The deamidated CP sample was then heated to 80 °C for 10 min to inactivate enzyme and immediately cooled down to room temperature. Each sample was dialyzed, freeze-dried, and stored at 4 °C prior to further experiments. Control sample was treated in the same way as the deamidated sample for 6 h, but without using PG.

2.7. Determination of DD

The DD was measured as described by Yong et al. (2004) and Suppavorasatit et al. (2011) with some modifications. The amount of released ammonia produced from deamidation process was determined using ammonia colorimetric assay kit II (Biovision Inc., Milpitas, CA, USA). The DD was expressed as the percentage of the amount of released ammonia from deamidated CP compared to amount of ammonia from completely hydrolyzed CP sample, which was CP treated with 2 N sulfuric acid at 100 °C for 4 h.

2.8. Determination of DH

The DH was determined by the method described by Cabra, Arreguin, Vazquez-Duhalt, and Farres (2007) and Suppavorasatit et al. (2011). The DH was calculated from the ratio (in percentage) of the soluble protein in supernatant after precipitate deamidated CP sample with 0.2 N trichloroacetic acid (TCA) and the soluble protein in supernatant of the completed hydrolysis CP sample.

The soluble protein in supernatant was determined using DC (detergent compatible) Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). The absorbance was measured at 630 nm. The soluble protein concentration was quantified using standard curve of bovine serum albumin (BSA) with $r^2 \cong 0.98$ (data not shown).

2.9. Determination of amino acids

The total amino acid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using Hypersil Gold C-18 column connected with fluorescence detector. The dried protein samples (untreated and deamidated for 6 h) were hydrolyzed and derivatized by 6 N HCl and heated at 110 °C for 22 h. The samples were then mixed with AccQ-fluor derivatization reagent and heated to 50 °C for 10 min. Sodium acetate buffer (pH 4.9) with 60% acetonitrile was used as eluent.

2.10. Determination of solubility

Protein solubility (PS) at pH 3.0, 5.0, and 7.0 and pH solubility profile between pH 2.4–8.0 were determined in triplicate according to the procedure described by Yong et al. (2004) with some changes. One mg of freeze-dried CP sample was dissolved in 0.1 M phosphate-acetate buffer in 1.5 mL microcentrifuge tubes. The samples were kept at ambient temperature overnight, then vortexed and centrifuged at 1000g for 10 min (Kubota model#5310, Japan). The soluble protein in supernatant was determined by DC protein assay and the PS was calculated as shown in Equation (3).

$$\text{PS}(\%) = \frac{\text{Protein in supernatant}}{\text{Total Protein}} \times 100 \quad (3)$$

2.11. Determination of water- and oil-holding capacity

Water-holding capacity (WHC) and oil-holding capacity (OHC) were determined in triplicate according to a slightly modified method of Sze-Tao and Sathe (2000). The freeze-dried samples (0.1 g) were dissolved in 1 mL deionized water or dispersed in 1 mL palm oil, vortexed for 30 s. After letting them stand for 30 min, the mixtures were centrifuged at 13,600×g at 25 °C for 10 min (Kubota model#5310, Japan), and then the precipitate was weighed. WHC or OHC were expressed as g of water or oil retained per g of protein.

2.12. Determination of emulsification properties

Emulsifying activities index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) were measured by turbidimetric method described by [Pearce and Kinsella \(1978\)](#) with slight modification. One hundred and fifty mg sample was dispersed in 30 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) and mixed with 10 mL of palm oil, the mixture was then homogenized (Ystral model D-79282, Germany) at 22,000 rpm for 1 min to form emulsion. One hundred μ L of emulsion was taken (at 0 and 10 min after homogenization) and diluted with 9.9 mL of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The absorbance of diluted emulsion was measured at 500 nm. The EAI and ESI were calculated following Equations (4) and (5)

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{dilution factor}}{c \times \phi \times 10000} \quad (4)$$

$$\text{ESI}(\text{min}) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t \quad (5)$$

where A_0 is the absorbance of diluted emulsion immediately after homogenization, c is weight of protein per unit volume (g/mL) in the aqueous phase before emulsion formation, ϕ is oil volume fraction of the emulsion, ΔA is the change in absorbance between 0 and 10 min, and t is the time interval (10 min).

2.13. Determination of foaming properties

Foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) were determined according to the method described by [Kanu et al. \(2009\)](#) with some modifications. The freeze-dried CP was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at concentration of 0.5% (w/v). The foam was formed by homogenizing 50 mL of protein solution at 18,000 rpm for 1 min. The FC and FS were calculated as shown in Equations (6) and (7)

$$\text{FC}(\%) = \frac{V_{F0} - V_L}{V_L} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{FS}(\%) = \frac{V_{FT}}{V_{F0}} \times 100 \quad (7)$$

where V_L is volume of protein mixture before forming foam, V_{F0} is volume of foam immediately after homogenization, and V_{FT} is the volume of foam at interval time.

2.14. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. The data were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA). Duncan's multiple range test was used to compare the differences among treatments ($p < .05$) using SPSS statistic software version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results and discussion

3.1. Coconut protein extraction

It was found that yield of CP extracted from coconut skim milk was $3.81 \pm 0.71\%$ (w/w), while protein content was $81.68 \pm 1.03\%$ (w/w). This result was quite similar to that reported by [Thaiphant and Anprung \(2016\)](#) who extracted CP at pH 4.0. They found that the CP yield and protein content were 4.56% and 80.3% (w/w), respectively. In addition, moisture and fat contents of extracted CP were $0.98 \pm 0.01\%$ and $16.57 \pm 0.24\%$ (w/w), respectively.

