



การศึกษากระบวนการเตรียมและการผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจากกาก
ถั่วเหลืองที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษากระบวนการเตรียมและการผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจากกาก
ถั่วเหลืองที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษากระบวนการเตรียมและการผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจาก
กากถั่วเหลืองที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง”

ของ อธิพัฒน์ ธนรัชต์กุลเจริญ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีไลรักษ์ อินธิปัญญา)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา รุตรัตน์มงคล)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิวิมล จิตรากร)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษากระบวนการเตรียมและการผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจากกากถั่วเหลืองที่เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง
ผู้วิจัย	อธิพัฒน์ ธนรัชต์กุลเจริญ
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา รุตรัตนมงคล
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2568
คำสำคัญ	กากถั่วเหลือง (Okara), โปรตีนเข้มข้น, โปรตีนไฮโดรไลเสท, คลีนอัลตราโซนิค, เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการเตรียมและการผลิตโปรตีนเข้มข้น (Okara protein concentrate; OPC) และโปรตีนไฮโดรไลเสท (Okara protein hydrolysate; OPH) จากกากถั่วเหลือง (Okara) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ได้จากปริมาณมากจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง โดยมุ่งเน้นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้เพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับแนวคิดเศรษฐกิจหมุนเวียนและการพัฒนาอย่างยั่งยืน ตลอดจนตอบสนองต่อความต้องการโปรตีนทางเลือกจากพืชที่เพิ่มสูงขึ้น Okara แม้จะมีองค์ประกอบทางโภชนาการที่ดี แต่การนำไปใช้ประโยชน์ยังมีจำกัดเนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ที่เหลืออยู่มีความสามารถในการละลายต่ำและถูกกักเก็บภายในโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อน การวิจัยนี้จึงประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการพริทเทอมน้ำด้วยคลื่นอัลตราโซนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

งานวิจัยนี้จึงดำเนินการศึกษาอย่างเป็นระบบใน 6 ขั้นตอนหลัก โดยในขั้นตอนที่ 1 เป็นการศึกษาคุณสมบัติของกากถั่วเหลือง (Okara) ทั้งในรูปสดและแห้ง ผลการศึกษาพบว่าการอบแห้ง Okara สด (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 75.49 ± 0.23) ที่ 60°C นาน 8-10 ชั่วโมง สามารถลดความชื้นลงเหลือร้อยละ 2.69 ± 0.31 ใน Okara แห้ง ($p < 0.05$) ส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีมีความเข้มข้นสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยโปรตีนเพิ่มจากร้อยละ 10.91 ± 0.08 เป็นร้อยละ 32.15 ± 0.19 ไขมันเพิ่มจากร้อยละ 1.25 ± 0.44 เป็นร้อยละ 8.66 ± 0.33 และเยื่อใยเพิ่มจากร้อยละ 5.68 ± 0.67 เป็นร้อยละ 10.55 ± 0.85 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ Okara แห้งสูงกว่า Okara สดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งค่า DPPH (IC₅₀) ต่ำกว่า: 6.45 ± 0.01 เทียบกับ 15.36 ± 0.005 มก./ก. และ FRAP สูงกว่า: 11.47 ± 0.58 เทียบกับ 4.87 ± 0.18 มก./ก. และมีปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดสูงกว่า ($p < 0.05$) โดยมีกรดกลูตามิก (4614 มก./100ก.) และลิวซีน (2912 มก./100ก.) เป็นองค์ประกอบเด่น อย่างไรก็ตาม Okara สดแสดงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายน้ำ (ร้อยละ 22.24 ± 1.25 เทียบกับร้อยละ

4.84±0.06) และการเกิดอิมัลชัน (ร้อยละ 30.65±1.06 เทียบกับร้อยละ 20.29±0.18) ที่ดีกว่า Okara แห่ง (p<0.05) และการทำแห้งช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์/ราได้อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ขั้นตอนที่ 2 การผลิต OPC จาก Okara แห่ง สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีน (Protein content) สูงสุดคือการสกัดที่ pH 11.5 นาน 90 นาที (ได้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 81.37±0.62) ขณะที่สภาวะที่ให้ร้อยละการคืนกลับของโปรตีน (Protein recovery) สูงสุดคือ pH 11.5 นาน 90 นาที (ได้ร้อยละ 68.42±1.15) ซึ่งสภาวะนี้ยังให้ร้อยละผลผลิตการสกัด (Extraction yield) สูงสุดด้วย (ร้อยละ 28.35±0.48) การสกัดจาก Okara สดให้ประสิทธิภาพเชิงปริมาณต่ำกว่า Okara แห่งอย่างชัดเจน (ร้อยละการคืนกลับของโปรตีนสูงสุดเพียงร้อยละ 13.73±0.45) จึงเลือกใช้ Okara แห่งเป็นวัตถุดิบหลักในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 เป็นการศึกษาผลของเทคนิคพรีทรีทเมนต์ 2 วิธีต่อการสกัดโปรตีนจาก Okara แห่ง (สกัดที่ pH 11.5, 90 นาที) โดยการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (37 kHz) นาน 45 นาที สามารถลดขนาดอนุภาคโปรตีนจาก 368 นาโนเมตร เหลือ 220 นาโนเมตร เพิ่มค่าศักย์ซีตาในเชิงลบ สูงสุดที่ -45 mV (ที่ 30 นาที) ส่งผลให้ร้อยละการคืนกลับของโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 77.11±0.38 และปริมาณโปรตีนเพิ่มเป็นร้อยละ 81.37±0.62 พร้อมทั้งปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่หลายประการ เช่น ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็นร้อยละ 66.30±1.06 (ที่ 45 นาที) การดูดซับน้ำสูงสุดร้อยละ 15.62±0.77 (ที่ 45 นาที) การเกิดโฟมสูงสุดร้อยละ 24.37±0.82 (ที่ 45 นาที) และการเกิดอิมัลชัน สูงสุดร้อยละ 69.13±0.52 (ที่ 15 นาที) ส่วนการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ พบว่า Viscozyme ร้อยละ 5 (90 นาที) ให้ร้อยละการคืนกลับของโปรตีนสูงที่สุด (ร้อยละ 93.25±1.28) และ Xylanase ร้อยละ 5 (90 นาที) ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด (ร้อยละ 89.67±0.85) อย่างไรก็ตามการใช้ เอนไซม์มีต้นทุนที่สูงกว่าการใช้อัลตราโซนิกอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาพรีทรีทเมนต์แบบผสมผสาน (อัลตราโซนิก 45 นาที + Xylanase ร้อยละ 3, 90 นาที) กับ Okara แห่ง ให้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 85.23±1.15 และร้อยละการคืนกลับของโปรตีนร้อยละ 82.15±0.95 ซึ่งสูงกว่าการใช้อัลตราโซนิกเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาต้นทุน การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิก 45 นาทีเพียงอย่างเดียวจึงถูกเลือกสำหรับเตรียม OPC เพื่อผลิต OPH เนื่องจากคุ่มค่าทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้นและประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นในระดับที่ยอมรับได้

ขั้นตอนที่ 5 การผลิต OPH โดยนำ OPC ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกมาย่อย ด้วย Flavourzyme ร้อยละ 2.5 นาน 90 นาที พบว่า OPH ที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านอัลตราโซนิกอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 73.78±1.45 เทียบกับร้อยละ 62.46±1.45) (p<0.05) และมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น DPPH (IC50) ลดลงเหลือ 3.25±0.10 มก./ก., FRAP เพิ่มขึ้น เป็น 16.75±0.28 มก./ก. ปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดสูงขึ้นประมาณ 1.15-1.17 เท่า (p<0.05) และมี

ระดับการย่อยสลาย (%DH) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เช่น ที่ Flavourzyme ร้อยละ 5, 120 นาที %DH เพิ่มจากร้อยละ 84.8 เป็นร้อยละ 108.5) การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกยังช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย (ร้อยละ 85.45 ± 1.60 เทียบกับร้อยละ 75.25 ± 1.45) และการเกิดโฟม (ร้อยละ 25.09 ± 1.41 เทียบกับร้อยละ 20.70 ± 1.63) ($p < 0.05$)

ขั้นตอนที่ 6 การประเมินทางเศรษฐศาสตร์ด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer ในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กพบว่าการใช้ Okara แห่งร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกเป็นวิธีที่มีความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์สูง โดยมีเงินลงทุนโครงการรวม 7,959,000 บาท ต้นทุนการดำเนินงานประจำปี 14,319,000 บาท/ปี และรายได้ประจำปี 18,351,000 บาท/ปี กำลังการผลิต 11,470 กิโลกรัม MP/ปี ด้วยต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม MP และรายได้ต่อหน่วย 1,600.00 บาท/กิโลกรัม MP ให้อัตรากำไรขั้นต้น 21.97% ค่าผลตอบแทนจากการลงทุน (ROI) 38.00% ระยะเวลาคืนทุน 2.63 ปี อัตราผลตอบแทนภายใน (IRR) หลังหักภาษี 30.09% และมูลค่าปัจจุบันสุทธิ (NPV) 15,067,000 บาท ที่อัตราคิดลด 7.00% การวิเคราะห์โครงสร้างต้นทุนพบว่าต้นทุนวัตถุดิบรวม 11,069,624 บาท/ปี โดย Dried Okara คิดเป็น 9,474,960 บาท (85.59%) และต้นทุนค่าแรงงาน 851,786 บาท/ปี (5.95% ของต้นทุนดำเนินงาน) แสดงให้เห็นถึงลักษณะของกระบวนการที่เน้นการใช้เครื่องจักรและวัตถุดิบมากกว่าแรงงาน

ผลการศึกษาทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่า การนำ Okara แห่งมาผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (37 kHz, 45 นาที) เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ดีที่สุดสำหรับการผลิต OPC และ OPH ที่มีคุณภาพสูง โดยสามารถเพิ่มมูลค่าจากผลิตผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมนมแล้วเหลือให้เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่และกิจกรรมทางชีวภาพสูงตอบสนองต่อความต้องการตลาดโปรตีนทางเลือกจากพืชและสนับสนุนแนวคิดเศรษฐกิจหมุนเวียนอย่างยั่งยืน

Title	STUDY OF PRETREATMENT AND PRODUCTION OF SOY PROTEIN CONCENTRATE AND HYDROLYSATE FROM OKARA
Author	Athippat Thanaratkuljarern
Advisor	Associate Professor Khanitta Ruttarattanamongkol, Ph.D..
Co-Advisor	Assistant Professor Worasit Tochampa, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Food Science and Technology - (Type A 2), Naresuan University, 2025
Keywords	Okara, Protein concentrate, Protein hydrolysate, Ultrasonic, Cell wall Degrading Enzyme

ABSTRACT

This research aimed to study and develop processes for the preparation and production of okara protein concentrate (OPC) and okara protein hydrolysate (OPH) from okara, a major by-product of the soymilk industry. The focus was on adding value to this waste material to enable its efficient utilization in the food industry, aligning with circular economy concepts and sustainable development while responding to the increasing demand for plant-based alternative proteins. Although okara possesses good nutritional composition, its utilization remains limited due to the low solubility of residual proteins that are trapped within complex cell wall structures. This research therefore applied ultrasonic pretreatment technology to enhance protein extraction efficiency and improve the quality of the final products.

This research was systematically conducted in 6 main stages. Stage 1 involved studying the properties of okara in both fresh and dried forms. The results showed that drying fresh okara (initial moisture content $75.49 \pm 0.23\%$) at 60°C for 8-10 hours successfully reduced moisture content to $2.69 \pm 0.31\%$ in dried okara ($p < 0.05$), resulting in significantly higher concentrations of chemical components ($p < 0.05$). Protein content increased from $10.91 \pm 0.08\%$ to $32.15 \pm 0.19\%$, fat increased from $1.25 \pm 0.44\%$ to $8.66 \pm 0.33\%$, and fiber increased from $5.68 \pm 0.67\%$ to $10.55 \pm 0.85\%$. The antioxidant activity of dried okara was significantly higher than fresh okara ($p < 0.05$), with lower DPPH (IC₅₀) values: 6.45 ± 0.01 vs. 15.36 ± 0.005 mg/g, and higher FRAP values: 11.47 ± 0.58 vs. 4.87 ± 0.18 mg/g, along with higher content of all amino acids ($p < 0.05$), with glutamic

acid (4,614 mg/100g) and leucine (2,912 mg/100g) being the predominant components. However, fresh okara exhibited superior functional properties in terms of water solubility ($22.24 \pm 1.25\%$ vs. $4.84 \pm 0.06\%$) and emulsification capacity ($30.65 \pm 1.06\%$ vs. $20.29 \pm 0.18\%$) compared to dried okara ($p < 0.05$), while drying significantly reduced total microbial count and yeast/mold populations ($p < 0.05$).

Stage 2 focused on OPC production from dried okara. The optimal conditions for achieving maximum protein content were extraction at pH 11.5 for 90 minutes (yielding $81.37 \pm 0.62\%$ protein content), while the conditions providing maximum protein recovery were also pH 11.5 for 90 minutes (achieving $68.42 \pm 1.15\%$ recovery), which also provided the highest extraction yield ($28.35 \pm 0.48\%$). Extraction from fresh okara showed clearly lower quantitative efficiency compared to dried okara (maximum protein recovery of only $13.73 \pm 0.45\%$), leading to the selection of dried okara as the primary raw material for subsequent stages.

Stage 3 investigated the effects of two pretreatment techniques on protein extraction from dried okara (extracted at pH 11.5 for 90 minutes). Ultrasonic pretreatment (37 kHz) for 45 minutes successfully reduced protein particle size from 368 nm to 220 nm, increased the maximum negative zeta potential to -45 mV (at 30 minutes), resulting in increased protein recovery to $77.11 \pm 0.38\%$ and protein content to $81.37 \pm 0.62\%$, while improving several functional properties including maximum solubility increased to $66.30 \pm 1.06\%$ (at 45 minutes), maximum water absorption capacity of $15.62 \pm 0.77\%$ (at 45 minutes), maximum foaming capacity of $24.37 \pm 0.82\%$ (at 45 minutes), and maximum emulsification capacity of $69.13 \pm 0.52\%$ (at 15 minutes). Cell wall-degrading enzyme pretreatment showed that Viscozyme 5% (90 minutes) provided the highest protein recovery ($93.25 \pm 1.28\%$) and Xylanase 5% (90 minutes) yielded the highest protein content ($89.67 \pm 0.85\%$). However, enzymatic treatment had significantly higher costs compared to ultrasonic treatment.

Stage 4 studied combined pretreatment (ultrasonic 45 minutes + Xylanase 3%, 90 minutes) with dried okara, yielding $85.23 \pm 1.15\%$ protein content and $82.15 \pm 0.95\%$ protein recovery, which were significantly higher than ultrasonic treatment alone. However, considering cost factors, ultrasonic pretreatment for 45 minutes alone was selected for OPC preparation for OPH production due to its preliminary economic viability and acceptable efficiency improvement.

Stage 5 involved OPH production by hydrolyzing ultrasonically pretreated OPC with 2.5 % Flavourzyme for 90 minutes. The resulting OPH had significantly higher protein content compared to the control group without ultrasonic treatment ($73.78 \pm 1.45\%$ vs. $62.46 \pm 1.45\%$) ($p < 0.05$) and exhibited improved antioxidant activity with DPPH (IC₅₀) reduced to 3.25 ± 0.10 mg/g, FRAP increased to 16.75 ± 0.28 mg/g, all amino acid contents increased approximately 1.15-1.17 fold ($p < 0.05$), and significantly higher degree of hydrolysis (%DH) (e.g., at 5 % Flavourzyme for 120 minutes, %DH increased from 84.8% to 108.5%). Ultrasonic pretreatment also enhanced solubility ($85.45 \pm 1.60\%$ vs. $75.25 \pm 1.45\%$) and foaming capacity ($25.09 \pm 1.41\%$ vs. $20.70 \pm 1.63\%$) ($p < 0.05$).

Stage 6 involved economic evaluation using SuperPro® Designer at small industrial scale, demonstrating that the use of dried okara with ultrasonic treatment was highly economically feasible. The total project investment was 7,959,000 baht, annual operating costs were 14,319,000 baht/year, and annual revenue was 18,351,000 baht/year, with a production capacity of 11,470 kg MP/year. The production cost per unit was 1,248.41 baht/kg MP and revenue per unit was 1,600.00 baht/kg MP, providing a gross profit margin of 21.97%, return on investment (ROI) of 38.00%, payback period of 2.63 years, internal rate of return (IRR) after tax of 30.09%, and net present value (NPV) of 15,067,000 baht at a 7.00% discount rate. Cost structure analysis revealed total raw material costs of 11,069,624 baht/year, with dried okara accounting for 9,474,960 baht (85.59%) and labor costs of 851,786 baht/year (5.95% of operating costs), indicating a process characteristic that emphasizes machinery and raw materials over labor.

The overall research findings demonstrate that utilizing dried okara through ultrasonic pretreatment (37 kHz, 45 minutes) represents the most efficient and economically viable approach for producing high-quality OPC and OPH. This method successfully adds value to soymilk industry by-products by converting them into protein products with enhanced functional properties and biological activities, meeting the market demand for plant-based alternative proteins while supporting sustainable circular economy concepts.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์และการสนับสนุนอย่างดียิ่งจากหลายหน่วยงานและบุคคล ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ ประการแรกผู้วิจัยขอขอบพระคุณแหล่งทุนสนับสนุนการวิจัย ได้แก่ โครงการทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2565 ระดับปริญญาโท ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย อันเป็นปัจจัยสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัยนี้ให้ดำเนินไปได้อย่างราบรื่น นอกจากนี้ขอขอบคุณ บริษัท เตรี พลาสติก จำกัด (จังหวัดนครสวรรค์) สำหรับความอนุเคราะห์หัตถ์ถุดิบ (กากถั่วเหลือง) ที่ใช้ในการวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา รุตริตนมงคล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้เวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง ถ่ายทอดองค์ความรู้ทางวิชาการ ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิวิมล จิตรากร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิไลรัก อินธิปัญญา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอันมีคุณค่าและเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์และถูกต้องตามหลักวิชาการมากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนและรุ่นพี่นิสิตสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ได้แก่ นางสาวคณารักษ์ ทิบทอง, นางสาววลัยภรณ์ ไท่นพราหม์, นางสาวนันทวรรณ บุญมี, นางสาวกุลปรียา ทิมเครือจีน, นางสาวสกุรัตน์ บุญจริง, นางสาวจิรัชยา จัดพล และนางสาวธัญญา สายโธ๊ะ สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ มิตรภาพ และกำลังใจอันดีงามเสมอมา ตลอดจนผู้มีส่วนเกี่ยวข้องและให้ความช่วยเหลือท่านอื่นๆ ซึ่งมีอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้

ท้ายที่สุดนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่สนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และกำลังใจอย่างเต็มที่ ซึ่งเป็นพลังและแรงสนับสนุนอันสำคัญยิ่งทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยจนประสบความสำเร็จลุล่วง คุณูปการและคุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงวิชาการ และผู้ที่สนใจในการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ทางการเกษตรสืบไป

อธิปัทมน์ ธนรัชต์กุลเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
ประกาศคุณูปการ	ฌ
สารบัญ	ญ
สารบัญตาราง	ต
สารบัญภาพ	ธ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
สมมติฐานของการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1. ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง.....	6
1.1. ลักษณะโครงสร้างของเมล็ดถั่วเหลือง.....	6
1.2. ส่วนประกอบย่อยเซลล์.....	8
1.2.1 โปรตีนที่รวมกันอยู่เป็นรูปร่าง (protein bodies).....	8
1.2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates composition).....	11
1.3 การผลิตถั่วเหลือง.....	13
1.4 อาหารที่ทำจากถั่วเหลือง.....	14
1.5 การผลิตนมถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ได้ (Okara).....	15
2. กากถั่วเหลือง.....	17
2.1 กระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง Soya Technology Systems (STS).....	18
2.2 สถานการณ์ราคากากถั่วเหลืองในประเทศและต่างประเทศ.....	20
2.3 องค์ประกอบของ Okara และประโยชน์ต่อสุขภาพที่เกี่ยวข้อง.....	23
2.3.1 โปรตีนใน Okara.....	29
2.3.2 โยอาหารใน Okara.....	32
2.3.3 องค์ประกอบอื่นๆ.....	34

2.3.4 ประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรตีนถั่วเหลือง/ Okara.....	35
2.3.5 การใช้ประโยชน์จาก Okara.....	36
3. กระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด (pretreatments).....	40
3.1 การปรับสภาพเชิงกล (Mechanical pretreatment).....	40
3.2 การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment).....	40
3.3 ปรับสภาพทางชีวเคมี (Physicalchemical pretreatment).....	41
3.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment).....	41
3.5 การปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical pretreatment).....	41
3.5.1 การปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment).....	41
3.5.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด (Acid pretreatment).....	41
4. วิธีการสกัดโปรตีนจาก Okara.....	41
4.1 การสกัดด้วยด่าง.....	41
4.2 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonication-assisted extraction ; UAE).....	42
4.2.1 ปฏิกิริยาการเกิดคาวิเทชัน (Cavitation).....	44
4.2.2 ผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และโปรตีน.....	46
4.2.3 ผลของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว.....	47
4.2.4 การประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีอื่น.....	49
4.2.5 การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร.....	49
4.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์.....	49
4.3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์.....	50
4.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	52
4.3.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการสกัดโปรตีน.....	56
4.3.4 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์และสารตั้งต้นต่อคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	57
4.4 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase).....	59
4.5 เอนไซม์ไซลันเนส (Xylanase).....	60
4.6 เอนไซม์เพคตินเนส (Pectinase).....	61
4.7 การเลือกเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์.....	61
4.8 การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชในการสกัดโปรตีน.....	63
5. โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน.....	63

5.1 ระดับของโครงสร้างโปรตีน.....	64
5.1.1 โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary Structure).....	64
5.1.2 โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure).....	65
5.1.3 โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary Structure).....	66
5.1.4 โครงสร้างควอเทอร์นารี (Quaternary Structure).....	67
5.1.5 ความสำคัญของโครงสร้างโปรตีน.....	68
6. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน.....	69
6.1 กลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน.....	69
6.2 ประเภทของการสูญเสียสภาพธรรมชาติ.....	70
6.2.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (Thermal Denaturation).....	70
6.2.2 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความดัน (Pressure Denaturation).....	71
6.2.3 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยสารเคมี (Chemical Denaturation).....	71
6.3 การกลับสู่สภาพเดิม (Renaturation).....	72
6.4 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยความร้อนต่อคุณสมบัติของกิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ.....	73
6.4.1 ผลของความร้อนต่อโครงสร้างโปรตีนและกิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ.....	73
6.4.2 อิทธิพลของ pH ร่วมกับความร้อนต่อกิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ.....	74
6.4.3 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกิจกรรมทางชีวภาพ.....	75
6.4.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของกิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ.....	75
6.5 ความสำคัญทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้.....	76
7. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	78
7.1 การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี.....	78
7.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์.....	80
7.2.1 เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases).....	81
7.2.2 เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase).....	81
7.3 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH).....	84
7.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด.....	84
7.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ.....	84
7.3.3 การไตเตรทโปรตอนที่ถูกลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (pH-stat).....	85
8. กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	86

8.1	หลักการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ.....	86
8.1.1	DPPH radical scavenging method.....	86
8.1.2	ABTS free radical scavenging method.....	87
8.1.3	FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) method.....	87
8.1.4	FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) method.....	87
8.1.5	Total Flavonoid Content (TFC) method.....	88
8.2	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนเข้มข้น.....	88
8.3	การเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์.....	89
8.4	ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	90
8.4.1	ชนิดของเอนไซม์และระดับการไฮโดรไลซิส.....	90
8.4.2	ชนิดของโปรตีนและประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิส.....	90
8.4.3	ระยะเวลาการไฮโดรไลซิสและขนาดของเปปไทด์.....	90
8.5	ผลของการย่อยในระบบทางเดินอาหารต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ.....	90
9.	คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองและ Okara.....	91
9.1	คุณสมบัติการละลาย.....	92
9.2	คุณสมบัติการเป็นอิมัลชัน.....	92
9.3	คุณสมบัติการเกิดโฟม.....	94
9.4	คุณสมบัติการจับน้ำและไขมัน.....	95
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	96
	วัตถุประสงค์.....	96
	เอนไซม์.....	97
	สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย.....	98
	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย.....	99
	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินวิจัย.....	101
	ตอนที่ 1 ศึกษากระบวนการเตรียม Okara สด/แห้งและการวิเคราะห์.....	101
	การวิเคราะห์ตอนที่ 1.....	102
	ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้น.....	104
	การวิเคราะห์ตอนที่ 2.....	107
	ตอนที่ 3 การศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; พรีทรีทเม้นท์).....	108

ตอนที่ 3.1 การศึกษาผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น.....	108
ตอนที่ 3.2 การศึกษาผลกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีน.....	110
การวิเคราะห์ตอนที่ 3.....	114
ตอนที่ 4 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการพรีทรีทเมนต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์.....	115
การวิเคราะห์ตอนที่ 4.....	117
ตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส.....	118
การวิเคราะห์ตอนที่ 5.....	120
ตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองสถานการณ์เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุน	122
การวิเคราะห์ตอนที่ 6.....	122
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	124
ตอนที่ 1 การศึกษากระบวนการเตรียม Okara สดและแห้ง.....	124
1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ.....	124
1.1 ลักษณะทางกายภาพ.....	124
1.2 ค่าสี (L^* , a^* , b^*).....	126
2. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ.....	127
2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี.....	127
2.2 การศึกษากิจกรรมทางชีวภาพ.....	128
3. ปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid profile)	130
4. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่.....	132
5. การศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา	133
ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้น.....	134
1. การศึกษาปริมาณโปรตีน.....	134
1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง.....	134
1.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด.....	137
ตอนที่ 3 การศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; พรีทรีทเมนต์).....	139
ตอนที่ 3.1 การศึกษาผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น.....	139
1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ.....	139
ศักยภาพและขนาดอนุภาค.....	139

2. การศึกษาปริมาณโปรตีน	141
2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก...	141
2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก.....	142
2.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่งและสด ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก.....	144
3. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก.....	146
ตอนที่ 3.2 การศึกษาผลกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น.....	148
1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ.....	148
ศักย์ซีตาและขนาดอนุภาค.....	148
2. การศึกษาปริมาณโปรตีน.....	151
2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง.....	151
2.1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Cellulase	151
2.1.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Xylanase	152
2.1.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Pectinase	153
2.1.4 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Viscozyme.....	155
2.1.5 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ในสภาวะเหมาะสม	156
2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด	158
2.2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Cellulase	158
2.2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Xylanase	159
2.2.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Pectinase	161
2.2.4 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Viscozyme	162

2.2.5 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ในสภาวะเหมาะสม	164
3. สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนัง เซลล์.....	165
ตอนที่ 4 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการพรีทรีทเมนต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์.....	168
การศึกษาปริมาณโปรตีน.....	168
ตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส.....	172
1. การศึกษาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส.....	172
2. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ.....	175
2.1 ลักษณะทางกายภาพ.....	175
2.2 ค่าสี (L^* , a^* , b^*).....	176
3. การศึกษาสมบัติทางเคมี.....	177
4. การศึกษากิจกรรมทางชีวภาพ.....	179
5. ปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid profile).....	181
6. ระดับการย่อยสลาย	184
7. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่.....	186
8. การศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา	189
ตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้แบบจำลองสถานการณ์เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุน ระดับ อุตสาหกรรมขนาดเล็ก.....	191
ศึกษาสมดุลมวลสาร (Mass balance) และศึกษาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนด้วย โปรแกรม SuperPro® Designer ของตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่าน การพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก).....	191
1. แบบจำลองการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซ- นิก.....	191
2. ข้อมูลปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วย คลื่นอัลตราโซนิก.....	194
3. ข้อมูลกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซ- นิก.....	198

4. แผนภูมิแกนต์แสดงการใช้งานอุปกรณ์ต่อรอบการผลิต (Equipment Gantt Chart Single Batch) จากแบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก.....	199
5. การประเมินทางเศรษฐศาสตร์จากแบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก.....	202
5.1 บทสรุปผู้บริหาร.....	202
5.2 รายละเอียดของเครื่องมือและราคา.....	204
5.3 ค่าแรงงาน ค่าวัตถุดิบ และค่าสาธารณูปโภค.....	206
5.3.1 ค่าแรงงาน	206
5.3.2 ค่าวัตถุดิบ	208
5.3.3 ค่าสาธารณูปโภค	209
5.4 คำนวณค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อปี.....	211
5.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำกำไร.....	212
บทที่ 5 บทสรุป.....	215
ข้อเสนอแนะ.....	218
บรรณานุกรม	220
ภาคผนวก	252
ประวัติผู้วิจัย.....	279

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองและส่วนประกอบต่างๆ (ฐานแห้ง).....	9
ตาราง 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเมล็ดถั่วเหลือง และโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น.....	10
ตาราง 3 กิจกรรมสารยับยั้งทริปซินของส่วนประกอบถั่วเหลือง	11
ตาราง 4 น้ำหนักเมล็ดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักฝักถั่วเหลืองทั้งหมด และปริมาณน้ำ สตาร์ช โปรตีน และน้ำมันของเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บ 20 วันก่อนการเก็บเกี่ยว.....	11
ตาราง 5 องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตของเมล็ดถั่วเหลืองสกัดที่จัดไขมันออกแล้ว	12
ตาราง 6 ประเทศและปริมาณถั่วเหลืองที่ผลิตตามลำดับ.....	13
ตาราง 7 องค์ประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	15
ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของนมถั่วเหลืองและนมวัว.....	16
ตาราง 9 ประมาณการผลผลิตและความต้องการใช้ Okara ทั่วโลก.....	21
ตาราง 10 ราคาถั่วเหลือง	22
ตาราง 11 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง นมถั่วเหลืองผง และ Okara.....	23
ตาราง 12 องค์ประกอบทางโภชนาการของ Okara สดและแห้ง	25
ตาราง 13 องค์ประกอบทางโภชนาการของ Okara	26
ตาราง 14 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนผสมโปรตีนถั่วเหลือง.....	30
ตาราง 15 องค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นของโปรตีนถั่วเหลือง (มก./ก.ของโปรตีน).....	31
ตาราง 16 องค์ประกอบของใยอาหารใน Okara	34
ตาราง 17 การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว.....	48
ตาราง 18 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	55
ตาราง 19 แผนการทดลองการศึกษากลไกของการผลิตโปรตีนเข้มข้น	104
ตาราง 20 แผนการทดลองการศึกษากลไกของการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น	108
ตาราง 21 แผนการทดลองการศึกษากลไกของการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น	110
ตาราง 22 แผนการทดลองการศึกษากลไกของการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังกระบวนการพรีทรีตเมนต์	115
ตาราง 23 แผนการทดลองการศึกษากลไกของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส	118
ตาราง 24 สมบัติทางกายภาพค่าสี (L^* , a^* , b^*) Hunter lab ของ Okara สดและแห้ง	127

ตาราง 25 องค์ประกอบทางเคมีของ Okara สดและแห้ง	128
ตาราง 26 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Okara สดและแห้ง	130
ตาราง 27 ปริมาณกรดอะมิโนของ Okara สดและแห้ง	131
ตาราง 28 สมบัติเชิงหน้าที่ของ Okara สดและแห้ง	133
ตาราง 29 สมบัติจุลชีวินวิทยาของ Okara สดและแห้ง	134
ตาราง 30 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง	137
ตาราง 31 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด	139
ตาราง 32 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สดและแห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก	145
ตาราง 33 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก	148
ตาราง 34 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วย เอนไซม์ Cellulase	152
ตาราง 35 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Xylanase	153
ตาราง 36 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วย เอนไซม์ Pectinase	154
ตาราง 37 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Viscozyme	156
ตาราง 38 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Cellulase	159
ตาราง 39 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Xylanase	160
ตาราง 40 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Pectinase	162
ตาราง 41 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Viscozyme	163
ตาราง 42 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์	168

ตาราง 43 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านการพรีทรีท-มันท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์	170
ตาราง 44 ตารางเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara	171
ตาราง 45 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีทมันท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส.....	175
ตาราง 46 สมบัติทางกายภาพค่าสี (L^* , a^* , b^*) Hunter lab ของ โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara	177
ตาราง 47 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara.....	179
ตาราง 48 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara.....	181
ตาราง 49 ปริมาณกรดอะมิโนโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara	183
ตาราง 50 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara ที่ไม่ผ่านการพรีทรีทมันท์ และผ่านการพรีทรีทมันท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก	188
ตาราง 51 สมบัติจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก Okara ที่ไม่ผ่านการพรีทรีทมันท์ และผ่านการพรีทรีทมันท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก	190
ตาราง 52 ปริมาณวัตถุดิบ เอนไซม์ และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ.....	195
ตาราง 53 ข้อมูลกระบวนการผลิต	199
ตาราง 54 บทสรุปทางเศรษฐศาสตร์สำหรับผู้บริหาร	203
ตาราง 55 รายละเอียดของเครื่องมือและราคา.....	205
ตาราง 56 ต้นทุนค่าแรงงาน (ราคาปี 2568)	208
ตาราง 57 ต้นทุนค่าวัตถุดิบ (ราคาปี 2568).....	209
ตาราง 58 ต้นทุนค่าสาธารณูปโภค (ราคาปี 2568).....	211
ตาราง 59 ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อปี (ราคาปี 2568)	212
ตาราง 60 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำกำไร (ราคาปี 2568).....	214

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างพื้นฐานของเมล็ดถั่วเหลือง ในมุมมองด้านหน้าและด้านข้าง	7
ภาพ 2 โครงสร้างจุลทรรศน์ของถั่วเหลือง.....	7
ภาพ 3 โครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วเหลือง	12
ภาพ 4 กากถั่วเหลือง (Okara) ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง	17
ภาพ 5 แผนผังลำดับงานของขั้นตอนการผลิตนมถั่วเหลือง/ Okara ของ STS	19
ภาพ 6 นัตโตะ (ซำย) และเทมเป้ (ขวา)	37
ภาพ 7 ภาพของอาหารที่ทำจาก Okara ได้แก่ เครื่องเคียง (ซำย) Okara ปั่นก้อนทอด (กลาง) และ ขนมโมจิทอดจาก Okara (ขวา).....	39
ภาพ 8 กลไกการทำงานของปรากฏการณ์ควิเทชันต่อเซลล์	45
ภาพ 9 กราฟพลังงานก่อกัมมันต์กับการดำเนินไปของปฏิกิริยา.....	50
ภาพ 10 การทำงานของเอนไซม์ แบบรวมโมเลกุล	51
ภาพ 11 การทำงานของเอนไซม์ แบบสลายโมเลกุล.....	51
ภาพ 12 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	52
ภาพ 13 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช	62
ภาพ 14 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโนและการเชื่อมต่อด้วยพันธะเปปไทด์	64
ภาพ 15 โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน แสดงลำดับกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อด้วยพันธะเปปไทด์	65
ภาพ 16 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน แสดง α -helix และ β -sheet	66
ภาพ 17 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน แสดงปฏิสัมพันธ์ต่างๆ ที่ยึดโครงสร้าง	67
ภาพ 18 โครงสร้างควอเตอร์นารีของโปรตีน แสดงการรวมตัวของ subunit หลายตัว.....	68
ภาพ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทั้ง 4 ระดับของโปรตีน.....	68
ภาพ 20 การเปรียบเทียบโปรตีนในสภาพธรรมชาติและสภาพที่สูญเสียธรรมชาติ	69
ภาพ 21 กลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยปัจจัยต่างๆ	70
ภาพ 22 ผลของ Urea และ guanidinium chloride ต่อโครงสร้างโปรตีน	72
ภาพ 23 กระบวนการ denaturation และ renaturation ของโปรตีน	72
ภาพ 24 เสถียรภาพความร้อน DPPH กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	73

ภาพ 25 ผลของการให้ความร้อนต่อปริมาณโปรตีนและความสามารถในการละลายของตัวอย่างโปรตีนไข่ขาว (A) ปริมาณโปรตีนและ (B) ความสามารถในการละลายของโปรตีนไข่ขาวผงเป็นกลาง (EWPN)	74
ภาพ 26 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์	83
ภาพ 27 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 1	101
ภาพ 28 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 2	106
ภาพ 29 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.1	110
ภาพ 30 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.2	114
ภาพ 31 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 4	116
ภาพ 32 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 5	119
ภาพ 33 แผนภาพการดำเนินงานทุกขั้นตอน	123
ภาพ 34 ลักษณะของ Okara สด จาก บริษัท แดรี่ พลัส จำกัด	125
ภาพ 35 ลักษณะของ Okara หลังจากอบด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ถึง 10 ชั่วโมง	125
ภาพ 36 ลักษณะของ Okara แห้ง ความชื้น 2.69% ที่ผ่านการบด และร้อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh	126
ภาพ 37 (ก) ขนาดอนุภาคและ (ข) ศักย์ซีตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้งที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (15, 30 และ 45 นาที) ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan	141
ภาพ 38 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง)ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan	142
ภาพ 39 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง)ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan	144
ภาพ 40 (ก) ขนาดอนุภาคและ (ข) ศักย์ซีตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ตัวอย่างควบคุม (C) Cellulase (CEL) Xylanase (XYL) และ Viscozyme (VIS) ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ที่ระยะเวลา 90 นาที ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการ	

ทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan.....	157
ภาพ 42 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง)ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ Cellulase (CEL), Xylanase (XYL), Pectinase (PEC) และ Viscozyme (VIS) ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ที่ระยะเวลา 90 นาที ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan.....	165
ภาพ 43 โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara.....	175
ภาพ 44 ระดับการย่อยสลาย (%Degree of hydrolysis, %DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก (45นาทีก) และย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Alcalase, Flavourzyme, Alcalase ร่วมกับ Flavourzyme) ที่ความเข้มข้น 2.5, 2.5+2.5 และ 5.0% ที่ระยะเวลา 90 และ 120 นาทีตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan	186
ภาพ 45 แบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก.....	193
ภาพ 46 แผนภูมิปริมาณการใช้วัสดุทั้งหมดต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก	196
ภาพ 47 แผนภูมิปริมาณวัสดุขาออกรวมต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก	197
ภาพ 48 แผนภูมิแกนต์แสดงการใช้งานอุปกรณ์ต่อรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก	201
ภาพ 49 แผนภูมิการใช้งานอุปกรณ์ต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก.....	206
ภาพ 50 แผนภูมิปริมาณแรงงานที่ใช้ต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไล-เซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก.....	208
ภาพ 51 เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช Pectinase, Xylanase, Cellulase และ Viscozyme (ตามลำดับ)	253
ภาพ 52 เอนไซม์โปรติเอส Flavourzyme.....	253
ภาพ 53 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest	254
ภาพ 54 สภาวะการสกัดโปรตีนด้วย 2M NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C pH 11.5.....	254

ภาพ 55 สภาวะการตกตะกอนโปรตีนด้วย 2M HCl ที่ pH 4.2	255
ภาพ 56 ลักษณะของ Okara protein solution หลังการปั่นเหวี่ยง	255
ภาพ 57 การพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และส่วน Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate	256
ภาพ 58 การพรีทรีทเม้นท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช และส่วน Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate	256
ภาพ 59 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate ที่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช	257
ภาพ 60 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate ที่ผ่านการปรับสภาวะให้เป็นกลางที่ pH 7.0	257
ภาพ 61 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein hydrolysate ที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ และไม่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์	258



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ในปัจจุบัน การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งและผลิตผลพลอยได้ (by-products) จากอุตสาหกรรมอาหารได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมุ่งเน้นการนำกลับมาแปรรูปและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดเศรษฐกิจหมุนเวียน (Circular Economy) และการพัฒนาอย่างยั่งยืนภายในห่วงโซ่อุปทานอาหาร (Food Supply Chain) กระบวนการเพิ่มมูลค่าดังกล่าวประกอบด้วยการนำวัสดุเหลือทิ้งหรือผลิตผลพลอยได้ที่มีมูลค่าเชิงพาณิชย์ต่ำมาผ่านกระบวนการแปรรูปที่เหมาะสม เพื่อสกัดหรือดัดแปลงให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูงขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายอุตสาหกรรม อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม เคมีภัณฑ์ และเวชสำอาง

แนวโน้มพฤติกรรมผู้บริโภคในปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงความตระหนักที่เพิ่มขึ้นในด้านสุขภาพ การควบคุมน้ำหนัก และการป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อรูปแบบการบริโภคอาหาร และเครื่องดื่ม นอกจากนี้ ความตระหนักถึงปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและความจำกัดของทรัพยากรธรรมชาติยังนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคไปสู่ผลิตภัณฑ์จากพืชมากขึ้น โปรตีนทางเลือกจากพืช (Plant-based Protein) จึงได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความยั่งยืนและมีประสิทธิภาพเชิงนิเวศน์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากแหล่งสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริบทของการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกและข้อจำกัดของทรัพยากรในการผลิตอาหาร

ในปัจจุบัน ความต้องการบริโภคนมถั่วเหลืองและนมจากพืชโดยรวมยังคงมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยข้อมูลล่าสุด ณ เดือนมิถุนายน 2568 ชี้ให้เห็นว่ามูลค่าตลาดนมถั่วเหลืองทั่วโลกในปี 2567 อยู่ที่ประมาณ 12.33 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ และคาดการณ์ว่าจะเติบโตอย่างต่อเนื่องในอัตราร้อยละ 6.9 ต่อปี จนมีมูลค่าถึง 19.63 พันล้านดอลลาร์สหรัฐภายในปี 2574 (ReAnIn, 2024) สำหรับประเทศไทย ตลาดนมจากพืชซึ่งมีนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบหลักมีแนวโน้มขยายตัวเช่นกัน โดยคาดว่ามูลค่าตลาดนมจากพืชในประเทศจะสูงถึง 20,629 ล้านบาทภายในปี 2568 (The Business Plus, 2023) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ขับเคลื่อนการเติบโตนี้เกิดจากกระแสการใส่ใจสุขภาพของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และในทวีปตัวขับเคลื่อนหลักในตลาดสำหรับการผลิต และการบริโภคนมถั่วเหลือง คือการเชื่อมโยงกับประโยชน์ต่อสุขภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อหลังจากได้รับการอนุมัติจากการเสนอขอเรียกกรองด้านสุขภาพถึง FDA เกี่ยวกับประสิทธิภาพของโปรตีนถั่วเหลือง (Soy protein ; SP) ในการลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ (Eze et al., 2021) ในระหว่างกระบวนการผลิตนมถั่ว

เหลืองเมื่อแยกนํ้านมออกแล้วจะได้ผลิตผลพลอยได้คือ โอคารา (Okara) หรือ กากถั่วเหลือง (Soybean residue) เป็นผลิตผลพลอย (by-product) ได้ที่มีมูลค่าทางการค้าต่ำส่วนใหญ่ถูกทิ้ง หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ และมีการนำมาแปรรูปเป็นอาหารค่อนข้างน้อย เนื่องจากผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ความร้อนสูง โดยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ส่วนใหญ่จะถูกสกัดออกเกือบหมด และทำให้เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนในปริมาณมาก และส่งผลให้โปรตีนจาก Okara (Okara protein ; OP) มีความสามารถในการละลายต่ำ ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยจากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม จะมี Okara สดเหลือทิ้งประมาณ 1.1 กิโลกรัม (Khare et al., 1995) ใน Okara สดจะมีความชื้นประมาณ 70 – 85% มักจะอยู่ในลักษณะกึ่งของแข็งด้วยปริมาณความชื้นที่สูงส่งผลให้ Okara สดดูแลจัดการได้ยาก และไวต่อการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ส่วน Okara แห้งมีโปรตีนประมาณ 26.8 - 37.5% ไขมัน 8.5 - 23.2% และคาร์โบไฮเดรต 37.9 - 52.9% (Ma et al., 1997; Sural & Couplet, 2005; Vishwanathan et al., 2011) คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดใน Okara ประกอบด้วยน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ 3.9 - 6.6% สตาร์ช 0.5 - 1.8% และเส้นใยอาหารทั้งหมด 31.8 - 54.3% (Sural & Couplet, 2005; Mateos-Aparicio et al., 2010) ขึ้นอยู่กับกระบวนการแปรรูป วิธีการ Okara นั้นมีส่วนส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นใกล้เคียงกับถั่วเหลือง รวมทั้งสารสำคัญกลุ่มซาโปนิน สารไอโซฟลาโวน และสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินซี อี และสารกลุ่มฟีนอลิก (วนิดา เทวฤทธิ์ และชิตติสรร์กุล, 2561) ดังนั้นการศึกษาระบบการเตรียม และการผลิตโปรตีนเข้มข้น (Okara protein concentrate ; OPC) และไฮโดรไลเสท (Okara protein hydrolysate ; OPH) จาก Okara ที่เป็นผลิตผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลืองถือเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่า และลดวัสดุเหลือทิ้งจากอาหารได้ ในกระบวนการเตรียม Okara เพื่อผลิตโปรตีน การอบแห้งด้วยความร้อนสูงอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน และส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติ และการทำงานของโปรตีน ดังนั้นการศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ชีวภาพ และเชิงหน้าที่ของ Okara แบบสดและแบบแห้ง สามารถนำไปสู่การผลิตเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพมากขึ้น

โปรตีนที่ละลายน้ำได้ส่วนใหญ่จะถูกสกัดออกเกือบหมดจากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Okara นั้นประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และยังไม่สามารถสกัดออกได้เป็นส่วนใหญ่ ภายใน Okara โปรตีนส่วนใหญ่มักจะอยู่ภายในผนังเซลล์ โดยจะรวมกันแน่นกับโพลีแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และอื่นๆ (de Figueiredo et al., 2018) ซึ่งทำให้แยกโปรตีนออกจาก Okara ได้ยากจากการสกัดโปรตีนด้วยด่างเพียงอย่างเดียว โดยกลยุทธ์สำคัญในการปรับปรุงการสกัดโปรตีนให้ Okara มีผลผลิต และคุณสมบัติที่ดีขึ้น คือการทำให้ผนังเซลล์สูญเสียสภาพเพื่อให้โปรตีนที่อยู่ภายในออกมาโดยการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด (Pretreatment; พรียพรีทเม้นท์) ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ คลื่นอัลตราโซนิก และเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช จากงานวิจัยของ

Vishwanathan et al., (2011) รายงานว่าโปรตีน Okara เข้มข้น (Okara protein concentrate ; OPC) มีความสามารถในการกักเก็บน้ำ/น้ำมันที่ใกล้เคียงกับ โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate ; SPC) และ โปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลท (Soy protein isolates ; SPI) แต่มีความสามารถในการละลาย และคุณสมบัติการเป็นอิมัลชันต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการสกัดโปรตีนและการทำงานของ OP ให้ดียิ่งขึ้น การนำคลื่นอัลตราโซนิกมาประยุกต์ใช้ในการสกัด เป็นเทคโนโลยีที่เพิ่งได้รับความสนใจจากงานวิจัยในการช่วยกระบวนการสกัดโปรตีนจากวัตถุดิบที่หลากหลาย (Zhang et al., 2018) กลไกการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกนั้นขึ้นอยู่กับปรากฏการณ์คาวิเทชัน (Cavitation) ซึ่งนำไปสู่การแตกตัวของอนุภาคหรือเซลล์ (Khanal et al., 2007) ซึ่งการแตกตัวของผนังเซลล์จากการเกิดคาวิเทชันทำให้สารประกอบที่ซ่อนอยู่ภายในเซลล์ถูกแยกออกมาสู่ตัวกลางในการสกัด ดังนั้นจึงส่งเสริมให้ผลผลิตจากการสกัดสูงขึ้นในระยะเวลาเวลาที่สั้นลง (Mason et al., 1996) อย่างไรก็ตาม ผลกระทบนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดั้งเดิมของโปรตีนด้วยการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (McClements, 1995) ด้วยเหตุนี้คลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงแต่สามารถใช้ได้ในกระบวนการสกัด อีกทั้งยังรวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนด้วย และการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช เช่น เซลลูเลส (Cellulase), เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase), เพกตินเนส (Pectinase) และไซลานเนส (Xylanase) เป็นต้น สามารถช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยโครงสร้างของผนังเซลล์จะถูกทำลาย และทำให้โปรตีนที่ยึดกันอยู่ภายในเซลล์ละลายออกมาในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ, 2559)

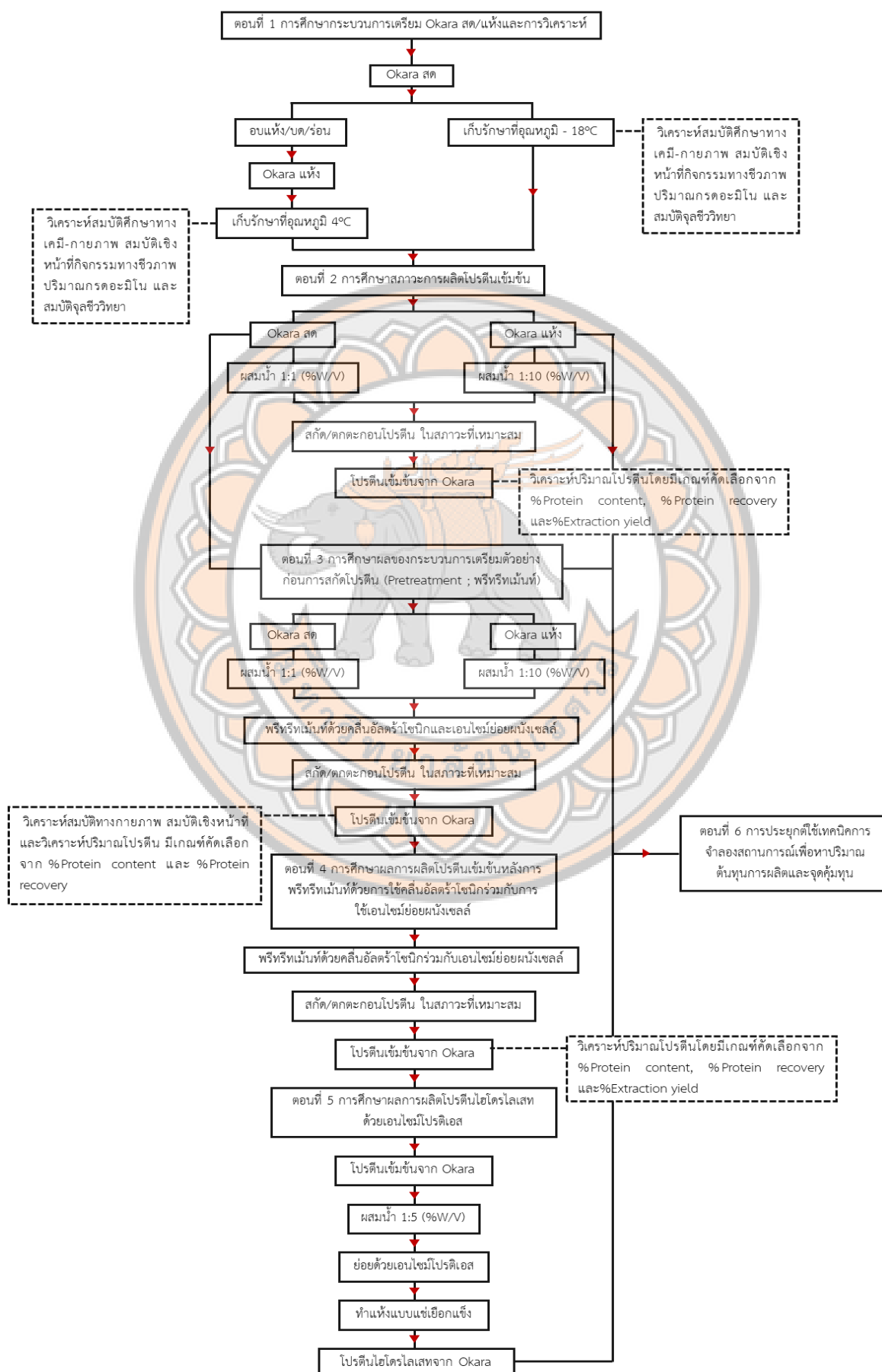
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara โดยมีขั้นตอนดังนี้: 1. การศึกษากระบวนการเตรียม และการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ เชิงหน้าที่ และกิจกรรมด้านอนุมูลอิสระระหว่าง Okara สดและแห้ง 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (pH และเวลา) ในการสกัดโปรตีนเข้มข้นจาก Okara ทั้งสองประเภท 3. การศึกษาผลของกระบวนการฟิสิทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ระยะเวลาต่างๆ และการศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช (Cellulase, Pectinase, Xylanase และ Viscozyme) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัด และคุณสมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และปริมาณโปรตีน 4. การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการฟิสิทรีทเม้นท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ต่อประสิทธิภาพการสกัด 5. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Alcalase และ Flavourzyme) จากโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านและไม่ผ่านการฟิสิทรีทเม้นท์ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดอะมิโน ลักษณะทางกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพ และ 6. การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองสถานการณ์ด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer เพื่อประเมินต้นทุนการผลิต ปริมาณผลผลิต และจุดคุ้มทุนในระดับ

ห้องปฏิบัติการ สำหรับกระบวนการผลิตทั้งหมด เพื่อคัดเลือกกระบวนการที่มีประสิทธิภาพและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการเตรียมและวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของ Okara ทั้งในรูปแบบสดและแห้ง ก่อนการผลิตโปรตีนเข้มข้น
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara
3. เพื่อศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; ฟรีทรีทเม้นท์) ต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara โดยการใช้เทคนิคคลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมผสาน
4. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ด้วยเอนไซม์โปรติเอส และวิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้
5. เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองสถานการณ์ในการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนของกระบวนการผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจาก Okara

ขอบเขตของงานวิจัย



สมมติฐานของการวิจัย

1. Okara ในรูปแบบสดและแห้งมีความแตกต่างกันในด้านสมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนเข้มข้น
2. การปรับสภาวะการสกัดโปรตีนจาก Okara ด้วยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น pH อุณหภูมิ และเวลา สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและคุณภาพของโปรตีนเข้มข้นที่ได้
3. กระบวนการพรีทรีทเมนต์ Okara ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมผสาน สามารถทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ ปลดปล่อยโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ และเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara ได้มากกว่าการสกัดแบบปกติ
4. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ด้วยเอนไซม์โปรติเอสสามารถปรับปรุงสมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และเพิ่มกิจกรรมทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ ทำให้เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่หลากหลาย
5. การผลิตโปรตีนเข้มข้นและไฮโดรไลเสทจาก Okara มีความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ โดยสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มจากผลิตผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมการผลิตนมถั่วเหลือง และมีจุดคุ้มทุนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตโปรตีนจาก Okara ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกจากพืชอีกชนิดที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนา และเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลาย
2. สามารถนำเทคนิคการพรีทรีทเมนต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชไปใช้ได้จริงในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และอุตสาหกรรม
3. สามารถลดการสร้างวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร หวนคืนผลิตผลพลอยกลับสู่ห่วงโซ่คุณค่าอาหาร และลดปัญหาทางด้านมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม
4. เป็นแนวทางในการให้หน่วยงานสามารถนำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้ ได้แก่ ผู้ประกอบการด้านอาหารเพื่อสุขภาพ กลุ่มวิสาหกิจชุมชน นักวิชาการและผู้สนใจทั่วไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