3.2. Optimization of PG deamidation on CP

From central composite design, the experimental data were obtained from 20 combinations of three independent variables, which were E/S, temperature, and pH (Table 1). Two models were fitted to explain DD and DH as dependent variables and showed as second-order equations (Equations (8) and (9)).

$$\text{DD}(\%) = -89.386 - 0.629x_1 + 2.503x_2 + 22.025x_3 - 0.008x_1^2 - 0.05x_2^2 - 2.982x_3^2 + 0.012x_1x_2 + 0.089x_1x_3 + 0.309x_2x_3 \quad (8)$$

$$\text{DH}(\%) = 19.428 + 0.176x_1 - 0.854x_2 + 0.097x_3 - 0.001x_1^2 + 0.012x_2^2 + 0.093x_3^2 - 0.001x_1x_2 - 0.015x_1x_3 - 0.024x_2x_3 \quad (9)$$

where DD is degree of deamidation (%), DH is degree of hydrolysis (%), x_1 is E/S (U/g protein), x_2 is temperature ($^{\circ}\text{C}$), and x_3 is pH. The coefficients of determination (r^2) of the models (DD and DH) were 0.929 and 0.928, respectively. To generate the surface and contour plots, the main effects of the models were determined by ANOVA. It was found that the main effects of DD model (Equation (8)) were not significant, while the least significant of DH model (Equation (9)) was E/S ($p = .896$). In order to find out the optimum condition from the plots, the overlaid contour plot of DD and DH using temperature and pH as independent variables was considered. The E/S was kept at a constant value of 36 U/g protein, which was the value that gave highest DD and acceptable DH values. The surface plots (a) and contour plots (b) of the DD and DH models are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively.

From Fig. 1, the temperature around 48–52 $^{\circ}\text{C}$ and the pH around 6.8–7.2 caused the highest DD value. The DD was increased with increasing temperature up to around 50 $^{\circ}\text{C}$, and then decreased when the temperature was raised above 50 $^{\circ}\text{C}$. This could be because the PG was inactive at temperature higher than 50 $^{\circ}\text{C}$ ([Yamaguchi & Yokoe, 2000](#)). In addition, an increase of DD was observed at pH around 7 (38% DD at pH 6.8). This result was in agreement with report of a group of researchers who found that the PG stabilized at pH around 5–9 and was highly active at pH 5–7 ([Yamaguchi et al., 2001](#)). However, the optimum conditions of PG deamidation can depend on many other factors, including protein type, protein structure, and amino acid profile ([Gu et al., 2001](#); [Hamada, 1992](#); [Mohammadi et al., 2016](#)).

Fig. 2 shows the minimum DH (<3%) at temperatures around 43–51 $^{\circ}\text{C}$ and pH around 8. This could be explained by the fact that high temperature caused protein unfolding and releasing the short chain peptides and/or proteins, so the DH was increased. In addition, at around neutral pH (pH = 7–8), the proteins were stable due to low electrostatic force, resulting in low DH ([Damodaran, Parkin, & Fennema, 2007](#)).

In order to optimize PG deamidation of CP by RSM, the desirable high DD and low DH were considered. From the overlaid contour plot of DD and DH, the optimum conditions chosen were at pH around 7.0 and temperature around 50 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 3). At this condition, the maximum DD (38%) was observed and the DH was around 3%, which was an acceptable value described by previous study ([Suppavorasatit et al., 2011](#)).

The effect of reaction time on PG deamidation of CP is shown in Fig. 4. The DD was dramatically increased to about 35% within first 2 h, and then slightly increased until reaching the plateau at 12 h (about 54% DD). In addition, the DH was also raised to approximately 3% within 2 h, and continued increasing to around 6% at 24 h. These possible hydrolytic reactions could have occurred due to the actions of PG itself and of active proteolytic enzymes originated from coconut meat since the enzymes might not be destroyed during protein extraction process ([Panicker, Usha, Roy, &](#)

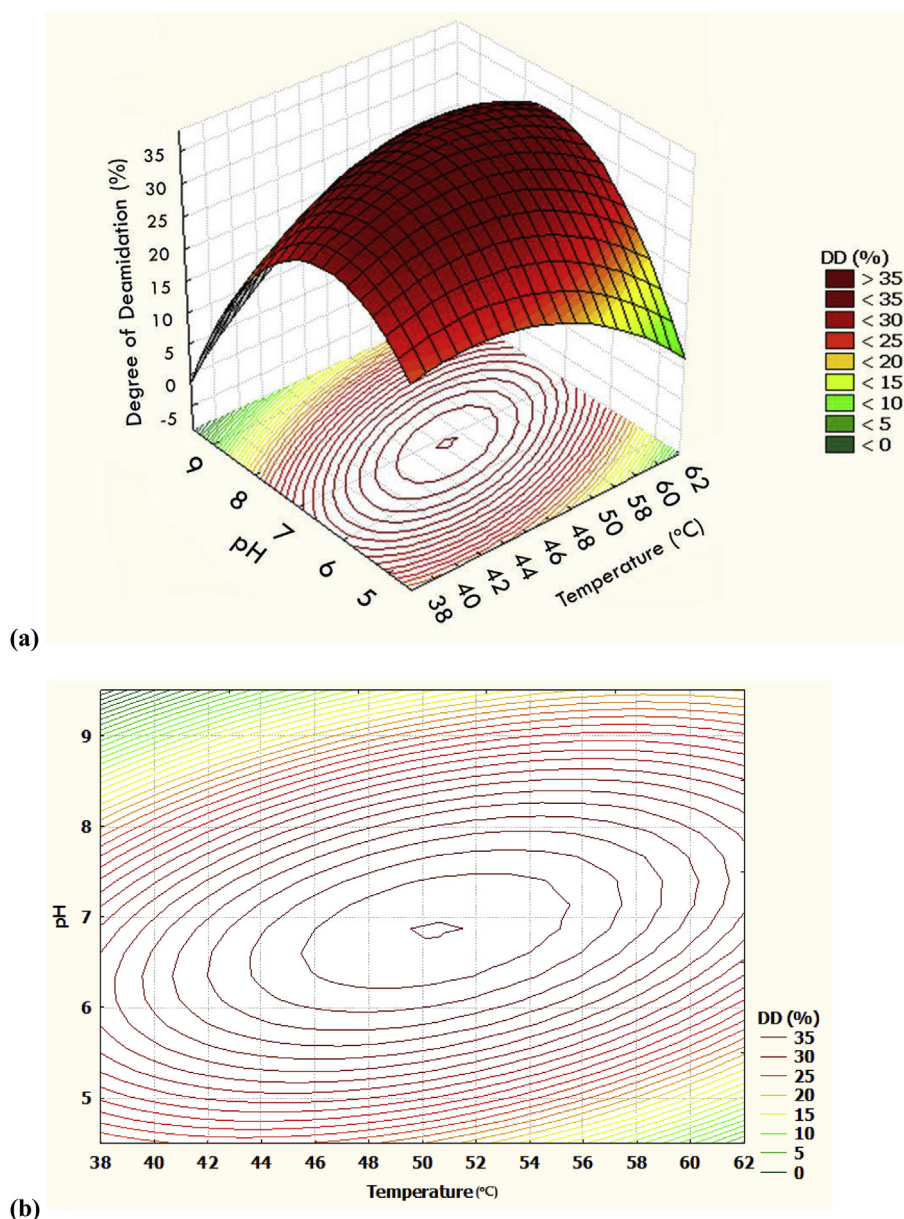


Fig. 1. Response surface (a) and contour (b) plots of the effect of temperature and pH on the degree of deamidation (DD, %) of coconut protein (CP) by protein-glutaminase (PG) at enzyme:substrate ratio 36 U/g protein (from Equation (7)).