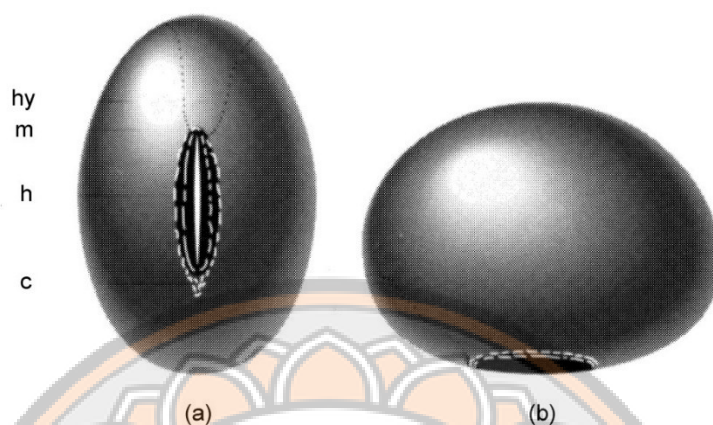
1. ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง เป็นพืชล้มลุก มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Glycine max* (L.) Merrill เป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) จัดเป็นถั่วเมล็ดแห้ง (legume) อยู่ในกลุ่มพืชน้ำมัน (oil crop) เป็นไม้พุ่มแตกแขนงค่อนข้างมาก ลำต้นตั้งตรง และมีความสูงประมาณ 30-150 เซนติเมตร ฝักถั่วเหลืองพัฒนามาจากรังไข่ ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นฝักรูปยาวและโค้ง ภายในมีเมล็ด 2-3 เมล็ด เรียงตัวอยู่ตามแนวนอนเมล็ดถั่วเหลืองมีรูปร่างค่อนข้างกลมรี มีลักษณะว่าทางด้านของเมล็ดที่มี hilum ขนาดของเมล็ดแตกต่างกันตามพันธุ์ ฤดูกาลปลูก ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และปริมาณน้ำที่ได้รับโดยทั่วไปมีขนาดเมล็ด 100 เมล็ดมีน้ำหนัก 5-20 กรัม พันธุ์เป็นที่ยอมรับปลูกในประเทศไทยปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 10 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ สจ.4 สจ.5 สุโขทัย 1 สุโขทัย 2 นครสวรรค์ 1 เชียงใหม่ 2 เชียงใหม่ 3 เชียงใหม่ 4 และ เชียงใหม่ 60 พื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองได้แก่แถบภาคเหนือ ภาคกลางตอนบน ภาคตะวันออก และ ตะวันตก (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ส่วนฤดูกาลที่เหมาะสมในการเพาะปลูกถั่วเหลือง ได้แก่ ฤดูฝน ปลายฤดูฝน และ ฤดู แล้ง โดยถั่วเหลืองควรแก่ในช่วงที่ไม่มีฝน (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ฤดูกาล อากาศ และ สภาพแวดล้อมหรือภูมิประเทศของพื้นที่เพาะปลูก (Lui, 1997) ถั่วเหลืองเป็นแหล่งสารอาหารที่ดี นอกจากการใช้ในอาหารปศุสัตว์แล้ว สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายสำหรับการบริโภคของมนุษย์ นำไปใช้เป็นวัตถุดิบ เพื่อการสกัดเป็นน้ำมันถั่วเหลือง และยังสามารถแปรรูป (food processing) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลาย เพื่อเป็นแหล่งโปรตีน เช่น โปรตีนเกษตร (texturized vegetable protein) โปรตีนถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยวมิ โชะ เต้าหู้ยี้ เทมเป้ ถั่วเน่า เป็นต้น (Riaz & Mian, 2006)

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเมล็ดถั่วเหลือง

เมล็ดถั่วเหลืองก็มีลักษณะกลม โดยรูปร่างและขนาดอาจแตกต่างกันอย่างมากตามสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต เมล็ดประกอบด้วยสามส่วนหลัก ได้แก่ เปลือกเมล็ด ใบเลี้ยง และงอกถั่ว (germ) หรือไฮโปคอติล (hypocotyl) โดยบริเวณเปลือกมีไฮลัม (hilum) ซึ่งเป็นจุดยึดติดกับฝัก ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีใบเลี้ยงสองใบยึดติดกันภายในเปลือก เมื่อแกะเปลือกออก ใบเลี้ยงจะแยกจากกัน และสามารถมองเห็นงอกถั่วได้อย่างชัดเจน โดยทั่วไป ถั่วเหลืองเพื่อการ

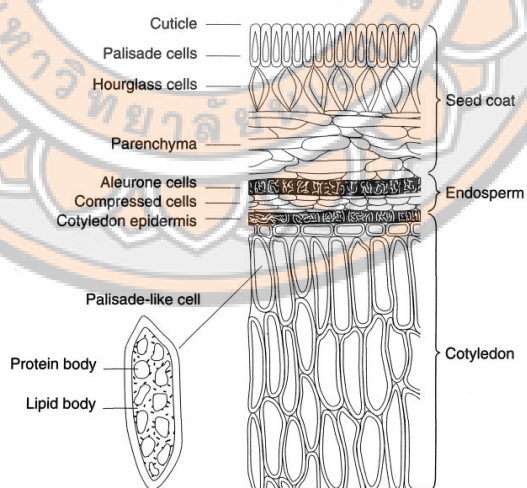
พลาสมิซึมประกอบด้วยเปลือกประมาณ 8% ไขมัน 90% และไฮโปคอติล 2% ของน้ำหนักรวม (Edward, 1995)



ภาพ 1 โครงสร้างพื้นฐานของเมล็ดถั่วเหลือง ในมุมมองด้านหน้าและด้านข้าง

h - hilum; c = chalaza; m = micropyle; hy = โครงสร้างของ hypocotyl ใต้เปลือกหุ้ม
เมล็ด

ที่มา : Smith, A.K., และ S.J. Circle, 1972



ภาพ 2 โครงสร้างจุลทรรศน์ของถั่วเหลือง

ที่มา : Smith, A.K., และ S.J. Circle, 1972

1.2 ส่วนประกอบย่อยเซลล์

1.2.1 โปรตีนที่รวมกันอยู่เป็นรูปร่าง (protein bodies)

โปรตีนบอดี (protein bodies) เป็นองค์ประกอบย่อยที่เด่นชัดในเซลล์ใบเลี้ยงของถั่วเหลือง ซึ่งสามารถมองเห็นได้ชัดเจนแม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง โดยมีการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอย่างแพร่หลายในการจำแนกและศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรตีนบอดีในถั่วเหลือง (Bils & Howell, 1963) โดยโปรตีนบอดีที่มีปริมาณโปรตีนสูงนี้ถือเป็นลักษณะเฉพาะของถั่วเหลือง (Wolf, 1972) Tombs รายงานว่าภายในโปรตีนบอดีมีองค์ประกอบของ RNA กรดไฟติก และลิปิด ส่วน Rost (1972) จำแนกโปรตีนบอดีออกเป็นสามประเภท ได้แก่ 1) ชนิดที่มีเฉพาะโปรตีนอัสสนฐาน, 2) ชนิดที่มีฟลักโกลบอยด์ (ไฟติน) ฝังอยู่ในโปรตีนอัสสนฐาน, และ 3) ชนิดที่มีทั้งฟลักโกลบอยด์และผลึกโปรตีนฝังอยู่ในโปรตีนอัสสนฐาน

Lott และ Buttrose (1978) ได้ศึกษาการปรากฏของโกลบอยด์ (globoids) ภายในโปรตีนบอดี (protein bodies) ของใบเลี้ยงในเมล็ดพืชตระกูลถั่วหลายชนิด และพบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองมีการก่อตัวของผลึกโกลบอยด์ ซึ่งมีลักษณะขนาดเล็กและพบได้ไม่บ่อย ทั้งนี้ พวกเขาสังเกตว่าในขณะที่บางเซลล์ประกอบด้วยเนื้อโปรตีนที่มีสิ่งเจือปนอยู่ แต่บ่อยครั้งพบว่าเซลล์ที่อยู่ติดกันกลับประกอบด้วยเนื้อโปรตีนที่ปราศจากสิ่งเจือปนโดยสิ้นเชิง ลักษณะเช่นนี้ที่ปรากฏในระดับเซลล์ต่อเซลล์ (หรือเนื้อเยื่อต่อเนื้อเยื่อ) ทำให้สามารถเข้าใจได้ว่าทำไมโปรตีนบอดีจึงอาจถูกมองข้ามหรือตีความผิดว่าเป็นสิ่งประดิษฐ์อันเกิดจากกระบวนการเตรียมตัวอย่าง

Wallis (1913) รายงานว่า protein bodies ของถั่วเหลืองสามารถละลายได้ในสารละลายโซดาไฟและโซเดียมคลอไรด์ 10% โดยปรากฏสีเหลืองเมื่อย้อมด้วยไอโอดีนและกรดฟิกริก และให้สีแดงเมื่อย้อมด้วยอีโอ ต่อมา Tombs (1967) สรุปว่า protein bodies คิดเป็นประมาณ 70% ของโปรตีนทั้งหมดในถั่วเหลือง โดยมีไกลซินินเป็นโปรตีนหลัก ถั่วเหลืองยังมีโปรตีนกลุ่มอื่น ได้แก่ โปรตีนเก็บสะสม (storage proteins) ประมาณ 70–80%, สารยับยั้งโปรตีเอส 8–10% (Miroljub & Sladana, 2004), เอนไซม์ลิพอกซีจีเนสและแลคเตทไฮโดรจีเนส ตลอดจนโปรตีนอื่น ๆ เช่น เลคติน รวมกันประมาณ 10% โปรตีนสะสมหลักในถั่วเหลืองคือโกลบูลิน (globulins) ซึ่งจำแนกเป็น 2S, 7S (glycinin), 11S (β -conglycinin) และ 15S ตามคุณสมบัติการตกตะกอน (Liu, 1997) โดย Kinsella (1979) รายงานว่าโปรตีนเหล่านี้คิดเป็น 8%, 35%, 52% และ 5% ของโปรตีนรวมในถั่วเหลืองตามลำดับ ในจำนวนนี้ 11S glycinin และ 7S β -conglycinin เป็นโปรตีนหลัก ซึ่งมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกัน β -

Conglycinin เป็นไกลโคโปรตีนที่อุดมด้วยซิสเทอีน ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลักสามชนิด ได้แก่ α (58 kDa), α (57 kDa) และ β (42 kDa) โดยจับกันผ่านแรงไม่ชอบน้ำ และพันธะไฮโดรเจน โดยไม่อาศัยพันธะไดซัลไฟด์ เพื่อสร้างไตรเมอร์ (Thanh & Shibasaki, 1978; Mujoo et al., 2003; Tezuka et al., 2004; Utsumi & Kinsella, 1985)

ตาราง 1 โกลบูลินที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ	โปรตีนทั้งหมด (%)	ชนิด	มวลโมเลกุล
2S (α -Conglycinin)	22	Trypsin inhibitors	8000; 21,500
		Cytochrome c	12,000
		Hemagglutinin	110,000
7S (β -and γ - Conglycinin)	37	Lipoxygenase	102,000
		β - Amylase	61,700
		7S globulin	180,000-210,000
11S (Glycinin)	31	11S globulin	350,000
15S	11		≈600,00

ที่มา : Wolf, 1970

องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน แป้งถั่วเหลือง และสารโปรตีนเข้มข้นแสดงไว้ในตาราง 3 (Tanteeratarm, 1993) โปรตีนจากถั่วเหลืองประกอบด้วยสารยับยั้งทริปซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่รบกวนการย่อยโปรตีน และเฮแมกกลูตินิน (เลกติน) ซึ่งมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ โดยทั่วไปสารเหล่านี้จำเป็นต้องถูกทำลายด้วยความร้อนก่อนบริโภค เพื่อป้องกันผลกระทบต่อคุณภาพโปรตีน ถั่วเหลืองยังมีสาร goitrogens และแอนติวิตามิน เช่น antivitamin D, E และ B12 ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาสารอาหาร (Liener, 1981)

นอกจากนี้ ความต้องการธาตุโลหะบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี ทองแดง และเหล็ก จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีถั่วเหลืองในอาหาร (O'Del, 1979) ปัจจัยที่เสถียรต่อความร้อนที่สามารถก่อให้เกิดการตอบสนองของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์นั้นแยกได้จากถั่วเหลือง เหล่านี้คือไอโซฟลาโวนซึ่งมีอยู่ในพืชในรูปของไกลโคไซด์ โครงสร้างของไอโซฟลาโวน (isoflavones) หลักที่แยกได้ และศักยภาพของเอสโตรเจนที่สัมพันธ์กับไดเอทิล

สตีลเบสทรอล ซาโปนิน (saponins) เป็นไกลโคไซด์ชนิดหนึ่งที่กระจายอยู่ทั่วไปในพืช ประกอบด้วยซาโปจีนิน (sapogenin) ซึ่งประกอบเป็นมอยอิตอะกลูคอนและน้ำตาล ซาโปเจนนี้อาจเป็นสเตียรอยด์หรือไตรเทอร์ปีน และน้ำตาลอาจเป็นกลูโคส กาแลคโตส เพนโทส หรือเมทิลเพนโทส ซาโปนินของถั่วเหลืองไม่มีพิษต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ ผลกระทบทางโภชนาการและทางชีวเคมีอื่นๆ ของถั่วเหลือง เช่น การต้านการก่อมะเร็ง และความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล

ตาราง 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเมล็ดถั่วเหลือง และโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น

Amino Acid	เมล็ดถั่วเหลือง (g/100g โปรตีน)	โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (g/100g โปรตีน)
Histidine*	2.6	2.8
Arginine	7.2	7.4
Aspartic acid	11.5	11.6
Cysteine	1.4	1.3
Glutamic acid	18.8	19.2
Glycine	4.1	4.2
Alanine	4.2	4.3
Isoleucine*	4.4	4.5
Leucine*	7.6	7.8
Lysine*	6	6.2
Methionine*	1.2	1.3
Phenylalanine*	4.9	5
Proline	5	5.1
Serine	4.8	5
Threonine*	3.7	3.8
Tryptophan*	1.3	1.3
Tyrosine	3.5	3.6
Valine*	4.6	4.8

หมายเหตุ : * กรดอะมิโนจำเป็น

ที่มา: Van den Berg, 2022, Kudetka, 2021 และ Kumar, 2016

ตาราง 3 กิจกรรมสารยับยั้งทริปซินของส่วนประกอบถั่วเหลือง

ชนิดผลิตภัณฑ์	ฤทธิ์ต้านทริปซิน (TIUa /g ของแข็งแห้ง $\times 10^{-3}$)	แบ่งถั่วเหลือง (%)
แบ่งถั่วเหลือง (ไม่ผ่านความร้อน)	86.4	100
ถั่วเหลืองไอโซเลท	25.5	30
เส้นใยถั่วเหลือง	12.3	14

ที่มา: Liener, 1981

ตาราง 4 น้ำหนักเมล็ดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักฝักถั่วเหลืองทั้งหมด และปริมาณน้ำ สตาร์ช โปรตีน และน้ำมันของเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บ 20 วันก่อนการเก็บเกี่ยว

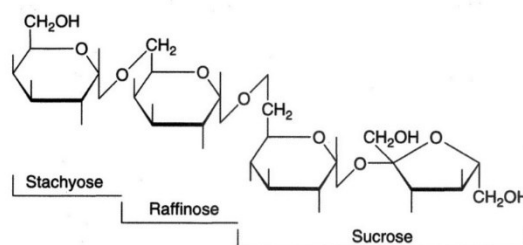
พันธุ์ถั่วเหลือง	น้ำหนักเมล็ด (% ของฝัก ทั้งหมด)	ปริมาณน้ำ (%)	ปริมาณ สตาร์ช (%)	ปริมาณ โปรตีน (% น้ำหนัก แห้ง)	ปริมาณน้ำมัน (% น้ำหนัก แห้ง)
โปรตีนปริมาณสูง	49.3	64.0	11.7	39.5	18.0
ลิพ็อกซีเจเนส-ฟรี	52.0	64.4	11.5	40.8	17.3
กรดไลโนเลนิกปริมาณต่ำ	52.6	63.7	10.9	39.4	17.0

ที่มา : Stevenson, 2006

1.2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates composition)

ถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 35% และที่ปลายเมล็ดและแบ่งถั่วเหลืองที่ แยกไขมันออกแล้วมีคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ประมาณ 17% และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ 21% ถั่วเหลือง พบว่ามีการใช้น้อยในอาหารของมนุษย์ เนื่องจากอาการท้องอืดที่เกิดจากราฟฟิโนส (raffinose) และสแตคิโอส (stachyose) มนุษย์ขาดเอ็นไซม์ในการไฮโดรไลซ์การเชื่อมโยงไกลโคซิดิก (glycosidic) ของราฟฟิโนสและสตาคิโอส ภาพ 3) กับน้ำตาลที่ง่ายกว่า ดังนั้นส่วนผสมจะเข้าสู่ลำไส้ส่วนล่างเหมือนเดิม โดยที่พวกมันจะถูกเผาผลาญโดยแบคทีเรีย

เพื่อทำให้เกิดอาการท้องอืด องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตของ Okara ที่สกัดน้ำมันออกแล้ว แสดงไว้ในตาราง 5 (Au-Kumar, 1992)



ภาพ 3 โครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วเหลือง

ที่มา : Smith, A.K., และ S.J. Circle, 1972

ส่วนประกอบอนินทรีย์หลักของถั่วเหลืองคือแร่ธาตุ ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกันไปตามพันธุ์ที่เลือก วิเคราะห์เมล็ดพันธุ์จากถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันและพบว่ามีความแปรปรวนค่อนข้างมาก ในการแยกเศษถั่ว พบว่ามีปริมาณแร่ธาตุ ในช่วงต่อไปนี้ โพแทสเซียม 1.5 - 1.92%, แมกนีเซียม 0.094 - 0.208%, โซเดียม 0.4 - 0.61%, แคลเซียม 0.024 - 0.063%, ฟอสฟอรัส 0.352 - 0.733% และเหล็ก 0.0044 - 0.0163% (Korngay, 1978)

ตาราง 5 องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตของเมล็ดถั่วเหลืองสกัดที่ขจัดไขมันออกแล้ว

คาร์โบไฮเดรต	แหล่ง	% wt
โมโนแซ็กคาไรด์ :		
กลูโคส	ใบเลี้ยง	-
โอลิโกแซ็กคาไรด์ :		
ซูโครส	ใบเลี้ยง	5.7
สตาชิโอส	ใบเลี้ยง	4.1
		4.6
โพลีแซ็กคาไรด์ :		
อะราบิแนน	ใบเลี้ยง	1
อะราบิโนกาแลคแทน	ใบเลี้ยง	8
พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นกรด	ใบเลี้ยง	7

ที่มา : Smith, A.K., และ S.J. Circle, 1972

1.3 การผลิตถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองยังคงสถานะเป็นพืชเศรษฐกิจระดับโลกที่มีความสำคัญสูงสุดในกลุ่มพืชน้ำมัน ทั้งในมิติของการผลิตน้ำมันและเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ จากข้อมูลล่าสุดของกระทรวงเกษตรธิการสหรัฐอเมริกา (USDA) ในปีการผลิต 2566/2567 (2023/2024) คาดการณ์ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 395.91 ล้านเมตริกตัน โดยมี บราซิล เป็นผู้นำการผลิตของโลกอย่างชัดเจนที่ปริมาณ 154.0 ล้านเมตริกตัน ตามมาด้วย สหรัฐอเมริกา (115.0 ล้านเมตริกตัน) และอาร์เจนตินา (50.0 ล้านเมตริกตัน)

สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทย จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (สศก.) ในปี 2567 คาดว่าประเทศไทยมีผลผลิตถั่วเหลือง (เมล็ดแห้ง) ประมาณ 25,480 ตัน หรือคิดเป็น 0.025 ล้านเมตริกตัน ซึ่งผลผลิตดังกล่าวสามารถตอบสนองความต้องการใช้ในประเทศได้เพียงส่วนน้อยเท่านั้น ทำให้ประเทศไทยต้องพึ่งพาการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและโดยเฉพาะอย่างยิ่งกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศเป็นปริมาณมหาศาลในแต่ละปีเพื่อรองรับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป

ตาราง 6 ประเทศและปริมาณถั่วเหลืองที่ผลิตตามลำดับ

ประเทศ	ปริมาณการผลิต (ล้านเมตริกตัน)
บราซิล	154
สหรัฐอเมริกา	115
อาร์เจนตินา	50
จีน	20.84
อินเดีย	11.5
ปารากวัย	10.1
แคนาดา	6.4
รัสเซีย	6.8
ประเทศไทย	0.025
รวมทั่วโลก	395.91

ที่มา : USDA, 2025

ถั่วเหลืองได้รับการปลูกเป็นหลักสำหรับน้ำมันของมัน แม้ว่าจะมีโปรตีนมากกว่าน้ำมัน เป็นพืช น้ำมันที่ปลูกที่ใหญ่ที่สุดในโลกเป็นเวลาหลายปี ทั่วโลก ประมาณ 87% เปอร์เซ็นต์ของการผลิตถั่วเหลืองทั้งหมดถูกบดเป็นกากถั่วเหลืองและน้ำมันถั่วเหลือง โดยที่เหลืออีก 13 เปอร์เซ็นต์ใช้สำหรับการบริโภคโดยตรงของมนุษย์ จากกระบวนการบดถั่วเหลือง ประมาณ 80% ถูกสกัดเป็นกากถั่วเหลืองเพื่อใช้ในอาหารสัตว์ และ 20% สกัดเป็นน้ำมันสำหรับการบริโภคของมนุษย์และเป็นวัตถุดิบเชื้อเพลิงชีวภาพ (Product Board, 2011) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา กากถั่วเหลืองถือเป็นแหล่งของสารอาหารที่มีคุณค่าและไฟโตเคมีคอลที่ค่อนข้างถูก เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงได้เริ่มนำมาใช้ในการกำหนดอาหารจากถั่วเหลืองหลายชนิด (Strahm, 2006)

1.4 อาหารที่ทำจากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้เพื่อสร้างอาหารแบบดั้งเดิมที่หลากหลายในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย เกาหลี อินเดีย ไทย เวียดนาม และบางประเทศในแอฟริกา (ส่วนใหญ่เป็นไนจีเรียและยูกันดา) อาหารถั่วเหลืองแบบดั้งเดิม ได้แก่ มิโซะ เต้าหู้ (นมถั่วเหลืองจับตัวเป็นก้อน) นมถั่วเหลือง เทมเป้ และซอสถั่วเหลือง ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองมากขึ้น ซึ่งรวมถึงถั่วและถั่วอกสด ขนมหักถั่วเหลือง ชีสถั่วเหลือง เครื่องดื่มจากถั่วเหลือง ซอสถั่วเหลือง พาสต้าที่มีส่วนผสมของถั่วเหลือง เนื้อสัตว์ที่คล้ายคลึงกัน และคุกกี้ถั่วเหลือง ความสำเร็จในเชิงพาณิชย์ของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ค่อนข้างต่ำจนกระทั่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) อนุมัติข้อเรียกร้องด้านสุขภาพในปี 2542 เกี่ยวกับการลดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจด้วยโปรตีนจากถั่วเหลือง (FDA, 1999; Henkel, 2000) การรับรู้ของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับประโยชน์ต่อสุขภาพที่อาจเกิดขึ้นซึ่งเกี่ยวข้องกับการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองซึ่งเป็นที่รู้จักว่ามีโปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และไฟโตเคมีคอล (เช่น ไอโซฟลาโวน ซาโปนิน ฟิเตต) และนำไปสู่ความต้องการที่เพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง โดยเฉพาะนมถั่วเหลืองและเครื่องดื่มจากนมถั่วเหลืองในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา (Golbitz & Jordan, 2006; Granato et al., 2010) โดยทั่วไป ผู้คนมีแนวโน้มที่จะซื้ออาหารที่เกี่ยวข้องกับการกล่าวอ้างด้านสุขภาพทางสรีรวิทยามากกว่าที่พวกเขาจะซื้อสำหรับอาหารที่มีการกล่าวอ้างเรื่องสุขภาพจิต (Siegrist, 2008) รายงานยังระบุว่ายอดขายทั่วโลกสำหรับอาหารเพื่อสุขภาพเพิ่มขึ้นประมาณ 60% ระหว่างปี 1998 ถึง 2003 และประมาณ 40% ในปี 2008 (Euromonitor, 2009)

ตาราง 7 องค์ประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

ชนิดวัตถุดิบ	ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เยื่อใย (%)	เถ้า (%)
ถั่วเหลือง	11.0	37.9	17.8	4.7	4.5
แป้งถั่วเหลืองพร้อมเปลือก	10.4	44.0	0.5	7.0	6.0
แป้งถั่วเหลืองพร้อมไร้เปลือก	10.7	47.5	0.5	3.5	6.0
แป้งถั่วเหลืองไขมันเต็ม	5.0	44.3	21.0	2.0	4.9
จุ่มถั่วเหลืองและแป้งถั่วเหลือง	7.0	54.9	0.8	2.4	6.0
แป้งถั่วเหลืองเลซิดิน	5.5	49.9	15.5	2.1	5.0
โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น	7.5	66.6	-	3.5	5.5
โปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต	5.0	93.1	-	0.2	4.0

ที่มา : E. Perkins, 1995

1.5 การผลิตนมถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ได้ (Okara)

โปรตีนจากพืชเป็นแหล่งโปรตีนที่ยั่งยืนมากกว่าโปรตีนจากสัตว์สำหรับประชากรมนุษย์ ในบรรดาแหล่งผักทั้งหมด มีเพียงนมถั่วเหลืองที่มีกรดอะมิโนจำเป็นเกือบทั้งหมดที่มี การย่อยได้ประมาณ 0.90 ซึ่งคล้ายกับนมวัว นมถั่วเหลืองเป็นสารสกัดน้ำร้อนจากเมล็ดถั่วเหลืองบดเปียก มีสีขาวนวลและมีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ส่วนใหญ่ รวมทั้งน้ำมันที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลือง (Hajirostamloo, 2009; USDA, 2015a) นมถั่วเหลืองถือเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เนื่องจากอุดมไปด้วยโปรตีนและมีไขมันอิ่มตัวต่ำกว่านมวัว

ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของนมถั่วเหลืองและนมวัว

องค์ประกอบทางเคมี	นมถั่วเหลือง	นมวัว
โปรตีน (ก. /100 ก.)	2.8 - 4.8	3.3
คอเลสเตอรอล (มก.)	0	10.4 - 14.0
แลคโตส (กรัม)	0	1.7
ไขมันทั้งหมด (ก.)	1.9 - 3.0	3.7
ไขมันอิ่มตัว (ก.)	0.2	2.3
ไฟเบอร์ (ก.)	1.3	0
โฟเลต (ไมโครกรัม)	33.6	5.0
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	32.2 - 41.0	60.6 - 64.0

ที่มา : USDA, 2015a ; Hajirostamloo, 2009 ; Shakeel และคณะ, 2015

นมถั่วเหลืองไม่มีแลคโตสหรือคอเลสเตอรอล ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับผู้ที่มีแพ้อัลแลคโตส และสำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด (Kris-Etherton, 2002 ; Mozaffarian & Ludwig, 2010; Anand et al., 2015)

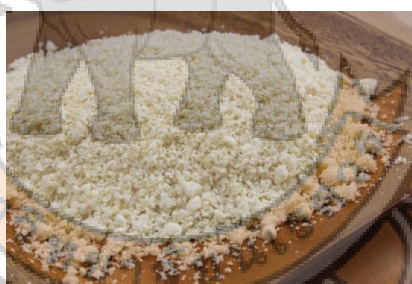
นอกจากนี้ นมถั่วเหลืองยังประกอบด้วยไอโซฟลาโวน (เจนิสไตน์ ไดซิน และกลีเซอริน) ซึ่งได้รับการแนะนำว่าอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น การลดความเสี่ยงของโรคมะเร็ง ป้องกันความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด การลดคอเลสเตอรอล ลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โรคกระดูกพรุนและการบรรเทาอาการวัยหมดประจำเดือน (Shu et al., 2001 ; Zhou et al., 2004; Messina et al., 2004 ; Messina, 2006 ; Bolla, 2015)

ในเชิงพาณิชย์ นมถั่วเหลืองมีจำหน่ายในรูปแบบต่างๆ เช่น นมถั่วเหลืองธรรมดา นมถั่วเหลืองปรุงแต่ง นมถั่วเหลืองประเภทนม เครื่องดื่มจากถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์เพาะเลี้ยง และการผสมนมถั่วเหลืองกับผักหรือนมจากนมอื่นๆ เนื่องจากการผลิตนมถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเนื่องจากความต้องการที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการสะสมของ Okara หลักในกระบวนการผลิต เช่น ถั่วเหลืองที่แปรรูปปริมาณสูงมีการประมาณการว่าทุกๆ 1 กิโลกรัมของเมล็ดถั่วเหลืองที่แปรรูปเป็นนมถั่วเหลือง จะทำให้เกิด Okara ประมาณ 1.1 กิโลกรัม (Khare et al., 1995 ; Liu, 1997)

2. กากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลือง (Soybean residue) หรือ โอคารา (Okara) เป็นผลผลิตพลอยได้ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งในขั้นตอนการผลิตหรือขั้นตอนการสกัดให้น้ำมันถั่วเหลืองเพื่อนำไปใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นต่อไป เช่น เต้าหู้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีหลากหลาย ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคให้ความนิยมมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะกลุ่มผลิตภัณฑ์จากนมถั่วเหลืองและเต้าหู้ การขยายตัวของอุตสาหกรรมกลุ่มนี้ทำให้มีของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตมากขึ้นเช่นกัน (Khare et al., 1995)

Okara จะมีสีขาวไปจนถึงเหลืองอ่อน (ภาพ 6) สีของ Okara ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของถั่วเหลืองที่ใช้ในการผลิตนมถั่วเหลือง ในปัจจุบัน Okara ที่เหลือจากกระบวนการผลิตนี้จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไป เนื่องจาก Okara ยังคงมีโปรตีน เยื่อใย และสารอาหารที่มีคุณค่าอยู่มาก จึงนิยมนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองสูงสุด Okara ที่เป็นผลผลิตพลอยได้เหล่านี้ควรนำมาพัฒนา แปรรูป และบริโภคเป็นอาหาร



ภาพ 4 กากถั่วเหลือง (Okara) ที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลือง

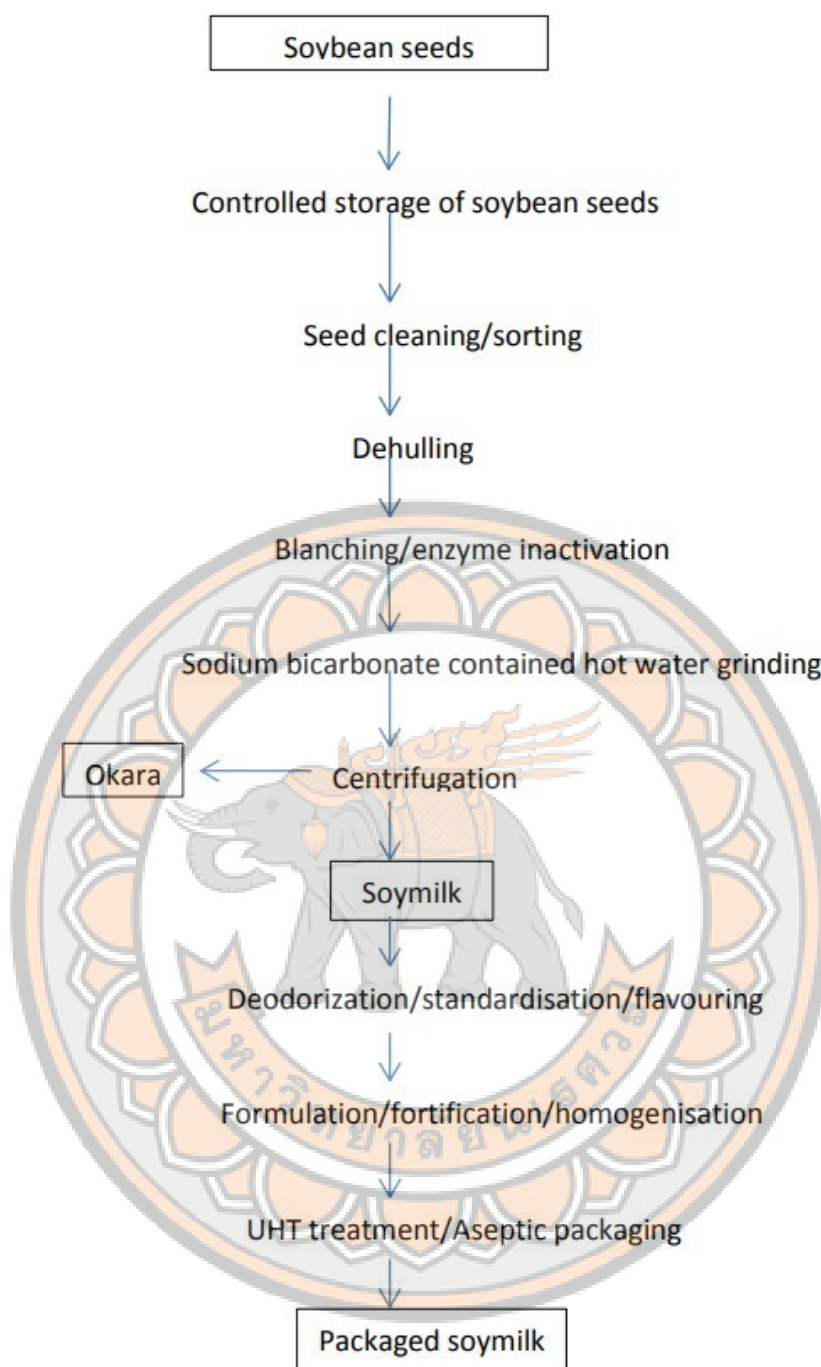
ที่มา : www.naturalmia.it

Okara ที่เหลือจากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง จะมีความชื้นประมาณ 70 -85% ของน้ำหนักกากสด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 16 -25% ของน้ำหนักกากแห้ง ไขมัน 8 - 12% เยื่อใย 20 - 40% โดยสัดส่วนของส่วนประกอบเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิด วัตถุดิบของถั่วเหลืองที่ใช้และกระบวนการขั้นตอนในการสกัดนมถั่วเหลือง เช่น ในกระบวนการผลิตนมถั่วเหลืองในประเทศจีนจะเตรียมนมถั่วเหลืองด้วยกระบวนการแช่น้ำ แล้วล้างออก จากนั้นบดและสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่กระบวนการผลิตของประเทศญี่ปุ่นจะให้ความร้อนกับถั่วเหลืองก่อนโดยการนำไปลวก แล้วจึงบดและสกัดที่อุณหภูมิสูง ซึ่งกระบวนการผลิตนมถั่วเหลืองลักษณะนี้จะได้นมถั่วเหลืองที่มีปริมาณสูงกว่า นอกจากนี้กระบวนการผลิตนี้ยังช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในถั่วเหลือง

ได้ และยังมีรายงานด้วยว่าคุณภาพของโปรตีนใน Okara นั้นดีกว่านมถั่วเหลือง เพราะมีอัตราส่วนของกลุ่มโปรตีนที่จำเป็นต่อร่างกายสูงกว่า (Lui, 1997)

2.1 กระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง Soya Technology Systems (STS)

วิธีนี้ดำเนินการในโรงงานผลิตอาหารสมัยใหม่ภายใต้ Good Manufacturing Practices (GMP) และรับรองว่านมถั่วเหลืองที่ผลิตออกมานั้นปลอดภัย เช่นเดียวกับที่ยอมรับได้ทางโภชนาการและทางประสาทสัมผัสสำหรับการบริโภคของมนุษย์ ขั้นตอนการประมวลผลแสดงในภาพ 7 การผลิตนมถั่วเหลืองในสมัยใหม่เริ่มต้นด้วยการเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองและการเก็บรักษาเมล็ดพืชในระบบที่มีการควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ จากนั้นทำความสะอาดเมล็ดพืช และแยกเมล็ดที่เสียหายออกเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไลออกซิเดส เมื่อถึงจุดนี้ ขั้นตอนการลอกเปลือกจะเกิดขึ้นเพื่อผลิตน้ำมันถั่วเหลืองที่ขาวและน่ารับประทาน เมล็ดที่เหลือจะถูกลอกเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายนอก (ลิโพซิเดส) และบดในสารละลายน้ำร้อนของโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อจัดการการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่พึงประสงค์ต่อไปผ่านการก่อตัวของสารละลายชั้นและเพื่อเพิ่มความสามารถในการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง โดย Okara ถูกแยกออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง นมที่สกัดแล้วจะถูกกำจัดกลืนโดยใช้สุญญากาศเพื่อกำจัดนมถั่วเหลืองและให้ความร้อนเพิ่มเติมในเครื่องกำจัดกลืน และกำหนดมาตรฐานเพื่อให้ได้องค์ประกอบโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจึงปรุงแต่งกลิ่นรส เสริมและทำให้เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอ ผลิตภัณฑ์นมที่ได้รับจะต้องผ่านการบำบัดด้วยอุณหภูมิสูงพิเศษ (UHT) และบรรจุในบรรจุภัณฑ์ปลอดเชื้อ (STS, 1986)



ภาพ 5 แผนผังลำดับงานของขั้นตอนการผลิตนมถั่วเหลือง/ Okara ของ STS

ที่มา : STS, 1986

2.2 สถานการณ์ราคากากถั่วเหลืองในประเทศและต่างประเทศ

กากถั่วเหลือง (Soybean Meal) เป็นผลผลิตร่วมที่สำคัญที่สุดจากกระบวนการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง และเป็นแหล่งโปรตีนหลักในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ทั่วโลก จากข้อมูลล่าสุดของกระทรวงเกษตรธิการสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture, 2025) ในปีการผลิต 2566/2567 คาดการณ์ว่าทั่วโลกจะมีการผลิตกากถั่วเหลืองประมาณ 258.4 ล้านเมตริกตัน โดยมีปริมาณความต้องการใช้ (การบริโภค) อยู่ที่ระดับใกล้เคียงกันคือประมาณ 255.7 ล้านเมตริกตัน

ประเทศจีนเป็นทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคกากถั่วเหลืองรายใหญ่ที่สุดของโลกอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากขนาดของอุตสาหกรรมปศุสัตว์ โดยเฉพาะสุกรและสัตว์ปีก ตามมาด้วยสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา ทั้งนี้ ราคากากถั่วเหลืองในตลาดโลกมีความผันผวนสูง โดยมีปัจจัยหลักมาจากสภาวะอากาศในกลุ่มประเทศผู้ผลิตหลักในทวีปอเมริกาใต้ (บราซิล, อาร์เจนตินา), ระดับความต้องการนำเข้าของประเทศจีน, ต้นทุนด้านพลังงานและโลจิสติกส์ รวมถึงสถานการณ์ของสินค้าเกษตรโปรตีนทดแทนอื่นๆ

ประเทศไทยเป็นผู้นำเข้ากากถั่วเหลืองสุทธิรายใหญ่ เนื่องจากผลผลิตถั่วเหลืองในประเทศมีปริมาณน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันและผลิตอาหารสัตว์ จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2568) ในปี 2567 ประเทศไทยมีความต้องการใช้กากถั่วเหลืองประมาณ 3.35 ล้านเมตริกตัน โดยต้องพึ่งพาการนำเข้าสูงถึง 2.60 ล้านเมตริกตัน หรือคิดเป็นสัดส่วนเกือบ 80% ของความต้องการใช้ทั้งหมด ความต้องการใช้ส่วนใหญ่มาจากอุตสาหกรรมเลี้ยงสุกรและไก่เนื้อ ดังนั้น ต้นทุนกากถั่วเหลืองในประเทศจึงเคลื่อนไหวตามราคาในตลาดโลก (CBOT) อัตราแลกเปลี่ยน และค่าขนส่งเป็นสำคัญ

ตาราง 9 ประเมินการผลิตและความต้องการใช้ Okara ทั่วโลก

ภูมิภาค/ประเทศ	ปี 2566	ปี 2567	ปี 2568	ปี 2569*	อัตราการเติบโต ปี 67/66
1. ผลผลิต Okara ทั่วโลก					
เอเชีย-แปซิฟิก (ล้านตัน)	8.5	9.1	9.7	10.3	7.10%
อเมริกาเหนือ (ล้านตัน)	2.8	3	3.2	3.4	7.10%
ยุโรป (ล้านตัน)	1.2	1.3	1.4	1.5	8.30%
อื่นๆ (ล้านตัน)	2	2.1	2.3	2.4	5.00%
รวมทั่วโลก	14.5	15.5	16.6	17.6	6.90%
2. ความต้องการใช้ตามประเภท					
อุตสาหกรรมเบเกอรี่ (ล้านตัน)	4.3	4.6	4.9	5.2	7.00%
ผลิตภัณฑ์เส้น (ล้านตัน)	3.2	3.4	3.6	3.9	6.30%
อาหารสัตว์ (ล้านตัน)	2.8	3	3.2	3.4	7.10%
ผลิตภัณฑ์เนื้อทดแทน (ล้านตัน)	1.9	2.1	2.3	2.5	10.50%
อื่นๆ (ล้านตัน)	2.3	2.4	2.6	2.6	4.30%
รวมความต้องการ	14.5	15.5	16.6	17.6	6.90%
3. ข้อมูลเฉพาะประเทศไทย					
การผลิต Okara (พันตัน)	18.5	19.8	21.2	22.7	7.00%
การใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (พันตัน)	12.4	13.3	14.2	15.2	7.30%
การใช้เป็นอาหารสัตว์ (พันตัน)	6.1	6.5	7	7.5	6.60%

*การประมาณการ

ที่มา : กรมการค้าภายในและ USDA, 2025

ตาราง 10 ราคากากถั่วเหลือง

ภูมิภาค/ประเทศ	ราคา (บาท/kg)*	วันที่อัปเดต	แหล่งที่มา
ตลาดโลก			
ราคาโลก (Any Origin)	12.89	พ.ค. 2568	World Bank
เอเชีย-แปซิฟิก			
จีน (ม.ค. 2568)	15.01	ม.ค. 2568	Procurement Resource
จีน (มี.ค. 2568)	18.29	มี.ค. 2568	Procurement Resource
ประเทศไทย			
กากถั่วเหลืองผลิตในประเทศ (เมล็ดนำเข้า)	16.56	มี.ย. 2568	Tridge
กากถั่วเหลืองนำเข้า (โปรตีน 47%)	18	มี.ย. 2568	Tridge
อเมริกา			
สหรัฐอเมริกา (Q4 2567)	30.17	ธ.ค. 2567	IMARC Group
ยุโรป			
เยอรมนี (Q4 2567)	34.06	ธ.ค. 2567	IMARC Group
โอเชียเนีย			
ออสเตรเลีย (Q4 2567)	35.71	ธ.ค. 2567	IMARC Group

ที่มา : IMARC Group, 2023, Procurement Resource, 2024, Tridge, 2025, U.S. Soybean Export Council, 2024, YCharts, 2025

2.3 องค์ประกอบของ Okara และประโยชน์ต่อสุขภาพที่เกี่ยวข้อง

Okara เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตนมถั่วเหลืองและมีมูลค่าทางการค้าต่ำ โดยพิจารณาจากยอดขายที่เพิ่มขึ้นอย่างมากของนมถั่วเหลือง ซึ่งคาดว่าจะถึง 16.3 พันล้านลิตรในปี 2561 (Statista, 2018) คาดว่าจะผลิต Okara ได้ประมาณ 6.5 พันล้านกิโลกรัม ปัจจัยขับเคลื่อนการเพิ่มขึ้นของตลาดนมถั่วเหลืองคือจำนวนผู้ที่แพ้นมวัวหรือแพ้แลคโตสและผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงเพิ่มขึ้น ในทางกลับกัน Okara เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีของพืช (โดยน้ำหนัก 26.8 - 37.5%) ไขมัน (โดยน้ำหนัก 8.5 - 23.2%) และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งรวมถึงเส้นใยอาหารเป็นหลัก (โดยน้ำหนัก 37.9 - 52.9%) (Ma et al., 1996 ; Sural & Couplet, 2005 ; Vishwanathan et al., 2011) ส่วนประกอบอื่นๆ ของถั่วเหลืองที่ยังคงอยู่ใน Okara ได้แก่ ไอโซฟลาโวน แร่ธาตุ วิตามิน ซาโปนิน และไฟเตต ส่วนประกอบเหล่านี้บางส่วน โดยเฉพาะไอโซฟลาโวนและโปรตีนจากถั่วเหลือง ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่ส่งเสริมสุขภาพในเชิงบวก เช่น การลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดและมะเร็ง ตลอดจนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Shu et al., 2001 ; Zhou et al., 2004 ; Xu และ Chang, 2012)

ตาราง 11 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง นมถั่วเหลืองผง และ Okara

พารามิเตอร์	ถั่วเหลือง	นมถั่วเหลืองผง	Okara
ความชื้น (ก./100 ก.)	8.29	4.32	4.89
แอสทิวติคของน้ำ	-	0.33	0.58
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ก./100 ก.)	91.71	95.68	95.11
โปรตีน (ก./100 ก.)	32.54	37.81	29.90
ไขมัน (ก./100 ก.)	18.64	22.44	9.01
เถ้า (%)	4.82	6.53	3.16
แร่ธาตุ (ก./กก.)			
P	5.38	6.99	4.60
Ca	1.95	2.66	3.60
K	17.32	15.42	5.64

ตาราง 11 (ต่อ)

พารามิเตอร์	ถั่วเหลือง	นมถั่วเหลืองผง	Okara
Mg	2.06	2.10	1.45
Na	0.45	0.43	0.59
Cu	0.01	0.02	0.00
Fe	0.21	0.08	0.08
Zn	0.04	0.04	0.03
Mn	0.03	0.03	0.02
Lipoxygenase activity (หน่วย/ก. ของแข็ง)	27.68	0.20	-
Relative Lipoxygenase activity (% ถั่วเหลืองดิบ)	100.00	0.72	-
% Lipid fractions			
Neutral Lipids (%)	91.00	94.03	90.92
Glycolipids (%)	2.66	2.52	1.88
Phospholipids (%)	6.97	4.03	4.08

ที่มา : G. Osthoff และคณะ, 2010

ตาราง 12 องค์ประกอบทางโภชนาการของ Okara สดและแห้ง

พารามิเตอร์	Okara แห้ง	Okara เปียก
ความชื้น (%)	4.71	80.25
เถ้า (%)	6.36	0.86
ไขมัน (%)	16.29	6.22
โปรตีน (%)	33.53	7.91
เส้นใยหยาบ (%)	36.32	4.10
เส้นใยทั้งหมด (%)	56.60	13.83
เส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ (%)	42.00	10.58
เส้นใยที่ละลายน้ำได้ (%)	14.60	3.25
แคลเซียม (มก./100 ก.)	0.32	80.00
เหล็ก (มก./100 ก.)	0.62	1.30
ทองแดง (มก./100 ก.)	0.10	1.46

ที่มา : ¹Santos และคณะ, 2018 ; ²Mbaeyi-Nwaoha และ Uchendu, 2016 ; ³O'Toole และคณะ, 1999 ; ⁴Guimaretaes และคณะ, 2018 ; ⁵O'Toole, 2004

ตาราง 13 องค์ประกอบทางโภชนาการของ Okara

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อวัตถุแห้ง 100 ก.)	อ้างอิง
Protein	25.4-28.4	
Aspartic acid	117 (มก./ก. โปรตีน)	
Threonine	41 (มก./ก. โปรตีน)	
Serine	50 (มก./ก. โปรตีน)	
Glutamic acid	195 (มก./ก. โปรตีน)	
Glycine	46 (มก./ก. โปรตีน)	
Alanine	46 (มก./ก. โปรตีน)	
Cysteine + Methionine	26 (มก./ก. โปรตีน)	Qiao และ Lu, 2012
Valine	51 (มก./ก. โปรตีน)	
Isoleucine	51 (มก./ก. โปรตีน)	
Leucine	81 (มก./ก. โปรตีน)	
Tyrosine + Phenylalanine	95 (มก./ก. โปรตีน)	
Lysine	65 (มก./ก. โปรตีน)	
Histidine	28 (มก./ก. โปรตีน)	
Arginine	75 (มก./ก. โปรตีน)	

ตาราง 13 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อวัตถุดิบแห้ง 100 ก.)	อ้างอิง
Proline	36 (มก./ก. โปรตีน)	
Fat	9.3-10.9 ก.	
Dietary fibers	52.8-58.1 ก.	Qiao และ Lu, 2012
Insoluble dietary fiber	40.2-43.6 ก.	
Soluble dietary fiber	12.6-14.6 ก.	
Ash	3.0-3.7 ก.	
Carbohydrates	3.8-5.3 ก.	
Rhamnose	0.85 ก.	
Fucose	0.45 ก.	
Arabinose	6.35 ก.	
Xylose	5.14 ก.	
Mannose	1.26 ก.	
Galactose	10.83 ก.	O'Toole, 1999
Glucose	15 ก.	
Uronic acids	5.03 ก.	
Stachyose	140 ก.	
Raffinose	30 ก.	
Sucrose	230 ก.	
Starch	59 ก.	
Phytic acid	50 ก.	
Minerals		
Potassium (K)	1046-1233 มก.	Van der Riet, 1989
Sodium (Na)	16.2-19.1 มก.	
Calcium (Ca)	260-428 มก.	