Mandal, 2009). Furthermore, the PG used in this study was commercial PG, which could contain some residual protease activities as well (Suppavorasatit et al., 2011).

In order to prepare PG deamidated CP samples for functional properties determination, the PG deamidation was performed using optimal condition: E/S of 36 unit/g protein, pH of 7.0 and temperature of 50 °C with various reaction times. The DD of prepared deamidated CP samples at 15 min, 6 h, and 12 h were 32.21, 42.57, and 49.61%, respectively, while the DH were 2.50, 5.23 and 5.58%, respectively. The DD and DH values of prepared samples appeared slightly different from the expected values (30, 40, and 50% DD). This could be the result of using higher substrate concentration during sample preparation process (200 mg/mL CP) compared to the optimization study (10 mg/mL CP) (Schwenke, 1997). A similar phenomenon was found in previous study about PG deamidation on soy protein isolate done by Suppavorasatit et al. (2011).

3.3. Determination of amino acids

Total amino acids of untreated CP and 6 h deamidated CP were determined by HPLC (Table 2). Both untreated and deamidated CPs contained high level of glutamic acid and arginine. As reported previously about action of PG on the proteins, PG can change glutamine residue both in peptide and protein chain to glutamic acid. It was expected to see the results showing an increase in glutamic acid after deamidation. However, the results showed similar amount of glutamic acid in both untreated and deamidated CP samples. It might be due to the conversion of glutamine to glutamic acid or pyroglutamic acid during sample preparation for the determination of the amino acid profile by HPLC (Airaud, Gayte-Sorbier, & Armand, 1987; Shih, 1985). Thus, the amount of glutamic acid shown in Table 2 was the total amount of glutamine, glutamic acid, and pyroglutamic acid. In addition, the composition of the amino acid in untreated CP was comparable to previous

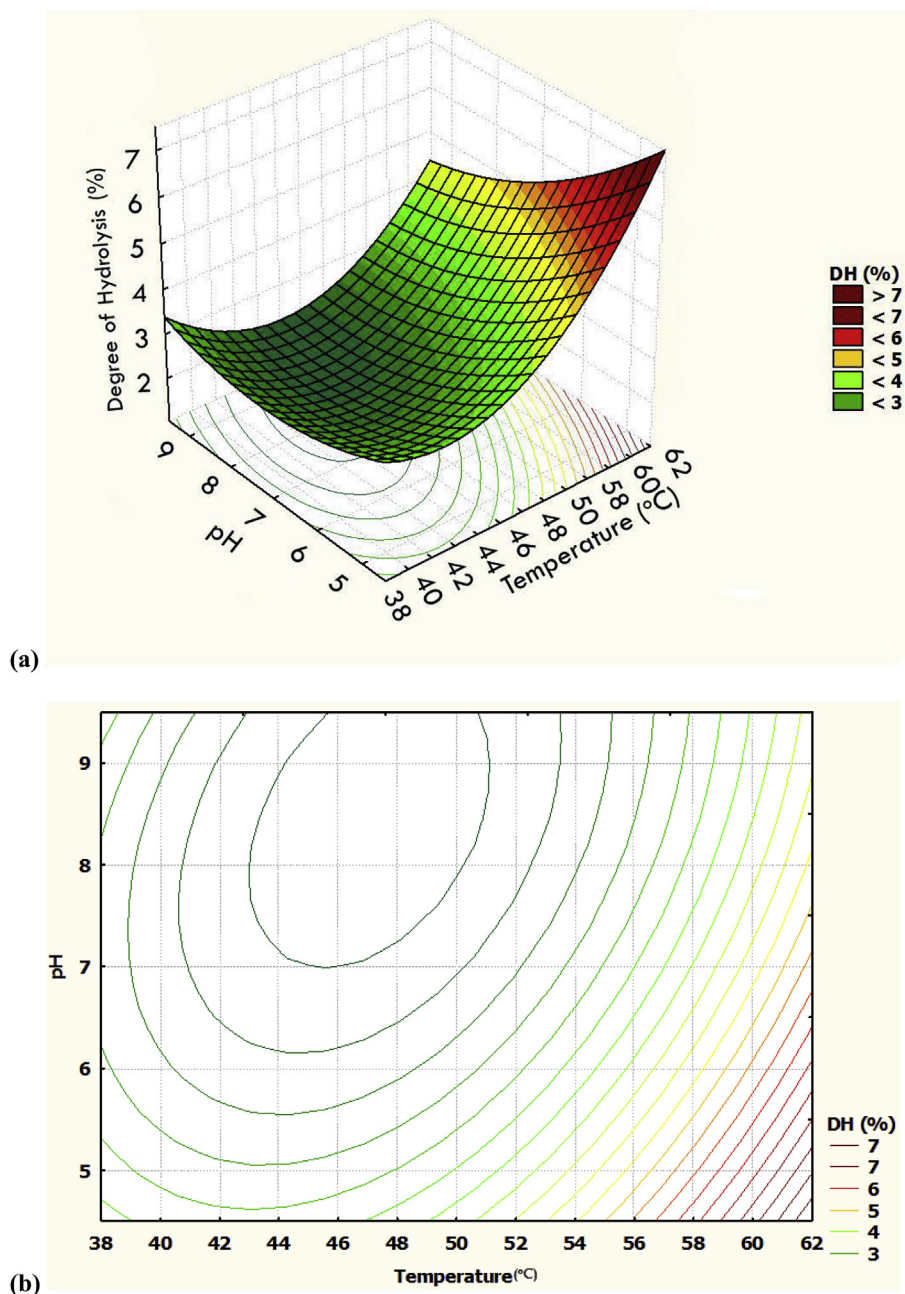


Fig. 2. Response surface (a) and contour (b) plots of the effect of temperature and pH on the degree of hydrolysis (DH, %) of coconut protein (CP) by protein-glutaminase (PG) at enzyme:substrate ratio 36 U/g protein (from Equation (8)).

study, which also indicated that the CP is high in glutamic acid, arginine, and aspartic acid and contains nine types of essential amino acids (Thaiphanit & Anprung, 2016).