ตาราง 13 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อวัตถุแห้ง 100 ก.)	อ้างอิง
Magnesium (Mg)	158-165 มก.	Van der Riet, 1989
Iron (Fe)	6.2-8.2 มก.	
Copper (Cu)	1.1-1.2 มก.	
Manganese (Mn)	2.3-3.1 มก.	
Zinc (Zn)	3.5-6.4 มก.	
Phosphorus (P)	396-444 มก.	
Vitamins		
Thiamine	0.48-0.59 มก.	Stanojevic และคณะ, 2014
Riboflavin	0.03-0.04 มก.	
Nicotinic acid	0.82-1.04 มก.	
Isoflavones	0.14 ก.	
Diadzin	76 μM	
Glycitin	16 μM	
Genistin	81 μM	
Diadzein	88 μM	
Glycitein	18 μM	
Genistein	60 μM	
Saponins	0.1	
Energy value	300 kcal	

2.3.1 โปรตีนใน Okara

มีโปรตีนหลายประเภทที่ประกอบเป็นโปรตีนถั่วเหลือง แต่โปรตีนหลักสองชนิดประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 70 – 90% ของโปรตีนทั้งหมดในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์คือ 7S (β -conglycinin) และ 11S (glycinin) (Liu, 1997) เป็นโปรตีนโกลบูลินสะสม และพบว่ามีคุณสมบัติการทำงานต่างๆ อันเนื่องมาจากโครงสร้างที่แตกต่างของพวกมัน ซึ่งมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติการทำงานโดยรวมของส่วนผสมโปรตีนถั่วเหลือง (Garcia et al., 1997; Kwon et al., 2002 ; Kwon et al., 2546) Glycinin (รู้จักกันในชื่อ 11S) เป็นเฮกซะเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 360 kDa และประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 12 ตัวที่แบ่งออกเป็นกรด 6 ตัว (34 - 44 kDa) และต่างพื้นฐาน (20 kDa) 6 ตัว (Adachi et al., 2003) โพลีเปปไทด์มีอยู่เป็นคู่ที่เป็นกรด-ด่างที่เชื่อมโยงกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เดี่ยว (A-SS-B) คู่พอลิเปปไทด์ที่เป็นกรด-ด่างที่เชื่อมด้วยไดซัลไฟด์เชื่อมโยงซึ่งกันและกันโดยพันธะที่ไม่ชอบน้ำและไฮโดรเจนเพื่อสร้างไตรเมอร์ที่มีพอลิเปปไทด์ 6 ตัวซึ่งแต่ละตัวมีโครงสร้างที่กะทัดรัดยิ่งขึ้น (Marcone et al., 1998) β -Conglycinin (7S) เป็นโปรตีนสะสมที่สำคัญอื่นๆ ของถั่วเหลือง และเป็น trimer ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 150 - 200 kDa (Kannan et al., 2012) มีหน่วยย่อยหลักสามหน่วย ได้แก่ α , α , β ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58 kDa, 57 kDa และ 42 kDa ตามลำดับ (Thanh & Shibasaki, 1978) โดยไม่มีการเชื่อมโยงไดซัลไฟด์ (Utsumi & Kinsella, 1985 ; Mujoo et al., 2003; Tezuka et al., 2004) หน่วยย่อยทั้งสามนี้มารวมกันโดยพันธะไฮโดรโฟบิกและพันธะไฮโดรเจนที่แรงโดยไม่มีพันธะไดซัลไฟด์เพื่อสร้าง ทรินเมอร์ β -Conglycinin เป็นไกลโคโปรตีนที่อุดมด้วยซิสเทอีนเป็น N-glycosylated เนื่องจากหน่วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมโยงกับสารตกค้างของกรดแอสปาร์ติกที่ปลาย N-terminal ของโมเลกุล (Marcone et al., 1998)

โปรตีนถั่วเหลืองหลักสามชนิดในท้องตลาด ได้แก่ แป้งถั่วเหลือง (ไขมันเต็มและแยกไขมัน) โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soy protein concentrate ; SPC) และโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต (soy protein isolate ; SPI) และจำแนกตามองค์ประกอบของโปรตีนตลอดจนวิธีการผลิต แป้งถั่วเหลืองไขมันเต็มผลิตโดยการไม่ถั่วเหลืองหลังจากลอกเปลือกออกแล้วและมีโปรตีนประมาณโดยน้ำหนัก 35 – 40% ในขณะที่แป้งที่สกัดไขมัน- 54 ของโปรตีน (Golbitz และ Jordan, 2006) โปรตีนจากถั่วเหลืองเข้มข้นได้มาจากแป้งหรือเกล็ดที่สกัดเอาไขมันออกหลังจากที่น้ำตาล น้ำ และแอลกอฮอล์ถูกกำจัดออกด้วยแอลกอฮอล์หรือวิธีการสกัดด้วยต่าง และมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง น้ำหนัก

65 – 70% (Endres, 2001 ; Golbitz และ Jordan, 2006) โปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต ที่นั้นได้มาจากแป้งหรือเกล็ดที่ขจัดไขมันออกหลังจากกำจัดน้ำตาลและวัสดุที่ละลายน้ำได้อื่นๆ รวมถึงเส้นใยโดยวิธีการสกัดด้วยต่าง พบว่ามีปริมาณโปรตีนมากกว่า 90% โดยน้ำหนัก (Endres, 2001) องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วเหลือง เหล่านี้แสดงไว้ในตาราง 16 ยิ่งไปกว่านั้น ไอโซพลาโวนในรูปแบบแอกทิฟ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเจนิสไตน์ และไดเซอินเกิดขึ้นปริมาณสูงในโปรตีนไอโซเลท อาจเป็นเพราะการใช้กระบวนการย่อยด้วยต่างที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการสกัดด้วยต่าง

ตาราง 14 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนผสมโปรตีนถั่วเหลือง

ชนิดโปรตีน ถั่วเหลือง	โปรตีนหยาบ (%)	เถ้า (%)	ไขมันหยาบ (%)	คาร์โบไฮเดรต ทั้งหมด (%)	ความชื้น (%)
DSF	52.0-54.0	5.0-6.0	0.5-1.0	30.0-34.0	6.0-8.0
SPC	62.0-69.0	3.8-6.2	0.5-1.0	19.0-24.0	4.0-6.0
SPI	86.0-87.0	3.8-4.8	0.5-1.0	3.0-4.0	4.0-6.0
OPI	77	2	4.1	7.5	4.5

* DSF: Defatted soy flour; SPC: Soy protein concentrate; SPI: Soy protein isolates; OPI: Okara protein isolates

ที่มา : Endres, 2001 ; Kim และ Kim, 2015

ส่วนผสมโปรตีนจากถั่วเหลือง โดยเฉพาะโปรตีนไอโซเลทถั่วเหลือง (SPI) และโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (SPC) เป็นโปรตีนจากพืชที่มีอยู่อย่างแพร่หลายซึ่งสามารถให้โปรตีนที่มีคุณภาพโดยพิจารณาจากปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็น (EAA) ที่มีอยู่ในนั้น ซึ่งเปรียบเทียบได้ดีหรือสูงกว่า ระดับที่แนะนำของ FAO/WHO แป้งถั่วเหลืองที่เป็นแหล่งโปรตีนยังมีปริมาณ EAA ที่เห็นได้ชัดเจน ดังแสดงในตาราง 17 นอกจากนี้ การย่อยได้ของโปรตีนแก้ไขข้อมูลคะแนนกรดอะมิโน (PDCAAS) แสดงให้เห็นว่า SPI และ SPC สามารถย่อยได้สูงโดยมีคะแนน PDCAAS ตั้งแต่ 0.92 ถึง 1.00 และ 0.99 สำหรับ SPI และ SPC ตามลำดับ (FAO/WHO, 1991; Sarwar, 1997) คะแนนเหล่านี้เปรียบเทียบได้ดีกับค่า PDCAAS (0.92 - 1.0) ที่รายงานสำหรับโปรตีนจากสัตว์ แต่สูงกว่าค่าตั้งแต่ 0.23 - 0.73 ที่รายงานสำหรับโปรตีนจากพืชอื่นๆ (FAO/WHO, 1991;

Ahrens et al., 2005) แสดงให้เห็นว่า Okara นั้นสามารถเป็นส่วนผสมของโปรตีนได้ (โปรตีนไอโซ-เลท) ที่มี EAA ในระดับที่เทียบเท่าหรือสูงกว่าระดับที่แนะนำของ FAO/WHO (Ma et al., 1996; Kumar et al., 2016) ผลลัพธ์ที่น่าเสนอในตาราง 17 และ 18 ยังเผยให้เห็นว่าปริมาณกรดอะมิโน OPI นั้นคล้ายคลึงกับของ SPI ซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถใช้โปรตีน Okara แทนโปรตีนจากถั่วเหลืองในเชิงพาณิชย์ได้ Proline เป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (NEAA) เพียงชนิดเดียวใน OPI ที่พบว่าต่ำกว่าช่วงที่รายงานสำหรับ SPI และ SPC นี้ไม่ใช่ปัญหาใหญ่เนื่องจากโปรตีนสามารถสังเคราะห์โดยร่างกายมนุษย์ได้ จากตาราง 17 ในบรรดากรดอะมิโนที่จำเป็น พบว่าเมไทโอนีน/ซิสเทอีนต่ำกว่าระดับที่แนะนำของ FAO/WHO เล็กน้อย และไม่มีรายงานทริปโตเฟน

ตาราง 15 องค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นของโปรตีนถั่วเหลือง (มก./ก.ของโปรตีน)

กรดอะมิโนที่ จำเป็น	FAO/WHO			Defatted Soy flour	Defatted Okara	Soy protein Concentrated	Soy protein isolated	Okara isolate
	2-5	10-12	Adult					
Histidine	19	19	16	26	27	23-26	23-27	28
Isoleucine	28	28	13	46	69.8	43-47	45-49	51
Leucine	66	44	19	78	108.5	74-77	78-82	81
Lysine	58	44	16	64	54	61-63	61-65	65
Methionine + Cystine	25	22	17	26	16.5	27-29	24-26	26
Phenylalanine + Tyrosine	63	22	19	88	97.5	84-88	86-92	95
Threonine	34	28	9	39	37	36-37	36-38	41
Tryptophan	11	9	5	14	ND	12-13	12-14	ND
Valine	35	25	13	46	46.6	47-48	49-51	51

ที่มา : FAO/WHO/UNU, 1999 ; Cavins และคณะ, 1972 ; Kumar และคณะ, 2016 ; Hughes และคณะ, 2011 ; Chan และ Ma, 1999

2.3.2 โยอาหารใน Okara

กากถั่วเหลือง (Okara) ถือเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ทางการเกษตรที่เป็นแหล่งของใยอาหาร (Dietary Fiber) ที่อุดมสมบูรณ์ที่สุดแหล่งหนึ่ง โดยใน Okara แห่งนี้มีปริมาณใยอาหารรวมสูงถึง 50-60% ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (García-Alonso et al., 2022) โยอาหารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Okara และเป็นที่สนใจอย่างมากในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมเชิงหน้าที่ (functional ingredient) ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ

สัดส่วนและองค์ประกอบของใยอาหารใน Okara

ใยอาหารใน Okara สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักตามความสามารถในการละลายน้ำ :

1. โยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble Dietary Fiber - IDF): เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของใยอาหารทั้งหมดใน Okara คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 80-90% ของใยอาหารทั้งหมด หรือประมาณ 40-50% ของน้ำหนัก Okara แห้ง (Li et al., 2019) โยอาหารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มกากอาหาร (bulking agent) ช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้ และส่งเสริมสุขภาพของระบบขับถ่าย
2. โยอาหารที่ละลายน้ำได้ (Soluble Dietary Fiber - SDF): แม้จะมีสัดส่วนน้อยกว่า คือประมาณ 10-20% ของใยอาหารทั้งหมด หรือ 2-10% ของน้ำหนัก Okara แห้ง แต่ใยอาหารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญ เช่น การสร้างความหนืด, ความสามารถในการอุ้มน้ำ, การเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งเป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ดีในลำไส้ และอาจมีส่วนช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (García-Alonso et al., 2022)

ชนิดของผนังเซลล์และองค์ประกอบทางเคมีของใยอาหาร

ใยอาหารปริมาณมหาศาลใน Okara มีที่มาจาก ผนังเซลล์ (Cell Wall) ของเซลล์เนื้อใบเลี้ยง (cotyledon cells) ในเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งมีความแข็งแรงและไม่ถูกย่อยสลายในกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง องค์ประกอบทางเคมีหลักของผนังเซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ซับซ้อน ได้แก่:

เซลลูโลส (Cellulose): เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 เป็นโครงสร้างหลักที่ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ ใน Okara แห้งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ 20-30%

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose): เป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย (เช่น Xyloglucan, Arabinoxylan) ทำหน้าที่เชื่อมโยงเส้นใยเซลลูโลสเข้าด้วยกัน ใน Okara แห้งมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สูงที่สุดในกลุ่มใยอาหาร คือ ประมาณ 25-35%

เพกทิน (Pectin): เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell wall) และชั้นมิดเดิลลามেলা (middle lamella) มีส่วนช่วยในการยึดเกาะระหว่างเซลล์

ลิกนิน (Lignin): เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต มีความซับซ้อนและทนทานต่อการย่อยสลายสูง พบในปริมาณไม่มากนักใน Okara

ด้วยองค์ประกอบของใยอาหารที่อุดมสมบูรณ์และหลากหลายนี้ ทำให้ Okara มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีใยอาหารสูง (high-fiber foods) เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ (Li et al., 2019)

ตาราง 16 องค์ประกอบของโยอาหารใน Okara

องค์ประกอบ	ปริมาณ (g/100g น้ำหนักแห้ง)	ร้อยละ (%w/w)	แหล่งอ้างอิง
โยอาหารรวม (TDF)	50.0-58.60	50.0-58.6	Fei et al. (2013); Razavizadeh et al. (2023)
โยอาหารไม่ละลายน้ำ (IDF)	40.2-55.63	40.2-55.6	Van der Riet et al. (1989); Fei et al. (2013)
โยอาหารละลายน้ำ (SDF)	1.91-14.6	1.9-14.6	Redondo Cuenca et al. (2008); Fei et al. (2013)
เซลลูโลส	25.0-30.0	25.0-30.0	Japan Tofu Association (2023)
เฮมิเซลลูโลส	15.0-20.0	15.0-20.0	Isolation and Structural
เพคติน	2.0-5.0	2.0-5.0	Characterisation (2018)
ลิกนิน	1.0-3.0	1.0-3.0	Razavizadeh et al. (2023)
โอลิโกแซ็กคาไรด์	3.0-5.0	3.0-5.0	Japan Tofu Association (2023)
โยอาหารหยاب (CF)	11.5-15.0	11.5-15.0	

2.3.3 องค์ประกอบอื่นๆ

ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ของถั่วเหลืองมีไฟเตตอยู่ในช่วง 0.1-2.22 ก./100 ก. วัตถุแห้ง (Al-Wahsh et al., 2005; Lestienne et al., 2005) ไฟเตตจำนวนเล็กน้อย (วัตถุแห้ง 0.5-1.2 กรัม/100 กรัม) ยังคงอยู่ในกระเจียบเขียวหลังการผลิตนมถั่วเหลือง (Van der Riet et al., 1989) ไฟเตตถือเป็นสารต่อต้านสารอาหารเพราะมันรบกวนการดูดซึมของสารอาหารรองที่จำเป็นบางอย่าง เช่น แคลเซียม เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม และทองแดง ซึ่งต่อมาอาจทำให้เกิดการขาดสารอาหารรองเหล่านี้ (Moser et al., 1988 ; Harland et al., 1988) ; Greger, 1999). ในทางกลับกัน ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา การวิจัยแสดงให้เห็นว่าไฟเตตสามารถใช้เพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดและระดับคอเลสเตอรอล (Jariwalla et al., 1990 ; Lee et al., 2007) โดยการลดดัชนีน้ำตาลในอาหาร (Thompson et al., 1987 ; Lee et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานผลของไฟเตตต่อการป้องกันการเกิดนิ่วในไต (Grases และ Costa-Bauza, 1999) ไฟเตตอาจแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง (Shamsuddin, 1995 ; Xu และ Chang, 2012) เพื่อลดผลกระทบเชิงลบของไฟเตต ต่อการดูดซึมสารอาหารรอง ได้มีการเสนอ

แนวทางในการบริโภคอาหารที่มีไฟเตตด้วยอาหารที่อุดมด้วยโปรตีนนี้อาจลดผลกระทบการปิดกั้นจุลธาตุของไฟเตตตามที่แนะนำโดยการวิจัยที่ดำเนินการโดย Sandström และคณะ 1989 มีข้อเสนอแนะว่าการฝึกควบคุมอาหารอย่างสมดุลจะทำให้ผลข้างเคียงของไฟเตตต่อสารอาหารรองที่ไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่ประสบความสำเร็จอย่างมากในการป้องกันโรคมะเร็ง นิวโนโต ปัญหาเลือดสูงและคอเลสเตอรอล (Schlemmer et al., 2009) ในเรื่องนี้ การบริโภค Okara หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Okara อาจนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้ องค์ประกอบที่สำคัญอีกประเภทหนึ่งใน Okara คือ micronutrients ซึ่งรวมถึงแร่ธาตุบางชนิด วิตามินบี และวิตามินที่ละลายในไขมันเหล่านี้เป็นสารประกอบสำคัญที่มีคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและการรักษาซึ่งรวมถึงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ, การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน, การป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (Quitain et al., 2006)

2.3.4 ประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรตีนถั่วเหลือง/ Okara

โปรตีนที่มีอยู่ในถั่วเหลืองที่มีปริมาณสูงก็มีอยู่ใน Okara ในปริมาณสูงเช่นกัน ส่งผลดีต่อสุขภาพหลายประการ โดยอิงจากการศึกษาในหลอดทดลองและในร่างกาย การศึกษาเหล่านี้ส่วนใหญ่ดำเนินการโดยใช้โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (SPC) หรือโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต (SPI) ที่สกัดจากแป้งถั่วเหลืองหรือ Okara

โรคหัวใจและหลอดเลือด (CVDs) เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตทั่วโลก โดยคิดเป็น 1 ใน 3 ของการเสียชีวิตทั้งหมดที่เกิดขึ้นทั่วโลก (ScienceDaily, 2017 ; WHO, 2018) ในปี 2559 ผู้เสียชีวิตจาก CVD ประมาณ 17.9 ล้านคน ซึ่งคิดเป็น 31% ของการเสียชีวิตทั้งหมดที่เกิดขึ้นทั่วโลกและประมาณ 85% ของผู้เสียชีวิตจาก CVD เกิดจากหัวใจวายและโรคหลอดเลือดสมอง (WHO, 2018) CVD เป็นกลุ่มของความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือด และรวมถึงโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง โรคหลอดเลือดแดงส่วนปลาย โรคหัวใจรูมาติก โรคหัวใจพิการแต่กำเนิด และการอุดตันของหลอดเลือดดำส่วนลึกและเส้นเลือดอุดตันที่ปอด (WHO, 2018) การบริโภคโปรตีนจากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นในช่วงที่ผ่านมา เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด (Scheiber et al., 2001) โปรตีนถั่วเหลืองมีคำยืนยันเรื่องสุขภาพโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ในปี 1999 ซึ่งระบุว่าโปรตีนถั่วเหลือง 25 กรัมที่บริโภคต่อวันอาจลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ (FDA, 1999) โดยการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด Anderson และคณะ, 1995 แสดงให้เห็นว่าการบริโภคโปรตีนถั่วเหลืองสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและไขมันได้ โปรตีนจากถั่ว

เหลืองได้แสดงให้เห็นกิจกรรมของการป้องกันหลอดเลือดในแบบจำลองสัตว์ (Adams et al., 2002 ; Adams et al., 2004) นอกจากนี้ การทดลองทางคลินิกหลายครั้งแสดงให้เห็นว่าการบริโภคโปรตีนถั่วเหลือง 25-50 กรัมต่อวันอาจทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง ระดับคอเลสเตอรอลไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) และระดับไตรกลีเซอไรด์ (Anderson et al., 1995 ; Reynolds et al., 2006 ; Weggemans & Trautwein, 2003 ; Zhan & Ho, 2005)

โปรตีนจากถั่วเหลืองได้รับการแนะนำเพื่อควบคุมภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ไขมันในเลือดสูง และภาวะอินซูลินในเลือดสูง (Lavigne et al., 2000 ; Velasquez & Bhathena, 2007 ; Kwon et al., 2010) นอกจากนี้ การบริโภคโปรตีนจากถั่วเหลืองอาจช่วยลดความเสี่ยงของโรคไตในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (Jenkins et al., 2003) อาหารจากถั่วเหลืองยังสามารถนำมาใช้สำหรับการจัดการโรคเบาหวานประเภท 2 โดยแสดงให้เห็นถึงผลดีบางประการต่อความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง หลอดเลือด และโรคอ้วน ซึ่งมักพบในโรคเบาหวานประเภท 2 (Holt, 1996) อย่างไรก็ตาม กลไกที่โปรตีนถั่วเหลืองให้ผลประโยชน์เหล่านี้ยังคงไม่ชัดเจนและยังคงอยู่ภายใต้การตรวจสอบ (Lavigne et al., 2000 ; Velasquez & Bhathena, 2007 ; Villegas et al., 2008)

2.3.5 การใช้ประโยชน์จาก Okara

การใช้ประโยชน์จาก Okara ในอุตสาหกรรมอาหาร มีการ ศึกษาวิจัยอยู่หลากหลาย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มประเภทอาหาร ได้แก่ 1) กลุ่มอาหารหมัก 2) กลุ่มอาหารทั่วไปที่ไม่มีกระบวนการหมัก และ กลุ่มที่ 3) อาหารพร้อมบริโภคในครัวเรือน กลุ่มอาหารหมัก: Matsumoto และ Take (1980) ทดลองนำ Okara ไปหมักด้วยเชื้อ *Bacillus* spp. ชนิดต่าง ๆ เพื่อทดลองผลิต เป็นผลิตภัณฑ์คล้ายนัตโตะ (ภาพ 8) ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิต Okara เป็นนัตโตะได้ Kronenberg และ Hang (1984) ทดลองผลิตผลิตภัณฑ์จีนแบบท้องถิ่นเรียกว่า “meitauza” โดยปล่อยให้ Okara สดเกิดการหมักตามธรรมชาติที่อุณหภูมิต่ำ (15 °C) เป็นเวลา 80 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อ *Actinomucor elegans* สามารถผลิตได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะใกล้เคียง “meitauza”



ภาพ 6 นัตโตะ (ซ้าย) และเทมเป้ (ขวา)

ที่มา : www.sanook.com และ www.thekitchn.com

นอกจากนี้ Zhu และคณะ, 2008 ได้ศึกษาทดลองผลิตผลิตภัณฑ์ เดียวกันนี้โดย ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* B2 ในการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ และยังเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนและ เปปไทด์ในผลิตภัณฑ์อีกด้วย Matsuo, 1990 ได้ ศึกษาทดลองนำกาก ถั่วเหลืองมาหมักด้วย *Rhizopus oligosporus* ซึ่งมีลักษณะคล้าย กับ เทมเป้อาหารพื้นเมืองของอินโดนีเซีย (ภาพ 8) โดยได้ทดลองเติม รำข้าวเพื่อเพิ่ม จำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อราพบว่า มีการทำงานของเอนไซม์ protease มากขึ้น พร้อมทั้งมีผลทำให้คุณภาพของ ผลิตภัณฑ์ดีขึ้นด้วย Takahashi, 1992 ได้ทดลองนำ Okara ที่ ผ่านกระบวนการหมักไปผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงหนูทดลอง และสังเกตการทำงานของลำไส้ใหญ่พบว่า มีผลทำให้ระบบการทำงานของ ลำไส้ใหญ่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากในอาหารที่มีส่วนประกอบ ของ Okara มีปริมาณเส้นใยอาหารมากกว่า อาหารปกติ Matsuo และ Hitomi (1992) พบว่า สัตว์ทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี ส่วนผสม ของ Okara ที่ผ่านกระบวนการหมักจะมีปริมาณ cholesterol ในตับและ กระแสเลือดลดลง นอกจากนี้ Yokota และคณะ, 1996 พบว่า กระบวนการหมักจะสามารถเพิ่มคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของ Okara ได้

จากงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมัก ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ได้สร้าง เอนไซม์ต่างๆ ขึ้นมาเพื่อย่อยสลายอาหารต่างๆ ใน Okara นั้นมีผลทำให้คุณสมบัติของ Okara เปลี่ยนไป โดยเฉพาะคุณสมบัติที่มีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นกระบวนการหมัก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์จาก Okara ได้

กลุ่มอาหารทั่วไปที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก: Nolan, 1983 รายงานว่า บริษัท Haarman และ Reimer Corp. ผู้ผลิตอาหารใน ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ผลิต snack-bar (อาหารว่างในรูปแบบแท่ง) จาก Okara Noguchi, 1987 ได้จดสิทธิบัตร กระบวนการนำ Okara ที่ได้จากกระบวนการผลิต น้านมถั่วเหลืองไปผลิตเป็นเนื้อเทียม (โปรตีนเกษตร) Watanabe และคณะ, 1997 ได้จดสิทธิบัตรการแปรรูปกากถั่วเหลือง เป็น low-calorie food stuff (อาหารที่ให้พลังงานต่ำ) ที่มีเส้นใยอาหารสูงและมี อนุภาคขนาดเล็ก โดยบริษัท Ajinomoto Co., Inc. ได้ซื้อลิขสิทธิ์ไปแล้ว Khare และ คณะ, 1995a ทดลองใช้ Okara ทดแทนแป้ง สาหร่ายในขนมปังเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน และเส้นใยอาหาร พบว่าผู้บริโภคยอมรับ ปริมาณ Okara ที่แทนที่ได้สูงสุด 60% ซึ่งมี ปริมาณโปรตีนและเส้นใยอาหาร 8.72% และ 5.98% ตามลำดับ Kobayashi, 1997 ได้ จดสิทธิบัตรการนำ Okara ไปแทนที่แป้งสาหร่ายในขนมเค้ก Rotem และคณะ, 2006 ได้จด สิทธิบัตรการนำ Okara ไปผลิตเป็น premix powder (ผงแป้งสำเร็จรูป) ที่มีโปรตีนสูง เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพต่างๆ เช่น คูกี้ อาหารเช้า พาสต้า ปิเกิล แครกเกอร์ และเส้นก๋วยเตี๋ยว เป็นต้น

กลุ่มอาหารพร้อมบริโภค: ในประเทศญี่ปุ่นนั้นมีการทำน้านมถั่วเหลืองเพื่อบริโภค ในครัวเรือนกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงมีการนำ Okara มาปรุงเป็นวัตถุดิบใน ครัวเรือน หลากหลายเมนู ดังภาพ 9 ซึ่งเป็นการนำ Okara สดมาปรุงเป็นเมนู อาหารโดยตรง โดย ที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปใดๆ เช่น การนำมาใช้เป็นเครื่องเคียง ผสมกับเนื้อสัตว์และ เครื่องปรุงอื่นเป็น Okara ปั่นก้อนทอด (Croquette) ผสมเนื้อ สัตว์เป็นไส้แฮมเบอร์เกอร์ นำไปผัดและปรุงรสรับประทานกับข้าว ยังสามารถนำไปผสม กับ แป้ง ชนิด อื่น เป็น เมนูอาหารและขนม หวาน เช่น นำไปผสมกับแป้งข้าวเหนียวแล้ว นำมาทำเป็นโมจิ เป็น ต้น



ภาพ 7 ภาพของอาหารที่ทำจาก Okara ได้แก่ เครื่องเคียง (ซ้าย) Okara ปั่นก้อนทอด (กลาง) และขนมโมจิทอดจาก Okara (ขวา)

ที่มา : www.cookpad.com

นอกจากการนำ Okara ไปใช้เป็นวัตถุดิบในอาหาร Okara ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นได้ และได้มีการศึกษาการนำไปใช้อย่างต่อเนื่องยกตัวอย่างเช่นงานวิจัยดังต่อไปนี้ Ohno และคณะ, 1995a, 1995b, 1996 ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Okara เพื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* NB22 ที่สามารถสร้างสาร iturin A ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา มักนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะด้านวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว Okara สด 1 กิโลกรัม สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิต iturin A ได้จำนวน 2 กรัม หรือ Okara แห้ง 1 กิโลกรัม สามารถผลิต iturin A ได้ 11 กรัม Khare และคณะ, 1995b ได้ทดลองนำ Okara มาใช้ผลิตกรดซิตริก ด้วย *Aspergillus niger* เปรียบเทียบกับเชื้อ *Aspergillus terreus* จากการทดลองพบว่า การใช้เชื้อ *A. niger* เพียงชนิดเดียวสามารถผลิตกรดซิตริกได้เพียง 20% ของอัตราการผลิตสูงสุดซึ่งเป็นการใช้เชื้อราสองชนิดร่วมกันคือ สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 5.1% หรือ Okara แห้ง 100 กรัม ใช้ผลิตกรดซิตริกได้ 5.1 กรัม Hayashi และคณะ, 1989, 1995 ได้ค้นพบว่า *Penicillium simplicissimum* AK-40 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถแยกได้จากดินนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน Okara เมื่อนำมาหมัก Okara ทำให้พบสารชนิดใหม่ คือสารกลุ่ม okaramine ชนิด A (CHNO) และ B (CHNO) โดยค้นพบสารนี้ที่มี โครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันหลายชนิด ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการกำจัด หนอนแมลง และยังได้ทดลองใช้เชื้อ *P. simplicissimum* ATCC 90288 ซึ่งสามารถ สร้าง okaramin ชนิด D - F ได้

จากข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า Okara นั้นยังมีคุณค่าอยู่มาก ไม่ว่าจะเป็นคุณค่าทางโภชนาการที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย รวมถึงการนำ Okara ไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ดังนั้นไม่ว่าจะเป็น Okara ที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองในครัวเรือนหรือจากอุตสาหกรรมก็สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดได้ เพื่อเป็นอีกแนวทางในการลดวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมที่เกิดขึ้นปริมาณมากในทุกๆ ปี และเป็นการเพิ่มมูลค่า (วนิดา, 2561)

3. กระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด (pretreatments)

3.1 การปรับสภาพเชิงกล (Mechanical pretreatment)

คือวิธีการที่ทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง โดยการหั่น สับ หรือทุบ เพื่อให้วัตถุดิบมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานแต่มีข้อดีคือต้นทุนต่ำ

3.2 การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment)

คือวิธีการที่ใช้การเพิ่มอุณหภูมิและการแผ่รังสี ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มอุณหภูมิ 1,100 เคลวิน ภายใต้สภาวะทั้งที่มีก๊าซเฉื่อยและตัวออกซิเจนที่สามารถทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินย่อยสลายได้ดี (Thermogravimetric treatment)

3.3 ปรับสภาพทางชีวเคมี (Physicalchemical pretreatment)

คือการรวมกันระหว่างวิธีทางเคมีและทางกายภาพมีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น การรีคัพเวอรี่ (recovery) 71% และ 74% ของวัตถุดิบเริ่มต้นที่สามารถละลายน้ำได้ อุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และเกลือ ทำได้โดยใช้ Ultrasound-Assisted Extraction และ Enzyme-Assisted Extraction ในสาหร่าย *G. turuturu* เมื่อรวม 2 กระบวนการนี้ทำให้วัตถุดิบที่ละลายน้ำได้มากถึง 91% (Le Guillard et al., 2016)

3.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการปรับสภาพที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น White-rot, Brown-rod และ Soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้

3.5 การปรับสภาพด้วยสารเคมี (Chemical pretreatment)

3.5.1 การปรับสภาพด้วยด่าง (Alkaline pretreatment)

เช่น การปรับสภาพโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.5.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด (Acid pretreatment)

เป็นการปรับสภาพที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออก การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางจะใช้เวลาความเข้มข้นกรดต่ำและอุณหภูมิสูง

4. วิธีการสกัดโปรตีนจาก Okara

โปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลตเป็นหนึ่งในชนิดของโปรตีนถั่วเหลือง โดยมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 90% แบบแห้ง (Johnson & Kikuchi, 1989) การสกัดโปรตีนของถั่วเหลืองและ Okara ได้รับการตรวจสอบโดยนักวิจัยหลายคนโดยใช้วิธีการต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสกัดโปรตีนโดยใช้สภาวะที่เป็นกรดและด่าง การสกัดด้วยเอนไซม์ และเมื่อไม่นานมานี้ด้วยเทคโนโลยีคลื่นอัลตราโซนิก กระบวนการนี้เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่หรือศึกษาอย่างครอบคลุมเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจาก Okara

4.1 การสกัดด้วยด่าง

ขั้นตอนนี้เป็นวิธีทั่วไปในการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองหลัก (ไกลบูลิน) เกี่ยวข้องกับการละลายของแป้งถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันหรือ Okara ในน้ำ (w/v) ตามด้วยการปรับ pH เป็นด่าง (ค่า pH 8.0, 8.5 หรือ 9.0) โดยใช้ 2N NaOH และการสกัดที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่อุ่น (ระหว่าง 40 - 80°C) เป็นเวลา 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมงภายใต้การกวน (Ma et al., 1996 ; Karki et al., 2010 ; Vishwanathan et al., 2011) สารสกัดโปรตีนนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมได้ผ่านการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH 4.5 โดยใช้ 2N HCl หลังจากนั้นโปรตีนที่ตกตะกอนจะถูกล้างด้วยน้ำกลั่น (Karki et al., 2009) ต่อมาโปรตีนที่ตกตะกอนสามารถกระจายตัวอีกครั้งในน้ำ และ pH ของสารละลายจะถูกปรับเป็น 7 เพื่อการละลายที่สมบูรณ์ จากนั้นโปรตีนที่ละลายได้จะถูกทำแห้งแบบพ่นฝอยหรือทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อให้ได้โปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลตหรือโปรตีน Okara (Wu et al., 2000 ; Karki et al., 2009 ; Karki et al., 2010) Ma et al., 1997 รายงาน protein recovery อยู่ที่ประมาณ 53% (w/w) และ 14% (w/w) ของโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบดั้งเดิม (แป้ง Okara) สำหรับโปรตีน Okara ไอโซเลตสกัดที่ 80 และ 25°C ตามลำดับ การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีนเหล่านี้ไม่พบความแตกต่างที่สำคัญในความเข้มข้นของแถบ นักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่ง (Liu et al., 2007) ได้รายงานผลผลิตการสกัดโปรตีนที่ 25.1% ซึ่ง

พวกเขาแสดงเป็นร้อยละของน้ำหนักเศษส่วนแห้งที่แยกได้น้ำหนักแบ่งถั่วเหลืองที่แยกไขมันจากแบ่งถั่วเหลืองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สภาวะของการสกัดคือ 0.03M Tris-HCl buffer (pH 8.5) ที่มี 0.01M โซเดียมไบซัลไฟต์เป็นตัวกลางในการสกัด, การสกัดสองครั้งที่ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและอัตราส่วน 1: 15 (w/v) ของแบ่ง: Tris-HCl ในการศึกษาอื่นที่รายงานโดย Karki และคณะ, 2010 ผลผลิตโปรตีนประมาณ 27% จาก

ผงถั่วเหลืองสกัดที่ pH 8.5 ที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที โดยมีอัตราส่วนผงต่อน้ำ 1:10 (น้ำหนักพื้นฐาน) เพื่อเพิ่มการเรียกคืนโปรตีนจาก Okara ที่ผ่านการบำบัดด้วยความร้อนอย่างรุนแรงในระหว่างการผลิตนมถั่วเหลือง Vishwanathan และคณะ, 2011 ทดลองกระบวนการสกัดโปรตีนสามขั้นตอนโดยใช้ 2N NaOH เพื่อปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 9.0 และทำการสกัดที่ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ผลการวิจัยพบว่าโปรตีนประมาณ 87 และ 80% สามารถกู้คืนได้จากแบ่ง Okara และเกล็ด Okara ตามลำดับ กระบวนการสามขั้นตอนนี้อาจใช้พลังงานสูงและอาจไม่ประหยัดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีสารแยกของเหลวจำนวนมากที่อาจต้องใช้ในการสกัดทั้งสามขั้นตอนให้เสร็จสิ้น นอกจากนี้ อุณหภูมิในการสกัดยังสูงกว่าและใกล้เคียงกับอุณหภูมิการทำให้เสียสภาพของโปรตีน ถั่วเหลืองหลักสองชนิด คือ 68°C และ 82°C (Riblett et al., 2001) โดยรวมแล้ว วิธีการสกัดด้วยต่างเป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้สารเคมีและพลังงาน ส่งผลให้เกิดการเรียกคืนของโปรตีนมากเกินครึ่งหนึ่งที่มียูอยู่ใน Okara (Ma et al., 1996 ; Vishwanathan et al., 2011)

4.2 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonication-assisted extraction ; UAE)

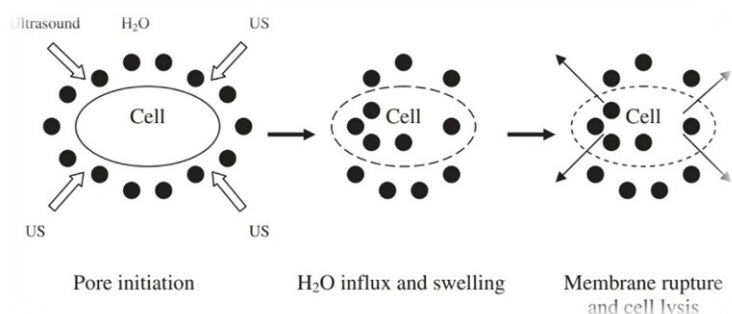
เทคโนโลยีอัลตราโซนิกถูกนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ เป็นขั้นตอนก่อนการบำบัดเพื่อเพิ่มหรือปรับปรุงกระบวนการทั้งหมดของการสกัดส่วนประกอบต่างๆ จากวัสดุจากพืช เช่น สารประกอบฟีนอลิกจากผงกะลามะพร้าว (Rodrigues & Pinto, 2007) และ hesperidin จาก penggan (*Citrus reticulata*) เปลือก (Ma et al., 2008) อัลตราโซนิก เป็นเทคโนโลยีสีเขียวที่ช่วยให้กระบวนการสกัดอย่างยั่งยืน โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดลดการใช้ตัวทำละลาย จำนวนหน่วยการทำงาน เวลาในการสกัด การใช้พลังงานและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Yagoub et al., 2017 ; Chemat et al., 2017) อัลตราโซนิกหมายถึงคลื่นเสียงหรือการสั่นสะเทือนทางกลที่เดินทางผ่านของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซที่มีความถี่สูงกว่าขีดจำกัดสูงสุดของการได้ยินของมนุษย์ (Mason, 1998) การเคลื่อนที่ของคลื่นเสียงในตัวกลางเกี่ยวข้องกับการใช้วงจรการขยายและการบีบอัด ในระหว่างวงจรการขยายตัว ฟองอากาศจะถูกสร้างขึ้นในระบบของเหลวซึ่งสร้างแรงดันลบในขณะที่ก่อตัวเติบโต และยุบตัวอย่างเป็นระบบ เมื่อเกิดการยุบตัวของโพรงใกล้เคียงกับขอบเขตที่เป็นของแข็ง จะเกิดไอพ่นของเหลวความเร็วสูงขึ้น ซึ่งทราบกัน

ว่าส่งผลกระทบรุนแรงต่อพื้นผิวที่เป็นของแข็ง (Luque-Garcia & De Castro, 2003) ปฏิกิริยาการสลายตัวที่เกิดด้วยอัลตราโซนิกเป็นพื้นฐาน คือการเกิดควิเทชัน (cavitation) หรือทำให้เกิดการสลายตัวของอนุภาคหรือเซลล์ (Khanal et al., 2007) การแตกตัวของผนังเซลล์โดยการเกิดควิเทชันทำให้สารประกอบที่ซ่อนอยู่ในเซลล์สัมผัสกับสารในการสกัด ดังนั้นจึงส่งเสริมการสกัดที่สูงขึ้นในระยะเวลาที่สั้นลง (Mason et al., 1996) การใช้คลื่นอัลตราโซนิกสามารถแบ่งตามความถี่และกำลังของเครื่องได้ดังนี้ ความถี่ต่ำ/กำลังสูง (<16-100 kHz และกำลังตั้งแต่ 10 ถึง 1000 W/cm²) และความถี่สูง/กำลังไฟฟ้าต่ำ (100 kHz ถึง 10 MHz และกำลังไฟฟ้าตั้งแต่ <1 W/cm²) อัลตราโซนิก (McClements, 1995 ; Demirdöven & Baysal, 2008 ; Soria & Villamiel, 2010) อัลตราโซนิกกำลังต่ำพบการประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์และเทคนิคการวิเคราะห์ ขณะที่อัลตราซาวด์กำลังสูงพบว่ามีมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีในเมทริกซ์ทางชีววิทยาโดยออกแรงกระทำทางกล การเกิดโพรงอากาศ และผลกระทบจากความร้อน (McClements, 1995 ; Demirdöven & Baysal, 2008 ; Soria & Villamiel, 2010) การใช้อัลตราโซนิกมักจะทำให้เกิดอุณหภูมิสูงกว่า 5000 K และความดันสูงประมาณ 500 atm ร่วมกับการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการแยกตัวของน้ำ (Rokhina et al., 2009)

อย่างไรก็ตาม ผลกระทบนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครงสร้างดั้งเดิมของโปรตีนด้วยการเปลี่ยนแปลงผลลัพท์ในคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (McClements, 1995) จากข้อเท็จจริงนี้ การใช้อัลตราโซนิกไม่เพียงแต่ช่วยในกระบวนการสกัดเท่านั้น แต่ยังใช้เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการทำงานของส่วนผสมที่จะสกัดด้วย Karki และคณะ, 2010 รายงานการเพิ่มขึ้น 46% และ 50% สำหรับโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดที่สกัดจากเกล็ดถั่วเหลืองตามลำดับ หลังจากใช้โซนิกเคชั่น 120 วินาทีที่แอมพลิจูด 84 μmpp เมื่อเทียบกับวิธีสกัดด้วยต่าง สภาวะที่ใช้ในการทดลองเหล่านี้ใช้พลังงานมากเนื่องจากการใช้พลังงานสูงประมาณ 1280 W และอาจมีการทำลายโครงสร้างของโปรตีนซึ่งนำไปสู่การลดการเกิดอิมัลชัน ความคงตัวของฟอง และคุณสมบัติทางรีโอโลยีตามที่ Karki และคณะ, 2009 สังเกตเห็นก่อนหน้านี้ มีการใช้กระบวนการสกัดด้วยเอนไซม์โดยใช้อัลตราโซนิก ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากฟักทอง (Wu et al., 2014) และใบ Epimedium (Chen et al., 2012) และรายงานว่าการผลิตการสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้อัลตราซาวด์พร้อมกับการสกัดด้วยเอนไซม์ (Chen et al., 2012; Wu et al., 2014) โดยรวมแล้ว Ultrasonication เป็นเทคโนโลยีที่มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำมาใช้สำหรับการสกัดโปรตีนจาก Okara เนื่องจากโปรตีนมักจะถูกเก็บไว้ในผนังเซลล์ ซึ่งจำเป็นต้อง ถูกทำให้ผนังเซลล์เกิดความเสียหายและสูญเสียสภาพ เพื่อให้โมเลกุลโปรตีนสามารถละลายหรือไฮโดรไลซ์ออกได้สารสกัดชีวภาพ

4.2.1 ปฏิกิริยาการเกิดคาวิเทชัน (Cavitation)

กระบวนการที่เกิดขึ้นได้ในตัวกลางหรือสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงอัลตราโซนิก โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล) เนื่องจาก ฟองอากาศ (Bubbles) ที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องจากโครงสร้าง ของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิกจะถูกบีบอัดและคลายตัวซ้ำไปมาเป็นจำนวน หลายพันรอบทำให้เกิดโพรงช่องว่างขึ้น โดยจะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตรา โซนิกเป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกันเป็นผลให้เกิดฟองอากาศมีขนาด ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งไม่เสถียรและแตกในที่สุด Frizzel และคณะ, 1988 รายงานว่า คาวิเทชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ คาวิเทชันแบบถาวร (Stable cavitation) และคาวิเทชันแบบชั่วคราว (Transient cavitation) ซึ่งแต่ละแบบจะมีผล ทำให้ลักษณะของฟองแก๊สที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิกแตกต่างออกไป โดยคาวิเทชันแบบ ถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศหรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง (Oscillate) เมื่อได้รับ คลื่นอัลตราโซนิกเป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศ หรือฟองแก๊ส ซึ่งฟองอากาศหรือฟองแก๊สนี้อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์ หรือเป็นขนาดของฟองแก๊สที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากับกับความถี่ในการสั่นส่วนคาวิเท ชันแบบชั่วคราวนั้นเกิดขึ้นในระยะการบีบอัดของฟองแก๊ส (Compression phase) ใน ของเหลวที่ได้รับความเครียด (Tension stress) ที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของ ฟองแก๊สทำให้การแตกของฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรืออาจเกิดจากฟองแก๊สเกิด การสั่นแกว่งและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลานึงก่อนที่จะแตกออก อย่างรวดเร็วเมื่อฟองแก๊สนั้นขยายขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ



ภาพ 8 กลไกการทำงานของปรากฏการณ์คาวิเทชันต่อเซลล์

ที่มา : Sala และคณะ, 1995

กลไกการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกนั้นขึ้นอยู่กับปรากฏการณ์คาวิเทชัน โดยทำให้เกิดรูพรุนที่เซลล์ และเกิดโพรงอากาศภายในเซลล์ และแรงกระแทกทางกลเหล่านี้สามารถทำลายส่วนประกอบโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การแตกตัวของอนุภาคหรือเซลล์ การเกิดคาวิเทชันทำให้สารประกอบที่ซ่อนอยู่ภายในเซลล์ถูกแยกออกมาสู่ตัวกลางในการสกัด ดังนั้นจึงส่งเสริมให้ผลผลิตจากการสกัดสูงขึ้นในระยะเวลาเวลาที่สั้นลง อย่างไรก็ตาม ผลกระทบนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดั้งเดิมของโปรตีนและส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ด้วยเหตุนี้คลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงแต่สามารถใช้ได้ในกระบวนการสกัด อีกทั้งยังรวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

Sala และคณะ, 1995 สภาวะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 5,000 เคลวินและความดันสูงถึง 2,000 บรรยากาศ ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างเกิดการขยายและหดตัวของฟองอากาศขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะหดตัว จึงเป็นผลให้การซึมผ่านของแก๊สในขณะที่ยืดตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองแก๊สนี้ขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนของอัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบจนกระทั่งฟองแก๊สมีขนาดเรโซแนนซ์ ทำให้ช่องว่างภายในฟองแก๊สมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งรอบของการสั่นและเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงพอในการคงสถานะของแก๊สหรือไอจึงทำให้เกิดการควบแน่น (Condensation) ขึ้นโดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก และเป็นที่เชื่อกันว่าปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งทันทีที่ฟองแก๊สแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการ

เร่งปฏิกิริยาเคมี (Reaction pathway) หรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ ใหม่ที่แตกต่างไปจาก ปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะเดิม

4.2.2 ผลของคลื่นอัลตราโซนิกต่อเอนไซม์และโปรตีน

Sala และคณะ, 1995 รายงานว่ามีการรวบรวมผลการศึกษาในเรื่องผลของ คลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และองค์ประกอบอื่นๆนั้นมีมานานแล้วโดยประมาณ 70 ปีที่ ผ่านมาซึ่งต่อมาในภายหลังพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์สามารถทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่ เกิดปฏิกิริยาดีโพลีเมอไรเซชัน (Depolymerization) ขึ้นได้ ตัวอย่างเช่น พบว่าทำให้ ความหนืดของสารละลายสตาร์ช (Starch) กัมอะราบิก (Gum arabic) เจลาติน (Gelatin) และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ชนิดอื่นๆมีค่าลดลงหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของโพลีเมอร์ของสตาร์ชและเดกซ์แทรน (Dextrans) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด ใหญ่ โลกุต ใหญ่ขึ้น รวมทั้งทำให้ DNA แตกสลายแต่ยังคงโครงสร้างขององค์ประกอบ ย่อยไว้ได้ เป็นต้น และภายหลังยังมีการค้นพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์นั้นทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแก๊สที่ละลายหรือ มีอยู่ในสารละลายที่นำมาสัมผัสกับคลื่น เช่น ถ้าแทนที่แก๊สออกซิเจนด้วยไฮโดรเจนจะ ทำให้ น้ำหนักโมเลกุลของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่หลายชนิดเพิ่มขึ้นได้

ในส่วนของผลคลื่นอัลตราซาวด์ต่อโปรตีน พบว่ามีความซับซ้อนในการ เกิดปฏิกิริยาเมื่อสัมผัสกับคลื่นอัลตราซาวด์ เช่น โพลีเมอร์ของโปรตีนทรงกลม (Polymeric globular proteins) จะเกิดการแตกตัวทำให้มีขนาดเล็กลงเป็นหน่วยย่อย และถ้าในสารละลายตัวกลางนั้นแก๊สออกซิเจน อาจมีผลทำให้โครงสร้างจตุรภูมิ (Quarternary structure) โดยอาจทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ในส่วนของไลโป โปรตีน (Lipoprotein) คลื่นอัลตราซาวด์อาจทำให้ไขมันบางส่วนแยกออกจากโครงสร้าง (Delipidation) และในฮีโมโปรตีน (Haemoproteins) อาจทำให้เกิดการแยกตัวของฮีม (Haeme) ออกจากโกลบิน (Globin) และในกรณีที่สารละลายโปรตีนได้รับคลื่นอัลตรา ซาวด์เป็นเวลานานมากขึ้นอาจมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยสาย โซโพลีเปปไทด์อาจแตกออกทำให้เกิดชิ้นส่วนของโมเลกุลย่อยที่มีขนาดเล็กลง เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยังยั้งเอนไซม์และจุลินทรีย์นั้น พบว่ามีการนำ เทคนิคหรือกระบวนการอื่นๆมาใช้ร่วมกับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งมีรายงานศึกษาที่ แตกต่างกันไป

4.2.3 ผลของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว

การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีสีเขียว (Green Technology) ที่ได้รับความสนใจอย่างสูงในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มผลผลิตการสกัด ลดระยะเวลาในกระบวนการ และลดการใช้ตัวทำละลาย เมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม งานวิจัยล่าสุดแสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกสามารถเพิ่มผลผลิตการสกัดโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยการใช้พลังงานที่ลดลงและระยะเวลาที่สั้นลง (Arik et al., 2024) หลักการสำคัญของ UAE คือการใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (โดยทั่วไป >20 kHz) ส่งผ่านเข้าไปในตัวกลางที่เป็นของเหลว ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า คาวิเทชัน (Acoustic Cavitation)

โปรตีนจากถั่วลันเตา (Pea Protein): งานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า UAE สามารถเพิ่มผลผลิต (yield) ของโปรตีนสกัดจากถั่วลันเตาได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการใช้ US-probe เทคนิคสามารถเพิ่มอัตราการกู้คืนโปรตีนไปถึง 52.53 ± 0.19 g/hg เมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมที่ 45.28 ± 0.90 g/hg (Tang et al., 2024) กลไกหลักคือการที่คลื่นอัลตราโซนิกช่วยทำลายเมทริกซ์ของสตาร์ชและโปรตีนที่จับตัวกันแน่นในเมล็ด ทำให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ UAE สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนถั่วลันเตา ทำให้มีการเปิดออกของโปรตีน (protein unfolding) และเปิดเผยหมู่ไฮโดรโฟบิกภายในสู่พื้นผิว ส่งผลให้ความโปร่งใสของฟิล์ม ความแข็งแรงในการดึง และคุณสมบัติกันน้ำดีขึ้น (Cheng et al., 2021)

โปรตีนจากถั่วชิกพี (Chickpea Protein): การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดโปรตีนจากถั่วชิกพีไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มผลผลิตการสกัดจาก 55.1% ด้วยวิธีการต่างแบบดั้งเดิมเป็น 66.1% ด้วย UAE ในเวลาที่สั้นกว่า 6 เท่าและใช้พลังงานน้อยกว่า 29 เท่า (Arik et al., 2024) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่อีกด้วย โดยพบว่าโปรตีนที่สกัดด้วย UAE มี surface hydrophobicity เพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ และมีความเสถียรในการเกิดอิมัลชันและโฟมที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนที่สกัดด้วยวิธีปกติ (Kang et al., 2022)

โปรตีนจากถั่วเลนทิล (Lentil Protein): เช่นเดียวกันกับพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น การใช้ UAE ในการสกัดโปรตีนจากถั่วเลนทิลช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับการสกัดแบบต่าง ทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ระหว่าง 82.7% ถึง 90% และยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน โดยโปรตีนที่สกัดด้วย UAE และ enzyme-assisted extraction มีความสามารถในการละลายที่ pH 7 ดีกว่า

การสกัดแบบต่างเพียงอย่างเดียว ซึ่งส่งผลให้โปรตีนมีคุณสมบัติเชิงพื้นที่ผิว (surface properties) ที่ดีขึ้น (Miranda et al., 2022)

ตาราง 17 การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว

แหล่งโปรตีน	สภาวะการสกัด	ผลผลิตโปรตีน (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	สมบัติที่ปรับปรุง	แหล่งอ้างอิง
Faba Bean	123 W, 1:15 g/mL, 41 min, 623 mL	19.75	92.87	Water/oil holding capacity ↑, Foaming capacity ↓	Badjona et al. (2024)
Quinoa	37 kHz, 320 W, 20 min, pH 9, 1:5 ratio	57.0*	94.0*	Gelation temperature, Emulsifying activity ↑	Quintero et al. (2021)
Black Bean	37 kHz, 320 W, 20 min, pH 9, 1:5 ratio	55.0*	92.0*	Water/oil sorption ↑	
Lentil	37 kHz, 320 W, 20 min, pH 9, 1:10 ratio	52.0*	90.0*	Functional properties ↑	
Pumpkin Seed	AE+US treatment	57.8 ± 2.0	94.04 ± 0.77	Solubility, Foaming capacity ↑, Particle size ↓	Sert et al. (2022)
Wheat Germ	Sonication treatment	37-57	N/A	Extraction efficiency ↑	Zhu et al. (2009)
Moringa Leaves	25 kHz, 300 W US + 81 W MW, 41°C, 148 s	82.07 mg/g**	N/A	Combined US+MW effect	Cheng & Shu (2022)
Peanut	Sequential US (100% amplitude, 15 min) + MW (725 W, 8 min)	Higher than MW alone	Lower purity	Sequential treatment benefits	Ochoa-Rivas et al. (2021)

4.2.4 การประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีอื่น

การใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับไมโครเวฟ (US+MW) ในการสกัดโปรตีนจากใบ *Moringa oleifera* พบว่าให้ผลผลิตโปรตีน 82.07 mg/g ซึ่งสูงกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมที่ให้ผลผลิต 68.99 mg/g (Cheng & Shu, 2022) ไมโครเวฟช่วยในการสกัดผ่าน dielectric heating ซึ่งส่วนประกอบสนามไฟฟ้าของไมโครเวฟทำให้โมเลกุลขั้วหมุนและจัดเรียงตัวในปรากฏการณ์ที่เรียกว่า dipolar polarization

4.2.5 การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร

การนำคลื่นอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารนั้นมีความหลากหลายและแตกต่างกันไปตามชนิดหรือประเภทของอาหารและวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ Mason, 1998 รายงานการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหารโดยแบ่งได้เป็นหลายแบบ เช่น

การสกัด (Extraction) คลื่นอัลตราซาวด์จะช่วยให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัสดุที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร (Mass transfer) เพิ่มขึ้นสูง นอกจากนั้นคลื่นอัลตราซาวด์ยังไปทำลายพื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น ตัวอย่างเช่น การสกัดน้ำตาลออกจากหัวบีท (Sugar beets) การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายและจากถั่วเหลืองที่สกัดไขมัน การสกัดสารในชาออกจากใบชาในการผลิตชาสำเร็จรูปละลายได้ทันที เป็นต้น

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยในการกรอง (Acoustically aided filtration) ช่วยทำให้อัตราการกรองของของเหลวเพิ่มขึ้น โดยทำให้เกิดผลที่สำคัญต่อการกรองสองประการได้แก่ทำให้เกิดการรวมตัวกัน (Agglomeration) ของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (Fine particles) ทำให้การกรองเกิดขึ้นได้รวดเร็วและอีกประการหนึ่งคือคลื่นอัลตราซาวด์จะให้พลังงานบางส่วนที่เกิดขึ้นจากการสั่นของวัตถุ (Vibration energy) แก่ของเหลวมีผลทำให้อนุภาคบางส่วนยังคงแขวนลอยอยู่ได้และทำให้สามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการช่วยกรองน้ำแอปเปิ้ลทำให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น เป็นต้น

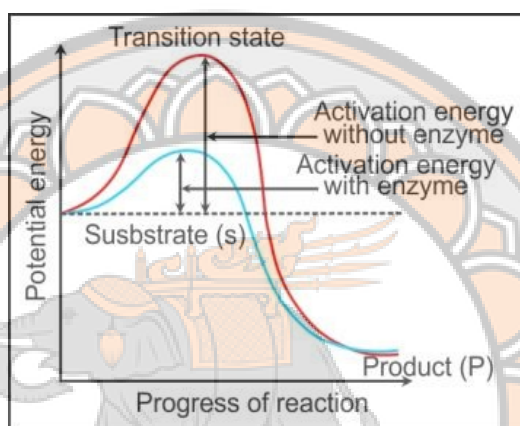
4.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนและอาจรวมถึงสารชีวโมเลกุลชนิดอื่นที่สามารถเร่งปฏิกิริยา (Catalytic- activity) ในลักษณะค่อนข้างจำเพาะ เอนไซม์ทุกชนิดจะมีส่วนที่เรียกว่า Active site ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและชนิดของปฏิกิริยา จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์

ตามที่ ต้องการ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงมาก เร่งปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้ปริมาณน้อยและไม่สูญเสียไปในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา

4.3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์

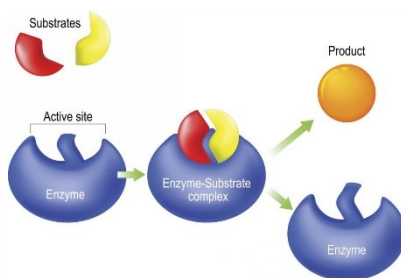
เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดก่อนกลสมชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตโดยจะไปลดพลังงานก่อกัมมันต์ (Activation energy: E_a) และทำให้อนุภาคของสารตั้งต้นชนกันในทิศทางที่เหมาะสม มีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น ดังภาพ 11



ภาพ 9 กราฟพลังงานก่อกัมมันต์กับการดำเนินไปของปฏิกิริยา

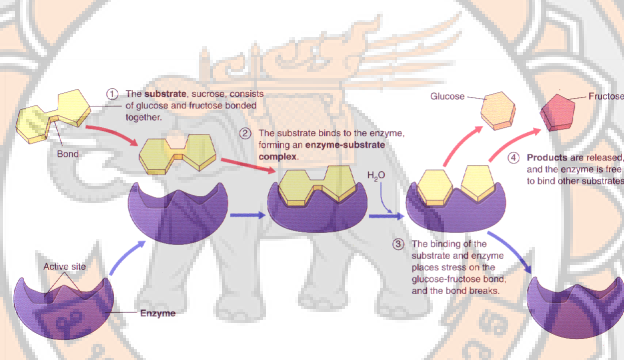
ที่มา : <https://www.topperlearning.com/doubts-solutions/draw-a-graph-depicting-the-concept-of-activation-energy-during-an-enzyme-catalysed-reaction-j8prfooe>

จากกราฟ การหาพลังงานก่อกัมมันต์ (E_a) จากกราฟระหว่างพลังงานกับการดำเนินไป ของปฏิกิริยาสามารถหาได้โดยนำเอาพลังงานของสารตั้งต้นไปลบออกจากพลังงานที่จุดสูงสุดของ การเกิดปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งเอนไซม์จะมีตำแหน่งกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาและมีขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ ดังภาพ 10 และ 11



ภาพ 10 การทำงานของเอนไซม์ แบบรวมโมเลกุล

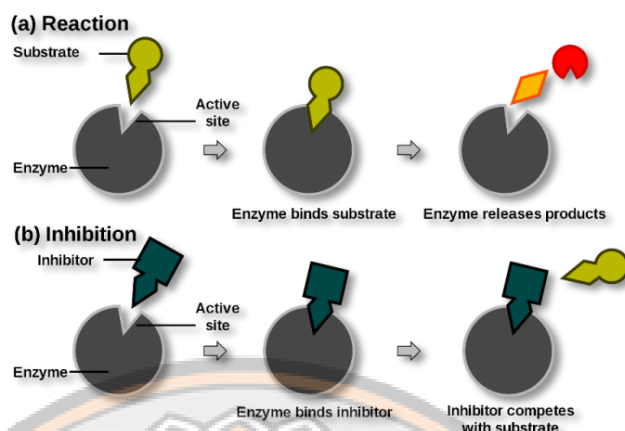
ที่มา : <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319704.php>



ภาพ 11 การทำงานของเอนไซม์ แบบสลายโมเลกุล

ที่มา <http://science.halleyhosting.com/sci/ibbio/chem/notes/chpt8/chpt8.htm>

เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งการเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ หรือเรียกว่า การยับยั้ง (Inhibition) โดยมีตัวยับยั้ง (Inhibitor) เข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในตำแหน่ง Active site ก่อนสารตั้งต้น จึงทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นไม่ได้



ภาพ 12 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ที่มา: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Competitive_inhibition.svg

เอนไซม์จะไปช่วยทำให้โมเลกุลของสารประกอบที่มีโครงสร้างสลับซับซ้อนแตกออกเป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ เอนไซม์แต่ละชนิดทำงานเฉพาะอย่าง ตัวอย่างได้แก่ เอนไซม์ Cellulase ช่วยให้เซลลูโลสซึ่งมีโมเลกุลของน้ำตาลหลายร้อยโมเลกุลมาต่อเชื่อมโยงกันเป็นสายแตกออกเป็นโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์และนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น

4.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ประสิทธิภาพหรือกิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ ซึ่งหมายถึงอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเคมีนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมหลายประการ การทำความเข้าใจปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในงานวิจัยและอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อให้สามารถควบคุมปฏิกิริยาให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด (Illanes et al., 2019) ปัจจัยหลักๆ มีดังนี้

4.3.2.1 อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ สองลักษณะที่ตรงข้ามกัน ในช่วงแรก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจากระดับต่ำ จะเป็นการเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับทั้งโมเลกุลของเอนไซม์และสารตั้งต้น ทำให้มีการเคลื่อนที่และชนกันบ่อยขึ้นและแรงขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วยจนถึงจุดที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum Temperature) อย่างไรก็ตาม หากอุณหภูมิสูงเกินจุดนี้ไป พลังงานความร้อนที่

มากเกินไปจะเข้าไปทำลายพันธะที่ไม่แข็งแรงนัก เช่น พันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ซึ่งเป็นแรงที่ช่วยรักษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เกิดการ เสียสภาพธรรมชาติ (Denaturation) โครงสร้างของบริเวณเร่ง (Active site) จะผิดเพี้ยนไป ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้อีก ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว (Robinson, 2015)

4.3.2.2 ความเป็นกรด-เบส (pH) ค่า pH ของสารละลายส่งผลโดยตรงต่อประจุไฟฟ้าของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่ง (Active site) และกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการคงรูปของโครงสร้างสามมิติ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงค่า pH ที่เหมาะสม (Optimum pH) ที่ทำให้ประจุของกรดอะมิโนเหล่านั้นอยู่ในสภาวะที่ถูกต้องที่สุดสำหรับการจับกับสารตั้งต้นและเร่งปฏิกิริยา หากค่า pH ของสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปจากจุดที่เหมาะสม ประจุของกรดอะมิโนจะเปลี่ยนไป ทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นลดลงหรือกลไกการเร่งปฏิกิริยาผิดเพี้ยนไป ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และหากค่า pH เปลี่ยนแปลงไปมากจนถึงจุดที่เป็นกรดจัดหรือด่างจัด อาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพอย่างถาวรได้ เช่นเดียวกับผลของอุณหภูมิที่สูงเกินไป (Illanes et al., 2019)

4.3.2.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate Concentration) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ หากเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate) ในช่วงแรก อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารตั้งต้น เนื่องจากมีโอกาสมากขึ้นที่โมเลกุลของสารตั้งต้นจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นไปจนถึงจุดหนึ่ง บริเวณเร่งของเอนไซม์ทั้งหมดจะถูกจับจองด้วยสารตั้งต้นจนเกิด สภาวะอิ่มตัว (Saturation) ณ จุดนี้ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อไปอีก อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป และจะมีค่าคงที่อยู่ที่อัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ซึ่งถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของเอนไซม์และความเร็วในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ (Robinson, 2015)

4.3.2.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ (Enzyme Concentration) ในสภาวะที่มีสารตั้งต้นมากเกินไป (Substrate saturation) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ กล่าวคือ ยิ่งมีความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเท่าใด ก็จะมีบริเวณเร่ง (Active site) พร้อมทำงานมากขึ้นเท่านั้น ส่งผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรง

4.3.2.5 สารยับยั้ง (Inhibitors) สารยับยั้งคือสารเคมีที่เมื่อจับกับเอนไซม์แล้วจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงหรือหยุดทำงาน แบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ

- การยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible Inhibition): สารยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรงและสามารถหลุดออกได้ เช่น การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive) ที่สารยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้นและเข้าไปแย่งจับที่บริเวณเร่ง
- การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible Inhibition): สารยับยั้งจะเข้าทำปฏิกิริยาและสร้างพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพอย่างถาวร

4.3.2.6 สารกระตุ้น (Activators) และโคแฟกเตอร์ (Cofactors) เอนไซม์

บางชนิดต้องการโมเลกุลหรือไอออนอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนมาช่วยในการทำงานจึงจะแสดงกิจกรรมได้เต็มที่ เรียกรวมว่า โคแฟกเตอร์ ซึ่งแบ่งได้เป็น:

- ไอออนของโลหะ (Metal Ions): เช่น Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ให้ถูกต้อง หรือมีส่วนร่วมโดยตรงในบริเวณเร่ง
- โคเอนไซม์ (Coenzymes): เป็นโมเลกุลอินทรีย์ขนาดเล็ก (มักเป็นอนุพันธ์ของวิตามิน) ที่ช่วยในกระบวนการเร่งปฏิกิริยา เช่น การถ่ายโอนหมู่ฟังก์ชัน (Illanes et al., 2019)

ตาราง 18 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัย	คำอธิบาย	ช่วงที่เหมาะสม/หมายเหตุ
ชนิดของสารตั้งต้น	ชนิดของสารตั้งต้นมีผลต่อ ความจำเพาะเจาะจงของ เอนไซม์และอัตราการ เกิดปฏิกิริยา	ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และสารตั้งต้น
ความเข้มข้นของสารตั้งต้น	ความเข้มข้นของสารตั้งต้น เพิ่มขึ้นจะเพิ่มอัตราการ เกิดปฏิกิริยาจนถึงจุดอิ่มตัว ของเอนไซม์	จุดอิ่มตัวของเอนไซม์ (Saturation point) ที่ ความเข้มข้นสูง
ความเข้มข้นของเอนไซม์	ความเข้มข้นของเอนไซม์ เพิ่มขึ้นจะเพิ่มอัตราการ เกิดปฏิกิริยาโดยตรง	สัมพันธ์เชิงเส้นกับอัตราการ เกิดปฏิกิริยาในช่วงที่สารตั้ง ต้นเพียงพอ
ความเป็นกรด-เบส (pH)	pH มีผลต่อโครงสร้างสามมิติ ของเอนไซม์และความสามารถ ในการจับสารตั้งต้น	ช่วง pH ที่เหมาะสม แตกต่างกัน เช่น 6-8 สำหรับเอนไซม์หลายชนิด
อุณหภูมิ	อุณหภูมิส่งผลต่อความเร็วของ โมเลกุลและการชนกันของ เอนไซม์กับสารตั้งต้น	อุณหภูมิที่เหมาะสมมักอยู่ ระหว่าง 30-40°C แต่ขึ้นกับ แหล่งที่มาของเอนไซม์
สารยับยั้งปฏิกิริยา	สารยับยั้งสามารถลดหรือหยุด การทำงานของเอนไซม์ได้ โดย มีทั้งแบบแข่งขันและไม่แข่งขัน	มีสารยับยั้งหลายชนิด เช่น สารเคมี ยา หรือผลิตภัณฑ์ จากธรรมชาติ
สารกระตุ้น	สารกระตุ้นช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพการทำงานของ เอนไซม์	ไอออนเช่น Mg^{2+} , Ca^{2+} เป็นตัวกระตุ้นทั่วไป

ที่มา : llanes et al, 2019

4.3.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการสกัดโปรตีน

กลไกการทำงานของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์:

เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เป็นกลุ่มคาร์โบไฮเดรสที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน) โดยทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ผ่านการย่อยสลายองค์ประกอบผนังเซลล์อย่างเป็นระบบ ช่วยในการปลดปล่อยโปรตีนเซลลูลาร์จากเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ธัญพืช และเมล็ดผลไม้ที่มีน้ำมัน เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืชและทำลายเมทริกซ์เซลล์ในฐานะตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ช่วยอำนวยความสะดวกในการปลดปล่อยสารสกัดเข้าสู่ตัวทำละลาย เร่งอัตราการสกัด และเพิ่มผลผลิต เพคตินาส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส เอไมเลส และโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการสกัดด้วยเอนไซม์ (Rashwan et al., 2025)

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพการสกัด:

การศึกษาล่าสุดแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเมทริกซ์และการกู้คืนโปรตีน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูง (2.5% และ 4.8%) เอนไซม์สามารถทำลายเมทริกซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้การกู้คืนโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่ำ (Hu et al., 2024) นอกจากนี้ การศึกษาการสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลถั่วพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการไฮโดรไลซิสส่งผลให้การกู้คืนโปรตีนและระดับการไฮโดรไลซิส (DH) เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการไฮโดรไลซิสด้วย Flavourzyme หรือ Alcalase ที่ความเข้มข้น 1.5% v/w เป็นเวลา 120 นาที ให้ผลการกู้คืนโปรตีนและค่า DH ที่สูงที่สุด (Tran et al., 2022)

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยน้ำ (AEP) และการสกัดด้วยเอนไซม์ (EAEP) พบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนรวม (TPE) ได้ 14% ในระบบที่เข้มข้น (SLR 1:7.5) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ การสกัดด้วยเอนไซม์ยังสามารถเพิ่มระดับการไฮโดรไลซิสจาก 4.6% เป็น 21.1% และปรับปรุงการย่อยได้ในระบบทดสอบ (in vitro protein digestibility) จาก 34% เป็น 61% (Yang et al., 2025)

อิทธิพลของอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวต่อประสิทธิภาพเอนไซม์:

การศึกษาการสกัดโปรตีนจากถั่วดำด้วยเอนไซม์แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว (Solid-to-Liquid Ratio; SLR) ต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ การวิเคราะห์ ANOVA แสดงให้เห็นว่า SLR มีอิทธิพลต่อการสกัดโปรตีน

มากกว่าปริมาณเอนไซม์ ($F = 1187$ เทียบกับ $F = 185$, $p < 0.001$) การเพิ่มเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอส 1% ในระบบที่มี SLR 1:15 ให้ผลเพิ่มขึ้นเพียง 3% แต่ในระบบที่เข้มข้นกว่า (SLR 1:7.5) ให้ผลเพิ่มขึ้นถึง 14% ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ในระบบที่เข้มข้นสามารถต่อต้านความต้านทานการถ่ายเทมวลได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าการสกัดในระบบที่เข้มข้นจะมีความต้านทานต่อการถ่ายเทมวลสูงกว่า (ความหนืดสูงขึ้นและความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างตัวถูกละลายในเมทริกซ์และตัวทำละลายต่ำลง) (Yang et al., 2025)

ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อความเลือกจำเพาะของเอนไซม์:

การเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นระหว่างการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์จะส่งผลให้อัตราการไฮโดรไลซิสลดลง การศึกษาพบว่าความเลือกจำเพาะของเอนไซม์ต่อจุดตัดแต่ละจุดในสารตั้งต้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก สำหรับ β -lactoglobulin ที่ถูกย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* พบว่าความเลือกจำเพาะแตกต่างกันตั้งแต่ 0.003% ถึง 17% หรือแม้แต่ 0% สำหรับจุดตัดบางจุด การเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในความเลือกจำเพาะของเอนไซม์ต่อจุดตัดที่เอนไซม์มีความเลือกจำเพาะสูง (Butré, 2014)

ความท้าทายในการใช้เอนไซม์กับโปรตีนจากพืช:

การสกัดด้วยเอนไซม์ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการสกัด ลดเวลาการสกัด ลดความเสียหายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเหมาะสมสำหรับส่วนผสมที่ไวต่อความร้อนและไม่เสถียร การศึกษาเปรียบเทียบพบว่า การสกัดด้วยเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนสูงสุด ความสามารถในการละลายที่ดีที่สุด และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพอื่นๆ ที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยด่างและเกลือ (Elsohaimy et al., 2015)

ปริมาณเอนไซม์ที่แนะนำและสภาวะการใช้งาน:

สามารถใช้เอนไซม์ชนิดเดียวหรือเอนไซม์หลายชนิดผสมกันได้ การศึกษาพบว่า การสกัดด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.25-1.0% w/w สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในระบบที่มีอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวสูง (Yang et al., 2025)

4.3.4 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์และสารตั้งต้นต่อคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท

นอกเหนือจากผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยตรงแล้ว การปรับความเข้มข้นของเอนไซม์ (ซึ่งมักพิจารณาในรูปของอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น หรือ E/S ratio) และ

ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย) ยังเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมคุณลักษณะและคุณภาพของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทสุดท้าย ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการนำไปใช้งาน (Toldrà et al., 2020)

ผลของอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S Ratio)

อัตราส่วน E/S เป็นปัจจัยกำหนดที่สำคัญที่สุดต่อ ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis - DH) ซึ่งหมายถึงเปอร์เซ็นต์ของพันธะเพปไทด์ที่ถูกตัดไป โดย DH จะส่งผลต่อเนื่องไปยังคุณสมบัติอื่นๆ ดังนี้:

ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์: อัตราส่วน E/S ที่สูงขึ้น จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วและดำเนินไปได้ไกลกว่าในเวลาเท่ากัน ส่งผลให้ได้ค่า DH ที่สูงขึ้น โปรตีนจะถูกตัดเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง และมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น (Wang et al., 2015)

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional Properties): การเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่อย่างมาก โดยทั่วไปแล้ว เพปไทด์ขนาดเล็ก (จาก DH สูง) จะมีความสามารถในการละลายน้ำ (solubility) ได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในทางกลับกัน อาจทำให้คุณสมบัติด้านการสร้างอิมัลชัน (emulsifying capacity) และการสร้างโฟม (foaming capacity) ลดลง เนื่องจากความสามารถในการสร้างฟิล์มที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นบริเวณพื้นผิวระหว่างเฟส (interfacial film) มักต้องการสายเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่พอสมควร (Lafarga et al., 2019)

คุณสมบัติทางชีวภาพ (Bioactive Properties): งานวิจัยจำนวนมากพบว่าค่า DH ที่สูงขึ้นมักจะสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ที่สูงขึ้น เนื่องจากเพปไทด์ขนาดเล็กสามารถเข้าถึงและเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ง่ายกว่า

คุณสมบัติด้านรสชาติ (Sensory Properties): นี่คือข้อจำกัดที่สำคัญที่สุดประการหนึ่ง การใช้ E/S ratio ที่สูงเพื่อให้ได้ DH สูง มักจะนำไปสู่การเกิด รสขม (bitterness) ที่รุนแรงขึ้น ซึ่งเกิดจากการที่เอนไซม์ตัดและเปิดเผยกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) ที่ปลายสายของเพปไทด์ ทำให้การนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทำได้ยากขึ้น (Toldrà et al., 2020)

ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate Concentration)

ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา: ในทางทฤษฎี การเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นจะเพิ่มอัตราเร็วปฏิกิริยา แต่ในทางปฏิบัติสำหรับสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง มักจะเกิดปัญหาด้านความหนืด (viscosity) ที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการผสมและการถ่าย

โอนมวล (mass transfer) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าถึงซับสเตรทได้อย่างทั่วถึง ส่งผลให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยรวมช้าลงได้ (Wang et al., 2015)

ต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ: ในเชิงอุตสาหกรรม การใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงที่สุดเท่าที่จะทำได้เป็นสิ่งที่พึงประสงค์ เพราะจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตต่อหน่วยปริมาตรของถังปฏิกรณ์ (throughput) และลดปริมาณน้ำที่ต้องใช้ ซึ่งจะช่วยประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำแห้งผลิตภัณฑ์ในท้ายที่สุด ดังนั้น การหาจุดสมดุล (optimization) ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงสุดกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ยอมรับได้จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในกระบวนการผลิต

4.4 เอนไซม์ไซลานาส (Xylanase)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสซึ่งอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืช ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษนั้นไซแลนมีผลกระทบเป็นอย่างมากในกระบวนการฟอกสี (Dekker และ Linder, 1979; Chen et al., 1997; Lee et al., 1998) ดังนั้นจึงได้มีการนำเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกมาใช้ในการกำจัดไซแลนที่มีในเยื่อกระดาษ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการฟอกสีซึ่ง Nichaus และคณะ, 1999 พบว่า คุณสมบัติของ Xylanase ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษต้องประกอบด้วย (1) ปราศจากการทำงานของเอนไซม์ ในกลุ่มเซลลูลิโกลิติก (cellulolytic enzymes) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการย่อยของเยื่อเซลลูโลส (cellulose fibers) (2) ต้องการ Xylanase ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเพื่อให้ง่ายต่อการแพร่เข้าไปในเยื่อไม้และ (3) ผลผลิต (yield) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์สูงทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตให้น้อยลงซึ่งถือเป็น ปัจจัยสำคัญที่สุด มีหน้าที่ย่อยแกนหลัก (main chain) ของเฮมิเซลลูโลส มีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ชนิด endo-1,4- β เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไซแลนที่มีแกนหลักเป็นน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 ทำให้ได้ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และชนิด exo-1,4 - β ซึ่งย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์จากปลายแต่ไม่รีดิวซ์ให้สายสั้นลง เอนไซม์ Xylanase เป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยไซแลนที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ซึ่งจุลินทรีย์ไม่น่าสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ (Pastor et al., 2007)

เอนไซม์ Xylanase เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวมๆกันว่า เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) หรือ กลูแคนไฮโดรเลส (glucanhydrolase) ซึ่งแบ่งออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้น คือ อะราบินอส (L- arabinose) ออกมาเอนไซม์กาแลก-กาเนส (D-galactanase) ย่อยสลายเฉพาะการแลกแทน (galactan) และน้ำตาลอะราบินอิกาแลกแทน (L- arabino-D-galactan) เอนไซม์แมนนาเนส (D- mannase)

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ β -(1,4)-D-mannanopyranosyl ของน้ำตาลแมนแนน (D-mannan) และเอนไซม์ Xylanase (β -xylanase) ตัดพันธะ β -(1,4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน Xylanase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกไซแลน เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม xylanolytic enzyme ที่มีความสำคัญที่สุดในการทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักของ Xylanase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะที่พันธะ β -1,4-xylosidic linkage

4.5 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส มีกลไกการทำงาน 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็น prohydrolytic step โดยสายโซ่ Anhydroglucose ถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สองเกิด Hydrolytic cleavage ของสายโพลิเมอร์ (ชฎาพร หัตถบุรณ์, 255) การทำงานของกลไกเริ่มจากเซลลูเลสเกิดการบวมตัวพร้อมกับการสลายพันธะไฮโดรเจน การทำงานเกิดร่วมกันของ Endoglucanase และ Exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระส่วน Exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลาย ซึ่งจะถูกละลายต่อไป โดย β -glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ (Fan et al., 1987)

เอนไซม์ Cellulase (Cellulase or Cellulosic enzymes) ทำหน้าที่ในการย่อยเซลลูโลสเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสและอินเทอร์มีเดียต โดยทั่วไป Cellulase ที่ใช้เป็น เอนไซม์ผสม (cellulase- complex) ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ Endo- β -glucanase, Exo- β -glucanase และ β -glucosidase

Endo- β -glucanase (1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4), Cx จะสลายพันธะ ปีตา-ไกลโคไซด์ โดย random hydrolysis ให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็วและมีหมู่รีดิวซิงเพิ่มขึ้นผลผลิตจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกเมอร์

Exo- β -glucanase (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), Ci เป็น exosplitting-enzyme จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึก โดยจะตัดพันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิง (non-reducing end) ของโมเลกุลเซลลูโลสได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส (Cellobiose)

β -glucosidase, (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21), Cellobiase : จะไฮโดรไลซ์โมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และไฮโดรไลซ์พันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงของเซลโลเดกซ์ทรินที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยอัตราการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ ปีตาไกลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของสายสับสเตรทสั้นลง และไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสได้รวดเร็วที่สุด

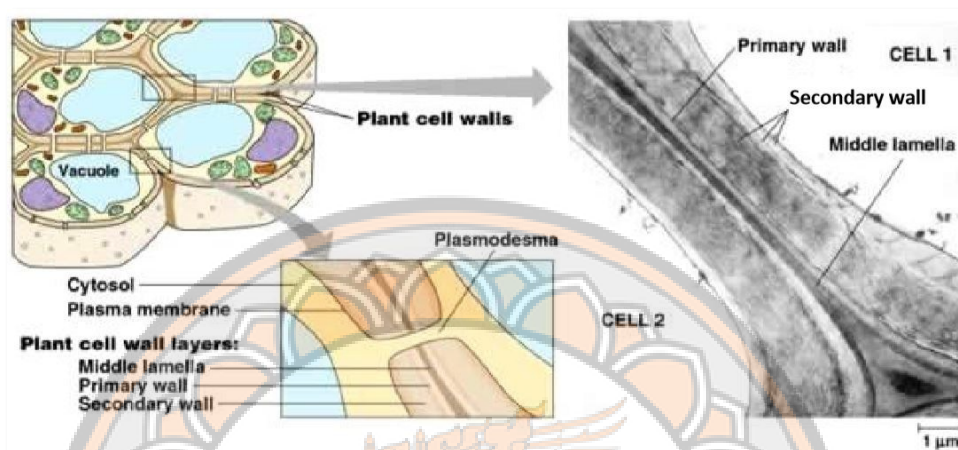
4.6 เอนไซม์เพคตินเนส (Pectinase)

เพคตินเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์พืชโดยเฉพาะในผลไม้ชนิดต่าง ๆ โดย Brummell, 2006 พบว่า ผนังเซลล์ของ citrus และแอปเปิ้ลมีพอลิเมอร์ของเพคตินในปริมาณครึ่งหนึ่งของทั้งหมด โครงสร้างของเพคตินประกอบด้วย สายหลักที่ประกอบด้วยบริเวณที่เชื่อมต่อของกรดกาแลกตูลอนิกเพียงชนิดเดียว และบริเวณที่เชื่อมต่อน้ำตาลแรมโนส และกรดกาแลกตูลอนิก และโซ่กิ่ง (side chain) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลอะราบินอส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลไซโลส (Kashyap et al., 2001) เอนไซม์ Pectinase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเพคตินที่ผนังเซลล์พืช มีผลทำให้สารประกอบเพคตินมีขนาดโมเลกุลสั้นลง ส่งผลให้น้ำผลไม้ที่เนื้อมีความอ่อนตัว ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำผลไม้สกัดได้ (สมฤดี, 2555) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการตัดย่อยสารประกอบเพคติน พบได้ทั้งพืชชั้นสูง และในจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่เนื่องจากสารประกอบเพคตินเป็นส่วนประกอบ ของพืชเกือบทุกชนิดทั่วโลก และสมบัติของสารประกอบเพคตินเหล่านั้นแตกต่างกัน มีผลให้ชนิด และกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจะกล่าวโดยทั่วไปแล้ว สมบัติของ Pectinase คือ เอนไซม์ที่สามารถตัดย่อยสารประกอบเพคติน กรดเพคติกหรือสารประกอบ oligo-Dgalacturonate ได้ด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ กันเช่น เกิดปฏิกิริยา translimination ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มี พันธะคู่และบางชนิดเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่รีดิวซ์ ซึ่งปฏิกิริยาการตัดย่อยเกิดขึ้นได้ทั้งแบบสุ่ม (random) จัดเป็นกลุ่ม endo-enzyme หรือปฏิกิริยาการตัดย่อยจากปลายซึ่งจัดเป็นกลุ่ม exo-enzyme

4.7 การเลือกเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

การเลือกเอนไซม์สกัดโปรตีนให้เหมาะสมต้องอาศัยความเข้าใจในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพกทิน โปรตีน ในผนังเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell wall) ประกอบด้วยไมโครไฟบริลเซลลูโลส (Cellulose microfibrils) ที่ฝังตัวอยู่ในเมทริกซ์ที่มีลักษณะชุ่มน้ำที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ สองกลุ่มหลักคือ เฮมิเซลลูโลสและเพกทิน โดยมีโปรตีนที่เป็นโครงสร้างจำนวนเล็กน้อย แต่ละไมโครไฟบริลเซลลูโลสเชื่อมต่อกัน โดยการเชื่อมต่อแบบร่างแห (Cross-linking) ของโมเลกุลเฮมิเซลลูโลสสร้างเป็นโครงข่ายเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลส (Cellulose-hemicellulose network) ในขณะที่โครงข่ายพอลิเมอร์ของเพกทิน (Pectin polysaccharide network) ซึ่งฝังตัวในโครงข่ายเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลสเป็นตัวสร้างเมทริกซ์ที่อุ้มน้ำ เพื่อด้านทานแรงกดและแรงเฉือน มีความสำคัญต่อการควบคุมการยอมให้สารผ่าน (Permeability) ของผนังเซลล์ ส่วนในบริเวณผนัง

เชื่อมยึดระหว่างเซลล์ (Middle lamella) เพกทินสร้างโครงสร้างต่อกันคล้ายตะแกรง ซึ่งเกิดจากสายระหว่างโฮโมกาแล็กทูโรแนน (Homogalacturonans) ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยสะพานแคลเซียม (Calcium cross-bridges)



ภาพ 13 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช

ที่มา : <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/cellwall.htm>

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายชนิดประกอบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยเฮมิเซลลูโลสจะแตกต่างกับเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประกอบโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสประเภทเดียวประกอบอยู่ในโมเลกุล เฮมิเซลลูโลสเป็นโมเลกุลที่มีค่ามวลโมเลกุลน้อยกว่ามวลโมเลกุลของเซลลูโลส และมีค่า Degree of polymerization ไม่เกิน 200 สามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ ได้หลากหลายดังนี้คือ กาแล็กโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomanan) อะราบินอกลูคูโรโนไซด์ (arabinoglucuronoxylan) อะราบินอกาแลกแทน (arabinogalactan) กลูคูโรโนไซด์ (glucuronoxylan) และกลูโคแมนแนน (glucomanan) โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายโดยสารละลายกรด แล้วให้โมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลงคือ โมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบินอส ซึ่งส่วนใหญ่จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก (Dhillon et al., 2000; Kosugi et al., 2002) โดยน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 8-14 linkage จะได้พอลิเมอร์ที่เรียกว่าไซแลนมีโครงสร้างรอง (branch chain) เป็นน้ำตาลเพนโตส (pentose) เฮกโซส (hexose) และกรดยูโรนิก (uronic acid) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของไซแลนนั้นๆ พืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเป็นไซแลนเหมือนกันแต่จะแตกต่างกันเฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่ง

ของหน่วยข้างเคียง (side chain unit) องค์ประกอบที่ต่างกันไปทั้งความยาวและหมู่แทนที่ ทำให้ไซแลนมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืชมีโครงสร้างหลักเป็น O-acetyl-arabino-4- O-methylglucuronoxylan มีค่า DP ประมาณ 70 โดยไซแลนในพืชตระกูลหญ้ามี 4-O-methyl-a-D-glucuronic acid ในปริมาณที่น้อยกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็ง แต่มี L-arabinofuranose จำนวนมากนอกจากนี้พบว่ามี O-acetyl group ประมาณ 2-5% โดยน้ำหนัก

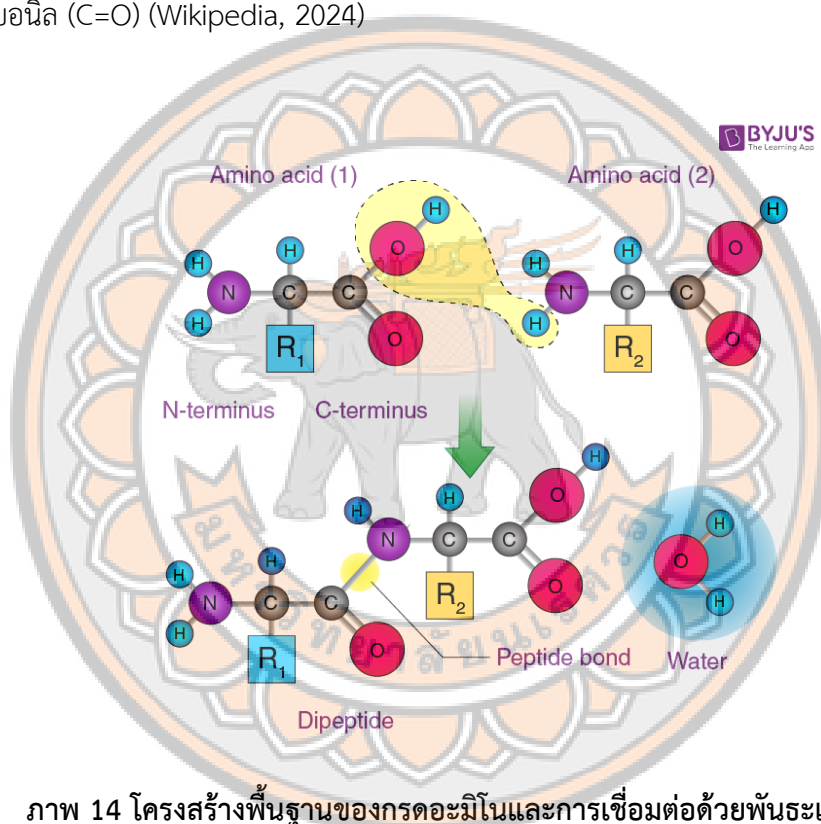
4.8 การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชในการสกัดโปรตีน

Kasai และคณะ, 2004 รายงานว่า Okara นั้นย่อยยากด้วยเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากมีส่วนประกอบที่ย่อยไม่ได้จำพวกเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำในปริมาณมาก และ Cassab, 1998 รายงานว่า autoclaving ด้วยไอน้ำเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121°C มีประสิทธิภาพ ในการคลายเซลล์ที่จับยึดไว้ด้วยกัน จากนั้นตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ด้วย Cellulase 1%, 40°C, 15 ชั่วโมง เพื่อย่อยผนังเซลล์ปฐมภูมิก่อน และจากนั้นตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ Pectinase (1%, 40°C, 15 ชั่วโมง) และได้ protein yield ประมาณ 83 – 85% โดยน้ำหนัก de Figueiredo และคณะ, 2019 รายงานว่าเมื่อใช้กระบวนการ enzymatic hydrolysis เข้ามาช่วย ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลสได้จาก Okara มีปริมาณกรดอะมิโนและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเทียบกับโปรตีนเข้มข้นจาก Okara โดยมีเอนไซม์เชิงซ้อน (multi-enzyme complex) Viscozyme เป็นเอนไซม์ที่มีคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการไฮโดรไลซ์ผนังเซลล์ของ Okara และช่วยในการสกัดโปรตีน การใช้เอนไซม์ช่วยสกัดดำเนินการภายใต้ อุณหภูมิที่ต่างกัน (37 – 53°C) ความเข้มข้นของเอนไซม์ (1.5% – 4%) และค่า pH (5.5 – 6.5) ตามการออกแบบของคอมโพสิตส่วนกลาง หลังจากการสกัดโปรตีนถูกทำให้เข้มข้นโดยการ ตกตะกอนไอโซอิเล็กทริก สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 53°C, pH 6.2 และความเข้มข้น 4% และปริมาณโปรตีนเข้มข้นคือ 56% (โดยน้ำหนักแห้ง) และการกักเก็บ 28% คิดเป็นการเพิ่มขึ้น 17% และ 86% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการปรับสภาพด้วย เอนไซม์ มัลติเอนไซม์เชิงซ้อน Viscozyme สามารถไฮโดรไลซ์โพลีแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์ที่มี โครงสร้างซับซ้อน ปรับปรุงการสกัด และได้โปรตีนเข้มข้นจาก Okara ที่มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น

5. โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน

โปรตีนเป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นที่สร้างขึ้นจากชุดของกรดอะมิโน L- α ได้มากถึง 20 ชนิด กรดอะมิโนทุกชนิดที่ใช้สร้างโปรตีนมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน โดยคาร์บอน α จะเชื่อมต่อกับหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และสายข้างที่แปรผัน มีเพียงโปรลีนเท่านั้นที่แตกต่างจากโครงสร้างพื้นฐานนี้

เนื่องจากสายข้างของโพรลีนเป็นแบบวงแหวน เชื่อมต่อกับหมู่เอมีโน ทำให้ความยืดหยุ่นของโซ่โพรลีนจำกัด สายข้างของกรดอะมิโนมาตรฐานมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีที่หลากหลาย และผลรวมของกรดอะมิโนทั้งหมดจะเป็นตัวกำหนดโครงสร้างสามมิติและการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี กรดอะมิโนในโซ่โพลีเปปไทด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ระหว่างหมู่เอมีโนและหมู่คาร์บอกซิล กรดอะมิโนแต่ละตัวในโซ่เรียกว่า residue และชุดของอะตอมคาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจนที่เชื่อมต่อกันเรียกว่า main chain หรือ protein backbone พันธะเปปไทด์มีรูปแบบ resonance สองแบบที่ให้ลักษณะพันธะคู่บางส่วนกับ backbone คาร์บอน α จะอยู่ในระนาบเดียวกันโดยประมาณกับไนโตรเจนและหมู่คาร์บอนิล ($C=O$) (Wikipedia, 2024)



ภาพ 14 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโนและการเชื่อมต่อดัวยพันธะเปปไทด์

ที่มา : <https://byjus.com/jee/peptide-bond/>

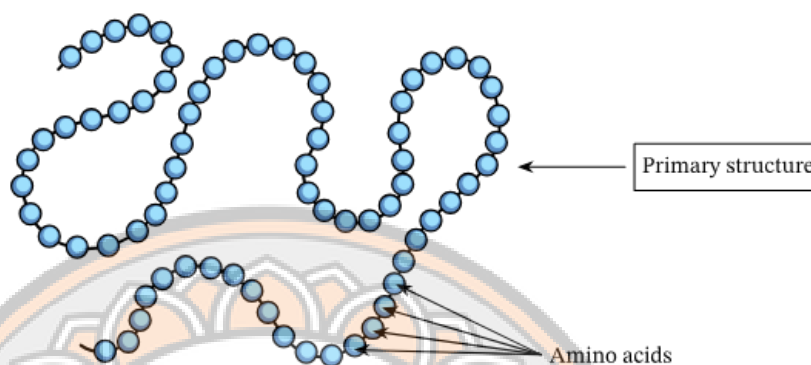
5.1 ระดับของโครงสร้างโปรตีน

โปรตีนมีสี่ระดับโครงสร้างที่แตกต่างกัน ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และควอเทอร์นารี แต่ละระดับมีลักษณะเฉพาะและการมีเสถียรภาพที่แตกต่างกัน (MedSchoolCoach, 2024)

5.1.1 โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary Structure)

โครงสร้างปฐมภูมิคือลำดับเชิงเส้นของกรดอะมิโนที่เชื่อมโยงกันด้วยพันธะเปปไทด์ โซ่โพลีเปปไทด์จะลงท้ายด้วยหมู่เอมีโนอิสระที่เรียกว่า N-terminus หรือ amino

terminus และหมู่คาร์บอกซิลอิสระที่เรียกว่า C-terminus หรือ carboxy terminus ตามธรรมเนียม ลำดับเปปไทด์จะเขียนจาก N-terminus ไป C-terminus ซึ่งสอดคล้องกับลำดับที่โปรตีนถูกสังเคราะห์โดยไรโบโซม (Wikipedia, 2024)



ภาพ 15 โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน แสดงลำดับกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์

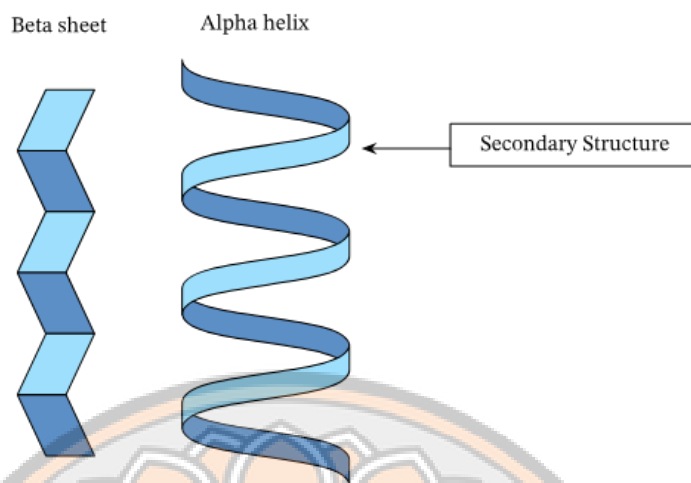
ที่มา : <https://www.nagwa.com/en/explainers/528127907457/>

5.1.2 โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure)

โครงสร้างทุติยภูมิเป็นการพับของโซ่โพลีเปปไทด์เพื่อสร้าง α -helices และ β -sheets โครงสร้างเหล่านี้ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่าง backbone ของโซ่เปปไทด์ ไม่ใช่สายข้าง องค์ประกอบโครงสร้างทุติยภูมิปกติ ได้แก่:

- α -helices: โครงสร้างเกลียวขวาที่เสถียรด้วยพันธะไฮโดรเจน
- β -sheets: โครงสร้างแผ่นพับที่อาจเป็นแบบขนานหรือต่อต้านขนาน
- Turns และ loops: ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่าง α -helices และ β -sheets
- Random coils: ส่วนที่ไม่มีโครงสร้างที่แน่นอน

การพับเหล่านี้เกิดขึ้นจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลุ่ม $C=O$ และ NH ของกรดอะมิโนที่อยู่ใน backbone (MedSchoolCoach, 2024)



ภาพ 16 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน แสดง α -helix และ β -sheet

ที่มา : <https://www.nagwa.com/en/explainers/528127907457/>

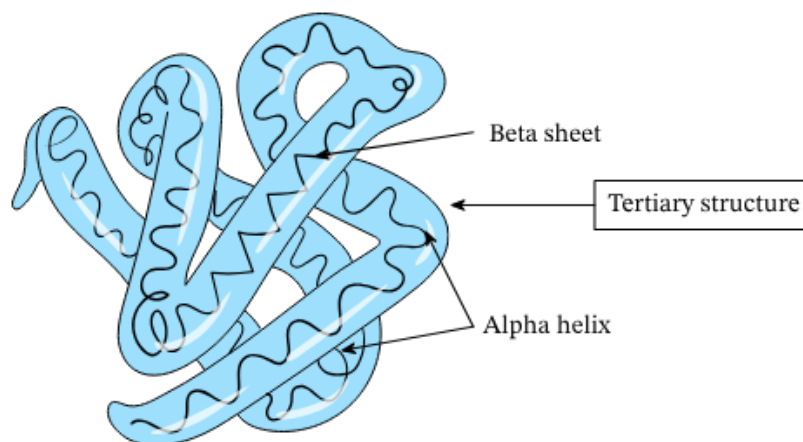
5.1.3 โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary Structure)

โครงสร้างตติยภูมิคือโครงสร้างสามมิติที่แท้จริงของโซ่โพลีเปปไทด์เดียว เสถียรโดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายข้าง (กลุ่ม 'R') ของกรดอะมิโน ปฏิสัมพันธ์เหล่านี้ประกอบด้วย:

- ปฏิสัมพันธ์ไอออนิก (Ionic interactions): ระหว่างกลุ่มที่มีประจุบวกและลบ
- พันธะไฮโดรเจน: ระหว่างสายข้างที่มีขั้ว
- แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces): ปฏิสัมพันธ์อ่อนๆ ระหว่างอะตอม
- ปฏิสัมพันธ์ไฮโดรโฟบิก: การรวมกลุ่มของสายข้างที่ไม่ชอบน้ำ
- พันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds): พันธะโควาเลนต์ระหว่าง cysteine สองตัว

โครงสร้างตติยภูมิเป็นตัวกำหนดหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน

(MedSchoolCoach, 2024)



ภาพ 17 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน แสดงปฏิสัมพันธ์ต่างๆ ที่ยึดโครงสร้าง

ที่มา : <https://www.nagwa.com/en/explainers/528127907457/>

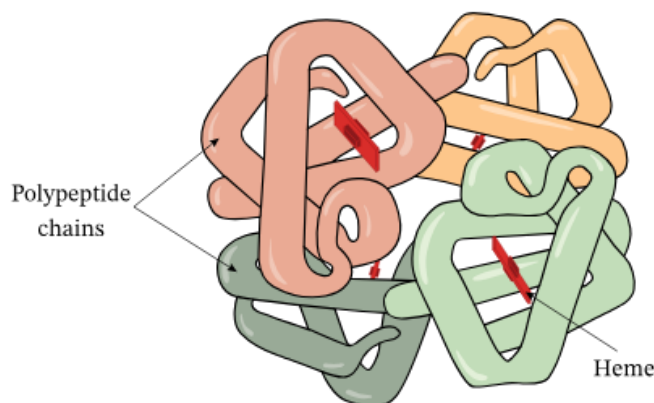
5.1.4 โครงสร้างควอเทอร์นารี (Quaternary Structure)

โครงสร้างควอเทอร์นารีเกิดขึ้นเมื่อมีการรวมตัวกันของโซ่โพลีเปปไทด์สองหรือมากกว่า (subunits) เพื่อสร้างโปรตีนที่มีหน้าที่เฉพาะ (multimer) การรวมตัวนี้มีเสถียรภาพโดยปฏิสัมพันธ์แบบไม่โควาเลนต์และพันธะไดซัลไฟด์ คล้ายกับปฏิสัมพันธ์ที่ทำให้โครงสร้างตติยภูมิมีเสถียรภาพ

โปรตีนที่มีโครงสร้างควอเทอร์นารีสามารถมีได้หลายรูปแบบ เช่น:

- โฮโมไดเมอร์ (Homodimer): สร้างจาก subunit เหมือนกันสองตัว
- เฮเทอโรไดเมอร์ (Heterodimer): สร้างจาก subunit ต่างกันสองตัว
- โครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้น: เช่น เติตราเมอร์ หรือโครงสร้างที่มี subunit หลายตัว

ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ ฮีโมโกลบิน ซึ่งประกอบด้วย subunit 4 ตัว (2 α และ 2 β) (MedSchoolCoach, 2024)

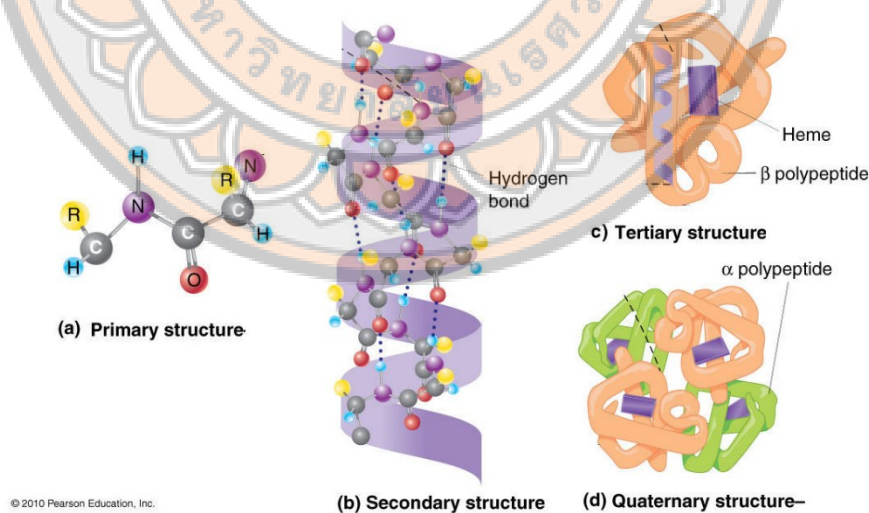


ภาพ 18 โครงสร้างควอเตอร์นารีของโปรตีน แสดงการรวมตัวของ subunit หลายตัว

ที่มา : <https://www.nagwa.com/en/explainers/528127907457/>

5.1.5 ความสำคัญของโครงสร้างโปรตีน

โครงสร้างโปรตีนมีความสำคัญต่อการทำงาน เนื่องจากรูปร่างและการจัดเรียงของกรดอะมิโนจะกำหนด active site และความสามารถในการจับกับ substrate หรือโมเลกุลอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอาจส่งผลให้โปรตีนสูญเสียหน้าที่ (denaturation) หรือเปลี่ยนแปลงหน้าที่ (conformational changes) ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญของการควบคุมกิจกรรมทางชีวภาพและการพัฒนาต่างๆ

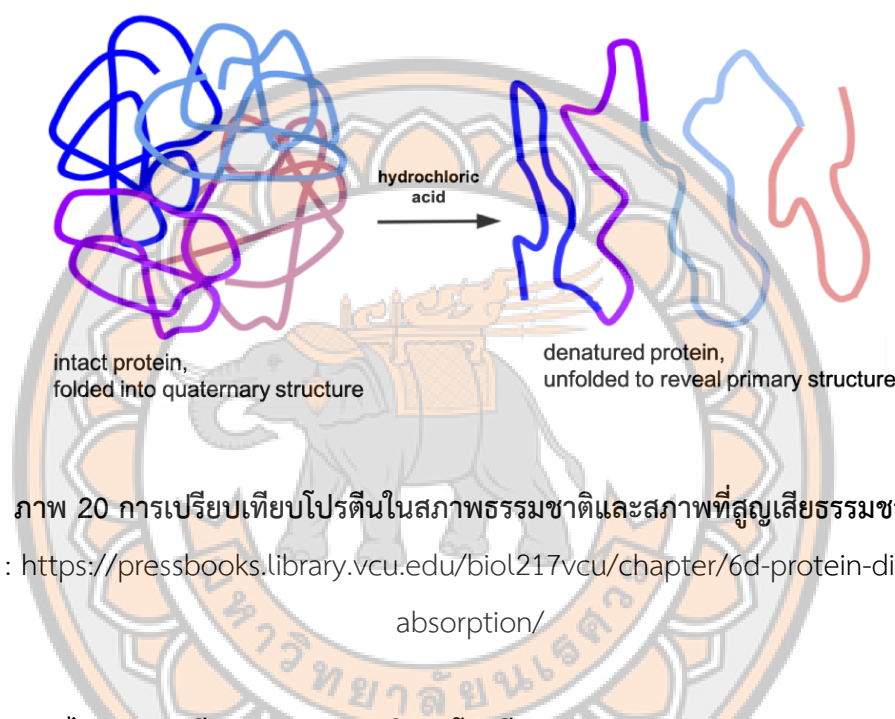


ภาพ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทั้ง 4 ระดับของโปรตีน

ที่มา : https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html

6. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation) คือกระบวนการที่โครงสร้างสามมิติของโปรตีนถูกรบกวนจนเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยที่จะไม่ทำให้เกิดการสลายพันธะเปปไทด์ขึ้น โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ยังคงเหมือนเดิม แต่โครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิ และควอเตอร์นารีจะสูญหายไป ส่งผลให้โปรตีนสูญเสียหน้าที่ทางชีวภาพ (Britannica, 2025)



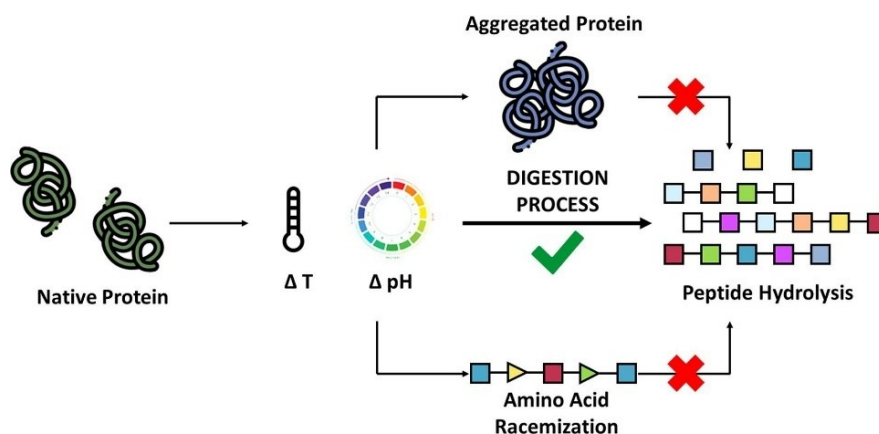
ภาพ 20 การเปรียบเทียบโปรตีนในสภาพธรรมชาติและสภาพที่สูญเสียธรรมชาติ

ที่มา : <https://pressbooks.library.vcu.edu/biol217vcu/chapter/6d-protein-digestion-absorption/>

6.1 กลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดจากการทำลายแรงยึดเหนี่ยวอ่อนๆ ที่รักษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ ปฏิสัมพันธ์ไฮโดรโฟบิก และปฏิสัมพันธ์ไอออนิก ขณะที่พันธะเปปไทด์และพันธะไดซัลไฟด์ยังคงเหมือนเดิม (Britannica, 2025)

งานวิจัยล่าสุดแสดงให้เห็นว่ากระบวนการสูญเสียสภาพธรรมชาติมีความซับซ้อนและขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ การศึกษาเปรียบเทียบการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความดัน ความร้อน และสารเคมีในโปรตีน apolipoprotein A-1 และ lysozyme พบว่าแต่ละกระบวนการมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน (Roche et al., 2018)



ภาพ 21 กลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยปัจจัยต่างๆ

ที่มา : Accardo et al. (2022)

6.2 ประเภทของการสูญเสียสภาพธรรมชาติ

6.2.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน (Thermal Denaturation)

การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนเป็นกระบวนการที่มีความร่วมมือ (cooperative) สูงที่สุด มีลักษณะเฉพาะคือมีค่าเอนทัลปีและเอนโทรปีเป็นบวกสูง และเนื่องจากการชดเชยระหว่างเอนทัลปีและเอนโทรปี (enthalpy-entropy compensation) จึงมีพลังงานอิสระเป็นลบเพียงเล็กน้อย กระบวนการนี้ส่งผลให้ปริมาตรของโปรตีนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการละลายของกลุ่มไฮโดรโฟบิกภายในที่ถูกเปิดออกมาสู่ตัวทำละลาย (Roche et al., 2018)

การศึกษาด้วยเทคนิค differential scanning calorimetry (DSC) พบว่าการเปลี่ยนแปลงความจุความร้อน (heat capacity change, ΔC_p) ของโปรตีนมีค่าเป็นบวกสูงและคงที่จนถึง 80°C โดยมีค่าระหว่าง $4\text{--}12 \text{ kJ} \times \text{K}^{-1}$ ขึ้นอยู่กับความไฮโดรโฟบิกของโปรตีน (Masson, 2022)

- การปรับสภาพด้วยความร้อนแห้ง (Dry heat stabilization): เป็นการปรับสภาพด้วยความร้อนอุณหภูมิสูงกับวัตถุดิบแห้ง เพื่อทำลายเอนไซม์และจุลินทรีย์
- การปรับสภาพด้วยความร้อนชื้น (Wet heat stabilization): เป็นการให้ความร้อนวัตถุดิบที่มีความชื้นในสภาวะปิดสนิท ก่อนนำมาทำแห้งต่อไป

6.2.2 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความดัน (Pressure Denaturation)

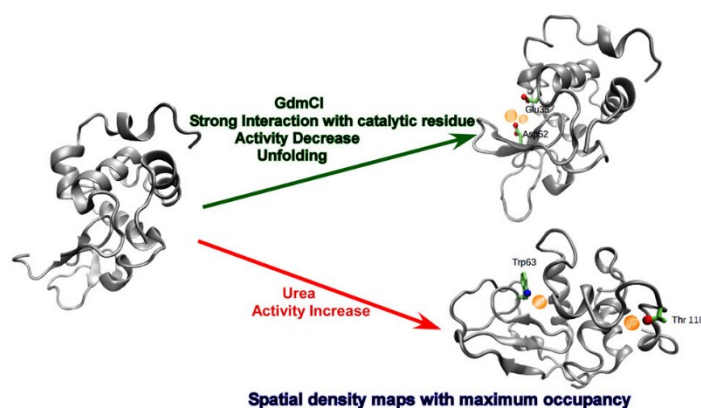
การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความดันมีความร่วมมือน้อยกว่าการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน มีค่าเอนโทรปีและเอนทัลปีเป็นบวกน้อยกว่า และมีพลังงานอิสระเป็นลบมากกว่า ที่น่าสนใจคือในขณะที่ยังคงการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนและสารเคมีทำให้ปริมาตรโปรตีนเพิ่มขึ้น การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความดันกลับทำให้ปริมาตรโปรตีนลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Roche et al., 2018)

การศึกษาเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิสูงและความดันสูงต่อโปรตีน STEP (PTPN5) พบว่าอุณหภูมิสูงทำให้หน่วยเซลล์ฝักขยายตัว 3.9% และโปรตีนขยายตัว 1.1% ขณะที่ความดันสูงทำให้หน่วยเซลล์หดตัว 2.1% แต่โปรตีนยังคงขยายตัวเล็กน้อย 0.4% (Guerrero et al., 2024)

6.2.3 การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยสารเคมี (Chemical Denaturation)

การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยสารเคมีมีความร่วมมือที่ต่ำและแสดงพลังงานอิสระเป็นลบมากที่สุด โดยเฉพาะเมื่อใช้ guanidinium hydrochloride ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบจับกันสูงกับโปรตีนบางชนิด สารเคมีที่ใช้ทำลายโครงสร้างโปรตีนที่พบบ่อย ได้แก่:

- Urea และ guanidinium chloride: มีความชอบสูงต่อพันธะเปปไทด์ ทำลายพันธะไฮโดรเจนและสะพานเกลือระหว่างสายข้างที่มีประจุ
- กรดและด่าง: ทำลายปฏิสัมพันธ์ไอออนิกและพันธะไฮโดรเจน
- ตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น ethanol, acetone): รบกวนการดึงดูดระหว่างกลุ่มไม่มีขั้ว
- สารออกซิไดซ์และรีดิวซ์: ทำลายหรือสร้างพันธะไดซัลไฟด์



ภาพ 22 ผลของ Urea และ guanidinium chloride ต่อโครงสร้างโปรตีน

ที่มา : Accardo et al. (2022)

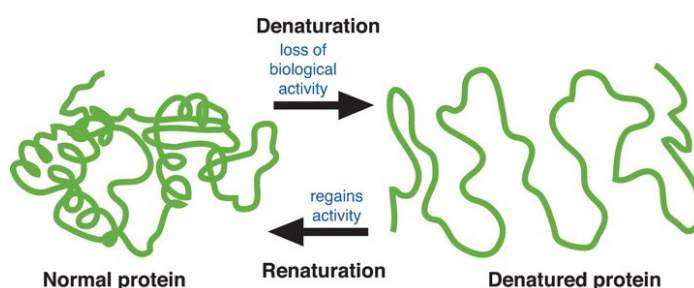
6.3 การกลับสู่สภาพเดิม (Renaturation)

ในบางกรณี โปรตีนสามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมได้เมื่อสารทำลายโครงสร้างถูกกำจัดออก กระบวนการนี้เรียกว่า renaturation อย่างไรก็ตาม การกลับสู่สภาพเดิมไม่ได้เกิดขึ้นเสมอ โดยเฉพาะในกรณีของการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน เช่น การต้มไข่ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ย้อนกลับไม่ได้ (irreversible denaturation) (Britannica, 2025)

การศึกษาพบว่าความสำเร็จของการ renaturation ขึ้นอยู่กับ:

- ชนิดและความเข้มข้นของสารทำลายโครงสร้าง
- ระยะเวลาที่โปรตีนอยู่ในสภาพที่สูญเสียธรรมชาติ
- สภาพของการกำจัดสารทำลายโครงสร้าง
- โครงสร้างและขนาดของโปรตีน

agents: pH, temp, ionic strength, solubility



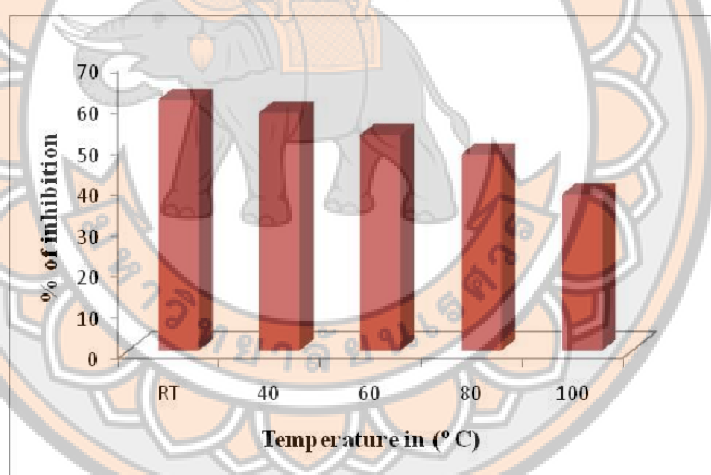
ภาพ 23 กระบวนการ denaturation และ renaturation ของโปรตีน

ที่มา : Biswas et al. (2018)

6.4 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยความร้อนต่อคุณสมบัติของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

6.4.1 ผลของความร้อนต่อโครงสร้างโปรตีนและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

การบำบัดด้วยความร้อนเป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแปรรูปอาหาร โปรตีนโดยทั่วไปมีความไวต่อความร้อน ดังนั้นการบำบัดด้วยความร้อนอาจทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ การเชื่อมโยง และการรวมตัวของโปรตีนหรือโปรตีนไฮโดรไลเซต การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยเชลล์ (Scallop Protein Hydrolysates; SPH) พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบำบัดด้วยความร้อนเพิ่มขึ้นในช่วง 65-100°C กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของ SPH ลดลงจาก 58.15% เป็น 44.61% แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการบำบัดที่แตกต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ว่า SPH มีความต้านทานต่อกระบวนการทางความร้อนได้ดี (Lin et al., 2020)