3.4. Band patterns by SDS-PAGE

The band patterns by sodium dodecyl sulfate –polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of untreated, control, and deamidated CP for 15 min, 6 h and 12 h are displayed in Fig. 5. Generally, main proteins found in CP are globulins, including 11S and 7S globulin. More than 80% of globulin is cocosin or 11S globulin, which has molecular weight around 326 kDa. However, from previous studies, three bands (24, 34, and 55 kDa) were shown in SDS-PAGE. The minor globulin is 7S, which has native molecular weight

of 156 kDa with three bands as 16, 22, 24 kDa shown in SDS-PAGE (Garcia, Arocena, Laurena, & Tecson-Mendoza, 2005; Kwon, Park, & Rhee, 1996).

Fig. 5 shows similar band patterns, but different in band intensity. The control and deamidated CP show high band intensity at lower than 22 kDa bands, especially at about 12 and 16 kDa. The percentage of band intensities of all samples (untreated, control, deamidated CP at 15 min, 6 h, and 12 h) at lower than 22 kDa determined by gel documentation and analysis software is 13.44, 15.47, 17.11, 19.38 and 22.09, respectively. This phenomenon might have occurred due to the heat treatment and protein hydrolysis. The proteins could have unfolded and shorter chain peptides and/or proteins could be released. A downward shift of the band patterns of deamidated protein was also found in other proteins,

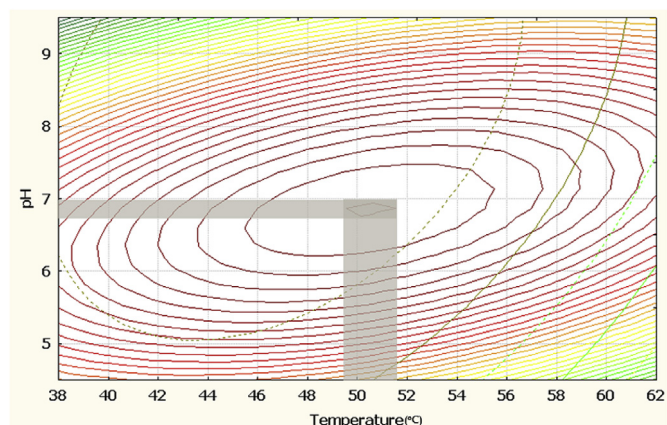


Fig. 3. Overlaid contour plots of the response variables, degree of deamidation (DD, %) and degree of hydrolysis (DH, %), of coconut protein (CP) by protein-glutaminase (PG) showing the optimal region for deamidation.

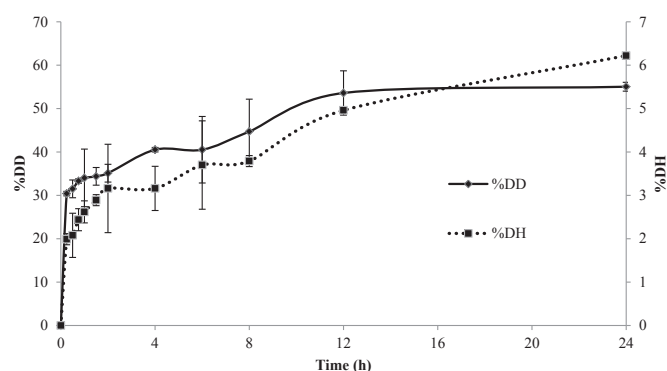


Fig. 4. Changes in degree of deamidation (DD, %) and degree of hydrolysis (DH, %) of coconut protein (CP) induced by protein-glutaminase (PG) deamidation as a function of time.

Table 2

Amino acid profile of untreated and deaminate coconut proteins by protein-glutaminase.

amino acid	untreated (mg/100 mg)	deamidated
aspartic acid	6.65	6.74
serine	3.19	3.21
glutamic acid	16.87	16.41
glycine	3.16	3.12
histidine	2.04	2.06
arginine	10.94	10.62
threonine	1.99	2.00
alanine	2.85	2.93
proline	2.44	2.47
tyrosine	1.40	1.28
valine	3.34	3.57
lysine	3.85	3.95
isoleucine	1.92	2.09
leucine	4.49	4.65
phenylalanine	3.43	3.35

including soy protein, wheat gluten, and maize protein. (Suppavarasatit et al., 2011; Yong, Yamaguchi, & Matsumura, 2006).

3.5. Circular dichroism (CD)

The changes in secondary structure caused by deamidation were

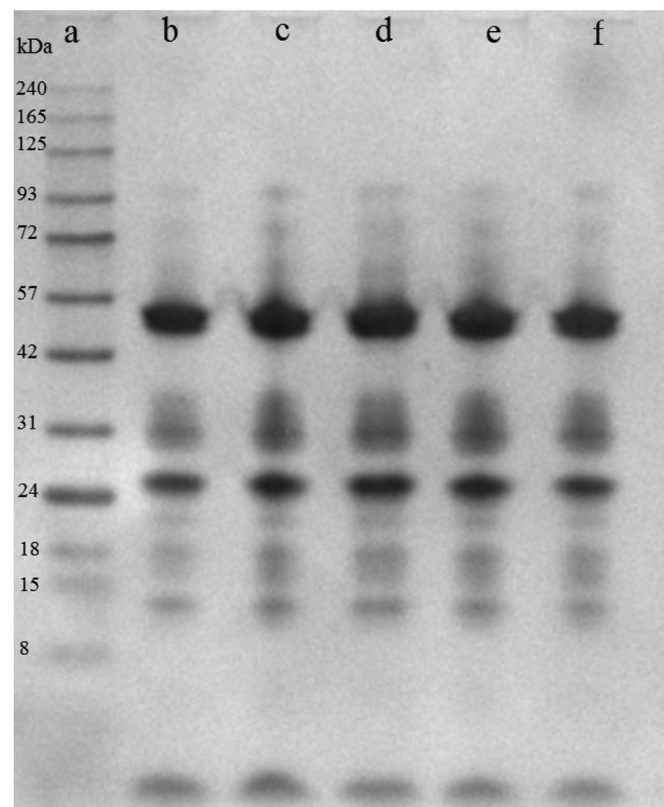


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of coconut protein treated by PG: (a) molecular weight markers; (b) untreated coconut protein; (c) control coconut protein, incubated without PG for 6 h (10.46% DD); (d) coconut protein incubated with PG for 15 min (32.21% DD); (e) coconut protein incubated with PG for 6 h (42.57% DD); (f) coconut protein incubated with PG for 12 h (49.61% DD).