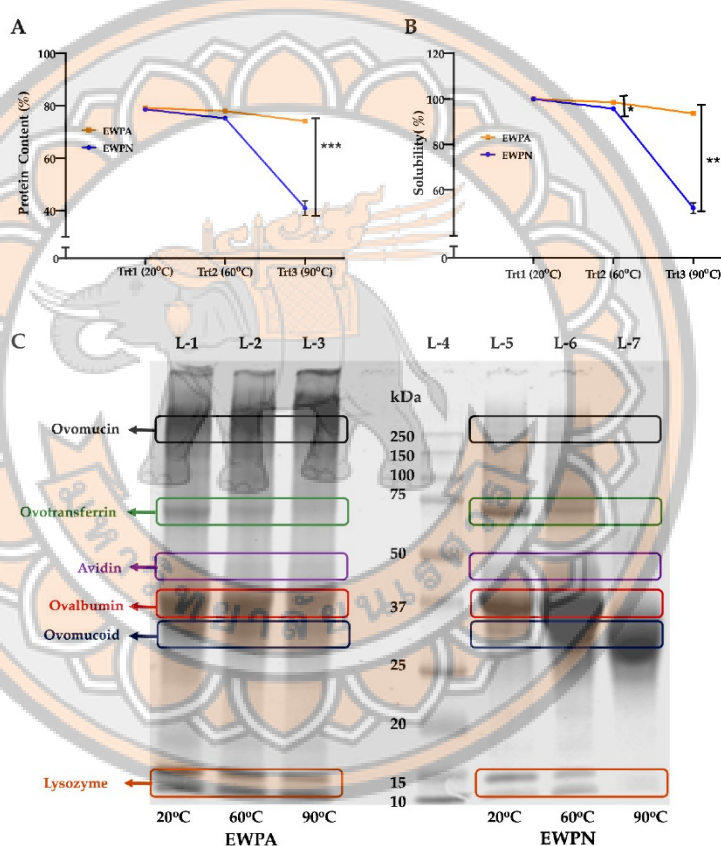


ภาพ 24 เกลียวภาพความร้อน DPPH กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน
ที่มา : Manukumar et al. (2013)

อุณหภูมิสูงที่ใช้ในการบำบัดด้วยความร้อนอาจเพิ่มการย่อยสลายของ SPH และส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของ SPH ซึ่งส่งผลให้เสียกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระบางส่วน ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ SPH ไม่ได้สูญหายไปทั้งหมด แสดงให้เห็นถึงความเสถียรของโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อการบำบัดด้วยความร้อน (Lin et al., 2020)

6.4.2 อิทธิพลของ pH ร่วมกับความร้อนต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาผลของ pH และการบำบัดด้วยความร้อนต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของผงไข่ขาว (Egg White Powder; EWP) แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างปัจจัยทั้งสอง การศึกษาพบว่า pH ของ EWP มีผลโดยตรงต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติและความสามารถในการละลายของโปรตีน การให้ความร้อนกับ EWP อาจส่งผลให้เกิดการรวมตัวของโปรตีน โดยกลุ่มที่มี pH เป็นกลาง (EWPN) มีการรวมตัวของโปรตีนสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี pH เป็นด่าง (EWPA) (Rao et al., 2020)



ภาพ 25 ผลของการให้ความร้อนต่อปริมาณโปรตีนและความสามารถในการละลายของตัวอย่างโปรตีนไข่ขาว (A) ปริมาณโปรตีนและ (B) ความสามารถในการละลายของโปรตีนไข่ขาวเป็นกลาง (EWPN)

ที่มา : Rao et al. (2020)

ที่น่าสนใจคือการคลายของโปรตีน EWPA ที่อุณหภูมิ 60°C แสดงความสามารถในการย่อยในระบบทางเดินอาหารที่สูงขึ้นและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระผ่านการทดสอบ Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับ EWPN โดย EWPA แสดงกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่า EWPN อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยไม่คำนึงถึงอุณหภูมิการบำบัด และ EWPA แสดงกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระสูงสุดหลังจากการบำบัดด้วยความร้อนที่ 60°C (Rao et al., 2020)

6.4.3 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกิจกรรมทางชีวภาพ

การบำบัดด้วยความร้อนสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ต่อโครงสร้างทุติยภูมิหรือตติยภูมิของเปปไทด์ การศึกษาเปรียบเทียบพบว่าการบำบัดด้วยความร้อนสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญในกิจกรรม ABTS ของเปปไทด์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองหมักที่อุณหภูมิ 25°C (12.67%), 75°C (13.21%) และ 100°C (12.58%) ตามลำดับ กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของเปปไทด์ดังกล่าวยังเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 75°C (17.09%) และ 100°C (17.52%) ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงในกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มต้านอนุมูลอิสระบางกลุ่มในระบบทางเดินอาหาร การกระทำของเอนไซม์ส่งผลต่อองค์ประกอบกรดอะมิโน ปริมาณ และโครงสร้างของเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ ทำให้ส่งผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของมัน (Lin et al., 2020)

6.4.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสทมักถูกใช้เป็นส่วนผสมอาหารเชิงหน้าที่หรือสารเติมแต่งอาหาร ความเสถียรของกิจกรรมทางชีวภาพระหว่างการแปรรูปอาหาร การเก็บรักษา การใช้งาน และการย่อยจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง องค์ประกอบและโครงสร้างของโปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถถูกย่อยสลาย ดัดแปลง และปรับโครงสร้างใหม่หลังจากที่ถูกแปรรูป เก็บรักษา และทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบอาหารอื่น ขณะเดียวกัน กิจกรรมทางชีวภาพของมันก็สามารถถูกกระตุ้น ย่อยสลาย หรือยับยั้งระหว่างกระบวนการนี้ (Lin et al., 2020)

ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการบำบัดด้วยความร้อน แต่ไม่ใช่ pH เป็นปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงความสามารถในการย่อยของโปรตีนและการปลดปล่อยเปปไทด์ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระหลังการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Rao et al., 2020)

งานวิจัยล่าสุดของ Irakli et al. (2020) ที่ศึกษาผลของความร้อนต่อโปรตีนจากรำข้าว พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที ทำให้โครงสร้างของโปรตีนคลายตัวออกอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องโดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลอิสระ (free sulfhydryl groups) จากการดอะมิโนซิสเทอีนที่ถูกเปิดเผยออกมา

อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ไม่ใช่กราฟเส้นตรง การให้ความร้อนที่มากเกินไปทั้งในแง่ของอุณหภูมิและเวลา อาจส่งผลเสียต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน งานวิจัยของ Tong et al. (2022) ที่ศึกษาโปรตีนถั่วเหลือง พบว่าการให้ความร้อนในระดับปานกลางจะเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีนเป็นเส้นใยขนาดเล็ก (fibrillation) ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและเปิดเผยบริเวณที่ออกฤทธิ์ได้ แต่หากให้ความร้อนที่รุนแรงเกินไป จะทำให้โปรตีนเกิดการจับกลุ่มกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ที่ไม่มีระเบียบ (amorphous aggregation) และไม่ละลายน้ำ การจับกลุ่มกันอย่างแน่นหนานี้จะกลับไป "ฝัง" หมู่ฟังก์ชันที่เคยถูกเปิดเผยออกมาอีกครั้ง ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง ดังนั้น การควบคุมสภาวะการให้ความร้อนจึงเป็นสิ่งสำคัญในการดัดแปลงคุณภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนออกมาให้ได้มากที่สุด

6.5 ความสำคัญทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้

การเข้าใจกระบวนการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนมีความสำคัญต่อ:

- การแปรรูปอาหาร: การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์
- การพัฒนายา: การรักษาเสถียรภาพของโปรตีนยา
- การวิจัยทางชีวเคมี: การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน
- เทคโนโลยีชีวภาพ: การผลิตและเก็บรักษาเอนไซม์

งานวิจัยล่าสุดแสดงให้เห็นว่าการใช้แบบจำลองแบบร่วมมือ (cooperative models) ในการวิเคราะห์โปรตีนให้ข้อมูลเชิงลึกใหม่เกี่ยวกับกระบวนการพับและคลายของโปรตีน ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ในอนาคต (Roche et al., 2018)

อภิญา และปาริฉัตร, 2550 ได้ศึกษาผลของความร้อนต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียวเข้มข้น ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที แก่สารละลายโปรตีนถั่วเขียวก่อนการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกและการทำแห้งที่ 55°C ทำให้โปรตีนถั่วเขียวมีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำ แต่โปรตีนถั่วเขียวเข้มข้นที่เตรียมโดยการผ่านความร้อนก่อนตกตะกอนสามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิ 60°C ในขณะที่โปรตีนถั่วเขียวที่ไม่ได้ผ่านความร้อนก่อนการตกตะกอนเกิดเจลที่อุณหภูมิ 70°C นอกจากนี้ความร้อนระดับดังกล่าวยังช่วยให้มีลิกซันที่ใช้โปรตีนถั่วเขียวเป็นสารอิมัลซิไฟด์มีความคงตัวต่อความร้อนเพิ่มขึ้นในสถานะที่เป็นต่าง

ภรณ์, 2540 ศึกษาการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากใบมันสำปะหลังโดยการปรับสภาพใบด้วยความร้อนและสารเคมี ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2% อุณหภูมิ 30°C เวลา 20 นาที ตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้น้ำโปรตีนจากใบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพแล้ว ปรับ pH ในช่วง 2 - 10 ศึกษาเกี่ยวกับการใช้กลูตาราลดีไฮด์ พบว่า กระบวนการที่เริ่มจากการปรับสภาพใบโดยแช่น้ำกลั่นที่ 40°C 40 นาที ให้ค่าดังกล่าวสูงสุด ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน และเกิดอิมัลชันค่อนข้างดี

ปาริฉัตร, 2539 การใช้เอนไซม์ตัดแปลงสมบัติการให้ฟองของโปรตีนจาก Okara โดยการย่อยโปรตีนอย่างจำกัดด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม คือ อัลคาไลน์โปรติเอส, แอซิดโปรติเอส และนิวทรัลโปรติเอส ย่อยสลายโปรตีนในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และ pH อัตโนมัติ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนที่ให้ค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด แปรค่าเวลาการย่อยสลายโปรตีนเป็น 5, 10, 15, 20, 25 นาที แปรอุณหภูมิเป็น 20, 40, 60°C และแปรระดับ pH ตามชนิดเอนไซม์ พบว่า pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการเกิดฟอง และสถานะที่เอนไซม์ทั้ง 3 กลุ่มสามารถตัดสลายโปรตีนอย่างจำกัดและอย่างจำเพาะเกิดเป็นสารให้ฟองที่มีปริมาตรและความคงตัวสูงสุด ขึ้นกับปัจจัยของเวลาร่วมกับอุณหภูมิ

สุภาวดี, 2550 ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์ปาเปน เอนไซม์อัลคาเลส พบว่า เอนไซม์ปาเปน ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และใช้กรดซัคซินิกแอนไฮไดรต์ พบว่า การดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชันไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน่วยย่อยของโปรตีน และพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรมีค่าสูงขึ้น ที่ระยะเวลาสูงขึ้น ความสามารถการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการดัดแปรเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับการดัดแปรด้วยเอนไซม์โปรติเอส พบว่าแนวโน้มของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์โปรติเอสมีมากกว่าโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยกระบวนการซัคซินิลเลชัน

น้ำทิพย์, 2547 ศึกษาการปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเขียว โดยการใช้สารตกตะกอนและการดัดแปรโปรตีนด้วยสารเคมี เช่น กรดซัคซินิก กรดอะซิติก และโซเดียมซัลไฟด์ เป็นต้น และทำแห้ง พบว่า การผลิตโดยปรับ pH สารละลายโปรตีน เป็น 9.5 ก่อนการตกตะกอนโปรตีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีโปรตีนถึงโดยน้ำหนักแห้ง 82% - 91%

7. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนโดยการตัดสายพอลิเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นๆด้วยการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการเกิดเจล สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น (Kristinsson และ Rasco, 2000) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยทั่วไปแบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่

7.1 การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี

เป็นการทำให้พันธะเปปไทด์แตกออกโดยการใช้สารละลายกรดหรือด่าง เป็นวิธีที่มีขด้นทุนต่ำแต่ควบคุมระดับการย่อยได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร การย่อยโปรตีนด้วยกรดสามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดีแต่ทำให้ทริปโตเฟน (Tryptophan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย สารละลายกรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยกรดจะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลางเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ในการย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟตและการย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยโปรตีนเนื่องจากเกลือที่ได้ในกระบวนการเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไป

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หากย่อยในสภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาราคีไมเซชัน (Racemization) ของกรดอะมิโน โยจะทำให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (Dehydroalanine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆเกิดเป็นสารประกอบหลายชนิด เช่น lysinoalanine และLanthionine เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญและสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย (Kristinsson และ Rosco, 2000)

โดยกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทในระดับอุตสาหกรรมจะนำโปรตีนจากพืชมาทำปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรดที่อุณหภูมิ 100 - 125°C ภายใต้ความดันปกติหรือความสูง

เวลาที่ใช้น้อยอยู่กับชนิดของโปรตีนและความดัน หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นลง นำของผสมที่ได้ไปทำให้เย็น แล้วจึงเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปเพื่อปรับให้มี pH 5-6 (ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและกลีนิรสที่ต้องการ) นำของผสมที่ได้เข้าเครื่องกรองเพื่อกำจัดสาร Humin ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายและขั้นตอนการปรับ pH โดยทริปโตเฟนไทโรซีน ซิสทีน ฟีนิลอะลานีน เมไทโอนีน และอาร์จินีน เป็นกรดอะมิโนที่มีส่วนสำคัญในการเกิดสาร Humin หลังจากนั้นนำของผสมที่ได้มาทำให้เข้มข้นมากขึ้น จะทำให้เกลือและกรดอะมิโนที่ไม่ละลายตกตะกอนออกมา นำเข้าเครื่องกรองอีกครั้งแล้วนำส่วนใสที่ได้ไปรวมกับสารให้กลีนิรสอื่นๆ หลังจากนั้นผ่านเข้าขั้นตอนการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีจำหน่ายทั่วไป ส่วนมากจะอยู่ในรูปผง นอกจากนี้อาจจะผลิตในรูปของเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว (ของแข็งทั้งหมด 82-89%) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการของตลาด (Manley & Fagerson, 1971) ข้อได้เปรียบของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรด คือ ต้นทุนในการผลิตต่ำ ระยะเวลาในการผลิตสั้น ได้กลีนิรสที่ดีและเข้มข้น แต่ข้อเสีย คือ มีปริมาณเกลือสูงประมาณ 40% (Aaslyng et al., 1998) และเกิดสาร 3-monochloropropanediols (3-MCPD) ซึ่งจัดเป็นสารพิษที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในร่างกาย

Jantawat และคณะ, 1998 รายงานว่าการกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในสัดส่วนที่ต่ำ จะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนอิสระและเกิดการสะสมของกรดอะมิโน แต่ทว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกในสัดส่วนที่มากขึ้นจะทำให้กรดอะมิโนบางส่วนถูกดึงหมู่อะมิโนจากโมเลกุลออก (Deamination) และเป็นผลให้เกิดการลดลงของระดับอะมิโนไนโตรเจนทั้งหมด เช่นเดียวกับสัดส่วนอะมิโนไนโตรเจนกับไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งส่งผลให้ได้รับคะแนนด้านกลีนิรสที่ดีกว่าและนอกจากนี้แอมโมเนียซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการทำลายโครงสร้างกรดอะมิโนจะทำให้เกิดกลิ่นคุณภาพต่ำลง ในขณะที่เดียวกับการใช้อุณหภูมิที่สูงร่วมกับการย่อยด้วยกรดจะทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของกรดอะมิโนด้วย

มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อลดการปนเปื้อนของสารดังกล่าว โดยมีหลายแนวทาง คือ

- การย่อยสลายไปการใช้วัตถุดิบที่มีไขมันน้อย เช่น การใช้แบ่งหัวเหลืองที่มีการสกัดไขมันออกแล้ว
- การปรับลดปริมาณกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิต
- ปรับเปลี่ยนวิธีการผลิตโดยใช้เอนไซม์แทนกรดเกลือ

7.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

ใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลง และกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมากและสามารถย่อยโปรตีนในสภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้กรดหรือด่าง การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic group) ในโมเลกุลโปรตีน เช่น Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine และ Valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้นี้จะเกิดน้อยลง เพราะสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดรสขมจึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยโปรตีน (Kristinsson et al. Rosco, 2000)

กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นเทคนิคที่ใช้สภาวะการย่อยที่อ่อนกว่ากรด โดยการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5-7 ขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ที่จะแตกพันธะเปปไทด์ของแหล่งโปรตีน ด้วยการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่มีขายทางการค้า เช่น Flavourzyme, Alcalase, Trypsin, Bromelain นอกจากนี้การย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ได้มีข้อดีเพียงการลดการผลิตสารก่อมะเร็งให้น้อยลงเมื่อเทียบกับวิธีการที่ใช้สารเคมี แต่ยังให้ความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาและเกิดการกำจัดหมู่อะมิโนได้ในสภาวะที่ต่ำลง ด้วย pH ที่เป็นกลางและที่อุณหภูมิห้อง (Sonklin et al., 2011)

หลักการสำคัญของการย่อยสลายโปรตีน คือ เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติหน้าที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ความคงตัวและกลิ่นรส ดังนั้นจึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ สภาวะในการย่อยสลาย ได้แก่ pH อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ เป็นต้น

เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนและชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดอื่นๆ กล่าวคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์หลายล้านเท่า ด้วยปริมาณเอนไซม์ระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยเอนไซม์ชนิดที่เป็นโปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลท ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยจะตัดพันธะเปปไทด์ได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งประเภทได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์และการแบ่งตาลกลไกการทำงาน

การแบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวพอลิเปปไทด์ แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

7.2.1 เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่า อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase) ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase)

7.2.2 เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่ของโมเลกุลโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเซตรที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี, 2547) เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากด้านใน ส่วนเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้านนอก (Adler-Nissen, 1986) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) ของปฏิกิริยา (ปราณี, 2543)

กลไกการทำงานแบ่งได้ 4 ประเภท ดังนี้

1. ซีรีนโปรติเอส (Serine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (Alkali protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 7.0-11.0 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซีรีล (Seryl residue) และหมู่อิมิดาโซล (Imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟฟลูออไรด์ (di-Isopropyl phosphofluoride) ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่อิโตรอกซิลของอนุมูลเซรีลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Elastase, Thrombin และ Trypsin เป็นต้น

2. ซัลไฮดริลโปรติเอส (Sulhydryl protease) หรือซิสเตอีนโปรติเอส (Cysteine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอส (Neutral protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.0-7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยสารซัลไฮดริล (Sulhydryl reagent) ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและอาจสูญเสียแอกติวิตีไปในที่สุด เอนไซม์กลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Bromelain และ Papain เป็นต้น

3. เมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอสมี pH ที่เหมาะสมคือ 7.8 เป็นพวกเอกซ์โซเปปติเดส เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอ็อกซิเจนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือรวมในปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน โดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับอ็อกซิเจนของโลหะ (Metal chelating agent) เช่น 1,10 - Phenanthroline และ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น Carboxypeptidase A, Carboxypeptidase B, Carnosinase และ Prolidase เป็นต้น

4. แอสพาติกโปรติเอส (Aspartic protease) เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นคาร์บอกซิลโปรติเอส (Carboxyl protease) และเอซิดโปรติเอส (Acid protease) มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 2.0-4.0 มีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุโมเลกุลกรดแอสพาติก 2 อนุโมเลกุลอยู่ในบริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยเปปสแตติน (Pepstatin) เอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น Pepsin และ Rennin เป็นต้น (Whitaker, 1994 อ้างถึง โดย ธนยพร, 2550)

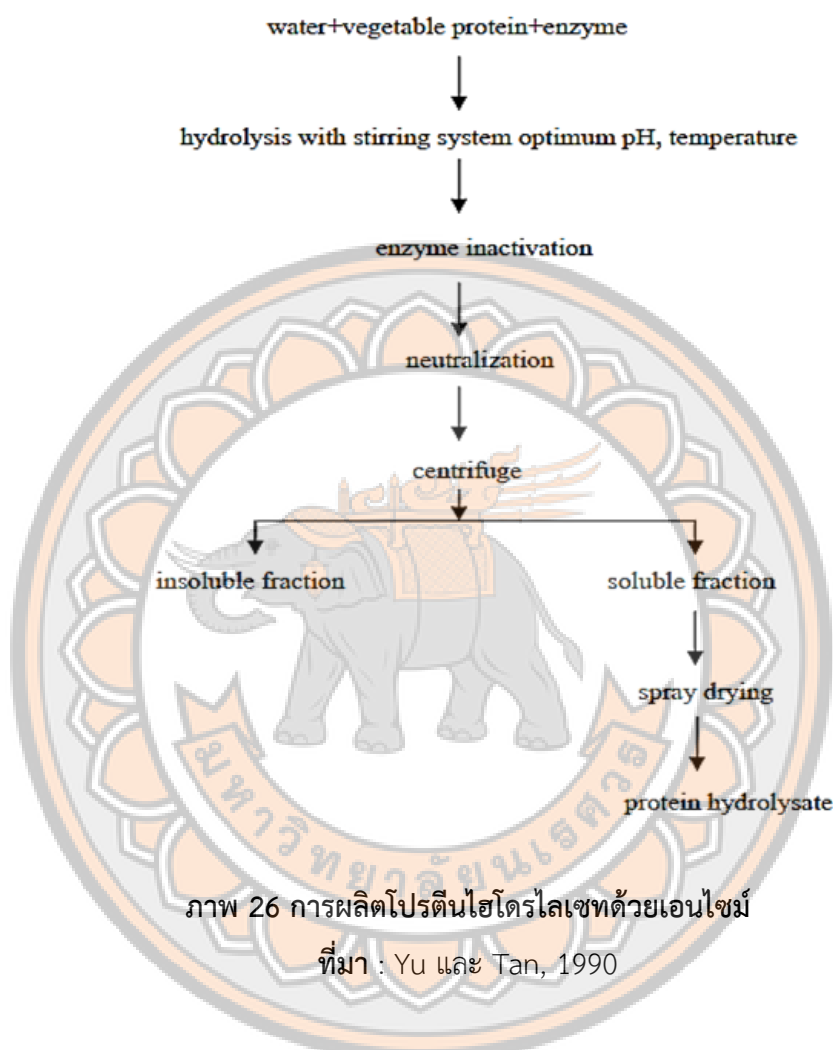
ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนแตกต่างกัน เช่น

1. Alcalase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60°C และมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8-8.5 (Anonymous, 2000)

2. Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้อาจมีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50°C ที่ pH ในช่วง 5-7 (Anonymous, 2000)

3. Neutrase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55°C ที่ pH ในช่วง 5.5-7 (Anonymous, 2000) การย่อยสลายโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายคือ โปรติเอส ซึ่งมีชื่อทางการค้าได้แก่ Flavourzyme, Alcalase, Novozymes, Cucurbita, Pomiferin, Hieronymin, Trypsin, Papain และ Bromelain (Kong et al., 2008) ซึ่งมีข้อดีคือไม่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งและให้สารให้กลิ่นรสที่หลากหลาย แต่พบว่ามีข้อเสียคือโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ อาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (สุปราณี, 2539) โดยเมื่อทำการย่อยสลายแล้วจะได้กรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นจำนวนมาก ซึ่งในปฏิกิริยามอลาร์ด

กรดอะมิโนและเปปไทด์จะก่อให้เกิดสารให้กลิ่นรส ซึ่งกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์



เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนพบว่า ผลผลิตที่ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนอิสระรวมทั้งกลุ่มของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ฟอสเฟต และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น (Whitaker, 1994) เอนไซม์ที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะแตกต่างกัน

Chuan และคณะ, 2009 พบว่าหากใช้เอนไซม์ต่างชนิดกันจะส่งผลต่อปริมาณเปปไทด์ที่ผลิตได้ โดยทดสอบจากการนำเอนไซม์ชนิดต่างๆมาทำการย่อยสลายโปรตีนจากป่านเพื่อผลิตโปรตีนไอโซเลท (Hemp protein isolate : HPI) ดังแสดงดังภาพ 4 ซึ่งพบว่าร้อยละการย่อยสลาย จะสูงมากใน 2 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นจะเริ่มมีร้อยละการย่อยสลายลดลง โดยพบว่าเอนไซม์ Alcalase และ Pepsin ปริมาณเปปไทด์

เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงแรก และตามมด้วยเอนไซม์ Protamex และ Neutrase และเอนไซม์ Flavourzyme และ Trypsin จะเพิ่มขึ้นช้าที่สุด และเมื่อเวลาในการย่อยสลายผ่านไป 2-4 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการย่อยสลายจะลดลง อีกทั้งการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำให้รสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้มีรสชาติแตกต่างกัน

7.3 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

เป็นดัชนีที่ใช้บ่งชี้ระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความสะดวก ความเหมาะสม และระดับความละเอียดและเที่ยงตรงที่ต้องการ การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดการวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ (Free α -amino group) และการไทเทรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา (Silvestre, 1997)

7.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ในโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic : TCA) สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธี Kjeldhal การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet : UV) ของเปปไทด์ที่มีหมู่แวนและ การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-700 นาโนเมตร หลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยาไบยูเรต (Biuret) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (1) (Silvestre, 1997)

$$DH = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนหลังการตกตะกอนด้วย TCA} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \quad (1)$$

7.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ

โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธีไทเทรต (Formal titration) ซึ่งจะใช้สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วไทเทรตด้วยสารละลายเบส โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ (เปลี่ยนสีที่ pH 9.2) อัตราส่วนระหว่างแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free α -amino nitrogen) กับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถประมาณค่าระดับการย่อยโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้นอกจากนี้สารประกอบที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่อะมิโน เช่น Ninhydrine, Trinitrobenzen Sulfonic acid (TNBS), Polychroniadou, Fluorescamin และ

Orthiphtaldehyde (OPA) ก็สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน โดยวิธีเก่าแก่ที่สุดคือการใช้ Ninhydrine เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะได้สารประกอบสีน้ำเงินเข้ม โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงแต่มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น สารเคมีที่ใช้ต้องออกซิเจน มีการรบกวนจากแอมโมเนีย ค่าที่ได้จากแปลงค่าสูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Moore และ Stein, 1948) ส่วน TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ Primary amino group ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับโปรตีนไฮโดรไลเสท แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย Picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ Proline และ Hydroxyproline และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับ Amino group ของ Lysine ได้ (ธัญพร, 2550) สารประกอบอีกสองชนิด คือ Fluorescamin และ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี Fluorometry ซึ่งวิธีจะให้ความไวสูง แต่มีข้อเสีย คือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียรต่ำ (Church et al., 1985) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (2)

$$DH = \frac{(Lt - L0)}{(Lmax)} \quad (2)$$

Lt= ปริมาณ α -amino acid ที่เวลา t

L0= ปริมาณ α -amino acid เริ่มต้น

Lmax= ปริมาณ α -amino acid หลังจากการย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

7.3.3 การไตเตรทโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (pH-stat)

ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย ซึ่งทำให้หมู่อะมิโนหลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสทลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วย Sodium hydroxide หรือ Calcium hydroxide โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา (3) (ธัญพร, 2550)

$$DH = B \times Nb \times 1/Mb \times 1/\alpha \times 100/h_{tot} \quad (3)$$

B = ปริมาณเบสที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Nb= ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)

Mb= มวลของโปรตีน (กรัม)

$1/\alpha$ = ค่า Calibration สำหรับ pH-stat

h_{tot} = จำนวนพันธะเปปไทด์ในโปรตีน

วิธีการนี้จะใช้ในการวัดระดับการย่อยโปรตีนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพแต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะเป็นค่าสัมพัทธ์และหากต้องการความถูกต้องแม่นยำจะต้องตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เช่น TNBS หรือ OPA (Silvestre, 1997 อ้างถึงโดย ฉันทพร, 2550)

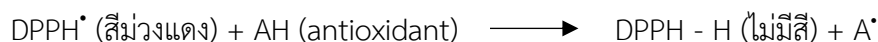
8. กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสท

8.1 หลักการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกที่ซับซ้อนและสามารถแสดงออกได้หลายรูปแบบ ดังนั้น การประเมินศักยภาพของสารสกัดหรือสารตัวอย่างจึงจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่หลากหลาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและสะท้อนกลไกการทำงานในมิติต่างๆ การใช้วิธีทดสอบเพียงวิธีเดียวอาจไม่เพียงพอในการสรุปคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยรวมได้ (Vinha et al., 2013) โดยวิธีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในงานวิจัยด้านอาหารและโภชนาการมีดังนี้:

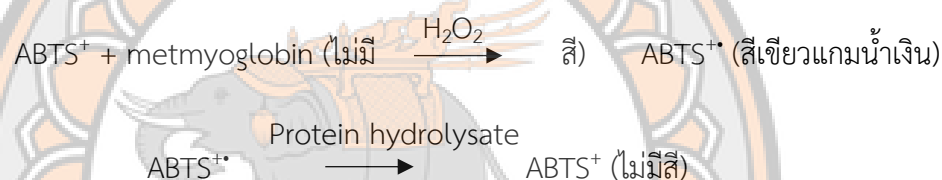
8.1.1 DPPH radical scavenging method

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrozyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทมีหลักการ คือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันจะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH มีความเสถียร เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลงซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul et al., 2007) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้



8.1.2 ABTS free radical scavenging method

ABTS⁺ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกเกิดจากสาร ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) ถูกออกซิไดส์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้กลายเป็น ABTS^{•+} (อนุมูลอิสระ) ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ใช้ทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ อัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลง ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้ (Landrault et al., 2001)



8.1.3 FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) method

เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) โดยรวมของสารตัวอย่าง ผ่านความสามารถในการรีดิวซ์ Ferric ion (Fe^{3+}) ในสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{3+} -TPTZ) ให้กลายเป็น Ferrous ion (Fe^{2+}) ซึ่งจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีน้ำเงินเข้ม สามารถตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร วิธีนี้มีความเรียบง่ายและทำซ้ำได้ดี แต่มีข้อจำกัดในการตรวจจับสารที่ทำปฏิกิริยาช้า เช่น สารประกอบไทออล

8.1.4 Total Phenolic Content (TPC) method

เป็นการวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิในพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลในสภาวะต่าง เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 765 นาโนเมตร ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกที่วัดได้มักมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

8.1.5 Total Flavonoid Content (TFC) method

เป็นการวัดปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะ ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยที่สำคัญของสารประกอบฟีนอลิก โดยอาศัยหลักการที่อะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) สามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองกับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 510 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบจากวิธีต่างๆ เป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยยืนยันกลไกการออกฤทธิ์ เช่น งานวิจัยของ Vinha et al. (2013) ที่ศึกษาในสารสกัดอะโวคาโด พบว่าปริมาณ TPC และ TFC มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้จากวิธี DPPH และ FRAP ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารหลักที่รับผิดชอบต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ การพบความสัมพันธ์ที่ตรงกันระหว่างผลจากหลายๆ การทดสอบจะช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับข้อสรุปของงานวิจัยได้อย่างมาก

8.2 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนเข้มข้น

โปรตีนเข้มข้น (Protein Concentrates) เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ผ่านการแปรรูปเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนโดยการกำจัดไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่นๆ ออกจากวัตถุดิบ โดยทั่วไปจะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 65-90% ของน้ำหนักแห้ง โปรตีนในสภาวะดั้งเดิมมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในระดับพื้นฐานอยู่แล้ว ซึ่งเกิดจากสองปัจจัยหลัก:

1. องค์ประกอบของกรดอะมิโน: กรดอะมิโนบางชนิดมีโครงสร้างที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น tyrosine, tryptophan, histidine, cysteine และ methionine อย่างไรก็ตาม ในโครงสร้างโปรตีนที่พับตัวสมบูรณ์ กรดอะมิโนเหล่านี้ส่วนใหญ่มักจะถูกฝังอยู่ภายใน ทำให้แสดงฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ (Sbroggio et al., 2016)

2. สารประกอบฟีนอลิกที่จับกับโปรตีน: ในระหว่างกระบวนการสกัดโปรตีนจากพืช สารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงตามธรรมชาติ สามารถเข้ามาจับกับโมเลกุลของโปรตีนได้ ทำให้โปรตีนเข้มข้นที่สกัดได้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากถั่วลิสง พบว่าเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL แสดงกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและความสามารถในการรีดิวซ์ที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ โดยแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Nwachukwu et al., 2016)

8.3 การเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein Hydrolysates) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์หรือกรด-ด่าง ทำให้เกิดเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่มีขนาดเล็กลง การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปลดปล่อยและเพิ่มศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญ ผ่านกลไกหลายประการ:

1. การเพิ่มการเปิดเผยของกรดอะมิโน: การย่อยโปรตีนเป็นการตัดสายโพลีเปปไทด์ให้สั้นลง ทำให้โครงสร้างคลายตัวออกและเปิดเผยกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเคยถูกฝังอยู่ภายในออกมาสู่ภายนอก
2. ขนาดโมเลกุลที่เล็กลง: เปปไทด์สายสั้นที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก ทำให้เคลื่อนที่ได้คล่องตัวและสามารถเข้าถึงอนุมูลอิสระได้ง่ายกว่าโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่มีการกีดขวางเชิงพื้นที่สูง
3. การสร้างหมู่ฟังก์ชันใหม่: การตัดพันธะเปปไทด์ทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล (C-terminus) และหมู่อะมิโน (N-terminus) ใหม่ขึ้นมา ซึ่งหมู่เหล่านี้มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะและมีส่วนช่วยในกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้

การศึกษาการไฮโดรไลซิสโปรตีนเวย์ด้วยเอนไซม์ต่างๆ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมด้วยเอนไซม์ corolase (WPH~C~) แสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (1.42 ± 0.12 μM Trolox/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเข้มข้นเวย์ (WPC) (0.19 ± 0.01 μM Trolox/mg protein) การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระนี้เกิดจากการเปิดเผยหมู่ reactive groups ในระหว่างการไฮโดรไลซิส (Mann et al., 2015)

8.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซต

8.4.1 ชนิดของเอนไซม์และระดับการไฮโดรไลซิส

การศึกษาการไฮโดรไลซิสโปรตีนจาก Okara ด้วยเอนไซม์ Alcalase และ Flavourzyme พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จาก Alcalase มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า Flavourzyme โดยโปรตีนที่ไฮโดรไลซิสด้วย Alcalase (A5) ที่ระดับการไฮโดรไลซิส (DH) 33.6% แสดงค่า FRAP สูงถึง 684.9 μM Trolox ในขณะที่ Flavourzyme (F5) ที่ DH 5.8% แสดงค่า FRAP 360.3 μM Trolox ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของระดับการไฮโดรไลซิสส่งผลให้กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Sbroggio et al., 2016)

8.4.2 ชนิดของโปรตีนและประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิส

การศึกษาการไฮโดรไลซิสโปรตีนจากข้าวหักด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่า chymotrypsin มีประสิทธิภาพสูงสุด (DH 22.50%) รองลงมาคือ alkaline protease (DH 20.17%) และ neutral protease (DH 18.70%) ตามลำดับ การเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมมีผลสำคัญต่อการได้เปปไทด์ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูง (Ren et al., 2016)

8.4.3 ระยะเวลาการไฮโดรไลซิสและขนาดของเปปไทด์

การศึกษาผลของระยะเวลาไฮโดรไลซิสต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระพบว่าระยะเวลาการไฮโดรไลซิสมีผลต่อทั้งขนาดของเปปไทด์และกิจกรรมทางชีวภาพ เปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (tri- และ dipeptides) และกรดอะมิโนอิสระที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสอย่างเข้มข้นมักจะสามารถในการเข้าถึงอนุมูลอิสระ ABTS ที่ละลายน้ำได้ดีกว่า DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระที่ไม่ชอบน้ำ (Sbroggio et al., 2016)

8.5 ผลของการย่อยในระบบทางเดินอาหารต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ sweet whey ก่อนและหลังการย่อยในระบบทางเดินอาหารเทียม พบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างหลังการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างมากไม่ว่าจะใช้วิธีใดในการวิเคราะห์ กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ sweet whey เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ SW-D > SW-D-P3 > SW ($p < 0.05$) กระบวนการย่อยมีผลเชิงบวกต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ sweet whey โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2-4 เท่าในการทดสอบ

ABTS, FRAP และ P-FRAP หลังการย่อยในระบบทางเดินอาหารเทียม ขณะที่การทดสอบ ORAC-FL แสดงการเพิ่มขึ้นที่มากกว่านั้น โดยค่า ORAC เพิ่มขึ้น 8 เท่า จาก 20.5 เป็น 167.2 $\mu\text{mol TE/g protein}$ (Dalaka et al., 2023)

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนแหล่งต่างๆ เช่น โปรตีนเคซีนในนม โปรตีนข้าวโพด โปรตีนไข่แดง โปรตีนกลุ้มเนื้อปลา โปรตีนจากกลุ้มเนื้อหมู โปรตีนซีรัมอัลบูมินจากเลือดวัว คอลลาเจน โปรตีนเวย์ โปรตีนกลูเตนจากแป้งสาลี และโปรตีนจากถั่วหลายชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Zhang et al., 2009) โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สภาวะในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน ชนิดของโปรตีน ระดับการย่อย องค์ประกอบของกรดอะมิโนและเปปไทด์ การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทจะมีปัจจัยหลายประเภทที่มีอิทธิพลต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร เช่น สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น เนื่องจากอิทธิพลดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีทดสอบเพียงวิธีเดียวในการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารใดๆได้ วิธีที่ใช้การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี

สุภาวดี, 2550 ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์ พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยและจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีแนวโน้มให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

9. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองและ Okara

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลืองมีความสำคัญที่จะต้องพิจารณา เนื่องจากคุณสมบัติเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ความแตกต่างในโครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองส่งผลต่อฟังก์ชันการทำงานที่แสดงออกเมื่อรวมเข้ากับระบบการผลิตอาหาร การทำงานของโปรตีน

ได้รับอิทธิพลจากการรวมกันของคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และโครงสร้างของโปรตีน (ปัจจัยภายใน) และปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยภายในเหล่านี้กับสภาพแวดล้อม (ปัจจัยภายนอก) ในระหว่างกระบวนการผลิต (Damodaran, 1994) ปัจจัยภายในนั้นรวมถึงขนาดโปรตีน รูปร่าง ความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำ และองค์ประกอบของกรดอะมิโน ตลอดจนโครงสร้างโครงสร้างของโปรตีน ปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของโปรตีนในระบบอาหาร ได้แก่ อุณหภูมิ pH ความแรงของไอออนิก และปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับส่วนประกอบอาหารอื่นๆ เช่น น้ำ ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โปรตีนจากถั่วเหลืองหลัก glycinin 11S (52%) และ β -conglycinin 7S (35%) (Hettiarachchy และ Kalapathy, 1998 ; Riblett et al., 2001) มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพแตกต่างกัน เช่นเดียวกับความสามารถในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลง ในสภาวะการผลิต เช่น ค่า pH อุณหภูมิ และความแข็งแรงของไอออนิกเนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้าง ตัวอย่างเช่น โปรตีน 7S (β -conglycinin) มีกลุ่มซีสเทอีนเพียง 2 - 3 กลุ่มต่อโมลโดยไม่มีพันธะซัลไฟด์ที่ชัดเจน และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย คือ 180 kDa ในขณะที่โปรตีน 11S (glycinin) มีกลุ่มไธอไซลไฟต์ 18 - 20 กลุ่มที่มีโมเลกุลเฉลี่ย น้ำหนัก 340 kDa เป็นผลให้น้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นและกลุ่มไธอไซลไฟต์ของglycinin มีส่วนช่วยในการสร้างเจลที่ดีขึ้นด้วยความชื้นที่เพิ่มขึ้น (Utsumi et al., 1997) ในทางกลับกัน β -conglycinin ซึ่งไม่มีพันธะซัลไฟด์และมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า ทำให้เกิดเจลที่อ่อนแอและโปร่งใส (Maruyama et al., 1999 ; Maruyama et al., 2002) คุณสมบัติเหล่านี้ของ β -conglycinin มีส่วนช่วยในการเพิ่มคุณสมบัติของอิมัลชันและการเกิดโฟม (Utsumi et al., 1997) Garcia และคณะ, 1997 ระบุว่าความสามารถในการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความหนืด การเกิดเจล การเกิดโฟม และการเป็นอิมัลชัน เป็นฟังก์ชันที่สำคัญของโปรตีนถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับการใช้อาหาร

9.1 คุณสมบัติการละลาย

ความสามารถในการละลายของโปรตีนได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นของโปรตีนในของเหลวหรือตัวทำละลาย และเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาในการประยุกต์ใช้กับอาหาร เนื่องจากอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติการทำงานอื่นๆ ของโปรตีน (Hailing และ Walstra, 1981 ; Vojdani, 1996) นี่เป็นเพราะว่าโปรตีนจะต้องละลายได้เมื่อรวมเข้ากับระบบอาหารเพื่อให้เกิดโฟมการทำอิมัลชัน และความสามารถในการจับกับน้ำและน้ำมัน รวมทั้งความเสถียรของความหนืด ซึ่งนำไปสู่การก่อตัวของระบบอาหารที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ โกลบูลินจากถั่วเหลือง ซึ่งส่วนใหญ่เป็น 7S (β -conglycinin) และ 11S (glycinin) เป็นโปรตีนสะสมที่มีมากที่สุดในถั่วเหลือง โกลบูลินจากถั่วเหลืองสามารถละลายได้ในสารละลายเจือจางของเกลือที่เป็นกลาง แต่ไม่ละลายในน้ำ เนื่องจากความแรงของไอออนิกเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการละลายของ

โปรตีนถั่วเหลือง โกลบูลินจากถั่วเหลืองละลายได้ดีกว่าที่ pH ห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริกซึ่งอยู่ที่ประมาณ pH 4.5-4.8 ซึ่งแสดงความสามารถในการละลายสูงสุด นี่หมายความว่าความสามารถในการละลายของถั่วเหลืองโกลบูลินขึ้นอยู่กับค่า pH ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถถูกลดทอนได้โดยการทำให้เป็นกรด (Wagner & Anon, 1990 ; Ma et al., 1996) ผ่านการให้ความร้อน โปรตีนไฮโดรไลเซตของ Okara มีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีน Okara อาจเกิดการเสียสภาพอันเป็นผลมาจากการให้ความร้อนอย่าง รุนแรงในระหว่างการผลิตนมถั่วเหลือง (Chan และ Ma, 1999a) การให้ความร้อนเป็นการบำบัดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนใหญ่ และส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโกลบูลินในขณะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ สิ่งนี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการพิจารณาความสามารถในการละลายของแหล่งโปรตีนชนิดใหม่เพื่อให้แน่ใจว่าการใช้ประโยชน์อย่างประสบความสำเร็จในอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไป การหาค่าความสามารถในการละลายโปรตีนทำได้โดยการวัดเศษส่วนของโปรตีนที่ละลายได้หลังจากที่นำสารละลายทั้งหมดไปใช้กับแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง

การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์บางส่วนสามารถใช้เพื่อปรับปรุงความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลือง (Jung et al., 2005 ; Tsumura et al., 2005 ; Kempka et al., 2014) ความสามารถในการละลายโปรตีน Okara ได้รับการปรับปรุงโดยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์บางส่วนโดยใช้ Flavouzyme ได้ถึง 46% เมื่อเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซ์ (Kempka et al., 2014) การเพิ่มความสามารถในการละลายของ โปรตีนไอโซเลท Okara (OPI) สามารถทำได้โดยการเพิ่มระดับของ deamidation ผ่านการดัดแปลงด้วยกรด (Chan และ Ma, 1999b) แนวทางนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำ Okara ไปใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหารได้

9.2 คุณสมบัติการเป็นอิมัลชัน

ความสามารถของโปรตีนจากพืชในการทำให้อิมัลชันคงตัวมีความสำคัญมากในผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่น นมอิมัลชันไฟเออร์ แป้งเค้ก มายองเนส น้ำสลัด ของหวานแช่แข็ง มาการีน เนย และแฟรงค์เฟิร์ต (Singh et al., 2008) เป้าหมายหลักของการเพิ่มอิมัลซิไฟเออร์คือการปรับปรุงการสร้างอิมัลชันและความเสถียร (Hasenhuettl และ Hartel, 2008) การศึกษาคุณสมบัติของอิมัลชันของ glycinin และ β -conglycinin พบว่า β -conglycinin สามารถสร้างอิมัลชันที่เสถียรมากกว่า glycinin อาจเป็นเพราะขนาดโมเลกุลที่ต่ำกว่าและความสามารถในการไม่ชอบน้ำที่สูงกว่า glycinin (Hayakawa และ Nakai, 1985) Aoki และคณะ, 2006 แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทำให้เป็นอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันของเศษส่วนที่อุดม

ด้วย β -conglycinin นั้นสูงกว่าของส่วนที่อุดมด้วย glycinin เนื่องจากอัตราการดูดซับที่ส่วนต่อประสานมีผลต่อการเกิดอิมัลชันของ glycinin จึงถูกดูดซับอย่างซ้ำๆ เนื่องจากการมีอยู่ของพันธะไดซัลไฟด์ทั้งระหว่างและในหน่วยย่อย ซึ่งชะลอการคลี่ออกของกรดอะมิโนของ glycinin ที่ส่วนต่อประสาน (McClements, 2004) การมีประจุสุทธิที่สูงขึ้นใน glycinin อาจทำให้เกิดแรงผลักที่สูงขึ้นระหว่างโมเลกุลที่มีประจุรอบๆ ส่วนต่อประสาน ซึ่งอาจทำให้เกิดการดูดซับซ้ำลงในภายหลัง นี่แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของโปรตีนทั้งสองจะมีผลต่อคุณสมบัติของอิมัลชันของส่วนผสมโปรตีนถั่วเหลือง การปรับสภาพด้วยกรดสามารถปรับปรุงกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน แต่ไม่ส่งผลต่อดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (Chan & Ma, 1999b) อย่างไรก็ตาม Fierens และคณะ, 2016 เสนอแนะว่า ความคงตัวของอิมัลชันของ OPI สามารถปรับปรุงได้ด้วยการผ่านเอนไซม์ไฮโดรไลซิส และเอนไซม์ที่สามารถให้ผลผลิตไฮโดรไลเซตที่สูงขึ้นได้ รวมถึงเอนไซม์ Alcalase และ Esperase เชิงพาณิชย์ ผลลัพธ์นี้ตรงกันข้ามกับการค้นพบของ Chan และ Ma (1999a) ซึ่งใช้ Trypsin ในการไฮโดรไลซ์ OPI

9.3 คุณสมบัติการเกิดโฟม

คุณสมบัติการเกิดโฟมหรือฟอง มีความสำคัญมากในการใช้งานอาหารบางชนิด เพื่อให้ได้เนื้อสัมผัสที่ต้องการ อาหารและเครื่องดื่มอัดลมบางชนิดที่ต้องใช้สารทำให้เกิดฟองเพื่อให้ได้คุณภาพที่ต้องการซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ได้แก่ ไอศกรีม วิปครีม ขนมปัง เค้ก ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เมอแรงค์ ช็อกโกแลตแท่ง มาร์ชเมลโล่ แชมเปญ และเบียร์ (Campbell & Mougeot, 2000 ; Green et al., 2013) Foamability ซึ่งเป็นประสิทธิภาพของการห่อหุ้มด้วยแก๊ส และความเสถียรของโฟม ซึ่งเป็นอายุการใช้งานของโฟม เป็นคุณสมบัติการเกิดฟองที่แยกจากกันสองประการและต้องพิจารณาในการประยุกต์ใช้กับอาหาร (Wilde และ Clark, 1996) OPI ที่อุณหภูมิการสกัดที่ 80 และ 25°C แสดงความคงตัวของฟองได้สูงกว่าโปรตีนไอโซเลทถั่วเหลืองในเชิงพาณิชย์ (Supro 610) (Ma et al., 1996) เนื่องจาก OPI อาจมีรูปแบบที่เหมาะสมกว่าในด้านคุณสมบัติการเกิดฟอง ซึ่งโมเลกุลโปรตีนของ OPI อาจมีความหนาแน่นของประจุสุทธิที่สูง ความหนาแน่นของประจุสุทธิสามารถส่งผลต่อความเสถียรของการเกิดฟองได้โดยการทำให้เกิดฟิล์มที่มีความหนืดสูง และต่อมาทำให้เกิดโฟมที่มีความเสถียรสูง (Nakai, 1983 ; Maeda et al., 1991 ; Phillips et al., 1994) การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของ OPI นั้นไม่ได้ช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดฟอง (Fierens, 2016) คุณสมบัติของการเกิดฟอง (ทั้งความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง) นั้นลดลงหลังจากการไฮโดรไลซ์ OPI ด้วยทริปซิน (Chan & Ma, 1999a)

9.4 คุณสมบัติการจับน้ำและไขมัน

คุณสมบัติในการกักเก็บน้ำหมายถึง ความสามารถของโปรตีนที่สามารถกักเก็บน้ำและไขมันไว้ได้โดยไม่ละลาย คุณสมบัติทั้งสองนี้เกิดจากการดักจับทางกายภาพของน้ำหรือไขมัน สิ่งเหล่านี้เป็นตัวแปรสำคัญในอาหารที่ต้องการการปรับปรุงเนื้อสัมผัส เช่น เนื้อหมัก แป้งอบ และ แป้งอัดรีด คุณสมบัติในการกักเก็บน้ำของ OPI (4.3 มล./กรัม – 5.1 มล./กรัม) จากการใช้วิธีการสกัดด้วยต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไอโซเลทถั่วเหลืองเชิงพาณิชย์ Supro 610 (5.2 มล./กรัม) (Ma et al., 1996) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรไลซิสสามารถปรับปรุงคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำ แต่ไม่สามารถช่วยในการจับกับไขมันได้ (Chan & Ma, 1999a) Vishwanathan และคณะ, 2011 รายงานว่า สามารถปรับปรุงทั้งคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำและไขมันของ OPI โดยให้ OPI กรองผ่านเมมเบรนเพื่อกำจัดสารที่ไม่ใช่โปรตีน Ma และคณะ, 1996 รายงานว่า OPI มีคุณสมบัติในการจับไขมันที่สูงกว่า Supro 610 และการdeamidation ไม่ได้เปลี่ยนคุณสมบัติในการจับไขมันของ OPI เนื่องจากไม่ก่อให้เกิด ผลกระทบต่อความหนาแน่นรวมของ OPI



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. Okara สด (Fresh Okara)

Okara สด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท แดรี่ พลัส จำกัด ตำบลม่วงหัก อำเภอยะหริ่ง นครสวรรค์ 60130 เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง โดย Okara ที่ได้มาเป็นวัตถุดิบที่ยังคงสภาพความสดใหม่ และมีปริมาณความชื้น $75.49 \pm 0.23\%$ บนเกณฑ์น้ำหนักเปียก (wet basis) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al. (2021) ที่รายงานว่า Okara สดมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 73-84%

การเก็บรักษาและขนส่ง:

การเก็บตัวอย่าง Okara สดดำเนินการครั้งละ 70-100 กิโลกรัม เพื่อให้เพียงพอต่อการใช้ในการทดลองตลอดระยะเวลาการวิจัย การขนส่งจากโรงงานผลิตไปยังคณะเกษตรศาสตร์ฯ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้รถยนต์ส่วนตัวเป็นระยะทาง 157 กิโลเมตร ใช้เวลาเดินทางประมาณ 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิเพื่อรักษาคุณภาพของวัตถุดิบ

เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ ดำเนินการแบ่งบรรจุ Okara สดลงในถุงโพลีเอทิลีนแบบซิปล็อค (zip-lock polyethylene bags) ขนาดบรรจุถุงละ 1.0 กิโลกรัม เพื่อลดการสัมผัสกับอากาศ และป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C ตามมาตรฐาน AOAC (2019) จนกว่าจะนำไปใช้ในกระบวนการทำแห้งและการทดลองต่อไป

2. Okara แห้ง (Dried Okara)

Okara แห้งที่ใช้ในการวิจัยเตรียมจาก Okara สด ผ่านกระบวนการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ SNOL รุ่น 60/300 LSN11 ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 8 - 10 ชั่วโมง จนได้ปริมาณความชื้นสุดท้าย $2.69 \pm 0.15\%$ บนเกณฑ์น้ำหนักเปียก (wet basis) อุณหภูมิที่เลือกใช้อิงตามการศึกษาของ Ostermann-Porcel et al. (2017) ที่พบว่าอุณหภูมิ 60°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการรักษาคุณภาพของโปรตีนและสารประกอบทางชีวภาพใน Okara

การเตรียมตัวอย่าง:

หลังจากกระบวนการอบแห้งแล้ว นำ Okara แห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (sample mill) ยี่ห้อ DXFILL รุ่น MACHINE DXM-2000 ที่ความเร็วรอบ 25,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงสแตนเลสขนาด 50 mesh ($300\ \mu\text{m}$) เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่

สม่ำเสมอและเหมาะสมต่อการสกัดโปรตีน ตามแนวทางของ Ma et al. (1997) ที่แนะนำว่าการใช้ขนาดอนุภาค 50 mesh จะให้ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนที่เหมาะสมที่สุด

ตัวอย่าง Okara แห่งที่ผ่านการเตรียมแล้วจะถูกเก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันความชื้นที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบต่างๆ และกระบวนการสกัดโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

3. คุณลักษณะเบื้องต้นของ Okara

Okara เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตนมถั่วเหลือง ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายน้ำของถั่วเหลือง ได้แก่ เยื่อใยอาหาร โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า Okara แห่งที่ใช้ในการวิจัยมีลักษณะเป็นผงสีครีมอ่อน มีกลิ่นหอมคล้ายถั่วเหลือง ไม่มีกลิ่นอับหรือเหม็นหืน แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของวัตถุดิบอยู่ในสภาพที่ดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการทดลอง

มาตรฐานการคัดเลือกวัตถุดิบ:

- ปริมาณความชื้นของ okara สดไม่เกิน 80%
- ไม่มีเชื้อราหรือการเน่าเสีย
- สีและกลิ่นปกติ ไม่มีกลิ่นเหม็นหืน
- เก็บรักษาภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลา
- ได้รับจากแหล่งผลิตที่มีมาตรฐานสุขอนามัย

การเลือกใช้ Okara เป็นวัตถุดิบในการวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ที่มีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือก มีปริมาณโปรตีนประมาณ 30-40% ของน้ำหนักแห้ง และยังมีสารประกอบทางชีวภาพอื่นๆ ที่มีประโยชน์ เช่น ไอโซฟลาโวน และเยื่อใยอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับแนวโน้มการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในปัจจุบัน

เอนไซม์

1. เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ฟิซ จากบริษัท แวลู อินดัสเตรียล โปรดักส์ จำกัด

1.1 Cellulase 20,000 u/ml (CMC) ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesi* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50°C

1.2 Pectinase ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดสรรจากการหมักแบบ liquid submerged มี แอกติวิตีของ esterase, hydrolases และ lyases สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ เอนไซม์ pH 3.5 ที่อุณหภูมิ 50°C

1.3 Xylanase 2,00,000 u/g ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดสรรจากการหมักแบบ liquid submerged สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50°C

1.4 Viscozyme เอนไซม์ ผสมประกอบด้วย Arabanase, Cellulase, Beta-glucanase, Hemicellulase, และ Xylanase จากเชื้อรา *Aspergillus aculeatus* กิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า หรือเท่ากับ 100 FBG/g, อุณหภูมิที่เหมาะสม 45 °C, ค่า pH ที่เหมาะสม 5.0)

2. เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีน จาก Xingtai Sinobest Biotech Co., Ltd.