measured using the far-UV CD spectra (190–250 nm) of the protein samples. The CD spectra of the soluble fractions of the untreated, control, and deamidated CP samples are shown in Fig. 6. From the CD spectra, it was found that deamidation could decrease the percentage of α -helix structure and increase that of β -sheet structure (Table 3). The increase in β -sheet formation after deamidation

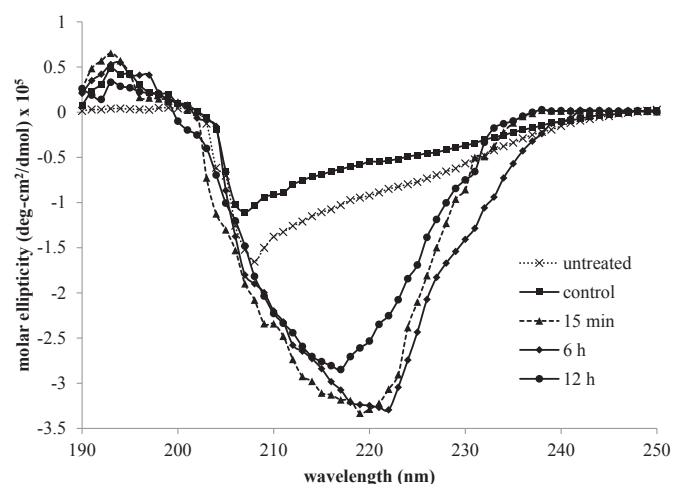


Fig. 6. Far UV-CD spectra of non-deamidated and deamidated coconut protein (CP): untreated; control (CP treated without PG); CP deamidated for 15 min (32.21% DD, 2.50% DH); CP deamidated for 6 h (42.57% DD, 5.23% DH); CP deamidated for 12 h (49.61% DD, 5.58% DH).

Table 3
Secondary structures of non-deamidated and deamidated coconut proteins.

sample	secondary structure (%)				
	α -helix	β -sheet	β -turn	random	sum
untreated	11.8	26.5	12.5	38.8	89.7
control	20.1	21.3	12.5	37.4	91.3
15 min	0.3	43.5	12.5	37.8	94.0
6 h	0.3	40.9	12.5	37.9	91.6
12 h	0.3	40.7	12.5	38.2	91.7

Data were derived from analysis of CD spectra.

agrees with previous works on α -zein and soy protein isolate (Suppavorasatit et al., 2011; Yong et al., 2004). Moreover, the percentage of β -turn structure and random coil did not differ among samples.

3.6. Protein solubility

pH solubility profiles of untreated, control, and deamidated CP samples (at 15 min, 6 h, and 12 h) are shown in Fig. 7. It was found that the solubility of all deamidated CP samples was higher than that in untreated and control samples at the pH < 4.2. In addition, at the pH > 5.0, untreated CP showed higher solubility in comparison to the others. From the plots, isoelectric point (pI) of CP has changed as a result of PG deamidation and heat treatment to inactivate enzyme (80 °C for 10 min). After PG deamidation, the pI of CPs was shifted to be around 4.0–4.2, compared to untreated and control CP, which was around 3.9–4.0. The slightly increased pI after deamidation was in agreement with the works published by Wang and Johnson (2001) and Suppavorasatit et al. (2011) who found that the shift of pI could be a result of heat treatment during enzyme inactivation step. In addition, it was reported that the shift in pI came from the reaction of deamidation which can increase the polyelectrolyte character of protein (Day et al., 2009). The increase in pI could make CP more soluble in acidic condition.

The protein solubility of deamidated CPs compared with untreated and control samples at different pH values (3.0, 5.0, and 7.0) is shown in Table 4. The solubility at pH 7.0 was higher than at pH 3.0 and 5.0. The lowest solubility was observed in all samples at pH 5.0 since it is close to the pI of CP. At pH 3.0 and 7.0, the solubility of control sample was lower than untreated CP due to thermal denaturation during heating step leading to the protein aggregation (Kwon et al., 1996). During heating, inter- and intramolecular bonds were ruptured, resulting in rearrangement of the proteins at the surface. This could have resulted in an increase of protein surface hydrophobicity and thus the protein solubility

Table 4
Solubility of non-deamidated and deamidated coconut proteins.

sample	solubility (%)		
	pH 3.0	pH 5.0 ^{ns}	pH 7.0
untreated	54.90 ^{ab} ± 1.79	20.03 ^c ± 1.94	85.43 ^{aA} ± 1.83
control	42.92 ^{bb} ± 4.05	19.70 ^c ± 2.12	76.11 ^{bA} ± 1.54
15 min	51.72 ^{ab} ± 2.66	20.63 ^c ± 2.50	66.12 ^{cA} ± 2.19
6 h	54.44 ^{ab} ± 0.44	22.27 ^c ± 2.58	67.68 ^{cA} ± 2.46
12 h	51.85 ^{ab} ± 4.17	23.36 ^c ± 2.33	83.63 ^{aA} ± 1.22

^{a-b} Within columns, values with different superscripts indicate significant differences at $p < .05$.

^{A-C} Within rows, values with different superscripts indicate significant differences at $p < .05$.

^{ns} No differences between data within the same column.

has decreased. At pH 3.0, the solubility of all deamidated samples was higher than that of control sample. This could be explained that the deamidation could have increased electrostatic forces of protein, and therefore the solubility has increased (Boye, Ma, & Harwalkar, 1997). Generally, the solubility of the proteins increases after modification of their structures by deamidation; however, the result shows that the solubility of deamidated protein at pH 7.0 was lower than that untreated and control samples except 12 h deamidated CP. A high solubility at neutral pH of 12 h deamidated CP might have resulted from hydrolysis since the DH had increased as a function of time (Fig. 4). This is in agreement with the previous finding showing that the solubility of the protein is increasing as a result of both deamidation and hydrolysis by rupturing the peptide linkages of the proteins (Yong et al., 2004).