2.1 Alcalase 100,000 u/g ถึง 400,000 u/g ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 55°C

2.2 Flavourzyme 60,000 u/g ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 50°C

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Sodium hydroxide, AR grade, RCI Labscan
2. Folin-ciocalteu, AR grade, Fluka
3. Sodium carbonate, AR grade, RCI Labscan
4. Gallic acid, AR grade, Sigma-Aldrich
5. Sodium nitrite, AR grade,
6. Aluminium Chloride, AR grade,
7. Quercetin, AR grade, Sigma-Aldrich
8. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), AR grade, Sigma-Aldrich
9. Methanol, AR grade, RCI Labscan
10. Sodium acetate, AR grade, RCI Labscan
11. Acetic acid glacial, AR grade, RCI Labscan
12. 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ), AR grade, Sigma-Aldrich
13. Hydrogen chloride, AR grade, RCI Labscan
14. Ferric chloride, AR grade, RCI Labscan

15. Potassium persulphate, AR grade, Sigma-Aldrich
16. Ethanol, AR grade, RCI Labscan
17. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) , AR grade, Sigma-Aldrich
18. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(Tolox) , AR grade, Sigma-Aldrich
19. Potassium dihydrogen phosphate, AR grade, Sigma-Aldrich
20. Acetone, AR grade, RCI Labscan
21. Sulfuric acid, AR grade, RCI Labscan
22. Boric acid, AR grade, RCI Labscan
23. Petroleum ether, AR grade, RCI Labscan
24. Potassium hydroxide, AR grade, RCI Labscan
25. Dichloran Rose Bengal Chloramphenical Agar (DRBC), Merck
26. Plate count agar, Merck
27. Peptone water, Merck

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

1. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, ED2244S)
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดย pH meter (Consort, C 830)
3. เครื่องวัดสี (Hunter Lab, DP 9000)
4. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Buchi, E-816 SOX)
5. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Distillation : Gerhardt รุ่น Vapodest/ Digestion : Gerhardt)
6. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (LABCONCO, 266853)
7. เครื่องวิเคราะห์เถ้า (Fisher, 10-650-126)
8. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo, Genesys 20)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (CRYSTE VARISPIN 15)
10. ตู้บลมร้อน (UMAC, UM-Oven 120 L)
11. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)
12. เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่าง (Elma Schmidbauer รุ่น S30H, 50/60 Hz, 280W)
13. เครื่องบดละเอียดขนาดกลาง (DXFILL MACHINE : DXM-2000;220V;3800W)

14. เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาคในช่วงนาโนเมตร (Malvern รุ่น Zetasizer Nano-ZS ZEN3600)

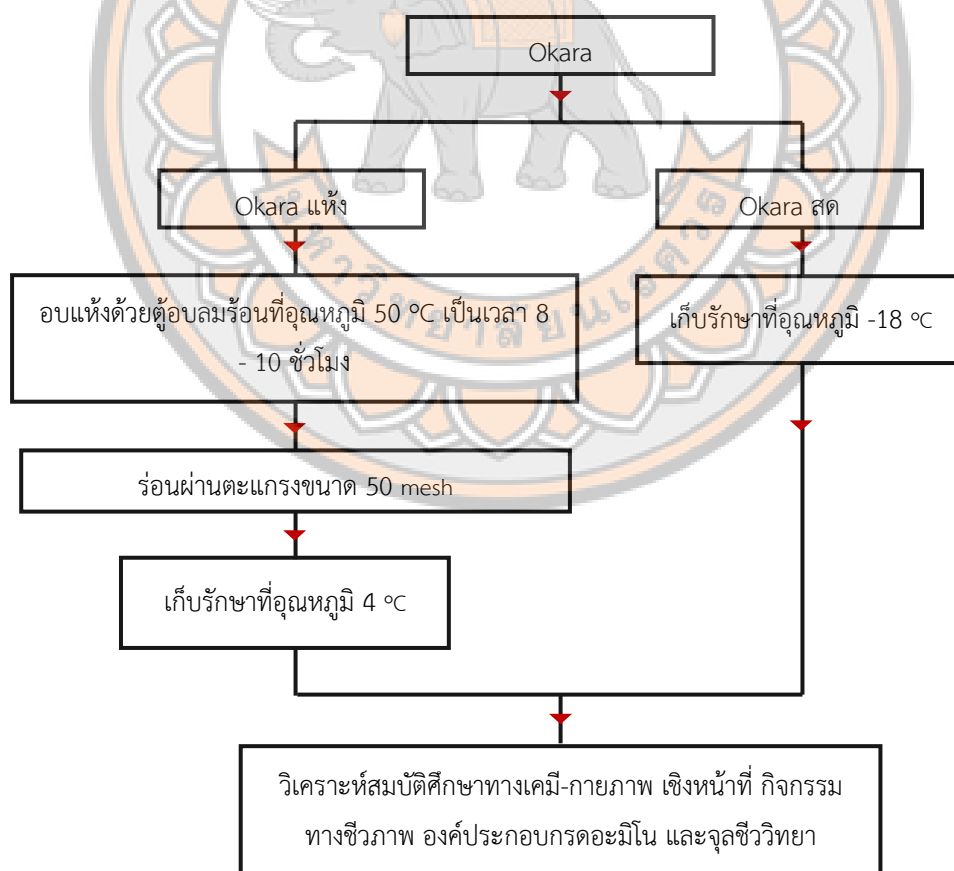


ขั้นตอนและวิธีการดำเนินวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษากระบวนการเตรียม Okara สด/แห้งและการวิเคราะห์

นำ Okara สดมาเตรียมเป็น Okara แห้งเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการทดลอง ด้วยการอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; รุ่น SNOL 60/300) ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 8 - 10 ชั่วโมง เพื่อลดระดับความชื้นให้ต่ำกว่าร้อยละ 5 ตามด้วยการลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องบด (Grinder; รุ่น DXFILL MACHINE: DXM-2000) และร่อนผ่านตะแกรงมาตรฐานขนาด 50 เมช (mesh) จากนั้นบรรจุผง Okara แห้ง ที่ได้ในโพลีเอทิลีนแบบซิปล็อค (zip-lock polyethylene bags) ที่ปิดสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง หลังจากนั้นนำตัวอย่าง Okara ทั้งสองรูปแบบ คือ Okara สด และ Okara แห้ง ที่เตรียมได้ มาดำเนินการวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ เชิงหน้าที่ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ องค์ประกอบกรดอะมิโน และคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 1



ภาพ 27 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 1

การวิเคราะห์ตอนที่ 1

1. สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

1.1 ดัชนีการละลายน้ำ (water solubility index, WSI) และดัชนีการดูดซับน้ำ (water absorption index, WAI) (ตามวิธีของ Anderson และคณะ, 1969)

1.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ (emulsion activity index, EAI) และ การวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsion stability index, ESI) (ดัดแปลงจาก Pearce และ Kinsella, 1978)

1.3 ความสามารถในการเกิดโฟม (foaming activity index, FAI) และความเสถียรของโฟม (foaming stability index, FSI) (ดัดแปลงจาก Sze-Tao และ Sathe, 2000)

1.4 วิเคราะห์ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ด้วยเครื่อง Colorimeter ระบบ CIE Lab*

2. สมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ

2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

2.1.1 ความชื้น (AOAC, 2000)

2.1.2 ไขมัน (AOAC, 2000)

2.1.3 โปรตีน (AOAC, 2000)

2.1.4 เยื่อใย (AOAC, 2000)

2.1.5 เถ้า (AOAC, 2000)

2.1.6 คาร์โบไฮเดรต [คำนวณจาก $100 - (\text{ความชื้น} + \text{ไขมัน} + \text{โปรตีน} + \text{เถ้า})$]

2.2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน วิธีดีฟิฟิเอซ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) (ดัดแปลงจากวิธีของ Brand และคณะ, 1955)

2.2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน (Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) (ตามวิธีของ Benzie และ Strain, 1996)

2.2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก (Metal chelating activity) (ดัดแปลงจากวิธีของ Diniset al, 1994)

2.2.4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents) โดยวิธี Folin-Ciocalteu method และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของ Gallic acid equivalent (ตามวิธีของ Gong และคณะ, 2012)

2.2.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงตามวิธีของ Pourmorad และคณะ, 2006)

3. องค์ประกอบกรดอะมิโน (Amino acid profile) ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) (ตามวิธี Alireza และคณะ, 2020) *อ้างอิงจากมาตรฐานอาหาร FAO/WHO

4. สมบัติจุลชีวะวิทยา

4.1 จำนวนจุลชีวะทั้งหมด (FDA BAM, 2001)

4.2 จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (FDA BAM, 2001)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial experiments in CRD) จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25



ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้น

Okara แห้งผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:10 (%W/V) และ Okara สด 1:1 (%W/V) (อัตราส่วนการผสมทั้งใน Okara แห้งและสด กำหนดโดยให้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด) สกัดโปรตีนโดยการปรับ pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5 และ 12 ด้วย 2 M NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C ที่ระยะเวลา 60 และ 90 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีระยะเวลา 30 นาที นำส่วน Supernatant ตกตะกอนโปรตีนด้วย 2M HCl ที่จุด Isoelectric point หรือ pH การตกตะกอนที่เหมาะสม นำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 นาที นำส่วน Pellet ที่ได้ผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:5 (%W/V) ปรับ pH 7.0 ด้วย 2 M NaOH และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นเก็บโปรตีน Okara เข้มข้น วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (%Protein content โดยวิธี Kjeldahl method) คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมและนำไปใช้ในขั้นตอนที่ 3 และ 4 (มีเกณฑ์คัดเลือกจาก %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield)

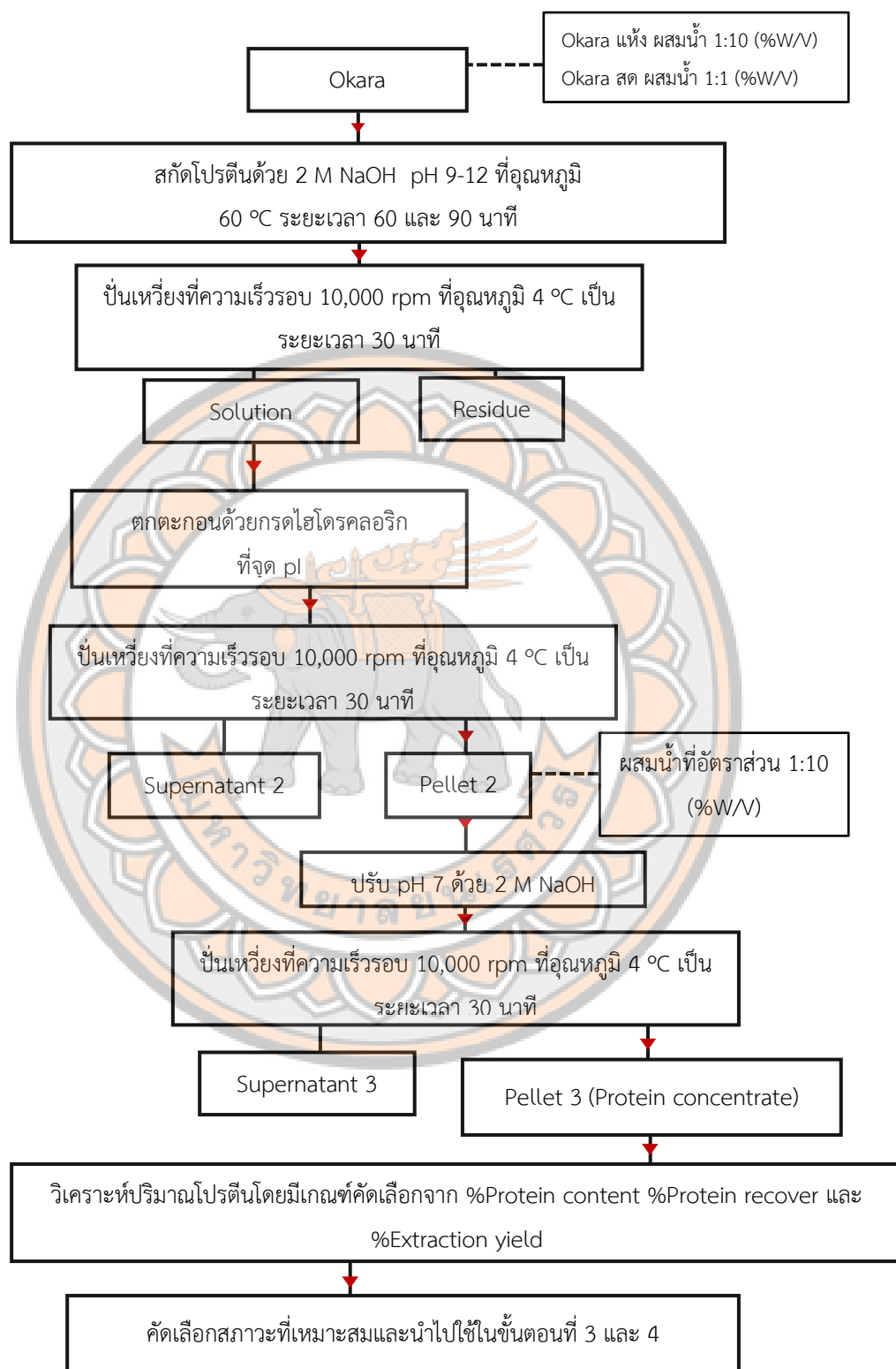
ตาราง 19 แผนการทดลองการศึกษามลของการผลิตโปรตีนเข้มข้น

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	pH สกัด	เวลา (min)	pH ตกตะกอน
Okara แห้ง	1	9	60	pI
	2		90	
	3	9.5	60	
	4		90	
	5	10	60	
	6		90	
	7	10.5	60	
	8		90	
	9	11	60	
	10		90	
	11	11.5	60	
	12		90	
	13	12.0	60	
	14		90	

ตาราง 19 แผนการทดลองการศึกษากลของการผลิตโปรตีนเข้มข้น (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	pH สกัด	เวลา (min)	pH ตกตะกอน
Okara สด	1	9	60	pl
	2		90	
	3	9.5	60	
	4		90	
	5	10	60	
	6		90	
	7	10.5	60	
	8		90	
	9	11	60	
	10		90	
	11	11.5	60	
	12		90	
	13	12.0	60	
	14		90	

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 2



ภาพ 28 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 2

การวิเคราะห์ตอนที่ 2

1. สมบัติทางเคมี (ปริมาณโปรตีน)

1.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (%Protein content โดยวิธี Kjeldahl method) ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Content} = ((\text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทชุดควบคุม (มิลลิลิตร)}) \times \text{ความเข้มข้นของ HCl (N)} \times 14.007 \times \text{แฟกเตอร์แปลงค่าโปรตีน (6.25)}) / (\text{น้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (กรัม)} \times 10)$$

1.2 วิเคราะห์ปริมาณ %Protein recovery ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Recovery} = (\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

1.3 วิเคราะห์ปริมาณ %Extraction yield ในฐานแห้ง

$$\% \text{Extraction Yield} = (\text{น้ำหนักรวมของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{น้ำหนักรวมของวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

2. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial experiments in CRD) จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® statistics version 25

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; 프리처리)

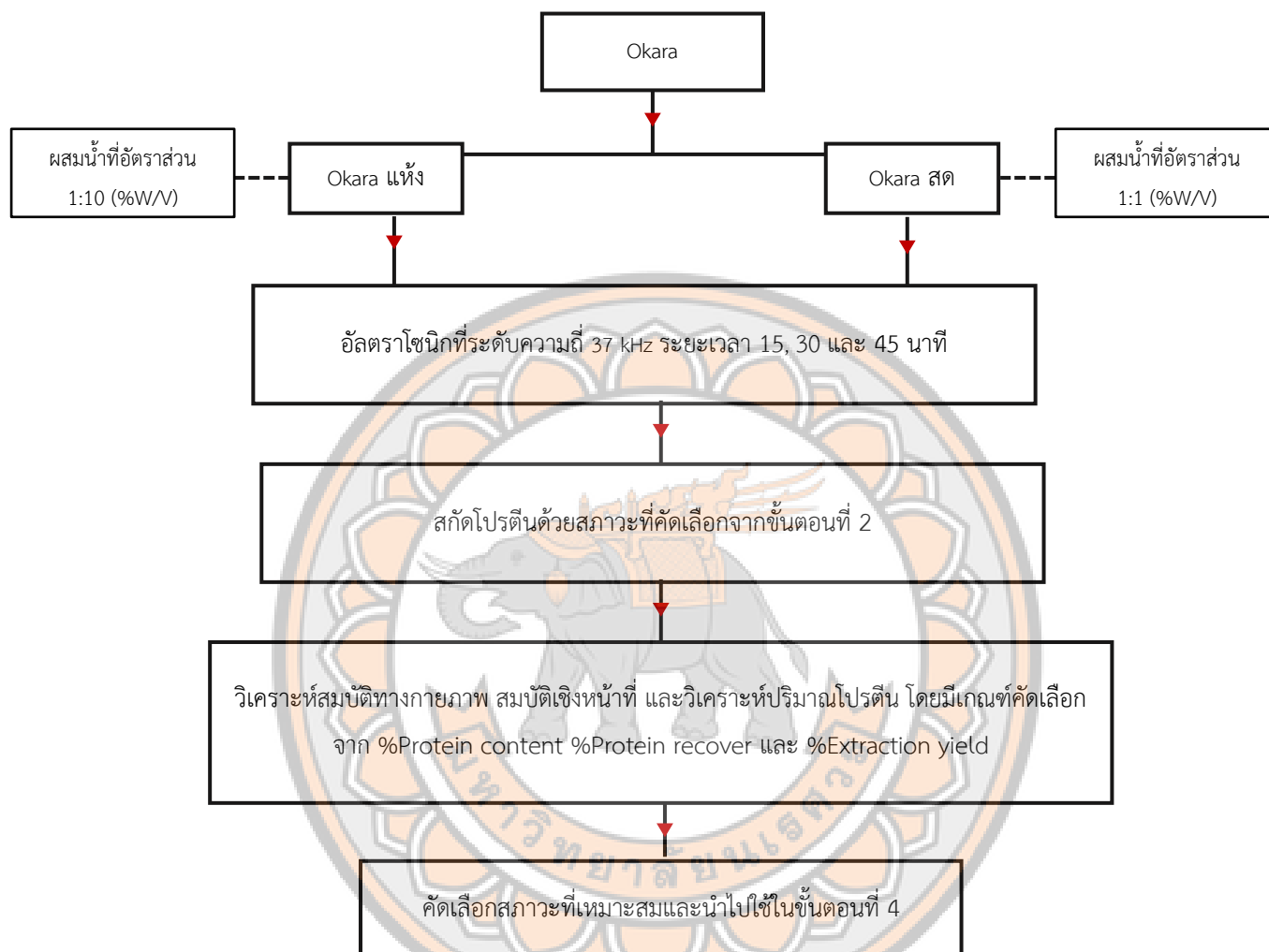
ตอนที่ 3.1 การศึกษาผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น

นำ Okara แห้งผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:10 (%W/V) และ Okara สด 1:1 (%W/V) นำเข้าสู่เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่าง (ยี่ห้อ Elma Schmidbauer GmbH, Germany) ให้คลื่นความถี่ 37 kHz ที่อุณหภูมิ $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลา 15, 30 และ 45 นาที จากนั้นเข้ากระบวนการสกัดโปรตีนด้วยสภาวะที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 2 และเก็บตัวอย่างโปรตีน Okara เข้มข้น วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมและนำไปใช้ในขั้นตอนที่ 4 (มีเกณฑ์คัดเลือกจาก %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield)

ตาราง 20 แผนการทดลองการศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ความถี่ (kHz)	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)
Okara สด	control	-	-	-
	2	-	-	15
	3	37	29 ± 2	30
	4	-	-	45
Okara แห้ง	control	-	-	-
	2	-	-	15
	3	37	29 ± 2	30
	4	-	-	45

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.1



ภาพ 29 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.1

ตอนที่ 3.2 การศึกษาผลกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีน

นำ Okara แห้งผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:10 (%W/V) และ Okara สด 1:1 (%W/V) จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ Cellulase pH 5.0 อุณหภูมิ 50°C, Pectinase pH 3.5 อุณหภูมิ 50°C, Xylanase pH 5.0 อุณหภูมิ 50°C และ Viscozyme pH 5.0 อุณหภูมิ 45°C ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง 1.0, 3.0 และ 5.0 เป็นเวลา 90 และ 120 นาที และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้ากระบวนการสกัดโปรตีนด้วยสภาวะที่คัดเลือกจากตอนที่ 2 และเก็บตัวอย่างโปรตีน Okara เข้มข้น วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมและนำไปใช้ในขั้นตอนที่ 4 (มีเกณฑ์คัดเลือกจาก %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield)

ตาราง 21 แผนการทดลองการศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีน เข้มข้น

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	pH	เวลา (นาที)	ความ เข้มข้นใน ฐานแห้ง (%)
Okara แห้ง	Control	-	-	-	-	-
	1	Cellulase	50	5.0	90	1
	2					3
	3					5
	4				120	1
	5					3
	6					5
	7	Xylanase	50	5.5	90	1
	8					3
	9					5
	10				120	1
	11					3
	12					5

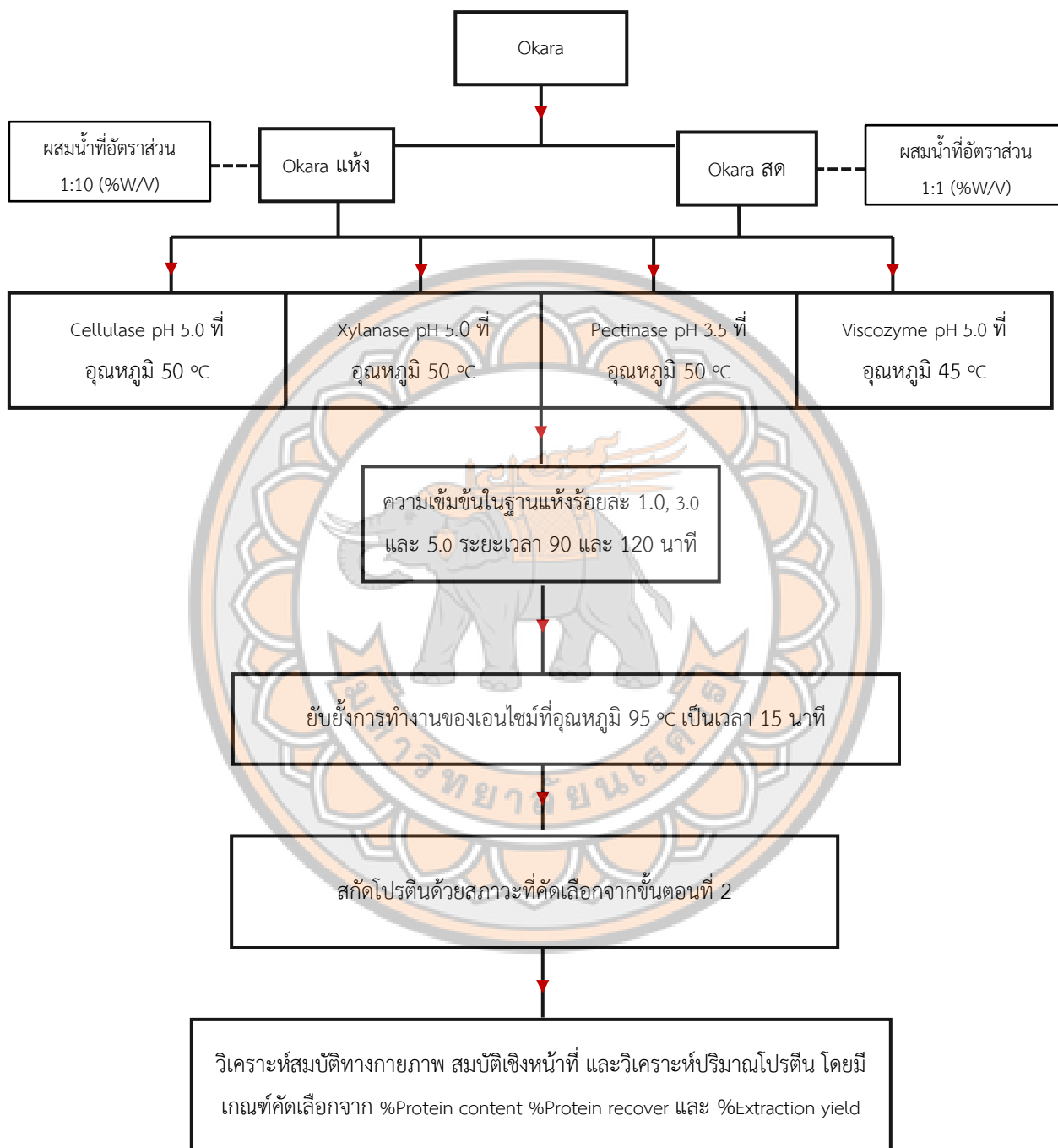
ตาราง 21 แผนการทดลองการศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีน
เข้มข้น (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	pH	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ในฐานแห้ง (%)
Okara แห้ง	13					1
	14				90	3
	15	Pectinase	50	3.5		5
	16					1
	17				120	3
	18					5
	19					1
	20				90	3
	21	Viscozyme	45	5.0		5
	22					1
	23				120	3
	24					5
Okara สด	1					1
	2				90	3
	3	Cellulase	50	5.0		5
	4					1
	5				120	3
	6					5
	7					1
	8				90	3
	9	Xylanase	50	5.5		5
	10					1
	11				120	3
	12					5

ตาราง 21 แผนการทดลองการศึกษาค้นคว้าผลของการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีน
เข้มข้น (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	pH	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น ในฐานแห้ง (%)
Okara สด	13	Pectinase	50	3.5	90	1
	14					3
	15					5
	16				120	1
	17					3
	18					5
	19	Viscozyme	45	5.0	90	1
	20					3
	21					5
	22				120	1
	23					3
	24					5

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.2



ภาพ 30 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 3.2

การวิเคราะห์ตอนที่ 3

1. สมบัติทางกายภาพ

ศักย์ซีตาและขนาดอนุภาค (Zeta potential and particle size)

2. สมบัติทางเคมี (ปริมาณโปรตีน)

2.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (%Protein content โดยวิธี Kjeldahl method) ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Content} = ((\text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทชุดควบคุม (มิลลิลิตร)}) \times \text{ความเข้มข้นของ HCl (N)} \times 14.007 \times \text{แฟกเตอร์แปลงค่าโปรตีน (6.25)}) / (\text{น้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (กรัม)} \times 10)$$

2.2 วิเคราะห์ปริมาณ %Protein recovery ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Recovery} = (\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

2.3 วิเคราะห์ปริมาณ %Extraction yield ในฐานแห้ง

$$\% \text{Extraction Yield} = (\text{น้ำหนักรวมของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{น้ำหนักรวมของวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

3. สมบัติเชิงหน้าที่

3.1 ความสามารถในการละลายน้ำ (Solubility)

3.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลชัน (emulsion activity index, EAI) และการวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsion stability index, ESI)

3.3 ความสามารถในการเกิดโฟม (foaming activity index, FAI) และความเสถียรของโฟม (foaming stability index, FSI)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial experiments in CRD) จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

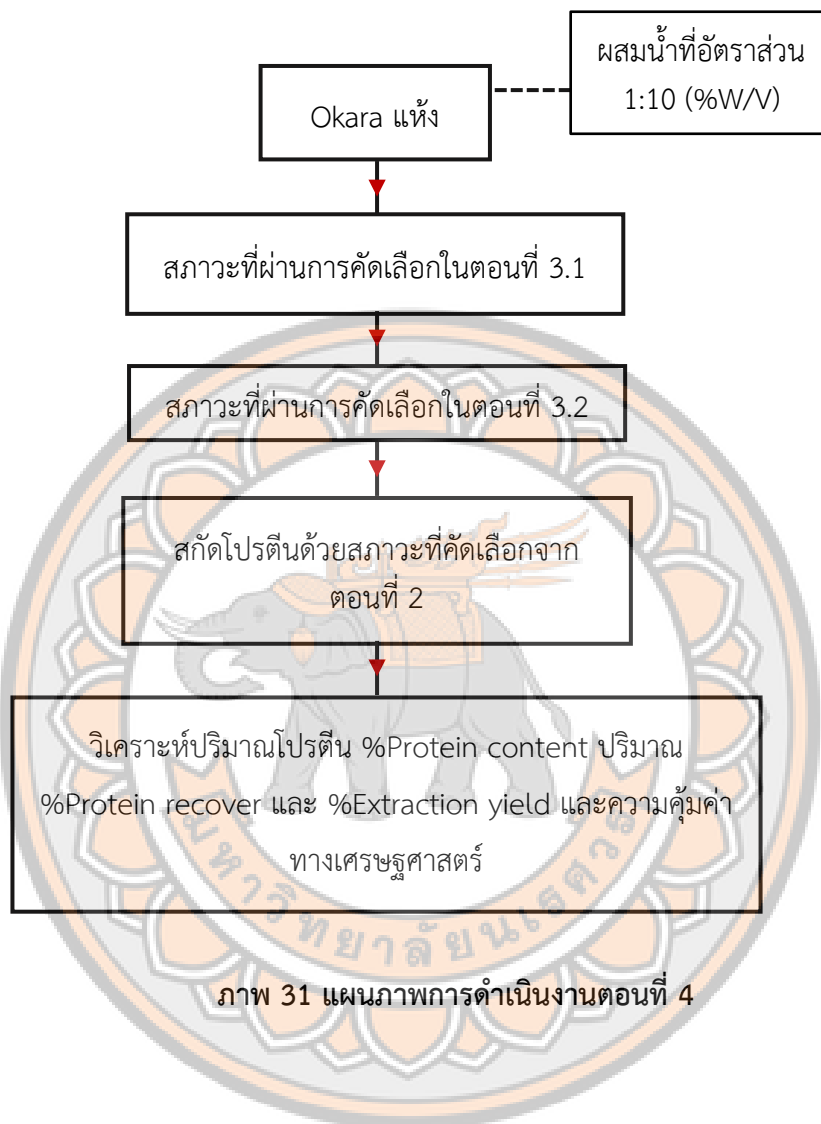
ตอนที่ 4 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการฟัรทรีทเม้นท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

Okara ผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:10 (%W/V) นำมาทำลายผนังเซลล์โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกร (ยี่ห้อ Elma Schmidbauer GmbH, Germany, S 30 H) ที่คลื่นความถี่ 37 kHz อุณหภูมิ 29 ± 2 °C ตามระยะเวลาที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.1 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.2 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้ากระบวนการสกัดโปรตีนด้วยสภาวะที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 2 และเก็บตัวอย่างโปรตีนเข้มข้นจากวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน มีเกณฑ์คัดเลือกจาก %Protein content %Protein recovery และ ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

ตาราง 22 แผนการทดลองการศึกษาผลของการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังกระบวนการฟัรทรีทเม้นท์

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	สภาวะคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.1	สภาวะคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.2	สภาวะสกัดโปรตีนคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 2
	Control	-	-	
	1	อัลตราโซนิกร 45 นาที	-	
	2	-	Xylanase 5%, 90 นาที	
	3	-	Viscozyme 3%, 90 นาที	
Okara แห้ง	4		Xylanase 3%, 90 นาที	
	5		Xylanase 3%, 120 นาที	pH 11.5, 90 นาที
	6		Xylanase 5%, 90 นาที	
	7	อัลตราโซนิกร 45 นาที	Xylanase 5%, 120 นาที	
	8		Viscozyme 3%, 90 นาที	
	9		Viscozyme 3%, 120 นาที	
	10		Viscozyme 5%, 90 นาที	
	11		Viscozyme 5%, 120 นาที	

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 4



ภาพ 31 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 4

การวิเคราะห์ตอนที่ 4

1. สมบัติทางเคมี (ปริมาณโปรตีน)

1.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (%Protein content โดยวิธี Kjeldahl method) ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Content} = ((\text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรทชุดควบคุม (มิลลิลิตร)}) \times \text{ความเข้มข้นของ HCl (N)} \times 14.007 \times \text{แฟกเตอร์แปลงค่าโปรตีน (6.25)}) / (\text{น้ำหนักตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (กรัม)} \times 10)$$

1.2 วิเคราะห์ปริมาณ %Protein recovery ในฐานแห้ง

$$\% \text{Protein Recovery} = (\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

1.3 วิเคราะห์ปริมาณ %Extraction yield ในฐานแห้ง

$$\% \text{Extraction Yield} = (\text{น้ำหนักรวมของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (กรัม)} / \text{น้ำหนักรวมของวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}) \times 100$$

2. การวิเคราะห์ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

2.1 ศึกษาสมดุลมวลสาร (Mass balance)

2.2 ศึกษาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial experiments in CRD) จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

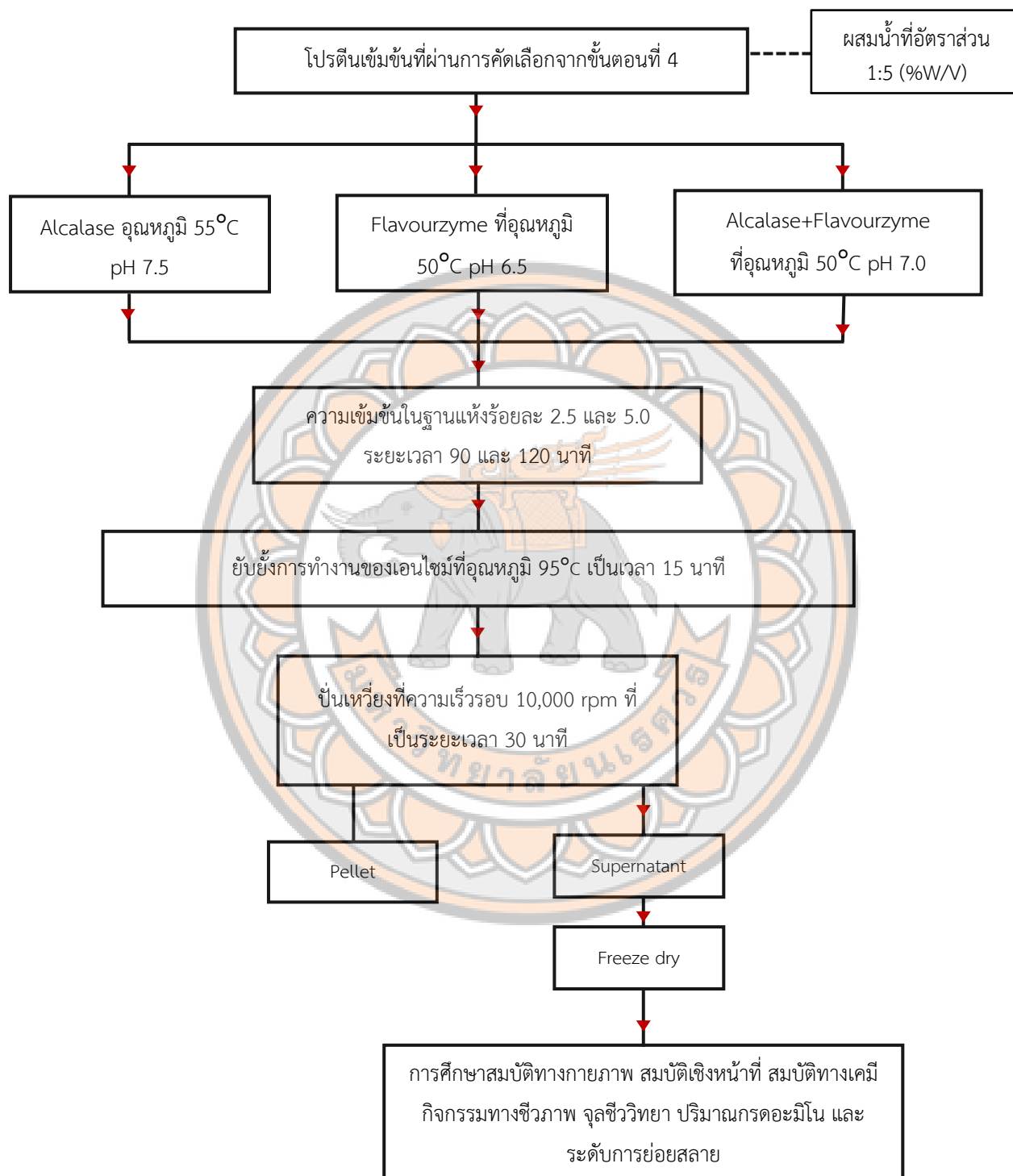
ตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์โปรติเอส

นำโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 4 ผสมน้ำที่อัตราส่วน 1:5 (%W/V) เข้ากระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ Alcalase ที่อุณหภูมิ 55°C pH 7.5, Flavourzyme ที่อุณหภูมิ 50°C pH 6.5 และ Alcalase + Flavourzyme ที่อุณหภูมิ 50°C pH 7.0 ที่ความเข้มข้นในฐานแห้งร้อยละ 2.5 และ 5.0 ระยะเวลา 90 และ 120 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วน Supernatant ทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมและ วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ สมบัติทางเคมี กิจกรรมทางชีวภาพ สมบัติจุลชีววิทยา ปริมาณกรดอะมิโน และระดับการย่อยสลาย

ตาราง 23 แผนการทดลองการศึกษาผลของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์โปรติเอส

จำนวน ตัวอย่าง	สภาวะคัดเลือกจาก ขั้นตอนที่ 4	เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	pH	เวลา (min)	ความเข้มข้น ในฐานแห้ง (%)
1	-	Alcalase	55	7.5	90	2.5
2	-					5.0
3	-				120	2.5
4	-					5.0
5	-	Flavourzyme	50	6.5	90	2.5
6	-					5.0
7	-				120	2.5
8	-					5.0
9	-	Alcalase	50	7.0	90	2.5
	-	+				
10	-	Flavourzyme			120	2.5
	-					

แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 5



ภาพ 32 แผนภาพการดำเนินงานตอนที่ 5

การวิเคราะห์ตอนที่ 5

1. สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

1.1 ความสามารถในการละลายน้ำ (Solubility)

1.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ (emulsion activity index, EAI) และการวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsion stability index, ESI)

1.3 ความสามารถในการเกิดโฟม (foaming activity index, FAI) และความเสถียรของโฟม (foaming stability index, FSI)

1.4 วิเคราะห์ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ด้วยเครื่อง Colorimeter ระบบ CIE Lab*

2. สมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ

2.1 องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

2.1.1 ความชื้น (AOAC, 2000)

2.1.2 ไขมัน (AOAC, 2000)

2.1.3 โปรตีน (AOAC, 2000)

2.1.4 เยื่อใย (AOAC, 2000)

2.1.5 เถ้า (AOAC, 2000)

2.1.6 คาร์โบไฮเดรต [คำนวณจาก $100 - (\text{ความชื้น} + \text{ไขมัน} + \text{โปรตีน} + \text{เถ้า})$]

2.1.7 ปริมาณโปรตีน %Protein content ปริมาณ %Protein recover และ %Extraction yield ในฐานแห้ง

2.2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay)

2.2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน (FRAP assay)

2.2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก (Metal chelating activity)

2.2.4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

2.2.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid contents)

3. สมบัติจุลชีววิทยา

3.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA BAM, 2001)

3.2 จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (FDA BAM, 2001)

4. องค์ประกอบกรดอะมิโน (Amino acid profile)

5. ระดับการย่อยสลาย (%Degree of hydrolysis (%DH))

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial experiments in CRD) จำนวนทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25



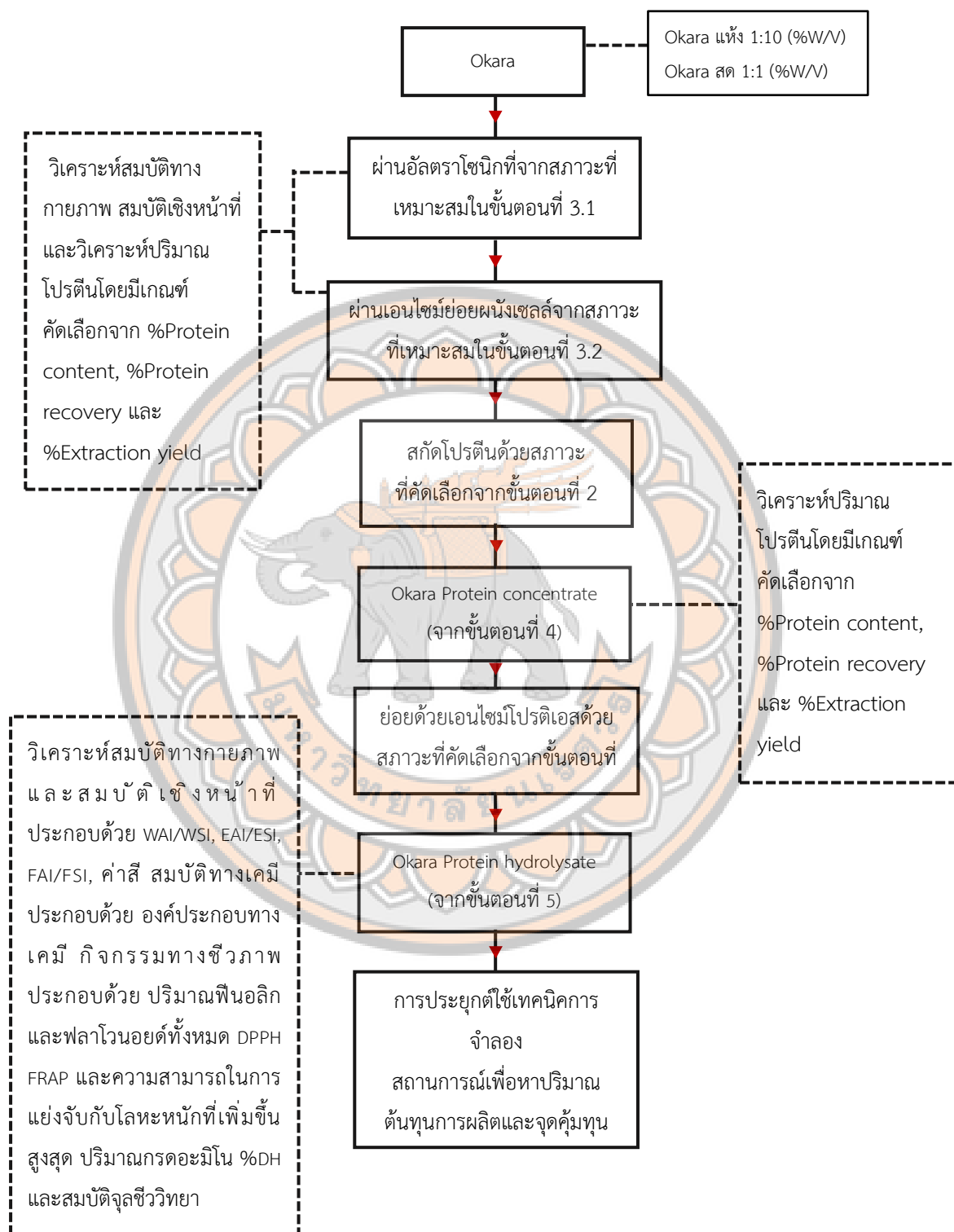
ตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้แบบจำลองสถานการณ์เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก

การทดลองในตอนที่ 6 เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองกระบวนการผลิต (Process Simulation) เพื่อดำเนินการประเมินและเปรียบเทียบความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้นของกระบวนการผลิตโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ในแต่ละสถานะ โดยใช้โปรแกรม SuperPro® Designer เป็นเครื่องมือหลักในการวิเคราะห์ ได้มีการสร้างแบบจำลองแผนผังกระบวนการ (Flowchart) ของแต่ละสถานะการทดลองที่ศึกษาในตอนที่ 2 ถึง 5 (นำเสนอขั้นตอนที่ 5) จากนั้นป้อนข้อมูลที่ได้จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเข้าสู่แบบจำลอง ประกอบด้วยข้อมูลเชิงกระบวนการ (เช่น ปริมาณวัตถุดิบ, ร้อยละผลผลิต, เวลาในการทำปฏิกิริยา) และข้อมูลเชิงเศรษฐศาสตร์ (เช่น ราคาของ Okara, สารเคมี, เอนไซม์, และราคาประเมินของอุปกรณ์ที่ใช้) โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อคำนวณสมดุลมวลสาร (Mass Balance) และประเมินต้นทุนการลงทุน (Capital Cost) และต้นทุนการดำเนินงาน (Operating Cost) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบตัวชี้วัดทางเศรษฐศาสตร์ที่สำคัญ คือ ต้นทุนการผลิตต่อหน่วย (Unit Production Cost) และ อัตราการผลิตต่อปี (Annual Production Rate) เพื่อคัดเลือกกระบวนการที่มีประสิทธิภาพและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์สูงสุด

การวิเคราะห์ตอนที่ 6

1. ศึกษาสมดุลมวลสาร (Mass balance)
2. ศึกษาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer

แผนภาพการดำเนินงานทุกขั้นตอน



ภาพ 33 แผนภาพการดำเนินงานทุกขั้นตอน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

บทนี้จะกล่าวถึงผลการทดลอง ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ตอน ได้แก่ 1) การศึกษากระบวนการเตรียม Okara สดและแห้ง 2) การศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้น 3) การศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; ฟริทท์เม้นท์) 3.1) การศึกษาผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น 3.2) การศึกษาผลกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น 4) การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการฟริทท์เม้นท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 5) การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส 6) การประยุกต์ใช้แบบจำลองสถานการณ์เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษากระบวนการเตรียม Okara สด/แห้งและการวิเคราะห์

1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

1.1 ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพของ Okara สด มีสีขาวครีมถึงเหลืองอ่อน (ภาพ 24) ซึ่งเป็นลักษณะสีที่บ่งชี้ถึง Okara ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน มีปริมาณความชื้นสูงที่ปรากฏเป็นลักษณะเด่นของ Okara สด ซึ่งมีผลต่อความคงตัวของจุลินทรีย์ และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้น เมื่อนำเข้าสู่กระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 8 ถึง 10 ชั่วโมง (ความชื้นไม่เกิน 5%) Okara มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ Okara สด สีของ Okara มีลักษณะเป็นสีเหลืองถึงเหลืองเข้ม (ภาพ 25) ซึ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C สามารถลดความชื้น (2.69 %) ได้ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีไปในทางสีไหม้เกรียม หรือการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่มากเกินไป หลังจากนั้นนำมาบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh เพื่อให้เป็นผงละเอียด (ภาพ 26) เหมาะสำหรับการศึกษาสมบัติศึกษาทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่และกิจกรรมทางชีวภาพ



ภาพ 34 ลักษณะของ Okara สด จาก บริษัท แดรี่ พลัส จำกัด



ภาพ 35 ลักษณะของ Okara หลังจากอบด้วยเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8 ถึง 10 ชั่วโมง



ภาพ 36 ลักษณะของ Okara แห้ง ความชื้น 2.69% ที่ผ่านการบด และร่อนผ่าน ตะแกรงขนาด 50 mesh

1.2 ค่าสี (L^* , a^* , b^*)

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของ Okara ทั้งในสภาพสดและแห้งจากตาราง 24 แสดงให้เห็นว่าค่าสี (L^* , a^* , b^*) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าความสว่าง (L^*) ของ Okara แห้ง (78.65 ± 0.03) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Okara สด (63.03 ± 0.11) การเพิ่มขึ้นของค่า L^* นี้มีสาเหตุหลักมาจากการสูญเสียไอน้ำระหว่างกระบวนการทำแห้ง เนื่องจากการมีอยู่ของน้ำในปริมาณสูงจะทำให้เกิดการหักเหและการกระเจิงของแสง เมื่อปริมาณน้ำลดลงพื้นผิวของตัวอย่างจึงมีความสามารถในการสะท้อนแสงได้มากขึ้น นอกจากนี้การทำแห้งยังส่งผลให้ความเข้มข้นของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำเช่นเยื่อใยอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคของพื้นผิวและเพิ่มความสามารถในการสะท้อนแสงของ Okara แห้ง (Krokida & Maroulis, 1997)

สำหรับค่า a^* ซึ่งแสดงถึงความเป็นสีแดง พบว่า Okara แห้งมีค่า a^* สูงขึ้นเป็น 1.82 ± 0.03 เทียบกับ Okara สดที่มีค่า 0.82 ± 0.09 และค่า b^* ซึ่งแสดงถึงความเป็นสีเหลืองก็มีค่าสูงขึ้นใน Okara แห้งเป็น 18.83 ± 0.08 เมื่อเทียบกับ Okara สดที่มีค่า 14.04 ± 0.10 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานสีแดงและเหลืองที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีหลายชนิดที่เกิดขึ้นพร้อมกันภายใต้อิทธิพลของความร้อนและออกซิเจนจากลมร้อนในระหว่างกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง

ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีประกอบด้วย ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ระหว่างหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนและโปรตีนกับน้ำตาลรีดิวซิง ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ตามธรรมชาติใน Okara ซึ่งเมื่อถูก

ออกซิไดซ์จะเกิดการรวมตัวเป็นสารประกอบควิโนน (quinone compounds) และพอลิเมอร์ที่มีสีเข้มขึ้น และปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) ที่สารประกอบคาร์บอนิลที่ได้จากปฏิกิริยานี้สามารถทำปฏิกิริยาต่อกับโปรตีนและก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์การสลายตัวของเมลานอยดิน (melanoidin) ที่มีสีน้ำตาลและเหลือง (Delfiya et al., 2022; Lewicki, 2004) การสัมผัสกับออกซิเจนในลมร้อนยังเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic browning) และการสลายตัวของโครงสร้างเซลล์ลูลาร์ ส่งผลให้ Okara แห้งมีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีครีมอ่อนเป็นสีเหลืองอ่อนแกมน้ำตาล

กระบวนการทำแห้งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของ Okara อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะความสว่าง (L^*) ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการสูญเสียน้ำ ขณะที่ค่าสีแดง (a^*) และสีเหลือง (b^*) เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีที่ซับซ้อนหลายชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างการอบแห้ง การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อลักษณะปรากฏของ Okara แห้งที่แตกต่างจาก Okara สดอย่างชัดเจน และอาจส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารในอนาคต

ตาราง 24 สมบัติทางกายภาพค่าสี (L^* , a^* , b^*) Hunter lab ของ Okara สดและแห้ง

ค่าสี	Okara แห้ง	Okara สด
L^*	78.65 ± 0.03^a	63.03 ± 0.11^b
a^*	1.82 ± 0.03^a	0.82 ± 0.09^b
b^*	18.83 ± 0.08^a	14.04 ± 0.10^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ

2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่าง Okara สดและ Okara แห้งจากตาราง 25 แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกพารามิเตอร์ ($p < 0.05$) โดยกระบวนการทำแห้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบสำคัญอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ Okara แห้งมีปริมาณความชื้นลดลงอย่างมาก (จาก $75.49 \pm 0.23\%$ เหลือเพียง $2.69 \pm 0.31\%$) ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของสารอาหารอื่นๆ เพิ่มขึ้น ได้แก่ โปรตีน (เพิ่มจาก $10.91 \pm 0.08\%$ เป็น $32.15 \pm 0.19\%$)

ไขมัน (เพิ่มจาก $1.25 \pm 0.44\%$ เป็น $8.66 \pm 0.33\%$) คาร์โบไฮเดรต (เพิ่มจาก $5.81 \pm 0.52\%$ เป็น $42.8 \pm 0.42\%$) และเยื่อใย (เพิ่มจาก $5.68 \pm 0.67\%$ เป็น $10.55 \pm 0.85\%$)

การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญนี้สอดคล้องกับหลักการทำแห้งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีการกำจัดน้ำออกไป ทำให้องค์ประกอบอื่นๆ มีความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งเป็นไปตามที่ Tapia และคณะ (2020) รายงานว่าการลดความชื้นไม่เพียงช่วยยืดอายุการเก็บรักษาโดยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ยังเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารอีกด้วย นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของไขมันใน Okara แห่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Guiné (2018) ที่พบว่ากระบวนการทำแห้งช่วยเพิ่มความเข้มข้นของไขมันในผลิตภัณฑ์จากพืช ส่วนปริมาณโปรตีนที่สูงถึง 32.15% ใน Okara แห่งนั้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงในผลิตภัณฑ์อาหาร สอดคล้องกับงานวิจัยของ García-Alonso และคณะ (2022) ที่ระบุว่า Okara อุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยที่สูงขึ้นใน Okara แห่งสนับสนุนข้อค้นพบของ Li และคณะ (2019) ที่แสดงให้เห็นว่า Okara เป็นแหล่งของใยอาหารที่ดี ซึ่งมีประโยชน์ต่อระบบย่อยอาหารและสุขภาพของระบบหัวใจและหลอดเลือด

ตาราง 25 องค์ประกอบทางเคมีของ Okara สดและแห้ง

องค์ประกอบทางเคมี (% ฐานเปียก)	Okara แห้ง	Okara สด
ความชื้น	2.69 ± 0.31^b	75.49 ± 0.23^a
ไขมัน	8.66 ± 0.33^a	1.25 ± 0.44^b
โปรตีน	32.15 ± 0.19^a	10.91 ± 0.08^b
เถ้า	3.15 ± 0.98^a	0.86 ± 0.12^b
เยื่อใย	10.55 ± 0.85^a	5.68 ± 0.67^b
คาร์โบไฮเดรต	42.8 ± 0.42^a	5.81 ± 0.52^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.2 การศึกษากิจกรรมทางชีวภาพ

จากตาราง 26 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า Okara ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า Okara สดในหลายด้าน เริ่มต้นจากค่า DPPH (IC₅₀) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดในการ

ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่า IC50 ของ Okara อยู่ที่ 6.45 ± 0.01 mg/g ซึ่งต่ำกว่า Okara สดที่มีค่า 15.36 ± 0.005 mg/g การที่ค่า IC50 ต่ำแสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ระบุว่าสารที่มีค่า IC50 ต่ำมักมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (Brand-Williams et al., 1995) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Turkmen และคณะ (2005) ยังพบว่ากระบวนการให้ความร้อนหรือทำแห้งช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักและธัญพืช

สำหรับค่า Fe²⁺ chelating activity ซึ่งใช้วัดความสามารถในการจับโลหะ พบว่า Okara แห้งมีค่า Fe²⁺ chelating ที่ 1.67 ± 0.14 mg ซึ่งสูงกว่า Okara สดที่มีค่าเพียง 1.04 ± 0.67 mg การที่ Okara แห้งมีความสามารถในการจับโลหะเหล็กสูงกว่า พบว่ากระบวนการทำแห้งสามารถเพิ่มศักยภาพในการลดการเกิดออกซิเดชันที่อาจเป็นอันตราย (Dinis et al., 1994)

ในแง่ของค่า TPC (Total Phenolic Content) พบว่า Okara แห้งมีค่า TPC สูงถึง 0.84 ± 0.06 mg GAE/g เมื่อเทียบกับ Okara สดที่มีค่า 0.56 ± 0.11 mg GAE/g ซึ่งแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารฟีนอลิกหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้ง ซึ่งสารฟีนอลิกเป็นที่รู้จักว่ามีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) และผลลัพธ์นี้ยังได้รับการสนับสนุนจากงานของ Zheng และ Wang (2001) ที่ระบุว่าปริมาณสารฟีนอลิกในอาหารส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและลดการเกิดออกซิเดชันในระดับเซลล์