3.7. Water- and oil-holding capacity

Water holding capacity (WHC) of all deamidated CP was higher than that of untreated CP as shown in Table 5. Previous reports indicated that deamidation reaction can change the functional group of protein from amide to carboxyl group which is more stable in ionic form. Therefore, the protein-water interaction raises due to the increment of protein net charge that results in the increase of WHC after deamidation (Damodaran et al., 2007; Mirmoghtadaie et al., 2009).

The effect of deamidation on oil holding capacity (OHC) is shown in Table 5. It was found that there was no difference among treatments. In general, OHC can be affected by many factors, including protein content, extent of change in oil/water surface area, hydrophobicity, and charge of the protein. However, this might be due to the CPs containing a certain amount of fat and because the major factor affecting fat absorption mechanism is the physical entrapment. The deamidation reaction by PG does not affect significantly the protein structure (Chan & Ma, 1999; Mirmoghtadaie et al., 2009).

3.8. Emulsifying properties

Emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) were performed in phosphate buffer at pH 7.0 as shown in Table 5. In general, the emulsifying properties of untreated and treated proteins are due to structural properties of the protein that can stabilize emulsion by forming a thin layer adsorbed at the oil-water interface. It is covalently bound and provided stability to emulsions against coalescence and flocculation (Dickinson, 2003, 2012; Sharif et al., 2017). However, the results in Table 5 show that the untreated CP had higher EAI than the others, while the 15 min deamidated CP had the lowest value. This might be due to

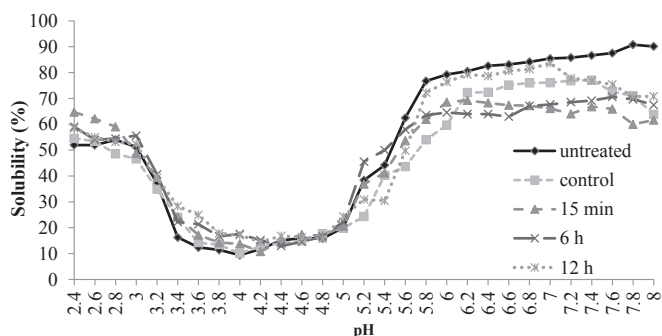


Fig. 7. pH solubility profiles of non-deamidated and deamidated coconut proteins by protein-glutaminase.

Table 5

Water-holding capacity (WHC), oil-holding capacity (OHC), emulsifying activity index (EAI), emulsifying stability index (ESI), and foaming capacity (FC) of non-deamidated and deamidated coconut proteins.

sample	WHC (g water/g protein)	OHC ^{ns} (g oil/g protein)	EAI (m ² /g protein)	ESI (min)	FC (%)
untreated	0.90 ^b ± 0.05	1.24 ± 0.06	52.46 ^a ± 0.40	53.41 ^c ± 4.92	6.11 ^a ± 0.05
control	1.01 ^{ab} ± 0.06	1.21 ± 0.16	24.83 ^b ± 1.06	62.00 ^c ± 2.65	4.67 ^c ± 0.58
15 min	1.08 ^a ± 0.12	1.25 ± 0.12	17.76 ^c ± 1.62	111.25 ^b ± 1.77	5.08 ^{bc} ± 0.14
6 h	1.16 ^a ± 0.08	1.43 ± 0.20	22.30 ^b ± 0.23	139.17 ^a ± 1.44	5.15 ^{bc} ± 0.18
12 h	1.08 ^a ± 0.01	1.19 ± 0.05	23.23 ^b ± 3.18	104.17 ^b ± 3.54	5.91 ^{ab} ± 0.13

^{a-c} Within columns, values with different superscripts indicate significant differences at $p < .05$.

^{ns} No differences between data within the same column.

effect of sufficiently soluble protein/oil ratio, structure, and surface hydrophobicity of the protein, which are the main factors affecting emulsifying properties (Boye et al., 1997; Sharif et al., 2017). The highest solubility at pH 7.0 was observed in untreated CP, when the solubilized protein could form a layer around oil droplet better than other treated proteins. Thus the EAI of untreated sample was the highest. In comparison within only the deamidated samples, the high DD sample had higher EAI since the deamidation could increase solubility, net charge, and surface hydrophobicity, thus changed the hydrophilic-lipophilic balance for emulsification (Chan & Ma, 1999; Damodaran et al., 2007). Moreover, after deamidation, more flexible secondary structures were found as shown in Fig. 6 and Table 3. After PG deamination, percentage of the β -sheet has increased, while that of the α -helix has decreased. These changes in the secondary structure can reflect in interfacial properties of the protein (Zhang, Waghmare, Chen, Xu, & Mitra, 2015). Furthermore, the comparison of amino acid profiles of deamidated and untreated CPs (Table 2) shows that deamidation caused some changes in amount of hydrophobic and hydrophilic amino acids, which could highly affect EAI values. These changes in amino acids profiles were also found in previous studies done on soy protein and wheat gluten (Chan & Ma, 1999; Liao et al., 2010).

In contrast to the result of EAI, the ESI of all deamidated CPs was higher than untreated and control samples. For deamidated CPs, the improvement of the emulsification ability is mainly based on the rise of electrostatic repulsive force of the deprotonated carboxyl groups and protein-protein interaction at water-oil interface (Dickinson, 2010a). Moreover, the stability of oil-in-water emulsion might be due to the proportion of 11S and 7S fractions in CP and deamidated CPs (Fig. 5). In addition, the deamidation could make proteins orient themselves toward fat in water-oil interface, and thus increasing the stability of the emulsion. However, the previous studies showed different influences on the emulsion stability such as interfacial tension, particle size distribution, rheological properties, protein-polysaccharide interaction and flocculation (Koberstein-Hajda & Dickinson, 1996; Thaiphonit & Anprung, 2016; Thaiphonit, Schleining, & Anprung, 2016). In addition, the 12 h deamidated CP showed lower ESI than 6 h modified CP. This decreasing of ESI could be due to the fact that the solubility of 12 h deamidated samples approached to untreated sample. It also can be explained that samples with high DD could cause an excessive net charge and increase electrostatic repulsion, resulting in the decrease in protein-protein interaction (Damodaran et al., 2007; Lei et al., 2015; Liao et al., 2010; Mirmoghataie et al., 2009). Moreover, heating process at 50 °C during CP deamidation for a longer time (12 h) is probably causing the heat-induced change in the protein-polysaccharide interactions in CP which plays a role in the formation of structure and texture as a thickening agent in O/W emulsions stabilized by the proteins (Thaiphonit & Anprung, 2016). In addition, the heating process and protein hydrolysis can induce change in the molecular weight of the CP as already shown in the band patterns by SDS-PAGE.