สุดท้าย ค่า TFC (Total Flavonoid Content) ของ Okara อยู่ที่ 2.45 ± 0.32 mg QE/g ซึ่งสูงกว่า Okara สดที่มีค่า 1.54 ± 0.74 mg QE/g ซึ่งบ่งชี้ว่าความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากการทำแห้ง ฟลาโวนอยด์ถือว่าเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันเซลล์จากการถูกทำลาย (Pietta, 2000) การวิจัยของ Heim และคณะ (2002) ยังยืนยันว่าฟลาโวนอยด์มีบทบาทในการช่วยยืดอายุการใช้งานของอาหารโดยการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ไม่พึงประสงค์ในอาหาร ผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า กระบวนการทำแห้งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ Okara ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มุ่งเน้นคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 26 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Okara สดและแห้ง

การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (% ฐานแห้ง)	Okara แห้ง	Okara สด
DPPH ((IC50) (mg/g))	6.45±0.01 ^b	15.36±0.005 ^a
FRAP (mg/g)	11.47±0.58 ^a	4.87±0.18 ^b
Fe2+ chelating (mg)	1.67±0.14 ^a	1.04±0.67 ^b
TPC (mg GAE/g)	0.84±0.86 ^a	0.56±0.11 ^b
TFC (mg QE/g)	2.45±0.32 ^a	1.54±0.74 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

3. ปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid profile)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนใน Okara สดและแห้ง (ตาราง 27) พบว่า Okara ทั้งสองรูปแบบมีกรดกลูตามิก (Glutamic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก โดย Okara แห้งมีปริมาณ 4614 mg/100g และ Okara สดมีปริมาณ 972 mg/100g กรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (non-essential amino acid) แต่มีบทบาทสำคัญในการให้รสชาติอูมามิในอาหาร ซึ่งส่งผลต่อความน่ารับประทาน (palatability) (Yamaguchi & Ninomiya, 2000) นอกจากนี้ กรดกลูตามิกยังเป็นสารตั้งต้นของสารสื่อประสาทกลูตาเมต (glutamate) ในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของสมอง (Fonnum, 1984)

สำหรับกรดอะมิโนจำเป็น พบว่าลิวซีน (Leucine) มีปริมาณสูงที่สุดใน Okara ทั้งสองรูปแบบ โดย Okara แห้งมี 2912 mg/100g และ Okara สดมี 614 mg/100g ลิวซีนเป็นกรดอะมิโนจำเป็นกลุ่ม branched-chain amino acid (BCAA) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อ และลดการสลายโปรตีน (Nair & Short, 2005) จากปริมาณลิวซีนที่สูงนี้ ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของ Okara ในการเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่ต้องการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ หรือผู้สูงอายุที่มักมีการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ รองลงมาคือไลซีน (Lysine) ซึ่ง Okara แห้งมี 2264 mg/100g และ Okara สดมี 477 mg/100g ไลซีนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การสร้างคอลลาเจน และการดูดซึมแคลเซียม (Civitelli & Villareal, 1994)

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Bo Li และคณะ (2012) ที่ศึกษาองค์ประกอบของ Okara พบว่ามีกรดกลูตามิก, แอสพาร์ติก (Aspartic acid), และลิวซีนเป็นกรดอะมิโนหลักเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ แม้ว่างานวิจัยดังกล่าวจะรายงานผลเป็นสัดส่วนต่อโปรตีนทั้งหมด ไม่ใช่

ปริมาณต่อ 100 กรัม ความแตกต่างของหน่วยที่ใช้รายงานนี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโน (เมื่อคิดเป็น mg/100g) มีแนวโน้มจะแตกต่างกัน นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น พันธุ์วัวเหลือง, สภาพแวดล้อมในการปลูก, และกระบวนการผลิตนมถั่วเหลืองที่ต่างกัน ก็อาจส่งผลต่อปริมาณกรดอะมิโนใน Okara ได้เช่นกัน และปริมาณกรดอะมิโนใน Okara สดที่ต่ำกว่า Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญนั้น เป็นผลมาจากปริมาณความชื้นที่สูงใน Okara สด (75.49%) ซึ่งทำให้สัดส่วนของของแข็ง (รวมถึงกรดอะมิโน) ลดลงเมื่อคิดต่อน้ำหนักรวม

ตาราง 27 ปริมาณกรดอะมิโนของ Okara สดและแห้ง

Amino acid	Okara แห้ง	Okara สด
Alanine (mg/100g)	1283 ^a	271 ^b
Aspartic acid (mg/100g)	2331 ^a	491 ^b
Cystine (mg/100g)	596 ^a	126 ^b
Glutamic acid (mg/100g)	4614 ^a	972 ^b
Glycine (mg/100g)	1045 ^a	220 ^b
*Histidine (mg/100g)	1772 ^a	374 ^b
Hydroxylysine (mg/100g)	<20	<5
Hydroxyproline (mg/100g)	<20	<5
*Isoleucine (mg/100g)	1873 ^a	395 ^b
*Leucine (mg/100g)	2912 ^a	614 ^b
*Lysine (mg/100g)	2264 ^a	477 ^b
*Methionine (mg/100g)	327 ^a	69 ^b
*Phenylalanine (mg/100g)	2148 ^a	453 ^b
Proline (mg/100g)	1633 ^a	344 ^b
Serine (mg/100g)	616 ^a	130 ^b
Threonine (mg/100g)	570 ^a	120 ^b
Tryptophan (mg/100g)	408 ^a	86 ^b
Tyrosine (mg/100g)	2042 ^a	430 ^b
*Valine (mg/100g)	1886 ^a	398 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

: * กรดอะมิโนจำเป็น

4. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่

จากการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติเชิงหน้าที่ของ Okara สดและแห้ง (ตาราง 28) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกสมบัติที่ทำการทดสอบ โดย Okara สด มีค่าการดูดซับน้ำ (7.65 ± 0.86 g/g) ต่ำกว่า Okara แห้ง (9.57 ± 0.68 g/g) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่สูงกว่าใน Okara สด ทำให้มีพื้นที่ในการดูดซับน้ำเพิ่มเติมได้น้อยกว่า (Chau & Cheung, 1998) ในทำนองเดียวกัน Okara สด มีค่าการดูดซับน้ำมัน (4.26 ± 0.77 g/g) ต่ำกว่า Okara แห้ง (8.6 ± 0.55 g/g) อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากน้ำใน Okara สด จะไปขัดขวางการจับตัวของน้ำมันกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนและเส้นใย (Liu, 1997)

ในทางตรงกันข้าม Okara สด มีค่าการละลายน้ำ ($22.24 \pm 1.25\%$) สูงกว่า Okara แห้ง ($4.84 \pm 0.06\%$) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบที่ละลายน้ำได้ใน Okara สด เช่น โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบางส่วน ยังไม่เสียสภาพหรือถูกเปลี่ยนแปลงไปมากนัก เมื่อเทียบกับ Okara แห้งที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง ซึ่งอาจทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (denaturation) และลดความสามารถในการละลายน้ำ (Nishinari et al., 2014)

สำหรับความสามารถในการเกิดอิมัลชัน Okara สด ($30.65 \pm 1.06\%$) มีค่าสูงกว่า Okara แห้ง ($20.29 \pm 0.18\%$) อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับความคงตัวของอิมัลชันที่ Okara สด (18.13 ± 0.46 นาที) มีค่าสูงกว่า Okara แห้ง (10.23 ± 0.82 นาที) อย่างมีนัยสำคัญ พบว่าโปรตีนใน Okara สด ยังคงมีคุณสมบัติในการเป็น emulsifier ที่ดีกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนยังไม่เสียสภาพไปมากนักจากกระบวนการทำแห้ง (Kinsella, 1979)

ในส่วนของการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม Okara สด ก็มีค่าสูงกว่า Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญ โดย Okara สด มีค่าการเกิดโฟม $7.45 \pm 1.55\%$ และความคงตัวของโฟม $20.94 \pm 0.33\%$ ในขณะที่ Okara แห้ง มีค่า $2.33 \pm 0.58\%$ และ $3.76 \pm 0.01\%$ ตามลำดับ แสดงว่าโปรตีนใน Okara สด ยังคงความสามารถในการดูดซับที่ผิวสัมผัสอากาศ-น้ำ และสร้างฟิล์มที่แข็งแรงเพื่อรักษาโครงสร้างของโฟมได้ดีกว่า (Damodaran, 1996) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ L'Hocine และคณะ (2006) ที่พบว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่เตรียมด้วยวิธีการที่แตกต่างกันมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่แตกต่างกัน โดยกระบวนการเตรียมมีผลต่อความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของโฟม

ตาราง 28 สมบัติเชิงหน้าที่ของ Okara สดและแห้ง

การทดสอบ	Okara แห้ง	Okara สด
การดูดซับน้ำ (g/g)	9.57±0.68 ^a	7.65±0.86 ^b
การดูดซับน้ำมัน (g/g)	8.60±0.55 ^a	4.26±0.77 ^b
การละลาย (%)	4.84±0.06 ^b	22.24±1.25 ^a
การเกิดอิมัลชัน (%)	20.29±0.18 ^b	30.65±1.06
ความคงตัวของอิมัลชัน (นาท)	10.23±0.82 ^b	18.13±0.46 ^a
การเกิดโฟม (%)	2.33±0.58 ^b	7.45±1.55 ^a
ความคงตัวของโฟม (%)	3.76±0.01 ^b	20.94±0.33 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

5. การศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา

ผลการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของตัวอย่าง Okara สดและแห้ง (ตาราง 29) Okara สด มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด 3.0×10^6 CFU/g ซึ่งสูงกว่า Okara แห้ง (4.3×10^5 CFU/g) การพบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในระดับสูง (Log 6.5) ใน Okara สดนี้ เป็นไปตามที่คาดการณ์ เนื่องจากความชื้นสูงและสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Li et al., 2012) ขณะที่การทำแห้งสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดลงได้ประมาณ 1 log cycle (เหลือ Log 5.6) ผ่านกลไกการลดค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Jay et al., 2005) แม้ว่าค่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดใน Okara แห้งจะยังคงค่อนข้างสูง อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพการทำแห้ง สปอร์ตที่ทนทาน หรือการปนเปื้อนภายหลัง แต่แนวโน้มการลดลงก็เป็นไปตามที่คาดหมาย

สำหรับปริมาณยีสต์และราทั้งหมดพบว่า Okara สดมีค่า 4.2×10^4 CFU/g (Log 4.6) ซึ่งสูงกว่าใน Okara แห้งที่มีค่า 8.7×10^2 CFU/g (Log 2.9) อย่างมีนัยสำคัญ ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำแห้งสามารถลดปริมาณยีสต์และราได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า 1.5 log cycle ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ว่า การลดค่า a_w ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะยีสต์และรา ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับข้อมูลจาก Li และคณะ (2012) ที่ระบุว่า Okara มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย รวมถึงคาร์โบไฮเดรตและเส้นใยซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ค่าปริมาณยีสต์และราทั้งหมดที่ตรวจพบใน Okara แห้ง (Log 2.9) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน

สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารแห้งโดยทั่วไป ซึ่งตามเกณฑ์ของ ICMSF และ Australia/New Zealand Food Standards ควรอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^4 CFU/g หรือต่ำกว่า

ตาราง 29 สมบัติจุลชีววิทยาของ Okara สดและแห้ง

การทดสอบ	Okara แห้ง	Okara สด
จำนวนจุลชีพทั้งหมด (CFU/g)	4.3×10^{5b}	3.0×10^{6a}
จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (CFU/g)	8.7×10^{2b}	4.2×10^{4a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้น

1. การศึกษาปริมาณโปรตีน

1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง

การศึกษาอิทธิพลของ pH (9.0-12.0) และระยะเวลาสกัด (60 และ 90 นาที) ต่อปริมาณโปรตีน (%Protein content) ในโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง (ตาราง 30) พบว่าทั้งสองปัจจัยมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าค่า pH เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการละลายของโปรตีน ซึ่งปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 9.0 ($39.73 \pm 0.29\%$ ที่ 60 นาที และ $41.66 \pm 0.48\%$ ที่ 90 นาที) ไปจนถึงช่วง pH 11.5-12.0 ที่ให้ค่าสูงสุด โดยสภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ pH 11.5 สกัดนาน 90 นาที ($73.14 \pm 0.84\%$) ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยหลักการที่ว่าในสภาวะต่าง โปรตีนถั่วเหลืองจะมีประจุลบสุทธิสูงเมื่อค่า pH อยู่ห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริก ($pI \approx 4.5-5.0$) ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลและเพิ่มความสามารถในการละลาย (Malhotra และ Coupland, 2004; Fennema, 2008) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่ม pH เป็น 12.0 กลับพบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ที่เวลา 60 นาที ($67.17 \pm 2.49\%$) มีค่าต่ำกว่าที่ pH 11.5 ($70.42 \pm 0.04\%$) เล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของโปรตีนในสภาวะที่รุนแรงเกินไป สอดคล้องกับการศึกษาของ Ma และคณะ (1996) ที่รายงานว่าสภาวะต่างสูงเกินไปอาจทำให้โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติการละลาย สำหรับอิทธิพลของระยะเวลาสกัดพบว่าให้ผลไม่สม่ำเสมอในแต่ละระดับ pH โดยที่ pH 9.0-10.0 การเพิ่มเวลาเป็น 90 นาทีไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ pH 11.0-12.0 การเพิ่มเวลาช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (เช่น จาก

70.42±0.04% เป็น 73.14±0.84% ที่ pH 11.5) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการละลายโปรตีนในสภาวะต่างสูงต้องการเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่นานขึ้น (Karki et al., 2010) ผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจาก Okara แห่ง คือ การใช้ pH 11.5 เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนสูงถึง 73.14±0.84%

ในส่วนของ %Protein recovery ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง พบว่าค่า pH และระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการคืนกลับของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีแนวโน้มชัดเจนว่า %Protein recovery เพิ่มขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น จากระดับต่ำที่ pH 9.0 (5.70±0.23% ที่ 60 นาที และ 6.86±0.11% ที่ 90 นาที) ผ่านช่วง pH 9.5-10.5 (ซึ่งให้ค่า recovery ประมาณ 4.43±0.15% ถึง 18.45±0.55%) และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วง pH 11.0-11.5 (ประมาณ 27.67±0.36% ถึง 38.06±0.32%) จนถึงค่าสูงสุดที่ pH 12.0 เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งให้ %Protein recovery สูงถึง 51.21±0.05% ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยหลักการที่ว่า ในสภาวะที่เป็นด่างสูง โปรตีนถั่วเหลืองซึ่งมีจุดไอโซอิเล็กทริกที่ pH ประมาณ 4.5-5.0 จะมีประจุลบมากขึ้น ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลและเพิ่มความสามารถในการละลาย (Damodaran, 2017; Fennema, 2008) สำหรับอิทธิพลของระยะเวลาในการสกัด พบว่าโดยทั่วไปการเพิ่มเวลาจาก 60 เป็น 90 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการคืนกลับโปรตีน โดยเฉพาะที่ pH สูง (10.5-12.0) เช่น ที่ pH 12.0 การเพิ่มเวลาสกัดจาก 60 นาที (32.53±0.29%) เป็น 90 นาที (51.21±0.05%) ช่วยเพิ่มค่า %Protein recovery ได้มากถึง 57.4% ซึ่งบ่งชี้ว่าการสกัดโปรตีนในสภาวะต่างสูงต้องการระยะเวลานานพอเพื่อให้การละลายเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (Karki et al., 2010) อย่างไรก็ตาม พบบางกรณีที่มีการเพิ่มเวลากลับทำให้ค่า %Protein recovery ลดลง เช่น ที่ pH 9.5 (จาก 11.65±0.12% เหลือ 8.89±0.12%) ซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของโปรตีนเนื่องจากการสัมผัสกับสภาวะต่างเป็นเวลานาน (Ma et al., 1996) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vishwanathan และคณะ (2011) ที่รายงานว่า การสกัดโปรตีนจาก Okara ที่ pH 12.0 ให้ค่า %Protein recovery สูงกว่า 45% และการเพิ่มเวลาสกัดช่วยเพิ่มการคืนกลับโปรตีนได้

และการวิเคราะห์ %Extraction yield พบว่าสภาวะ pH และระยะเวลามีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณผลผลิตการสกัด โดยพบแนวโน้มที่ชัดเจนว่า %Extraction yield เพิ่มขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น จากระดับต่ำสุดที่ pH 9.0 เป็นเวลา 60 นาที (4.61±0.06%) ไปจนถึงค่าสูงสุดที่ pH 12.0 เป็นเวลา 90 นาที (23.33±0.48%) ซึ่งสูงขึ้นถึง 5 เท่า แนวโน้มนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ %Protein content และ %Protein recovery ที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ โดยเฉพาะกับ %Protein recovery ที่แสดงรูปแบบการเพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกัน ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีการละลายของโปรตีน ซึ่งมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายอยู่ห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนถั่วเหลือง ($pI \approx 4.5-5.0$) (Nishinari et al., 2014) นอกจากนี้

ในสภาวะต่างสูงยังช่วยเพิ่มการละลายขององค์ประกอบอื่นๆ ใน Okara ด้วย ซึ่งรวมถึงคาร์โบไฮเดรตบางชนิดและสารประกอบอื่นที่ละลายได้ในด่าง (Fennema, 2008) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาการสกัด พบว่าโดยส่วนใหญ่การเพิ่มเวลาจาก 60 เป็น 90 นาที ช่วยเพิ่มค่า %Extraction yield โดยเฉพาะที่ pH สูง เช่น ที่ pH 10.5 (จาก $7.52 \pm 0.12\%$ เป็น $10.1 \pm 0.08\%$), pH 11.0 (จาก $13.88 \pm 0.66\%$ เป็น $17.06 \pm 0.09\%$), pH 11.5 (จาก $13.1 \pm 0.01\%$ เป็น $16.73 \pm 0.53\%$) และ pH 12.0 (จาก $15.57 \pm 0.02\%$ เป็น $23.33 \pm 0.48\%$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสกัดที่ pH สูงต้องการเวลามากขึ้นเพื่อให้โปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆ ละลายออกมาได้อย่างสมบูรณ์ (Karki et al., 2010) อย่างไรก็ตาม พบว่าที่ pH 9.5 และ 10.0 การเพิ่มเวลากลับทำให้ค่า %Extraction yield ลดลงเล็กน้อย (จาก $7.38 \pm 0.63\%$ เป็น $6.34 \pm 0.04\%$ ที่ pH 9.5 และจาก $7.88 \pm 0.32\%$ เป็น $7.08 \pm 0.05\%$ ที่ pH 10.0) ซึ่งอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของโปรตีนบางส่วนเมื่อสัมผัสกับสภาวะต่างเป็นเวลานาน (Ma et al., 1996) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vishwanathan et al. (2011) ที่รายงานว่า การสกัดโปรตีนจาก Okara ที่ pH 12.0 ให้ค่า extraction yield ประมาณ 25% และงานวิจัยของ Stanojevic และคณะ (2012) ที่พบว่าการสกัดโปรตีนถั่วเหลืองที่ pH สูงกว่า 10 ให้ผลผลิตสูงกว่า 20% นอกจากนี้ ยังสังเกตได้ว่าแนวโน้มของ %Extraction yield มีความสัมพันธ์โดยตรงกับ %Protein recovery แต่ไม่จำเป็นต้องแปรผันตรงกับ %Protein content เสมอไป เนื่องจาก yield คำนวณจากทั้งปริมาณโปรตีนและปริมาณของแข็งทั้งหมดที่สกัดได้ (Preece et al., 2017)

ตาราง 30 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง

ลำดับ	ตัวอย่าง	pH สกัดโปรตีน	ระยะเวลา (นาท)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง	9.0	60	39.73±0.29 ⁱ	5.70±0.23 ^l	4.61±0.06 ⁿ
2			90	41.66±0.48 ^h	6.86±0.11 ^k	5.30±0.04 ^m
3		9.5	60	50.74±0.46 ^f	11.65±0.12 ^j	7.38±0.63 ^j
4			90	45.10±0.28 ^g	8.89±0.12 ^j	6.34±0.04 ^l
5		10.0	60	58.86±0.17 ^d	4.43±0.15 ^m	7.88±0.32 ^h
6			90	52.76±0.56 ^e	11.61±0.36 ⁱ	7.08±0.05 ^k
7		10.5	60	59.79±0.30 ^d	13.98±0.18 ^h	7.52±0.12 ⁱ
8			90	58.72±0.28 ^d	18.45±0.55 ^g	10.1±0.08 ^g
9		11.0	60	64.08±0.08 ^c	27.67±0.36 ^f	13.88±0.66 ^e
10			90	65.07±0.67	34.54±0.41 ^c	17.06±0.09 ^b
11		11.5	60	70.42±0.04 ^b	28.69±0.41 ^e	13.1±0.01 ^f
12			90	73.14±0.84 ^a	38.06±0.32 ^b	16.73±0.53 ^c
13		12.0	60	67.17±2.49 ^c	32.53±0.29 ^d	15.57±0.02 ^d
14			90	70.57±0.77 ^b	51.21±0.05 ^a	23.33±0.48 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

1.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สดในตาราง 31 พบว่าค่า pH และระยะเวลาในการสกัดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณโปรตีน (%Protein content), การคืนกลับของโปรตีน (%Protein recovery) และผลผลิตการสกัด (%Extraction yield) สำหรับปริมาณโปรตีนเข้มข้นที่ได้จาก Okara สด พบค่าอยู่ในช่วง 39.06±0.52% ถึง 69.94±0.35% โดยค่าสูงสุดพบที่ pH 11.5 (60 นาที) และ 12.0 (90 นาที) ซึ่งใกล้เคียงแต่ต่ำกว่าค่าสูงสุดที่ได้จาก Okara แห้ง (73.14±0.84%) เล็กน้อย และไม่แสดงแนวโน้มที่ชัดเจนกับค่า pH อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างที่สำคัญอยู่ที่ประสิทธิภาพการสกัดเชิงปริมาณ คือค่าร้อยละการคืนกลับของโปรตีน (%Protein recovery) และร้อยละผลผลิตการสกัด (%Extraction yield) ที่ได้จาก Okara สด นั้นต่ำกว่าที่ได้จาก Okara แห้งอย่างมาก โดย Okara สดให้ %Protein recovery สูงสุดเพียง

13.73±0.45% (ที่ pH 12.0, 60 นาที) และ %Extraction yield สูงสุดเพียง 2.71±0.05% (ที่ pH 12.0, 60 นาที) เทียบกับ Okara แห้งที่ให้ค่าสูงสุดถึง 51.21±0.05% และ 23.33±0.48% ตามลำดับ

ประสิทธิภาพที่ต่ำสามารถอธิบายได้จากปัจจัยหลัก คือปริมาณน้ำที่สูงใน Okara สด (ประมาณ 75%) ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของของแข็งตั้งต้นในระบบสกัดต่ำ และอาจเจือจางสารสกัด รวมถึงโครงสร้างทางกายภาพของ Okara สดที่โปรตีนอาจถูกกักเก็บในเมทริกซ์และตัวทำละลาย เข้าถึงได้ยากกว่าเมื่อเทียบกับ Okara แห้งที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและอาจมีรูพรุนมากขึ้น หลังการทำแห้ง (Ma et al., 1996; Stanojevic et al., 2012;) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ชี้ว่าความชื้นเริ่มต้นมีผลลบต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน และการสกัดจากวัตถุดิบแห้งมักให้ yield สูงกว่าแบบเปียก (Vishwanathan et al., 2011) นอกจากนี้ ผลของระยะเวลาสกัดต่อทั้งสามค่าใน Okara สดก็ไม่สม่ำเสมอและซับซ้อนกว่าใน Okara แห้ง ซึ่งอาจสะท้อนถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ในระบบที่มีน้ำสูง แม้การสกัด Okara สดด้วยด่างจะสามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่มี %Protein content ค่อนข้างสูงได้ แต่ประสิทธิภาพเชิงปริมาณ (%Protein recovery และ %Extraction yield) นั้นต่ำกว่าการใช้ Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่าการใช้ Okara แห้งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นมีความเหมาะสมมากกว่าสำหรับกระบวนการสกัดโปรตีนด้วยวิธีนี้ในเชิงปฏิบัติหรือระดับอุตสาหกรรม



ตาราง 31 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด

ลำดับ	ตัวอย่าง	pH สกัดโปรตีน	ระยะเวลา (นาทีก)	%Protein content (db) (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (db) (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (db) (% ฐานแห้ง)
1	Okara สด	9.0	60	48.06±0.41 ^j	1.51±0.11 ^m	0.34±0.88 ^k
2			90	48.96±0.40 ^j	2.5±0.04 ^k	0.56±0.56 ^j
3		9.5	60	64.75±1.08 ^{de}	1.69±0.02 ^l	0.28±0.70 ^l
4			90	57.72±1.36 ^h	3.08±0.07 ^j	0.58±0.78 ^{ij}
5		10.0	60	39.06±0.52 ^k	1.25±0.05 ⁿ	0.35±0.45 ^k
6			90	61.68±0.29 ^f	4.15±0.17 ^h	0.66±0.14 ^h
7		10.5	60	65.03±0.27 ^d	3.61±0.53 ⁱ	0.60±0.35 ⁱ
8			90	67.07±1.60 ^c	5.44±0.18 ^f	0.88±0.36 ^g
9		11.0	60	64.53±0.19 ^e	7.41±0.54 ^e	1.25±0.23 ^e
10			90	58.61±1.56 ^g	5.11±0.22 ^g	0.95±0.48 ^f
11		11.5	60	69.94±0.35 ^a	8.98±0.33 ^d	1.4±0.18 ^d
12			90	68.30±0.99 ^b	13.44±0.20 ^b	1.61±0.66 ^c
13		12.0	60	55.25±0.98 ⁱ	13.73±0.45 ^a	2.71±0.05 ^a
14			90	69.66±0.43 ^a	11.05±0.39 ^c	1.73±0.86 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีน (Pretreatment ; ปริมาณน้ำ)

ตอนที่ 3.1 การศึกษาผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น

1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

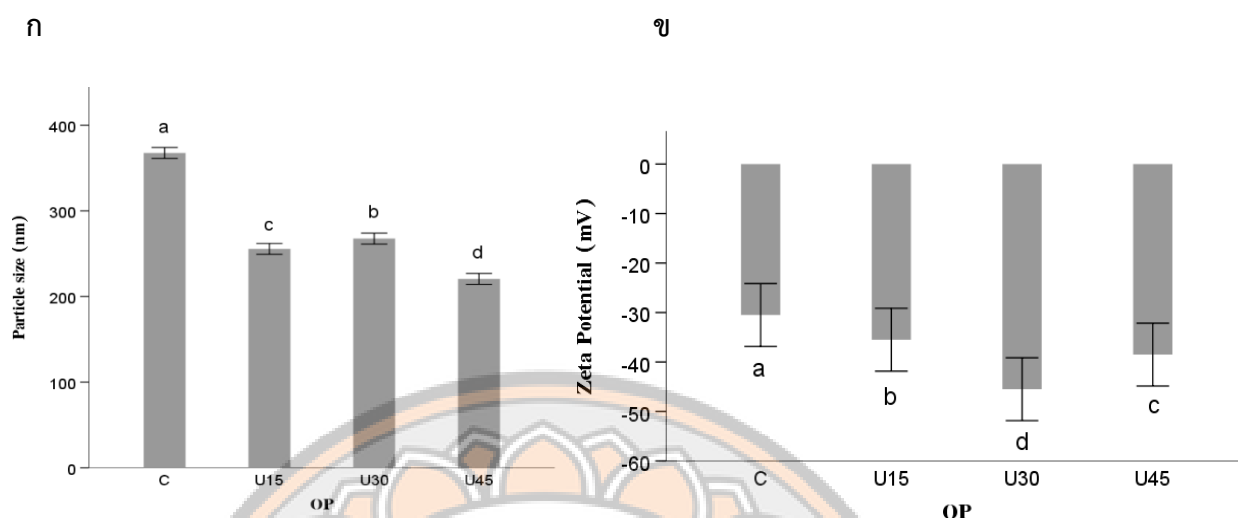
ศักย์ซีตาและขนาดอนุภาค

ผลการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค และศักย์ซีตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ระยะเวลาต่างกัน (ภาพ 36) แสดงให้เห็นผลกระทบของการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนอย่างชัดเจน จากผลการทดลองพบว่าขนาดอนุภาคของตัวอย่างควบคุม (C) คือโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่สกัดออกมาด้วยสภาวะที่ดีที่สุด ในตอนที่ 2 (pH 11.5 90 นาที) มีค่าสูงสุดที่ 368 นาโนเมตร ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกทุกตัวอย่างมีขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยตัวอย่าง U15, U30 และ

U45 คือ Okara แท่ง ที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโปรตีนด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ระยะเวลา 15, 30 และ 45 นาที่ที่มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 256, 267 และ 220 นาโนเมตร ตามลำดับ การลดลงของขนาดอนุภาคนี้สามารถอธิบายได้ด้วยปรากฏการณ์คาวิเตชัน (cavitation) ที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมากที่เพิ่มขึ้น และแตกตัวอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดแรงเฉือนสูง และคลื่นกระแทกที่สามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนและลดขนาดอนุภาค (O'Sullivan et al., 2016) อย่างไรก็ตาม พบว่าขนาดอนุภาคมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ U30 (267 นาโนเมตร) เมื่อเทียบกับ U15 (256 นาโนเมตร) ก่อนจะลดลงอีกครั้งที่ U45 (220 นาโนเมตร) ซึ่งอาจเกิดจากการรวมตัวกันใหม่ (reaggregation) ของโมเลกุลโปรตีนที่เสียสภาพบางส่วนในช่วงเวลาการฟริทริทเม้นท์ที่เพิ่มขึ้น ก่อนที่จะถูกทำลายต่อเมื่อเพิ่มเวลาการฟริทริทเม้นท์มากขึ้น (Jambrak et al., 2009)

ในส่วนของค่าศักย์ซีตา พบว่าทุกตัวอย่างมีค่าเป็นลบ โดยตัวอย่างควบคุม (C) มีค่าศักย์ซีตาที่ -30 มิลลิโวลต์ ซึ่งมีค่าน้อยที่สุด (เป็นลบน้อยที่สุด) ขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการฟริทริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีค่าศักย์ซีตาเป็นลบมากขึ้น โดย U15, U30 และ U45 มีค่าเท่ากับ -36, -45 และ -38 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ค่าศักย์ซีตาที่เป็นลบมากขึ้นนี้บ่งชี้ถึงความเสถียรที่เพิ่มขึ้นของระบบคอลลอยด์ของโปรตีน เนื่องจากศักย์ซีตาที่มีค่าสมบูรณ์สูง (มากกว่า ± 30 มิลลิโวลต์) ทำให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตระหว่างอนุภาค ช่วยป้องกันการรวมตัวและตกตะกอนของโปรตีน (McClements, 2004) การที่ค่าศักย์ซีตาเป็นลบมากขึ้นหลังการฟริทริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก อาจเกิดจากการที่คลื่นสามารถทำลายโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน ส่งผลให้กรดอะมิโนที่มีประจุลบบนโมเลกุลโปรตีนถูกเปิดเผยมากขึ้น (Chen et al., 2011)

ทั้งนี้ พบว่าตัวอย่าง U30 มีค่าศักย์ซีตาเป็นลบมากที่สุด (-45 มิลลิโวลต์) ซึ่งบ่งชี้ว่าระยะเวลา 30 นาที่อาจเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มความเสถียรของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang และคณะ (2014) ที่พบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกกับโปรตีนถั่วเหลืองสามารถลดขนาดอนุภาคและเพิ่มค่าศักย์ซีตาในเชิงลบได้ รวมถึงงานวิจัยของ Wang และคณะ (2022) ที่รายงานว่า การฟริทริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกสามารถปรับปรุงคุณสมบัติการละลายและความเสถียรของโปรตีนจากพืชได้ การฟริทริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ 37 kHz เป็นเวลา 15-45 นาที่สามารถลดขนาดอนุภาคและเพิ่มความเสถียรของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยระยะเวลา 45 นาที่ให้ขนาดอนุภาคเล็กที่สุด (220 นาโนเมตร) และระยะเวลา 30 นาที่ให้ค่าศักย์ซีตาที่เป็นลบมากที่สุด (-45 มิลลิโวลต์) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะส่งผลดีต่อคุณสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีน เช่น การละลาย ความสามารถในการอิมัลซิฟาย และความสามารถในการเกิดโฟม



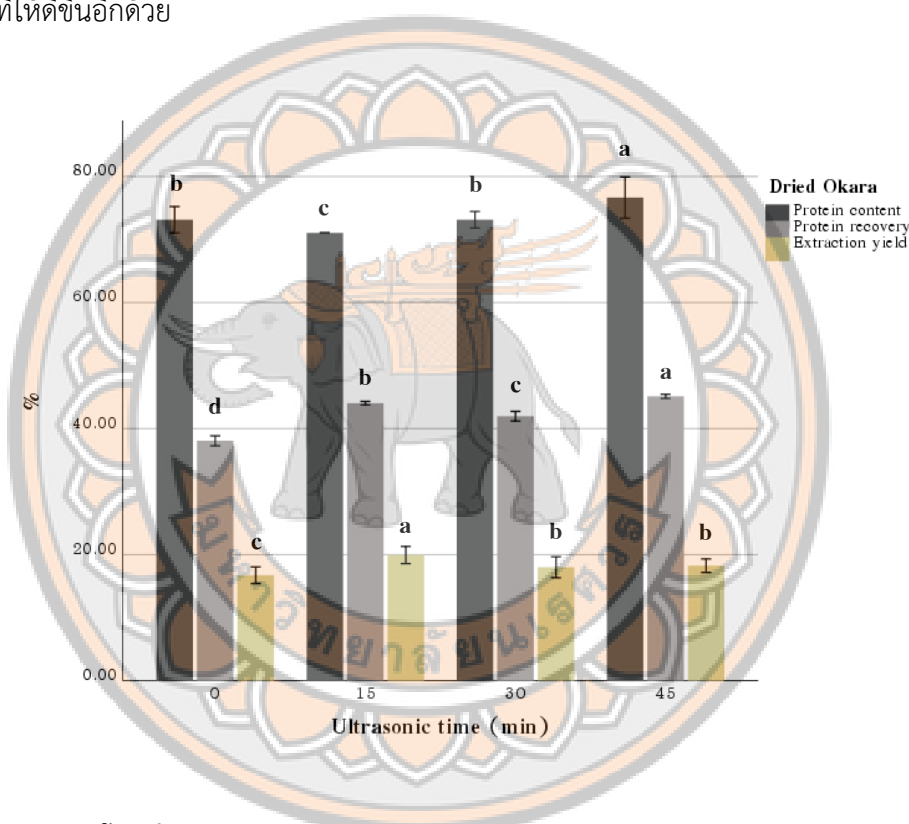
ภาพ 37 (ก) ขนาดอนุภาคและ (ข) ศักย์ซีตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่งที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (15, 30 และ 45 นาที) ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2. การศึกษาปริมาณโปรตีน

2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

ผลการทดลองในภาพ 37 แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara แห่ง อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ (เวลา 0 นาที) พบว่าการใช้อัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด ในหลายมิติ โดยสามารถเพิ่ม เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีน (%Protein content) ซึ่งบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ จาก $73.14 \pm 0.84\%$ เป็น $76.65 \pm 1.32\%$ และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของโปรตีน (%Protein recovery) ซึ่งสะท้อนถึงประสิทธิภาพการสกัด จาก $38.06 \pm 0.32\%$ เป็น $45.12 \pm 0.13\%$ การที่ประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้นนี้สามารถอธิบายได้ด้วย ปรากฏการณ์ควาเทชัน (Cavitation) ที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งสร้างแรงเฉือนและคลื่นกระแทกในระดับจุลภาค ช่วยทำลายโครงสร้างผนังเซลล์และปลดปล่อยโปรตีนที่ถูกกักเก็บอยู่ออกมาได้มากขึ้น (Jambrak et al., 2009) นอกจากนี้ คลื่นอัลตราโซนิกยังเหนี่ยวนำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน (Protein unfolding) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในภาพ 36 ที่แสดงให้เห็นว่าขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 368 นาโนเมตร เหลือเพียง 220 นาโนเมตรหลังการพรีทรีตเมนต์ 45 นาที การคลายตัวและขนาดที่เล็กลง

นี้ทำให้โปรตีนมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับตัวทำละลายมากขึ้นและละลายได้ดีขึ้น (O'Sullivan et al., 2016) อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์ผลผลิตการสกัด (%Extraction yield) กลับมีค่าสูงสุดที่เวลา 15 นาที ($19.93 \pm 0.55\%$) ก่อนจะลดลงเล็กน้อยที่เวลา 30 และ 45 นาที ($17.99 \pm 0.67\%$ และ $18.24 \pm 0.43\%$ ตามลำดับ) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้พลังงานสูงเป็นเวลานานเกินไปอาจก่อให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีน (re-aggregation) บางส่วน ทำให้ผลผลิตโดยรวมไม่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาอย่างต่อเนื่อง (Pingret et al., 2013) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2023) ที่พบว่าการสกัดโปรตีนจาก Okara ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกให้ผลผลิตและความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธีดั้งเดิม และยังช่วยส่งเสริมคุณสมบัติเชิงหน้าที่ให้ดีขึ้นอีกด้วย

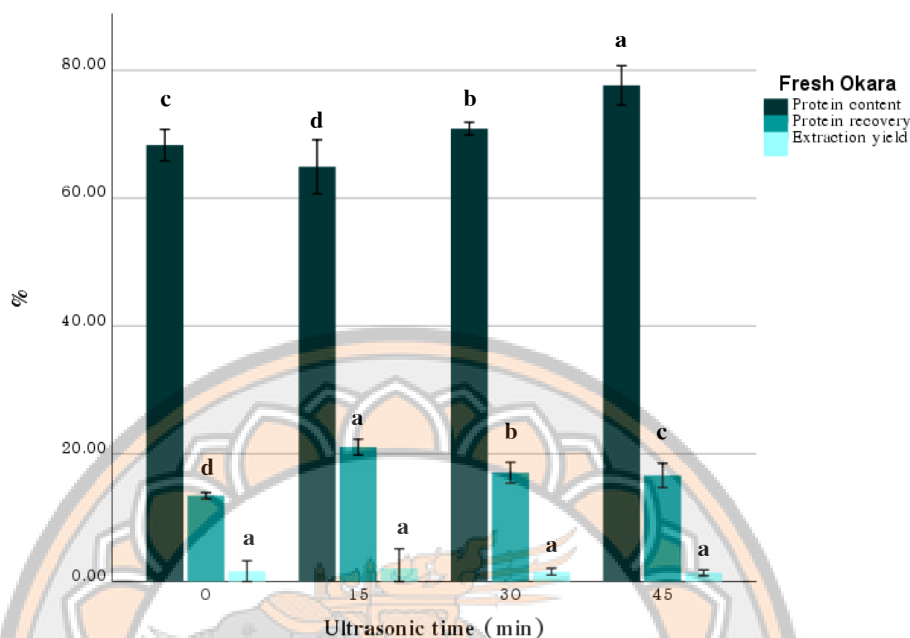


ภาพ 38 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง) ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพริทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองในภาพ 38 พบว่าการพริทรีทเม้นท์ Okara สดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่น่าสนใจในการปรับปรุงประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน แม้ว่าจะให้

ผลลัพธ์ที่แตกต่างจากการใช้ Okara แห้ง (ภาพ 37) ก็ตาม โดยพบว่าการใช้อัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที สามารถเพิ่ม เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีน (%Protein content) ได้สูงสุดที่ $77.64 \pm 1.24\%$ ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดในบรรดาตัวอย่าง Okara สดทั้งหมด และสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ (เวลา 0 นาที) ซึ่งมีค่า $68.30 \pm 0.99\%$ อย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มขึ้นของความบริสุทธิ์นี้ยืนยันว่าคลื่นอัลตราโซนิกสามารถช่วยปลดปล่อยโปรตีนและแยกออกจากองค์ประกอบอื่นได้ดีขึ้น แม้ในสถานะที่มีปริมาณน้ำสูง อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาในเชิงปริมาณ พบว่า เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของโปรตีน (% Protein recovery) และ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตการสกัด (%Extraction yield) มีค่าสูงสุดที่เวลา 15 นาที คือ $21.03 \pm 0.50\%$ และ $2.07 \pm 1.23\%$ ตามลำดับ ก่อนที่ค่าจะลดลงเมื่อใช้เวลานานขึ้น ปรากฏการณ์นี้ชี้ให้เห็นว่าในสถานะของ Okara สดที่มีน้ำมาก การใช้พลังงานอัลตราโซนิกในระยะเวลาสั้นๆ อาจเพียงพอต่อการทำลายโครงสร้างเซลล์เบื้องต้นเพื่อปลดปล่อยโปรตีน แต่การให้พลังงานเป็นเวลานาน อาจส่งเสริมให้โปรตีนที่คลายตัวออกมาแล้วเกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) และตกตะกอนไปกับส่วนของแข็ง ทำให้ค่าการคืนกลับและผลผลิตโดยรวมลดลง (Pingret et al., 2013) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพโดยรวมกับ Okara แห้ง (ภาพ 37) จะเห็นได้ชัดว่าค่า %Protein recovery และ %Extraction yield สูงสุดที่ได้จาก Okara สดนั้น ยังคงต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้ Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ Okara แห้งมีโครงสร้างที่มีรูพรุนและเปิดมากกว่า ทำให้ตัวทำละลายและพลังงานจากคลื่นอัลตราโซนิกสามารถแทรกซึมเข้าไปทำปฏิกิริยาและสกัดโปรตีนออกมาได้อย่างทั่วถึงและมีประสิทธิภาพมากกว่า (Vishwanathan et al., 2011)



ภาพ 39 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง) ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้งและสด ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิค

ผลการทดลองในตาราง 32 แสดงการเปรียบเทียบโดยตรงระหว่างประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara แห้งและสด ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคในระยะเวลาเดียวกัน พบว่า Okara แห้งให้ประสิทธิภาพการสกัดที่เหนือกว่า Okara สดอย่างมีนัยสำคัญ ในทุกพารามิเตอร์ โดย %Protein recovery สูงสุดของ Okara แห้งที่ $45.12 \pm 0.13\%$ (45 นาที) เทียบกับ Okara สดที่ $21.03 \pm 0.50\%$ (15 นาที) และ %Extraction yield สูงสุดของ Okara แห้งที่ $19.93 \pm 0.55\%$ (15 นาที) เทียบกับ Okara สดที่ $2.07 \pm 1.23\%$ (15 นาที) แสดงให้เห็นว่า Okara แห้งให้ผลผลิตสูงกว่าประมาณ 2.1 เท่าและ 9.6 เท่าตามลำดับ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญนี้สอดคล้องกับหลักการที่ว่า การทำแห้งช่วยทำลายโครงสร้างเซลล์ลูลาร์และสร้างรูพรุนในวัตถุดิบ ทำให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมและสกัดโปรตีนได้ดีขึ้น (Vishwanathan et al., 2011; Ostermann-Porcel et al., 2017)

นอกจากนี้ การมีความชื้นสูงใน Okara สดอาจขัดขวางการแทรกซึมของตัวทำละลายต่างและลดประสิทธิภาพการสกัด ขณะเดียวกัน %Protein content ของทั้งสองตัวอย่างมีแนวโน้มใกล้เคียงกันที่ระยะเวลา 45 นาที โดย Okara สดให้ค่า $77.64 \pm 1.24\%$ และ Okara แห้งให้ค่า $76.65 \pm 1.32\%$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคลื่นอัลตราโซนิคสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ในระดับใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเป็นประเภทใดของ Okara ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Eze et al. (2022) ที่พบว่าประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara ขึ้นอยู่กับสภาพกายภาพเริ่มต้นของวัตถุดิบ โดย Okara ที่ผ่านการทำให้แห้งจะให้ประสิทธิภาพสูงกว่า แม้ว่า Okara สดจะให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ต่ำกว่า แต่ยังคงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการใช้ประโยชน์โดยตรงจากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลืองโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้แห้งที่ใช้พลังงานสูง ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดการพัฒนากระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและประหยัดต้นทุน (Van den Wouwer et al., 2025) การเลือกใช้ Okara แห้งหรือสดในการสกัดโปรตีนควรพิจารณาจากความต้องการประสิทธิภาพการสกัด ต้นทุนการผลิต และความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้งานจริง

ตาราง 32 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สดและแห้ง ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

ลำดับ	ตัวอย่าง	ความถี่ (kHz)	ระยะเวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	% Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง	37	0	73.14 ± 0.84^b	38.06 ± 0.32^d	16.73 ± 0.53^d
2			15	71.04 ± 0.02^{bc}	44.03 ± 0.11^b	19.93 ± 0.55^a
3			30	73.14 ± 0.53^b	41.96 ± 0.31^c	17.99 ± 0.67^c
4			45	76.65 ± 1.32^a	45.12 ± 0.13^a	18.24 ± 0.43^b
5	Okara สด	37	0	68.30 ± 0.99^d	13.44 ± 0.20^h	1.61 ± 0.66^f
6			15	64.91 ± 1.70^e	21.03 ± 0.50^e	2.07 ± 1.23^e
7			30	70.88 ± 0.40^c	17.03 ± 0.66^f	1.54 ± 0.21^g
8			45	77.64 ± 1.24^a	16.61 ± 0.76^g	1.38 ± 0.18^h

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

: ระยะเวลา 0 นาที หมายถึง ตัวอย่างควบคุมโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้งและสดที่สกัดออกมาด้วยสภาวะที่ดีที่สุดในตอนต้นที่ 2

3. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง (ตาราง 34) การพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ความถี่ 37 kHz เป็นระยะเวลาต่างๆ (15-45 นาที) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการพรีทรีทเม้นท์ จาก $40.06 \pm 0.23\%$ ในตัวอย่างควบคุม เป็น $51.36 \pm 0.86\%$, $58.77 \pm 0.65\%$ และสูงสุดที่ $66.30 \pm 1.06\%$ ในตัวอย่าง U15, U30 และ U45 ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในการทดลองก่อนหน้าที่พบว่าคลื่นอัลตราโซนิกทำให้ขนาดอนุภาคลดลง (จาก 368 นาโนเมตร เหลือต่ำสุด 220 นาโนเมตร ที่ U45) และศักย์ซีตามีค่าเป็นลบเพิ่มขึ้น (จาก -30 มิลลิโวลต์ เป็นค่าระหว่าง -36 ถึง -45 มิลลิโวลต์) ซึ่งอนุภาคที่เล็กลงมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับน้ำมากขึ้น และการเพิ่มขึ้นของประจุลบช่วยเพิ่มแรงผลักระหว่างอนุภาคและการจับกับโมเลกุลน้ำ ส่งผลให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น (Arzeni et al., 2012)

ในทำนองเดียวกัน ความสามารถในการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการพรีทรีทเม้นท์ โดยเพิ่มจาก 9.23 ± 0.85 g/g ในตัวอย่างควบคุม เป็น 13.56 ± 0.39 g/g, 14.75 ± 0.46 g/g และสูงสุดที่ 15.62 ± 0.77 g/g ในตัวอย่าง U15, U30 และ U45 ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นนี้เกิดจากการที่คลื่นอัลตราโซนิกทำให้โครงสร้างโปรตีนคลายตัวและเปิดเผยหมู่ที่ชอบน้ำมากขึ้น (O'Sullivan et al., 2016) สำหรับความสามารถในการดูดซับน้ำมัน พบรูปแบบที่แตกต่างออกไป โดยเพิ่มขึ้นจาก 6.89 ± 1.32 g/g ในตัวอย่างควบคุม เป็น 7.23 ± 0.66 g/g ที่ U15 และสูงสุดที่ 10.15 ± 0.52 g/g ที่ U30 ก่อนจะลดลงเป็น 8.19 ± 0.94 g/g ที่ U45 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการพรีทรีทเม้นท์ที่ระยะเวลา 30 นาทีอาจเป็นจุดที่เหมาะสมสำหรับการเปิดเผยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำในระดับที่เหมาะสม (Jambrak et al., 2009)

ด้านความสามารถในการเกิดโฟม พบว่าตัวอย่าง U45 มีค่าสูงสุด ($24.37 \pm 0.82\%$) ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($18.05 \pm 1.96\%$) อย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลจากความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นและการเคลื่อนที่ไปยังพื้นผิวระหว่างเฟสที่เร็วขึ้นของอนุภาคขนาดเล็ก แต่ในทางตรงกันข้าม ความคงตัวของโฟมกลับลดลงในทุกสภาวะการพรีทรีทเม้นท์ โดยมีค่าต่ำสุดที่ U15 ($42.41 \pm 0.74\%$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($55.23 \pm 0.85\%$) ก่อนจะเพิ่มขึ้นเป็น $52.54 \pm 1.23\%$ ที่ U45 ปรากฏการณ์นี้บ่งชี้ว่าแม้โปรตีนที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์จะสามารถเคลื่อนที่ไปที่พื้นผิวอากาศ-น้ำได้ดีขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอาจทำให้ความยืดหยุ่นของฟิล์มโปรตีนที่ห่อหุ้มฟองอากาศลดลง (Kavimughil et al., 2023)

คุณสมบัติด้านอิมัลชันเพิ่มขึ้นอย่างมากที่ U15 ($69.13 \pm 0.52\%$) และ U45 ($65.12 \pm 0.87\%$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($50.11 \pm 0.23\%$) ในขณะที่ U30 ($52.19 \pm 1.23\%$) เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

อย่างไรก็ตาม ความคงตัวของอิมัลชันกลับลดลงในทุกตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ โดยมีค่าต่ำสุดที่ U30 (38.40 ± 0.74 นาที) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (43.13 ± 0.21 นาที) การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการเกิดอิมัลชันสามารถอธิบายได้จากการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการละลายและการลดลงของขนาดอนุภาคโปรตีน ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปที่ผิวหน้าระหว่างน้ำและน้ำมันได้รวดเร็วขึ้น ในขณะที่การลดลงของความคงตัวอาจเกิดจากการเสียดสีของโปรตีนบางส่วนจากพลังงานอัลตราโซนิก ส่งผลให้ฟิล์มที่ห่อหุ้มหยดไขมันมีความแข็งแรงลดลง (Chandrapala et al., 2011)

ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติเชิงหน้าที่เหล่านี้และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพจากการทดลองก่อนหน้า (ขนาดอนุภาคและศักย์ซีตา) บ่งชี้ถึงกลไกที่ซับซ้อนของอัลตราโซนิกต่อโครงสร้างโปรตีน การลดลงของขนาดอนุภาคและการเพิ่มขึ้นของค่าศักย์ซีตาเชิงลบส่งผลต่อการละลายและการดูดซับน้ำ แต่มีผลทั้งเชิงบวกและลบ ต่อสมบัติเชิงพื้นผิว (surface properties) เช่น การเกิดโฟมอิมัลชัน และความคงตัว ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Das, Panesar และ Saini (2023) ที่พบว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกสามารถเพิ่มความสามารถในการละลาย การดูดซับน้ำ และน้ำมัน และสมบัติการเกิดอิมัลชันและโฟมของโปรตีนถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการพรีทรีทเมนต์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะที่ต้องการ กล่าวคือ หากต้องการความสามารถในการละลาย การดูดซับน้ำ และความสามารถในการเกิดโฟมสูงสุด ควรใช้ระยะเวลา 45 นาที หากต้องการความสามารถในการดูดซับน้ำมันสูงสุด ควรใช้ระยะเวลา 30 นาที และหากต้องการความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุด ควรใช้ระยะเวลา 15 นาที การเลือกระยะเวลาการพรีทรีทเมนต์ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้โปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารที่แตกต่างกัน

ตาราง 33 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วย คลื่นอัลตราโซนิก

การทดสอบ	C	U15	U30	U45
การละลาย (%)	40.06±0.23 ^d	51.36±0.86 ^c	58.77±0.65 ^b	66.30±1.06 ^a
การดูดซับน้ำ (g/g)	9.23±0.85 ^d	13.56±0.39 ^c	14.75±0.46 ^b	15.62±0.77 ^a
การดูดซับน้ำมัน (g/g)	6.89±1.32 ^c	7.23±0.66 ^c	10.15±0.52 ^a	8.19±0.94 ^b
การเกิดโฟม (%)	18.05±1.96 ^c	19.42±0.55 ^b	17.21±0.21 ^d	24.37±0.82 ^a
ความคงตัวของโฟม (%)	55.23±0.85 ^a	42.41±0.74 ^d	44.15±0.81 ^c	52.54±1.23 ^b
การเกิดอิมัลชัน (%)	50.11±0.23 ^d	69.13±0.52 ^a	52.19±1.23 ^c	65.12±0.87 ^b
ความคงตัวของอิมัลชัน (นาที)	43.13±0.21 ^a	40.38±0.30 ^b	38.40±0.74 ^d	39.25±0.23 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

ตอนที่ 3.2 การศึกษาผลกระทบการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ต่อการผลิตโปรตีนเข้มข้น

1. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

ศักย์ซีตาและขนาดอนุภาค

ผลการวิเคราะห์ ภาพ 28 ขนาดอนุภาคและศักย์ซีตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Cellulase, Xylanase และ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ที่ระยะเวลา 90 นาที ก่อนการสกัดด้วยต่าง (pH 11.5, 90 นาที) ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนเข้มข้นที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ด้านขนาดอนุภาค พบว่าตัวอย่างควบคุมมีขนาดอนุภาคสูงสุดที่ 368 นาโนเมตร ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ทุกชนิดมีขนาดอนุภาคลดลง โดยเอนไซม์ Cellulase ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ขนาดอนุภาคลดลงเหลือ 311 และ 308 นาโนเมตร (ลดลง 15.5% และ 16.3% ตามลำดับ) เอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ขนาดอนุภาคลดลงเหลือ 296 และ 286 นาโนเมตร (ลดลง 19.6% และ 22.3% ตามลำดับ) และเอนไซม์ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ขนาดอนุภาคลดลงเหลือ 287 และ 280 นาโนเมตร (ลดลง 22.0% และ 23.9% ตามลำดับ)

การลดลงของขนาดอนุภาคนี้อาจอธิบายได้จากกลไกการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์ Cellulase ย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชใน Okara ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ถูกทำลายและปลดปล่อยโปรตีนออกมา (Karki et al., 2010) เอนไซม์ Xylanase มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบมากในผนังเซลล์พืช ส่งผล

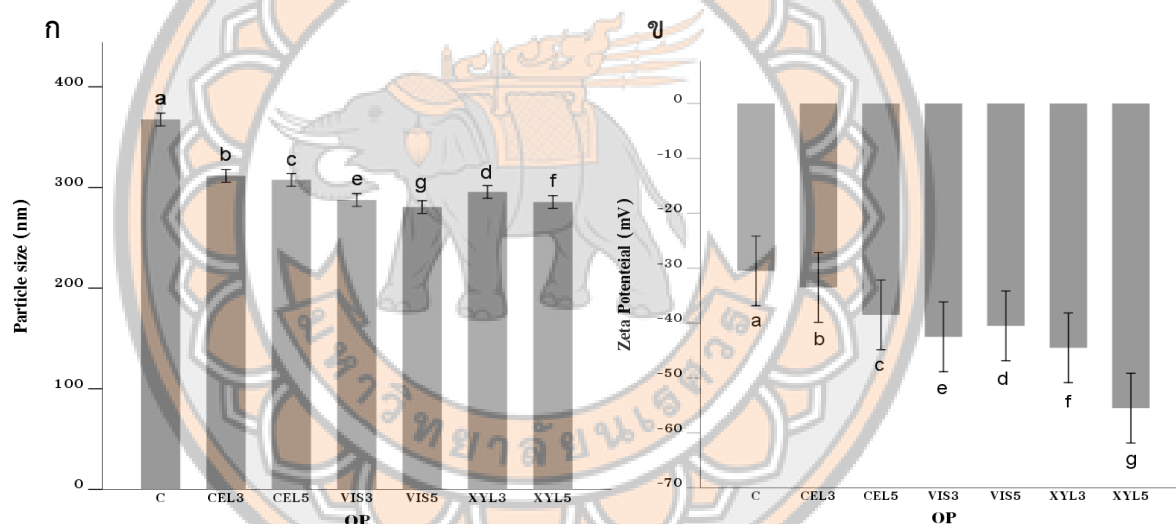
ให้เกิดการแตกตัวของผนังเซลล์และปลดปล่อยโปรตีนขนาดเล็กออกมา (Ng et al., 1997) ส่วน เอนไซม์ Viscozyme เป็นเอนไซม์ผสมที่มีทั้ง Arabinase, Cellulase, Beta-glucanase, Hemicellulase, และ Xylanase จึงสามารถย่อยสลายองค์ประกอบต่างๆ ในผนังเซลล์พืชและ โครงสร้างโปรตีนได้หลากหลาย ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการลดขนาดอนุภาคได้มากที่สุด (Alcortae et al., 2016) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 3% เป็น 5% ส่งผลให้ขนาดอนุภาคลดลง เพิ่มขึ้นในทุกชนิดของเอนไซม์ที่ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงขนาดระหว่างความเข้มข้น ของเอนไซม์และประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างเมทริกซ์ของ Okara