3.9. Foaming properties

The determination of foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) were performed in phosphate buffer (pH 7.0) and the results are displayed in Table 5 and Fig. 8, respectively. Generally, the foaming properties of the CP are due to the interfacial rheology of the adsorbed layer of the protein film around a bubble which can prevent Ostwald ripening (Dickinson, Ettelaie, Murray, & Du, 2002). This functional behavior can be affected by some properties of the proteins such as molecular weight, surface deformation and conformational structures (Dickinson, 1999, 2010b). Therefore, the untreated CP had the highest FC when compared with other samples (Table 5). This could be due to the heating step, which caused partial denaturation and increased surface hydrophobicity of the protein (Boye et al., 1997). Therefore, the FC of control and all deamidated CP samples have decreased. The deamidation reaction could cause the increase in net charge of the protein or peptides, resulting in increasing tendency of foam forming. Thus, the FC of deamidated CP at 12 h (DD = 49.61%) had higher value than deamidated CP at 15 min and 6 h (DD = 32.21 and 42.57%, respectively). In addition, the protein solubility is one of main factors affecting the foaming properties. The increment in FC could be caused by available protein (solubilized proteins) at air-water interface (Agyare, Xiong, & Addo, 2008).

The FS of all samples were decreased over time. The untreated CP showed slower decline in FS than the other samples. Fig. 8 shows that control and all deamidated samples exhibited a higher rate of decline than the untreated sample. This could be explained by the fact that the heating step for enzyme inactivation could alter the secondary and tertiary structure of proteins. Net charge of the protein was increased, resulting in the decrease in protein-protein interaction due to the excessive net charge. Similar decline in FS value as a function of resting time was also found in okara and oat protein after deamidation (Boye et al., 1997; Chan & Ma, 1999; Damodaran et al., 2007; Mirmoghataie et al., 2009).

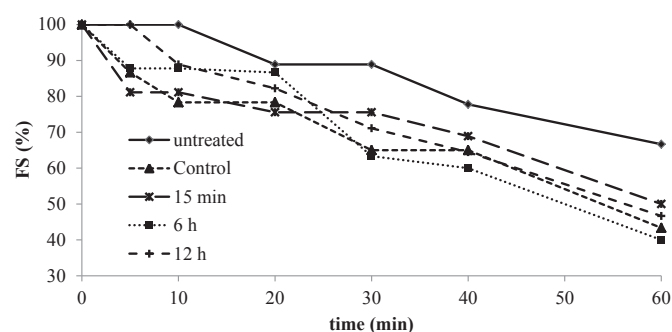


Fig. 8. Foaming stability (FS) of non-deamidated and deamidated coconut proteins by protein-glutaminase.

4. Conclusion

In summary, the deamidation using PG on coconut protein was successfully optimized using RSM. The optimal conditions in order to obtain high DD and acceptable DH were E/S of 36 U/g protein, pH of 7.0, and temperature of 50 °C. Some functional properties have changed by the deamidation process. The solubility under acidic conditions and emulsifying stability were increased after PG treatment. However, deamidation by PG could cause the decline of some properties, such as emulsifying activity and foaming stability. From industrial application perspective, there is potential of using CP as food proteins in the industry since CP functional properties can be changed by PG deamidation, especially in emulsified high protein aqueous foods. Moreover, CP could be an alternative food ingredient due to its complete protein and low in allergenicity. However, the study of other functional properties and allergenicity of PG deamidated CP might be needed for further use, that have not been considered in the present study.

Acknowledgments

The authors thank 100 Phan Ma-phrau Thai group for providing the coconut skim milk, Amano Enzyme Inc, Japan for providing the PG, and Nongyao Choosuk for her suggestions on RSM. The authors would also like to thank the Scholarship from the Graduate School, Chulalongkorn University to commemorate the 72nd anniversary of his Majesty King Bhumibala Aduladeja for the support of Miss Supichcha Kunarayakul.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.031>.

Funding

This work was supported by the 90th Anniversary Chulalongkorn University Fund [Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund; GCUGR1125592026M] and Thailand Research Fund [Grant Number TRG5880229].

References

- Agyare, K. K., Xiong, Y. L., & Addo, K. (2008). Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. *Food Chemistry*, 107, 1131–1137.
- Airaud, C. B., Gayte-Sorbier, A., & Armand, P. (1987). Stability of glutamine and pyroglutamic acid under model system conditions: Influence of physical and technological factors. *Journal of Food Science*, 52, 1750–1752.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International*. Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- Boye, J., Ma, C., & Harwalkar, V. (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. In S. Damodaran, & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 25–56). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R., & Farres, A. (2007). Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the Z19 α -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 439–445.
- Chan, W. M., & Ma, C. Y. (1999). Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*, 32, 119–127.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2007). *Fennema's food chemistry* (4th ed.). New York: CRC press.
- Day, L., Xu, M., Lundin, L., & Wooster, T. J. (2009). Interfacial properties of deamidated wheat protein in relation to its ability to stabilise oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 2158–2167.
- DebMandal, M., & Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 241–247.
- Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: Interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 161–176.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed system. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Dickinson, E. (2010a). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 130–140.
- Dickinson, E. (2010b). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 40–49.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28, 224–241.
- Dickinson, E., Ettelaie, R., Murray, B. S., & Du, Z. (2002). Kinetics of disproportionation of air bubbles beneath a planar air-water interface stabilized by food proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 252, 202–213.
- FAO. (2013). *Production*. http://faostat3.fao.org/browse/Q*/E/. (Accessed 18 May 2015).
- Garcia, R. N., Arocena, R. V., Laurena, A. C., & Tecson-Mendoza, E. M. (2005). 11S and 7S globulins of coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1734–1739.
- Gu, Y., Matsumura, Y., Yamaguchi, S., & Mori, T. (2001). Action of protein-glutaminase on α -lactalbumin in the native and molten globule states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5999–6005.
- Gunetilleke, K., & Larentius, S. (1974). Conditions for the separation of oil and protein from coconut milk emulsion. *Journal of Food Science*, 39, 230–233.
- Hagenmaier, R., Cater, C. M., & Mattil, K. F. (1972). Critical unit operations of the aqueous processing of fresh coconuts. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 49, 178–181.
- Hamada, J. S. (1992). Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 719–723.
- Hamada, J. S. (1994). Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 283–292.
- Kanu, P. J., Kanu, J. B., Sandy, E. H., Kandeh, J. B., Mornya, P., & HuiMing, Z. (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate. *American Journal of Food Technology*, 4, 226–240.
- Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1987). Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 285–288.
- Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1987). Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 224–227.
- Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. (2016). Process optimization for thermal-assisted high pressure processing of mango (*Mangifera indica* L.) pulp using response surface methodology. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 69, 372–381.
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219–280.
- Koberstein-Hajda, A., & Dickinson, E. (1996). Stability of water-in-oil-in-water emulsions containing faba bean proteins. *Food Hydrocolloids*, 10, 251–254.
- Kwon, K., Park, K. H., & Rhee, K. C. (1996). Fractionation and characterization of proteins from coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1741–1745.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lei, L., Zhao, Q., Selomulya, C., & Xiong, H. (2015). The effect of deamidation on the structural, functional, and rheological properties of glutenin prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed. *Food Chemistry*, 178, 96–105.
- Liao, L., Liu, T.-X., Zhao, M.-M., Cui, C., Yuan, B.-E., Tang, S., et al. (2010). Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid. *Food Chemistry*, 123, 123–130.
- Liu, Y., Li, X., Zhou, X., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2011). Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 44, 2205–2210.
- Marina, A., Che Man, Y., & Amin, I. (2009). Virgin coconut oil: Emerging functional food oil. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 481–487.
- Mepba, H. D., & Achinewhu, S. C. (2003). Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 15–25.
- Mirmoghtadaie, L., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2009). Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate. *Food Chemistry*, 114, 127–131.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B., & Delshadian, Z. (2016). Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 190, 186–193.
- Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigam, S., & McClements, D. J. (2005). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by coconut skim milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5747–5753.
- Östling, S., & Virtama, P. (1946). A modified preparation of the universal buffer described by Teorell and Stenhagen. *Acta Physiologica Scandinavica*, 11, 289–293.
- Panicker, L. M., Usha, R., Roy, S., & Mandal, C. (2009). Purification and characterization of a serine protease (CESP) from mature coconut endosperm. *BMC Research Notes*, 2, 81–90.
- Patil, U., & Benjakul, S. (2017). Characteristics of albumin and globulin from coconut meat and their role in emulsion stability without and with proteolysis. *Food Hydrocolloids*, 69, 220–228.
- Peamprasart, T., & Chiewchan, N. (2006). Effect of fat content and preheat treatment

- on the apparent viscosity of coconut milk after homogenization. *Journal of Food Engineering*, 77, 653–658.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–723.
- Rasyid, F., Manullang, M., & Hansen, P. M. T. (1992). Isolation and characterization of coconut protein. *Food Hydrocolloids*, 6, 301–314.
- Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., & Goormaghtigh, E. (2003). Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: A new scaling method. *Analytical Biochemistry*, 319, 114–121.
- Remya, S., Chikku, A. M., Renjith, R. S., Arunima, S., & Rajamohan, T. (2013). Coconut kernel protein in diet protects the heart by beneficially modulating endothelial nitric oxide synthase, tumor necrosis factor- α , and nuclear factor- κ B expressions in experimental myocardial infarction. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21, 325–331.
- Riha, W. E., III, Izzo, H. V., Zhang, J., & Ho, C. T. (1996). Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 225–255.
- Rosenthal, A., Pyle, D., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402–420.
- Salil, G., Nevin, K., & Rajamohan, T. (2011). Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in alloxan treated rats. *Chemico-biological Interactions*, 189, 107–111.
- Samson, S., Cater, C., & Mattil, J. (1971). Preparation and characterization of coconut protein isolates. *Cereal Chemistry*, 48, 182–190.
- Schwenke, K. D. (1997). Enzyme and chemical modification of proteins. In S. Damodaran, & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 393–423). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sharif, H. R., Williams, P. A., Sharif, M. K., Abbas, S., Majeed, H., Masamba, K. G., et al. (2017). Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – a review. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.002>.
- Shih, F. (1985). Analysis of glutamine, glutamic acid and pyroglutamic acid in protein hydrolysates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 322, 248–256.
- Suppavorasatit, I., De Meija, E. G., & Cadwallader, K. R. (2011). Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11621–11628.
- Sze-Tao, K. W. C., & Sathe, S. K. (2000). Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 69, 153–160.
- Thaiphanit, S., & Anprung, P. (2016). Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment. *Food Hydrocolloids*, 52, 756–765.
- Thaiphanit, S., Schleining, G., & Anprung, P. (2016). Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 60, 252–264.
- Vojdani, F. (1996). *Solubility*. London, UK: Blackie Academic and Professional.
- Wang, Y., Gan, J., Zhou, Y., Cheng, Y., & Nirasawa, S. (2017). Improving solubility and emulsifying property of wheat gluten by deamidation with four different acids: Effect of replacement of folded conformation by extended structure. *Food Hydrocolloids*, 72, 105–114.
- Wang, C., & Johnson, L. A. (2001). Functional properties of hydrothermally cooked soy protein products. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78, 189–195.
- Yamaguchi, S., Jeenes, D. J., & Archer, D. B. (2001). Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutamyl residues in proteins. *European Journal of Biochemistry*, 268, 1410–1421.
- Yamaguchi, S., & Yokoe, M. (2000). A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3337–3343.
- Yin, B., Wang, C., Liu, Z., & Yao, P. (2017). Peptide-polysaccharide conjugates with adjustable hydrophilicity/hydrophobicity as green and pH sensitive emulsifiers. *Food Hydrocolloids*, 63, 120–129.
- Yong, Y. H., Yamaguchi, S., Gu, Y. S., Mori, T., & Matsumura, Y. (2004). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7094–7100.
- Yong, Y. H., Yamaguchi, S., & Matsumura, Y. (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6034–6040.
- Zhang, W., Waghmare, P. R., Chen, L., Xu, Z., & Mitra, S. K. (2015). Interfacial rheological and wetting properties of deamidated barley proteins. *Food Hydrocolloids*, 43, 400–409.