ด้านศักย์ซีตา การพรีทรีตเมนต์ด้วยเอนไซม์ส่งผลให้ค่าศักย์ซีตามีความเป็นลบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก -30 มิลลิโวลต์ในตัวอย่างควบคุม โดยเอนไซม์ Cellulase ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ค่าศักย์ซีตาเพิ่มเป็น -33 และ -39 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ เอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ค่าศักย์ซีตาเพิ่มเป็น -44 และ -55 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ และเอนไซม์ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ทำให้ค่าศักย์ซีตาเพิ่มเป็น -42 และ -40 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของค่า ศักย์ซีตาในเชิงลบนี้บ่งชี้ถึงความเสถียรของอนุภาคโปรตีนในระบบคอลลอยด์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าศักย์ซีตามีค่าสัมบูรณ์สูง (มากกว่า ± 30 มิลลิโวลต์) ทำให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าสถิต ระหว่างอนุภาคที่มากขึ้น ช่วยป้องกันการรวมตัวและตกตะกอนของโปรตีน (McClements, 2015)

การที่ศักย์ซีตามีค่าเป็นลบมากขึ้นหลังการพรีทรีตเมนต์ด้วยเอนไซม์อาจเกิดจากหลายกลไก รวมถึงการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่อาจปกปิดประจุบนผิวโปรตีน การเปิดโครงสร้างของโปรตีนทำให้เผยกรดอะมิโนที่มีประจุลบมากขึ้น และการตัดพันธะในโมเลกุลโปรตีนทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลอิสระมากขึ้น (An et al., 2024) เอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 5% แสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มค่าศักย์ซีตาในเชิงลบ (-55 มิลลิโวลต์) ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 83.3% จากตัวอย่างควบคุม บ่งชี้ถึงความสามารถพิเศษของ Xylanase ในการเผยประจุบนผิวโปรตีนหรืออาจเกิดจากการย่อยสลาย องค์ประกอบเฉพาะในผนังเซลล์ที่ส่งผลต่อการกระจายประจุของโปรตีนที่สกัดได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการพรีทรีตเมนต์ด้วยเอนไซม์กับการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก จากการทดลองก่อนหน้า พบว่าทั้งสองวิธีสามารถลดขนาดอนุภาคและเพิ่มค่าศักย์ซีตาในเชิงลบได้ แต่ การใช้เอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 5% สามารถทำให้ค่าศักย์ซีตาเป็นลบได้มากกว่า (-55 มิลลิโวลต์) เมื่อเทียบกับค่าสูงสุดที่ได้จากอัลตราโซนิก (-45 มิลลิโวลต์) อย่างไรก็ตาม การลดขนาดอนุภาค ด้วยอัลตราโซนิก (ลดลงถึง 220 นาโนเมตร) มีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เอนไซม์ ซึ่งอาจเป็นเพราะ กลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดยอัลตราโซนิกทำให้เกิดแรงเฉือนและปรากฏการณ์แคพิเทชันที่สามารถแตกโครงสร้างได้รุนแรงกว่าการย่อยทางเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะเคมีบางชนิด เท่านั้น

ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosset และคณะ (2014) ที่พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมในการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถลดขนาดอนุภาคและเพิ่มความเสถียรของโปรตีนได้ รวมถึงการศึกษาของ Wang และคณะ (2014) ที่รายงานว่า การใช้เอนไซม์ Cellulase และ Xylanase ในการสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพรีทรีตเมนต์ Okara ด้วยเอนไซม์ก่อนการสกัดโปรตีนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนเข้มข้นที่ได้ โดยเอนไซม์ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดขนาดอนุภาค (280 นาโนเมตร) และเอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มค่าศักย์ซิตาในเชิงลบ (-55 มิลลิโวลต์) ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพเหล่านี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณสมบัติเชิงหน้าที่และความเสถียรของโปรตีน อาทิ ความสามารถในการละลาย การเกิดอิมัลชัน และการเกิดโฟม ตามที่ได้แสดงในการทดลองก่อนหน้านี้



ภาพ 40 (ก) ขนาดอนุภาคและ (ข) ศักย์ซิตาของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ตัวอย่างควบคุม (C) Cellulase (CEL) Xylanase (XYL) และ Viscozyme (VIS) ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ที่ระยะเวลา 90 นาที ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2. การศึกษาปริมาณโปรตีน

2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง

2.1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้

เอนไซม์ Cellulase

ผลการทดลองในตาราง 34 แสดงให้เห็นถึงผลของการพรีทรีทเมนต์ Okara แห้งด้วยเอนไซม์ Cellulase ที่ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% เป็นเวลา 90 และ 120 นาทีต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ $82.04 \pm 0.87\%$ เมื่อใช้ Cellulase 3% เป็นเวลา 120 นาที รองลงมาคือ $79.64 \pm 0.36\%$ (Cellulase 1%, 90 นาที) และ $77.67 \pm 1.66\%$ (Cellulase 3%, 90 นาที) ขณะที่ %Protein recovery มีค่าสูงสุดที่ $60.39 \pm 0.41\%$ เมื่อใช้ Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $58.75 \pm 0.18\%$ (Cellulase 5%, 120 นาที) และ $54.81 \pm 0.52\%$ (Cellulase 3%, 120 นาที) สำหรับ %Extraction yield พบว่ามีค่าสูงสุดที่ $27.57 \pm 0.37\%$ เมื่อใช้ Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $23.54 \pm 0.78\%$ (Cellulase 5%, 120 นาที) และ $21.48 \pm 0.22\%$ (Cellulase 3%, 120 นาที) การที่เอนไซม์ Cellulase สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญนี้เนื่องจาก Cellulase มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของ Okara ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ถูกทำลายและปลดปล่อยโปรตีนออกมา (Karki et al., 2010) การที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูงขึ้น (5%) ให้ %Protein recovery และ %Extraction yield สูงสุด แต่ไม่ทำให้ %Protein content สูงสุดนั้นสอดคล้องกับหลักการที่ว่าเอนไซม์ที่เข้มข้นสูงสามารถย่อยสลายเนื้อเยื่อได้มากขึ้น ทำให้ได้โปรตีนมากขึ้น แต่อาจมีการปนเปื้อนของสารประกอบอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตและเยื่อที่ย่อยสลายแล้วมากขึ้นด้วย ส่งผลให้ความบริสุทธิ์ของโปรตีนลดลง (de Figueiredo et al., 2018)

ตาราง 34 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการฟritที่หมักด้วย เอนไซม์ Cellulase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาท)	%Protein Content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง	Cellulase	1	90	79.64±0.36 ^b	43.09±0.66 ^e	17.40±0.11 ^d
2				120	73.17±0.76 ^d	40.84±0.87 ^f	17.51±0.98 ^d
3			3	90	77.67±1.66 ^c	53.77±0.55 ^d	21.45±1.20 ^c
4				120	82.04±0.87 ^a	54.81±0.52 ^c	21.48±0.22 ^c
5			5	90	68.69±0.80 ^e	60.39±0.41 ^a	27.57±0.37 ^a
6				120	77.33±0.33 ^c	58.75±0.18 ^b	23.54±0.78 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.1.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้ เอนไซม์ Xylanase

ผลการทดลองในตาราง 35 แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการฟritที่หมัก Okara แห้ง ด้วยเอนไซม์ Xylanase ที่ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% เป็นเวลา 90 และ 120 นาทีต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ 84.91±1.28% เมื่อใช้ Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ 78.19±5.27% (Xylanase 1%, 90 นาที) และ 78.08±1.38% (Xylanase 1%, 120 นาที) ขณะที่ %Protein recovery มีค่าสูงสุดที่ 66.34±0.84% เมื่อใช้ Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ 59.23±0.09% (Xylanase 5%, 120 นาที) และ 55.44±0.45% (Xylanase 3%, 90 นาที) สำหรับ %Extraction yield พบว่ามีค่าสูงสุดที่ 24.57±0.93% เมื่อใช้ Xylanase 5% เป็นเวลา 120 นาที รองลงมาคือ 24.51±1.03% (Xylanase 5%, 90 นาที) และ 24.45±0.80% (Xylanase 3%, 90 นาที)

การที่เอนไซม์ Xylanase สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญนี้ เนื่องจาก Xylanase มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของ Okara ทำให้โครงสร้างเซลล์แตกตัว และปลดปล่อยโปรตีนที่ถูกกักเก็บอยู่ภายในเซลล์ออกมาได้มากขึ้น (Karki et al., 2010) การที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูงขึ้น (5%)

ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกว่าสอดคล้องกับหลักการที่ว่าเอนไซม์ที่เข้มข้นสูงสามารถย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชได้มากขึ้น ส่งผลให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ Cellulase ในตาราง 34 พบว่า Xylanase ให้ %Protein content สูงกว่า (84.91% เทียบกับ 82.04%) และ %Protein recovery สูงกว่า (66.34% เทียบกับ 60.39%) แต่ %Extraction yield ใกล้เคียงกัน (24.51-24.57% เทียบกับ 27.57%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Xylanase มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณภาพและปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ดีกว่า Cellulase

ตาราง 35 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Xylanase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง	Xylanase	1	90	78.19±5.27 ^b	39.20±0.68 ^e	16.12±0.44 ^c
2			1	120	78.08±1.38 ^b	36.75±1.12 ^f	14.76±0.70 ^d
3			3	90	70.26±3.23 ^d	55.44±0.45 ^c	24.45±0.80 ^a
4			3	120	72.59±1.44 ^c	50.55±0.18 ^d	22.39±0.25 ^b
5			5	90	84.91±1.28 ^a	66.34±0.84 ^a	24.51±1.03 ^a
6			5	120	74.70±1.67 ^c	59.23±0.09 ^b	24.57±0.93 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.1.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Pectinase

ผลการทดลองในตาราง 36 การพรีทรีทเมนต์ Okara แห้งด้วยเอนไซม์ Pectinase ที่ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% เป็นเวลา 90 และ 120 นาที พบว่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ 58.74±1.70% เมื่อใช้ Pectinase 1% เป็นเวลา 120 นาที รองลงมาคือ 54.69±1.91% (Pectinase 5%, 120 นาที) และ 51.25±2.76% (Pectinase 3%, 90 นาที) ขณะที่ %Protein recovery มีค่าสูงสุดที่ 35.03±0.15% เมื่อใช้ Pectinase 5% เป็นเวลา 120 นาที รองลงมาคือ 33.35±0.16%

(Pectinase 5%, 90 นาที) และ $32.50 \pm 0.42\%$ (Pectinase 3%, 90 นาที) สำหรับ %Extraction yield พบว่ามีค่าสูงสุดที่ $24.22 \pm 0.69\%$ เมื่อใช้ Pectinase 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $20.09 \pm 0.81\%$ (Pectinase 3%, 120 นาที) และ $19.85 \pm 1.21\%$ (Pectinase 5%, 120 นาที)

ผลลัพธ์ที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่าเพคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ปฐมภูมิและชั้นมิดเดิลลาเมลลา อาจไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ขัดขวางการสกัดโปรตีนจาก Okara แห่ง เมื่อเทียบกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส หรือโครงสร้างของเพคตินใน Okara อาจทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ที่ใช้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Kasai et al. (2004) ที่พบว่าการใช้ Pectinase หลังการย่อยด้วย Cellulase สามารถช่วยเพิ่มการสกัดโปรตีนได้ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากสภาวะการทดลองหรือแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase ในตาราง 34 และ 35 พบว่า Pectinase ให้ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดย %Protein content สูงสุดของ Pectinase (58.74%) ต่ำกว่า Xylanase (84.91%) และ Cellulase (82.04%) และ %Protein recovery สูงสุดของ Pectinase (35.03%) ต่ำกว่า Xylanase (66.34%) และ Cellulase (60.39%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Pectinase มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์ของ Okara ได้น้อยกว่าเอนไซม์อื่นๆ เนื่องจากเพคตินมีปริมาณน้อยกว่าเซลลูโลสและไซแลนใน Okara

ตาราง 36 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านการฟัรทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ Pectinase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห่ง	Pectinase	1	90	42.15 ± 2.54^e	21.16 ± 1.23^e	16.14 ± 1.56^c
2				120	58.74 ± 1.70^a	32.39 ± 0.51^b	17.29 ± 0.75^c
3			3	90	51.25 ± 2.76^c	32.50 ± 0.42^b	19.65 ± 0.38^b
4				120	49.13 ± 1.04^d	30.70 ± 0.11^c	20.09 ± 0.81^b
5			5	90	43.19 ± 1.58^e	33.35 ± 0.18^b	24.22 ± 0.69^a
6				120	54.69 ± 1.91^b	35.03 ± 0.15^a	19.85 ± 1.21^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.1.4 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านกระบวนการใช้

เอนไซม์ Viscozyme

ผลการทดลองในตาราง 37 แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการพริทรีทเม้นท์ Okara แห่ง ด้วยเอนไซม์ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% เป็นเวลา 90 และ 120 นาทีต่อ ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ $80.35 \pm 1.65\%$ เมื่อใช้ Viscozyme 3% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $79.25 \pm 1.12\%$ (Viscozyme 5%, 90 นาที) และ $78.45 \pm 1.02\%$ (Viscozyme 5%, 120 นาที) ขณะที่ %Protein recovery มีค่าสูงสุดที่ $70.65 \pm 0.54\%$ เมื่อใช้ Viscozyme 5% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $68.10 \pm 0.65\%$ (Viscozyme 3%, 90 นาที) และ $61.43 \pm 0.77\%$ (Viscozyme 5%, 120 นาที) สำหรับ %Extraction yield พบว่ามีค่าสูงสุดที่ $25.32 \pm 1.35\%$ เมื่อใช้ Viscozyme 3% เป็นเวลา 90 นาที รองลงมาคือ $24.26 \pm 0.53\%$ (Viscozyme 5%, 120 นาที) และ $23.55 \pm 1.98\%$ (Viscozyme 5%, 90 นาที)

การที่เอนไซม์ Viscozyme สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญนี้ เนื่องจาก Viscozyme เป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย Arabinase, Cellulase, Beta-glucanase, Hemicellulase, และ Xylanase ซึ่งสามารถย่อยสลายส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ในพืชได้อย่างครอบคลุม เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นในตาราง 34-36 พบว่า Viscozyme ให้ %Protein recovery สูงสุด (70.65%) เมื่อเทียบกับ Xylanase (66.34%), Cellulase (60.39%) และ Pectinase (35.03%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ผสมมีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีน ดีกว่าการใช้เอนไซม์ตัวเดียว เนื่องจากสามารถย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์ได้หลากหลายมากขึ้น

ตาราง 37 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการฟัรริทเม้นท์ด้วย เอนไซม์ Viscozyme

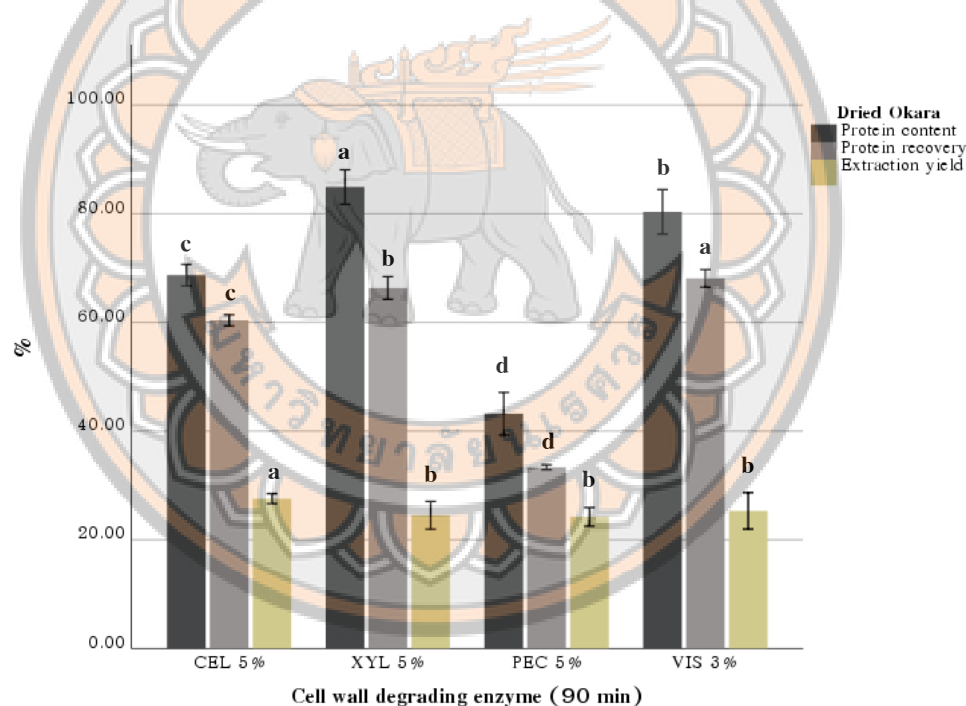
ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาทื)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง	Viscozyme	1	90	75.31±0.96 ^{bc}	39.25±0.75 ^e	16.83±0.53 ^d
2				120	72.91±0.82 ^c	38.53±0.62 ^e	16.01±0.63 ^d
3			3	90	80.35±1.65 ^a	68.10±0.65 ^b	25.32±1.35 ^a
4				120	75.98±1.02 ^{bc}	53.53±0.85 ^d	22.49±0.68 ^c
5			5	90	79.25±1.12 ^{ab}	70.65±0.54 ^a	23.55±1.98 ^b
6				120	78.45±1.02 ^{ab}	61.43±0.77 ^c	24.26±0.5b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.1.5 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านกระบวนการใช้ เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ในสภาวะเหมาะสม

ผลการทดลองในภาพ 40 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่างๆ ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการฟัรริทเม้นท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ใน Okara แห้ง พบว่า Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาทีให้ %Protein content สูงสุดที่ 84.91±1.28% รองลงมาคือ Viscozyme 3% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 80.35±1.65%, Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 68.69±0.80% และต่ำสุดคือ Pectinase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 43.19±1.58% สำหรับ %Protein recovery พบว่า Viscozyme 3% เป็นเวลา 90 นาทีให้ค่าสูงสุดที่ 68.10±0.65% รองลงมาคือ Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 66.34±0.84%, Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 60.39±0.41% และต่ำสุดคือ Pectinase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 33.35±0.18% ขณะที่ %Extraction yield พบว่า Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาทีให้ค่าสูงสุดที่ 27.57±0.37% รองลงมาคือ Viscozyme 3% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 25.32±1.35%, Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 24.51±1.03% และ Pectinase 5% เป็นเวลา 90 นาทีที่ 24.22±0.69%

การที่ Xylanase และ Viscozyme ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์อื่นนี้เนื่องจาก Xylanase สามารถย่อยไซแลนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของ Okara ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่ Viscozyme เป็นเอนไซม์ผสมที่สามารถย่อยสลายส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ได้อย่างครอบคลุม ส่งผลให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น การที่ Cellulase ให้ %Extraction yield สูงสุดแม้จะให้ความบริสุทธิ์โปรตีนต่ำกว่า สอดคล้องกับหลักการที่ว่า การย่อยเซลลูโลสช่วยเพิ่มการปลดปล่อยสารประกอบต่างๆ ออกมาพร้อมกับโปรตีน ในขณะที่ Pectinase ให้ประสิทธิภาพต่ำสุดในทุกพารามิเตอร์เนื่องจากเพคตินมีปริมาณน้อยใน Okara ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเลือกใช้เอนไซม์ขึ้นอยู่กับเป้าหมายสุดท้ายของกระบวนการสกัด ว่าต้องการเน้นประสิทธิภาพการสกัดโดยรวม (Viscozyme), ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ (Xylanase), หรือผลผลิตเชิงมวลสูงสุด (Cellulase)



ภาพ 41 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield (% ฐานแห้ง)ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ Cellulase (CEL), Xylanase (XYL), Pectinase (PEC) และ Viscozyme (VIS) ที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ที่ระยะเวลา 90 นาที ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรเหนือแท่งกราฟ ภายในแต่ละประเภทของการวัด แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด

2.2.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์

Cellulase

จากผลการทดลองการพรีทรีทเม้นท์ Okara สดด้วยเอนไซม์ Cellulase (ตาราง 38) พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า %Protein content มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเอนไซม์ ให้ค่าสูงสุดที่ $76.82 \pm 0.49\%$ เมื่อใช้ Cellulase 5% เวลา 90 นาที รองลงมาคือ $75.12 \pm 0.74\%$ ที่ 3% เวลา 90 นาที และ $74.92 \pm 0.70\%$ ที่ 5% เวลา 120 นาที ขณะที่ค่าต่ำสุดพบที่ $68.27 \pm 0.73\%$ เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที ในขณะที่ %Protein recovery และ %Extraction yield มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลา โดยให้ค่าสูงสุดที่ $40.88 \pm 1.26\%$ และ $16.91 \pm 1.63\%$ ตามลำดับ เมื่อใช้ Cellulase 5% เวลา 120 นาที เปรียบเทียบกับค่าต่ำสุดที่ $18.01 \pm 0.87\%$ และ $8.27 \pm 1.63\%$ ตามลำดับ เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง Okara แห้ง พบว่าการใช้ Cellulase กับ Okara แห้งให้ %Protein content สูงสุดที่ $82.04 \pm 0.87\%$ (3%, 120 นาที) ซึ่งสูงกว่า Okara สดที่ให้ค่าสูงสุด $76.82 \pm 0.49\%$ แต่ในแง่ของ %Protein recovery และ %Extraction yield พบว่า Okara แห้งให้ค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ คือ $60.39 \pm 0.41\%$ และ $27.57 \pm 0.37\%$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Okara สด ที่ให้ค่าสูงสุด $40.88 \pm 1.26\%$ และ $16.91 \pm 1.63\%$ ตามลำดับ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการที่ Okara สด มีปริมาณความชื้นสูงซึ่งเจือจางประสิทธิภาพของเอนไซม์และขัดขวางการสกัดโปรตีน ขณะที่ Okara แห้งมีโครงสร้างเซลล์ที่เปราะขึ้นและเอนไซม์สามารถเข้าถึงเซลล์ได้ง่ายขึ้น (Ma et al., 1997) ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นถึง ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและประสิทธิภาพการสกัด โดยที่ระยะเวลา 90 นาทีให้ %Protein content สูงกว่า 120 นาที แต่ให้ %Protein recovery และ %Extraction yield ต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เวลาที่ยาวนานขึ้นทำให้เกิดการสกัดสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนออกมาด้วย หรือเกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนจากฤทธิ์ของเอนไซม์เป็นเวลานาน (Kumar et al., 2016)

ตาราง 38 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ

%Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วย
เอนไซม์ Cellulase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความ เข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาทีก)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara สด	Cellulase	1	90	73.61±1.09 ^b	21.05±1.02 ^e	9.19±0.36 ^d
2				120	68.27±0.73 ^c	18.01±0.87 ^f	8.27±1.63 ^e
3			3	90	75.12±0.74 ^{ab}	28.23±0.97 ^d	11.65±0.25 ^c
4				120	74.02±1.10 ^b	31.83±0.65 ^c	13.82±0.22 ^b
5			5	90	76.82±0.49 ^a	39.48±0.75 ^b	16.12±0.89 ^a
6				120	74.92±0.70 ^{ab}	40.88±1.26 ^a	16.91±1.63 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
โดยวิธี Duncan

2.2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ Xylanase

จากผลการทดลองการพรีทรีทเม้นท์ Okara สดด้วยเอนไซม์ Xylanase (ตาราง 39) พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ 78.11±0.46% เมื่อใช้ Xylanase 1% เวลา 90 นาที รองลงมาคือ 76.67±1.04% ที่ 5% เวลา 90 นาที และ 75.59±0.89% ที่ 3% เวลา 90 นาที ขณะที่ค่าต่ำสุดพบที่ 70.03±0.73% เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที ในขณะที่ %Protein recovery และ %Extraction yield มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเอนไซม์ โดยให้ค่าสูงสุดที่ 33.43±1.11% และ 13.68±0.11% ตามลำดับ เมื่อใช้ Xylanase 5% เวลา 90 นาที เปรียบเทียบกับค่าต่ำสุดที่ 23.05±0.98% และ 10.28±0.36% ตามลำดับ เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ว่าเอนไซม์ Xylanase ช่วยย่อยสลายไซลแลนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของ Okara ทำให้โครงสร้างเซลล์สลายแตกตัวและปลดปล่อยโปรตีนที่ถูกกักเก็บอยู่ภายในเซลล์ออกมาได้มากขึ้น (Karki et al., 2010) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง Okara แห้ง พบว่าการใช้ Xylanase กับ Okara แห้งให้ประสิทธิภาพสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดย %Protein content สูงสุดของ Okara แห้งที่ 84.91±1.28% (5%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ 78.11±0.46% (1%, 90 นาที) %Protein recovery ของ Okara แห้งที่ 66.34±0.84% (5%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara

สดที่ $33.43 \pm 1.11\%$ (5%, 90 นาที) และ %Extraction yield ของ Okara แห้งที่ $24.57 \pm 0.93\%$ (5%, 120 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $13.68 \pm 0.11\%$ (5%, 90 นาที)

ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการที่ Okara สดมีปริมาณความชื้นสูงซึ่งเจือจางประสิทธิภาพของเอนไซม์และสร้างอุปสรรคต่อการเข้าถึงไซแลนในผนังเซลล์ ขณะที่ Okara แห้งมีโครงสร้างเซลล์ที่มีรูพรุนมากขึ้นและเอนไซม์สามารถเข้าถึงซับสเตรตได้ดีกว่า (Ma et al., 1997) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอนไซม์และคุณภาพโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นต่ำ (1%) ให้ %Protein content สูงสุด แต่ให้ %Protein recovery ต่ำสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่ำย่อยสลายเนื้อเยื่อได้จำกัด จึงสกัดโปรตีนที่มีคุณภาพสูงแต่ปริมาณน้อย ขณะที่ความเข้มข้นสูง (5%) ย่อยสลายเนื้อเยื่อได้มากขึ้น ทำให้ได้โปรตีนปริมาณมากแต่มีการปนเปื้อนของสารอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายแล้วมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ Cellulase ที่ใช้กับ Okara สด พบว่า Xylanase ให้ %Protein content สูงกว่า (78.11% เทียบกับ 76.82%) แต่ให้ %Protein recovery ต่ำกว่า (33.43% เทียบกับ 40.88%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ de Figueiredo และคณะ (2018) ที่พบว่าเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรตแตกต่างกันจะให้ผลลัพธ์ที่ต่างกัน โดยกลไกการทำงานของ Xylanase ที่จำเพาะต่อไซแลนทำให้สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อาจจำกัดการปลดปล่อยโปรตีนที่ถูกกักเก็บโดยเซลลูโลสหรือสารอื่นๆ

ตาราง 39 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยเอนไซม์ Xylanase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความ เข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara สด	Xylanase	1	90	78.11 ± 0.46^a	24.97 ± 1.55^e	10.28 ± 0.36^f
2				120	70.03 ± 0.73^d	23.05 ± 0.98^f	10.32 ± 0.88^e
3			3	90	75.59 ± 0.89^{bc}	29.85 ± 0.65^c	12.24 ± 0.74^d
4				120	73.82 ± 1.40^c	29.04 ± 0.21^d	12.65 ± 0.23^c
5			5	90	76.67 ± 1.04^{ab}	33.43 ± 1.11^a	13.68 ± 0.11^a
6				120	73.82 ± 0.32^c	32.15 ± 0.77^b	13.50 ± 1.42^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.2.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์

Pectinase

จากผลการทดลองการพรีทรีทเม้นท์ Okara สดด้วยเอนไซม์ Pectinase (ตาราง 40) พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า %Protein content แสดงแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้น ให้ค่าสูงสุดที่ $63.34 \pm 0.28\%$ เมื่อใช้ Pectinase 1% เวลา 120 นาที รองลงมาคือ $62.90 \pm 0.43\%$ ที่ 1% เวลา 90 นาที และ $58.93 \pm 0.79\%$ ที่ 3% เวลา 90 นาที ขณะที่ค่าต่ำสุดพบที่ $51.77 \pm 2.46\%$ เมื่อใช้ 5% เวลา 90 นาที ในขณะที่ %Protein recovery และ %Extraction yield มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเอนไซม์ โดย %Protein recovery ให้ค่าสูงสุดที่ $24.79 \pm 0.56\%$ เมื่อใช้ 5% เวลา 120 นาที และ %Extraction yield ให้ค่าสูงสุดที่ $13.71 \pm 0.70\%$ เมื่อใช้ 5% เวลา 90 นาที เปรียบเทียบกับค่าต่ำสุดที่ $20.19 \pm 0.59\%$ และ $10.32 \pm 0.28\%$ ตามลำดับ เมื่อใช้ 1% เวลา 90 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง Okara แห้ง พบว่าการใช้ Pectinase กับ Okara แห้งให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ต่ำกว่า Okara สดอย่างชัดเจน โดย %Protein content สูงสุดของ Okara แห้งที่ $58.74 \pm 1.70\%$ (1%, 120 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สด ที่ $63.34 \pm 0.28\%$ (1%, 120 นาที) %Protein recovery ของ Okara แห้งที่ $35.03 \pm 0.15\%$ (5%, 120 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $24.79 \pm 0.56\%$ (5%, 120 นาที) และ %Extraction yield ของ Okara แห้งที่ $24.22 \pm 0.69\%$ (5%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $13.71 \pm 0.70\%$ (5%, 90 นาที) ซึ่งแตกต่างจากแนวโน้มที่พบในเอนไซม์ชนิดอื่น

แสดงให้เห็นว่าเพคตินใน Okara สด อาจมีโครงสร้างที่เอื้อต่อการย่อยด้วย Pectinase มากกว่า Okara แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นที่ใช้กับ Okara สด พบว่า Pectinase ให้ประสิทธิภาพต่ำสุดในทุกพารามิเตอร์ โดย %Protein content สูงสุดของ Pectinase (63.34%) ต่ำกว่า Xylanase (78.11%) และ Cellulase (76.82%) %Protein recovery สูงสุดของ Pectinase (24.79%) ต่ำกว่า Cellulase (40.88%) และ Xylanase (33.43%) และ %Extraction yield สูงสุดของ Pectinase (13.71%) ใกล้เคียงกับ Xylanase (13.68%) แต่ต่ำกว่า Cellulase (16.91%) แนวโน้มการลดลงของ %Protein content เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้น เป็นลักษณะเฉพาะของ Pectinase ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ชนิดอื่น อาจเป็นผลมาจากการที่ Pectinase ที่ความเข้มข้นสูงย่อยสลายเพคตินได้มากเกินไป ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตและสารประกอบฟีนอลิกที่เกาะติดกับเพคติน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kasai และคณะ (2004) ที่พบว่าการใช้ Pectinase อาจช่วยเพิ่มการสกัดสารอื่นๆ นอกเหนือจากโปรตีน

ตาราง 40 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ

%Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพริทท์เม้นท์ด้วย
เอนไซม์ Pectinase

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความ เข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาทีก)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara สด	Pectinase	1	90	62.90±0.43 ^a	20.19±0.59 ^c	10.32±0.28 ^b
2				120	63.34±0.28 ^a	21.63±0.66 ^b	10.71±0.75 ^b
3			3	90	58.93±0.79 ^b	24.61±1.75 ^a	12.94±0.83 ^a
4				120	58.72±0.67 ^b	24.04±0.44 ^a	13.16±0.60 ^a
5			5	90	51.77±2.46 ^d	22.63±1.03 ^b	13.71±0.70 ^a
6				120	57.45±0.32 ^c	24.79±0.56 ^a	13.37±1.53 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
โดยวิธี Duncan

2.2.4 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์

Viscozyme

จากผลการทดลองการพริทท์เม้นท์ Okara สดด้วยเอนไซม์ Viscozyme (ตาราง 41) พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า %Protein content มีค่าสูงสุดที่ $77.63 \pm 0.89\%$ เมื่อใช้ Viscozyme 5% เวลา 90 นาที รองลงมาคือ $76.29 \pm 0.92\%$ ที่ 5% เวลา 120 นาที และ $76.28 \pm 1.13\%$ ที่ 3% เวลา 90 นาที ขณะที่ค่าต่ำสุดพบที่ $71.35 \pm 0.82\%$ เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที ในขณะที่ %Protein recovery และ %Extraction yield แสดงแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลา โดยให้ค่าสูงสุดที่ $41.53 \pm 1.07\%$ และ $17.24 \pm 0.59\%$ ตามลำดับ เมื่อใช้ Viscozyme 5% เวลา 120 นาที เปรียบเทียบกับค่าต่ำสุดที่ $21.68 \pm 0.93\%$ และ $9.76 \pm 0.52\%$ ตามลำดับ เมื่อใช้ 1% เวลา 120 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง Okara แห้ง พบว่าการใช้ Viscozyme กับ Okara แห้งให้ประสิทธิภาพสูงกว่า Okara สดอย่างมีนัยสำคัญ โดย %Protein content สูงสุดของ Okara แห้งที่ $80.35 \pm 1.65\%$ (3%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $77.63 \pm 0.89\%$ (5%, 90 นาที) %Protein recovery ของ Okara แห้งที่ $70.65 \pm 0.54\%$ (5%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $41.53 \pm 1.07\%$ (5%, 120 นาที) และ %Extraction yield ของ Okara แห้งที่ $25.32 \pm 1.35\%$ (3%, 90 นาที) เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ $17.24 \pm 0.59\%$ (5%, 120 นาที) ความแตกต่างของ

ประสิทธิภาพระหว่าง Okara สดและแห้ง เมื่อใช้ Viscozyme เป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ผสมต้องการเวลาและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์อย่างครบถ้วน โดยปริมาณความชื้นใน Okara สดอาจเจือจางความเข้มข้นของเอนไซม์และลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดใน Viscozyme

เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นที่ใช้กับ Okara สด พบว่า Viscozyme ให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในด้าน %Protein recovery (41.53%) และ %Extraction yield (17.24%) เมื่อเทียบกับ Cellulase ที่ให้ 40.88% และ 16.91% Xylanase ที่ให้ 33.43% และ 13.68% และ Pectinase ที่ให้ 24.79% และ 13.71% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ de Figueiredo และคณะ. (2018) ที่พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนดีกว่าการใช้เอนไซม์ตัวเดียว การที่ Viscozyme ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด เป็นผลมาจากกลไกการทำงานแบบ synergistic effect ของเอนไซม์หลายชนิดที่ประกอบอยู่ใน Viscozyme ทำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนอย่างมีประสิทธิภาพ

ตาราง 41 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านการพริทท์แห้งด้วยเอนไซม์ Viscozyme

ลำดับ	ตัวอย่าง	เอนไซม์	% ความ เข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara สด	Viscozyme	1	90	74.57±0.98 ^b	23.73±0.89 ^e	10.32±0.47 ^e
2				120	71.35±0.82 ^c	21.68±0.93 ^f	9.76±0.52 ^f
3			3	90	76.28±1.13 ^{ab}	31.36±0.95 ^d	13.48±0.62 ^d
4				120	74.91±0.96 ^b	33.42±0.87 ^c	14.25±0.58 ^c
5			5	90	77.63±0.89 ^a	38.95±1.16 ^b	15.87±0.63 ^b
6				120	76.29±0.92 ^{ab}	41.53±1.07 ^a	17.24±0.59 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

2.2.5 การศึกษาปริมาณโปรตีนเข้มข้นจาก Okara สด ที่ผ่านกระบวนการใช้เอนไซม์ ย่อยผนังเซลล์ในสถานะเหมาะสม

จากผลการทดลองการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 4 ชนิด (ภาพ 41) ในสถานะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจาก Okara สด พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดย Viscozyme ให้ประสิทธิภาพโดยรวมสูงสุด (% Protein content คือ $76.29 \pm 0.92\%$, %Protein recovery คือ $41.53 \pm 1.07\%$, %Extraction yield คือ $17.24 \pm 0.59\%$) รองลงมาคือ Cellulase (%Protein content คือ $74.92 \pm 0.70\%$, %Protein recovery คือ $40.88 \pm 1.26\%$, %Extraction yield คือ $16.91 \pm 1.63\%$) และ Xylanase (%Protein content คือ $76.67 \pm 1.04\%$, %Protein recovery คือ $33.43 \pm 1.11\%$, %Extraction yield คือ $13.68 \pm 0.11\%$) ขณะที่ Pectinase ให้ประสิทธิภาพต่ำสุด (%Protein content คือ $57.45 \pm 0.32\%$, %Protein recovery คือ $24.79 \pm 0.56\%$, %Extraction yield คือ $13.37 \pm 1.53\%$)

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง Okara แห้ง พบว่าเอนไซม์ทุกชนิดให้ประสิทธิภาพกับ Okara แห้ง สูงกว่า Okara สดอย่างชัดเจน โดย Viscozyme กับ Okara แห้งให้ %Protein content สูงสุดที่ $80.35 \pm 1.65\%$, %Protein recovery ที่ $70.65 \pm 0.54\%$ และ %Extraction yield ที่ $25.32 \pm 1.35\%$ เมื่อเทียบกับ Okara สด ที่ให้ค่า $76.29 \pm 0.92\%$, $41.53 \pm 1.07\%$ และ $17.24 \pm 0.59\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ Cellulase กับ Okara แห้งให้ %Protein content สูงสุดที่ $82.04 \pm 0.87\%$, %Protein recovery ที่ $60.39 \pm 0.41\%$ และ %Extraction yield ที่ $27.57 \pm 0.37\%$ เมื่อเทียบกับ Okara สดที่ให้ค่า $74.92 \pm 0.70\%$, $40.88 \pm 1.26\%$ และ $16.91 \pm 1.63\%$ ตามลำดับ ความเหนือกว่าของ Viscozyme เป็นผลมาจากการเป็นเอนไซม์ผสมที่มี synergistic effect ระหว่างเอนไซม์ต่างชนิดที่สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์ได้อย่างครอบคลุม การที่ Okara แห้งให้ประสิทธิภาพสูงกว่า Okara สด สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al. (2021) ที่พบว่าการลดความชื้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากการขาดน้ำทำให้โครงสร้างเซลล์เปราะขึ้นและเอนไซม์สามารถเข้าถึงซับสเตรตได้ดีขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้เอนไซม์ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการผลิต

ด้านความสามารถในการดูดซับน้ำ พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ทุกชนิด มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม โดย Viscozyme ให้ค่า การดูดซับน้ำสูงที่สุด (12.65 ± 0.17 g/g) รองลงมา คือ Cellulase (11.22 ± 0.91 g/g) และ Xylanase (11.09 ± 0.61 g/g) ขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีค่า เพียง 9.23 ± 0.85 g/g สำหรับความสามารถในการดูดซับน้ำมัน พบว่า Viscozyme และ Xylanase ให้ค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (8.53 ± 0.81 g/g และ 8.22 ± 0.25 g/g ตามลำดับ เทียบกับ 6.89 ± 1.32 g/g) แต่ Cellulaseกลับให้ค่าต่ำกว่า (5.77 ± 1.56 g/g) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการลดลงของขนาดอนุภาคโปรตีนที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้นและมีการเปิดเผยหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำและน้ำมันมากขึ้น ตามที่ Damodaran และคณะ (2014) ได้อธิบายไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนมีผลโดยตรงต่อความสามารถในการจับกับน้ำและน้ำมัน

สำหรับสมบัติในการเกิดโฟม และความคงตัวของโฟม พบความสัมพันธ์ที่ซับซ้อน โดยเอนไซม์ Xylanase ให้ค่าการเกิดโฟมสูงที่สุด ($20.77 \pm 0.18\%$) ขณะที่ Cellulase กลับลด การเกิดโฟมลงอย่างมีนัยสำคัญ ($14.77 \pm 0.56\%$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($18.11 \pm 1.96\%$) อย่างไรก็ตาม ความคงตัวของโฟมกลับแสดงแนวโน้มตรงกันข้าม โดยตัวอย่างควบคุมให้ค่าความคงตัวของโฟมสูงที่สุด ($55.63 \pm 0.85\%$) และเอนไซม์ Xylanase ให้ค่าต่ำที่สุด ($41.55 \pm 1.02\%$) ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับทฤษฎีของ McClements (2004) ที่อธิบายว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยบางส่วนจะมีเปปไทด์ขนาดเล็กที่เคลื่อนที่และดูดซับที่พื้นผิวระหว่างอากาศและน้ำได้เร็ว ทำให้เกิดโฟมได้ดี แต่มีความสามารถในการสร้างฟิล์มที่แข็งแรงน้อยกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้ความคงตัวของโฟมลดลง

ในด้านสมบัติการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชัน พบว่า Viscozyme ให้ค่าการเกิดอิมัลชัน สูงที่สุด ($59.12 \pm 0.70\%$) สูงกว่า Xylanase ($52.17 \pm 1.55\%$) ตัวอย่างควบคุม ($50.78 \pm 0.23\%$) และ Cellulase ($48.09 \pm 0.44\%$) อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ Cellulase กลับให้ค่าคงตัวของอิมัลชัน สูงที่สุด (45.33 ± 0.39 นาที) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (43.19 ± 0.21 นาที) Viscozyme (37.34 ± 0.23 นาที) และ Xylanase (35.31 ± 0.78 นาที) ความแตกต่างนี้สะท้อนถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดย Viscozyme เป็นเอนไซม์ผสมที่มีกิจกรรมของทั้ง Arabanase, Cellulase, Beta-glucanase, Hemicellulase, และ Xylanase ตามที่ Gama และคณะ (2015) รายงานไว้ จึงสามารถปลดปล่อยโปรตีนที่มีสัดส่วนของส่วนชอบน้ำและส่วนไม่ชอบน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดอิมัลชัน

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์กับผลการสกัดโปรตีน (ตาราง 34) พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูง (%Protein content) เช่น XYL5 ($84.91 \pm 1.28\%$) และ VIS5 ($80.35 \pm 1.65\%$) มีสมบัติเชิง

หน้าที่ที่ดีกว่าตัวอย่างควบคุมในหลายด้าน โดยเฉพาะการละลาย การดูดซับน้ำ และการเกิดโฟม นอกจากนี้ VIS5 ที่มีค่า %Protein recovery สูงที่สุด ($70.65 \pm 0.54\%$) ยังแสดงสมบัติการเกิดอิมัลชันที่โดดเด่น สอดคล้องกับการศึกษาของ de Figueiredo และคณะ (2019) ที่พบว่าการใช้ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 4% ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ $53\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.2) สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจาก Okara ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ที่สังเกตได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของโปรตีนระหว่างกระบวนการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ ซึ่งนอกจากจะช่วยย่อยสลายผนังเซลล์แล้ว ยังอาจส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนเอง ทำให้เกิดการคลายตัวบางส่วนและเปิดเผยหมู่ที่มีสมบัติทางพื้นผิวมากขึ้น ความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างโครงสร้างโปรตีนกับสมบัติการเกิดโฟมและอิมัลชัน สอดคล้องกับทฤษฎีของ O'Sullivan และคณะ (2016) ที่อธิบายว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโปรตีนอาจเพิ่มความสามารถในการดูดซับที่พื้นผิว แต่อาจลดความแข็งแรงของฟิล์มที่พื้นผิวระหว่างเฟส การพรีทรีทเมนต์ Okara แห้ง ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยเฉพาะการละลายและการดูดซับน้ำ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ผลกระทบต่อสมบัติการเกิดโฟมและอิมัลชันมีความซับซ้อนและขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ การเลือกใช้เอนไซม์ Xylanase หรือ Viscozyme ที่ความเข้มข้น 5% จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาโปรตีนเข้มข้นจาก Okara ที่มีสมบัติเชิงหน้าที่เฉพาะทางสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลาย ทั้งเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เนื้อเทียม หรือผลิตภัณฑ์อิมัลชันต่างๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับ Okara ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตาราง 42 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วย เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

การทดสอบ	C	CEL5	XYL5	VIS5
การละลาย (%)	40.06±0.23 ^d	60.65±0.33 ^c	62.12±0.99 ^a	61.08±1.68 ^b
การดูดซับน้ำ (g/g)	9.23±0.85 ^d	11.22±0.91 ^b	11.09±0.61 ^c	12.65±0.17 ^a
การดูดซับน้ำมัน (g/g)	6.89±1.32 ^c	5.77±1.56 ^d	8.22±0.25 ^b	8.53±0.81 ^a
การเกิดโฟม (%)	18.11±1.96 ^b	14.77±0.56 ^c	20.77±0.18 ^a	18.43±0.22 ^b
ความคงตัวของโฟม (%)	55.63±0.85 ^a	45.35±1.66 ^d	41.55±1.02 ^c	49.84±0.32 ^b
การเกิดอิมัลชัน (%)	50.78±0.23 ^c	48.09±0.44 ^d	52.17±1.55 ^b	59.12±0.70 ^a
ความคงตัวของอิมัลชัน (นาท)	43.19±0.21 ^b	45.33±0.39 ^a	35.31±0.78 ^d	37.34±0.23 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

ตอนที่ 4 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการพรีทรีทเมนต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

1. การศึกษาปริมาณโปรตีน

ในการศึกษาการพรีทรีทเมนต์ Okara แห้งด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (ตาราง 43) ได้เลือกใช้ระยะเวลาการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกที่ 45 นาที เป็นสภาวะพื้นฐานในการศึกษาต่อร่วมกับเอนไซม์ การคัดเลือกสภาวะดังกล่าวอิงจากผลการทดลองในตอนต้นที่ 3.1 (ตาราง 32) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้อัลตราโซนิกที่ 45 นาที ให้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเทียบกับเวลาอื่น (15 และ 30 นาที) และตัวอย่างควบคุมให้ค่า %Protein recovery สูงที่สุด (45.12±0.13%), %Protein content สูงที่สุด (76.65±1.32%) และขนาดอนุภาคเล็กที่สุด (220 nm) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเตรียมโปรตีนเข้มข้น เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทในตอนต้นที่ 5

เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (Okara แห้งที่คัดเลือกจากตอนที่ 2) ซึ่งไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ก่อนการสกัดโปรตีน พบว่ามีค่า %Protein content 73.14±0.84%, %Protein recovery 38.06±0.32% และ %Extraction yield 16.73±0.53% การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกที่ 45 นาทีสามารถเพิ่ม %Protein content ได้ 3.51%, เพิ่ม %Protein recovery ได้ 7.06% และเพิ่ม %Extraction yield ได้ 1.51% เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ

การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการปรับปรุงการสกัดโปรตีนจาก Okara ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lin และคณะ (2021) ที่รายงานว่า การใช้อัลตราโซนิกร่วมกับการสกัดด้วยตัวช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนจาก Okara ผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนและการเพิ่มความไม่ชอบน้ำที่พื้นผิว

จากภาพ 41 พบว่าการพริทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน โดยการใช้เทคนิคร่วมกันนี้ยังคงให้ประสิทธิภาพการสกัดที่สูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพสูงสุดของการใช้เทคนิคร่วมกันกับการใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียวที่สภาวะเหมาะสมที่สุด พบว่าการใช้เทคนิคร่วมกันไม่ได้ส่งผลให้ค่า %Protein content (สูงสุด ~80% เทียบกับ ~85% จาก Xylanase 5% 90 นาที อย่างเดียว) และ %Protein recovery (สูงสุด ~61% เทียบกับ ~71% จาก Viscozyme 5% 90 นาที อย่างเดียว) สูงขึ้นอย่างชัดเจน ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นถึงผลกระทบต่อความเสถียร หรือกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการอัลตราโซนิก และเอนไซม์ ซึ่งอาจไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน หรืออัลตราโซนิกอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในบางสภาวะ (Pingret et al., 2013)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านต้นทุนการผลิตพบว่า การใช้อัลตราโซนิกเพิ่มต้นทุนเพียง 0.84 บาท (13.83%) จาก 6.074 บาท เป็น 6.914 บาท ในขณะที่การใช้เอนไซม์ Xylanase เพิ่มต้นทุนถึง 132 บาท (2,173.36%) เป็น 138.074 บาท และการใช้เอนไซม์ Viscozyme เพิ่มต้นทุนมากถึง 1,869.12 บาท (30,771.16%) เป็น 1,875.194 บาท ดังนั้นการใช้อัลตราโซนิกเพียงอย่างเดียวจึงมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์มากกว่าการใช้เอนไซม์หรือการใช้เทคนิคร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Preece และคณะ (2017) ที่เสนอว่าการใช้กระบวนการทางกายภาพ ในการปรับปรุงการสกัดโปรตีนจาก Okara มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากกว่าการใช้เอนไซม์ที่มีราคาสูง

การเลือกใช้กระบวนการพริทรีทเม้นท์ด้วยอัลตราโซนิกที่ 45 นาที ในการนำไปใช้ในตอนที่ 5 โดยคลื่นอัลตราโซนิกทำให้เกิดปรากฏการณ์ควิเตชัน ซึ่งสร้างแรงเฉือนสูงและความดันที่เปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรง ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว และเปิดเผยบริเวณที่เอนไซม์โปรติเอสสามารถเข้าถึงและตัดพันธะเปปไทด์ได้ง่ายขึ้น ตามที่ Lin และคณะ (2021) รายงานว่าอัลตราโซนิกสามารถเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและทำให้โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีผลให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงตำแหน่งจำเพาะได้ดีขึ้น

การคัดเลือกการพริทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ 45 นาที นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Umego และคณะ (2021) ที่อธิบายว่า การใช้อัลตราโซนิกในการพริทรีทเม้นท์วัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มกิจกรรมทางชีวภาพ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีน เพิ่มอัตราการเปลี่ยนรูปของโปรตีน และเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในระหว่างกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ เมื่อนำมาใช้เหมาะสม การเตรียมโปรตีนเข้มข้นด้วยวิธีนี้จึงเอื้อประโยชน์ต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีขึ้นขั้นตอนต่อไป

ตาราง 43 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่ง ที่ผ่านการฟัรืท-เม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

ลำดับ	ตัวอย่าง	อัลตราโซนิก (นาที)	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้ง)	เวลา (นาที)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1	Okara แห้ง (คัดเลือกจาก ตอนที่ 2)	-	-	-	-	73.14±0.84 ^l	38.06±0.32 ^l	16.73±0.53 ^l
2	Okara แห้ง (คัดเลือกจาก ตอนที่ 3.1)	45	-	-	-	76.65±1.32 ^s	45.12±0.13 ^k	18.24±1.32 ^k
3	Okara แห้ง (คัดเลือกจาก ตอนที่ 3.2)	-	Xylanase	5	90	84.91±1.28 ^a	66.34±0.84 ^b	24.51±1.03 ^f
4			Viscozyme	3	90	80.35±1.65 ^b	68.10±0.65 ^a	25.32±1.35 ^d
5				3	90	77.12±1.83 ^c	49.65±0.72 ^j	20.45±0.06 ^j
6				3	120	72.68±3.25 ^j	46.25±0.09 ^j	20.14±1.23 ^j
7			Xylanase	5	90	66.71±1.49 ^k	52.86±2.00 ^s	25.18±1.20 ^e
8	Okara แห้ง (ตอนที่ 4)	45			120	64.52±2.11 ^l	52.11±0.02 ^h	25.54±1.32 ^c
9				3	90	79.45±1.65 ^c	55.35±0.85 ^e	22.35±0.75 ^h
10			Viscozyme		120	77.80±2.05 ^d	53.75±0.70 ^f	23.15±0.90 ^s
11				5	90	76.35±1.55 ^f	61.25±0.95 ^c	26.85±0.85 ^b
12					120	74.75±1.85 ^h	59.85±0.75 ^d	27.65±1.05 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

2.การวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตของการพรีทรีทเม้นท์

จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara (ตาราง 43) พบว่า การพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที เป็นกระบวนการที่มีความคุ้มค่า และมีศักยภาพในการขยายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรม โดยวิธีปกติ (ควบคุม) มีต้นทุน 6.074 บาท การใช้อัลตราโซนิกเพิ่มต้นทุนเพียง 0.84 บาท (13.83%) เป็น 6.914 บาท มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น 1.14 เท่า ขณะที่การใช้เอนไซม์ Xylanase เพิ่มต้นทุนอย่างมากถึง 132.00 บาท (2,173.36%) เป็น 138.074 บาท มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น 22.73 เท่า และการใช้เอนไซม์ Viscozyme เพิ่มต้นทุนสูงสุดถึง 1,869.12 บาท (30,771.16%) เป็น 1,875.194 บาท มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น 308.71 เท่า ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการใช้เอนไซม์มีต้นทุนที่สูงมากเมื่อเทียบกับกระบวนการทางกายภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Preece และคณะ (2017) ที่เสนอว่าการใช้กระบวนการทางกายภาพในการปรับปรุงการสกัดโปรตีนจาก Okara มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากกว่าการใช้เอนไซม์ที่มีราคาสูง

ในมุมมองเศรษฐศาสตร์ อัลตราโซนิกมีความคุ้มค่าสูงสุด เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของต้นทุนเพียง 13.83% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เอนไซม์ต้องการการลงทุนสูงมากจนอาจไม่คุ้มค่าสำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์ ยกเว้นในกรณีที่ผลิตภัณฑ์มีมูลค่าเพิ่มสูงมาก สำหรับการขยายสเกลสู่อุตสาหกรรม อัลตราโซนิกมีข้อได้เปรียบหลายประการ ได้แก่ ความเสถียรของกระบวนการสูง ไม่ต้องการการควบคุมอุณหภูมิที่เข้มงวด ไม่มีปัญหาการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ และสามารถดำเนินการอย่างต่อเนื่องได้

ตาราง 44 ตารางเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara

วิธีการพรีทรีทเม้นท์	ต้นทุนเดิม (บาท)	ต้นทุนใหม่ (บาท)	ต้นทุนเพิ่มขึ้น (บาท)	อัตราส่วนต้นทุนเมื่อ เทียบกับวิธีปกติ
วิธีปกติ (ควบคุม)	6.074	6.074	0	1.00x
อัลตราโซนิก	6.074	6.914	0.84	1.14x
เอนไซม์ Xylanase	6.074	138.074	132	22.73x
เอนไซม์ Viscozyme	6.074	1,875.19	1,869.12	308.71x

ตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์โปรติเอส

1. การศึกษาปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์โปรติเอส

จากการวิเคราะห์ตาราง 45 ซึ่งแสดงปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara พบว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วย คลื่นอัลตราโซนิกและชนิดของเอนไซม์โปรติเอสมีผลต่อการกระจายตัวของโปรตีนระหว่างส่วน Supernatant และ Pellet ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อค่าที่วิเคราะห์ได้ โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับ Flavourzyme ความเข้มข้น 2.5% ที่เวลา 90 นาที ให้ค่า %Protein content สูงสุด ($77.11 \pm 2.20\%$) แต่กลับมีค่า %Protein recovery ($10.89 \pm 0.76\%$) และ %Extraction yield ($10.83 \pm 0.76\%$) ที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการใช้ Flavourzyme 2.5% ที่ 90 นาทีโดยไม่มีการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิก ($17.75 \pm 0.95\%$ และ $20.78 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ)

จากการที่กระบวนการวิเคราะห์และการทำแห้งใช้เฉพาะส่วน Supernatant ซึ่งเป็นส่วนที่มีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water-soluble protein) และเปปไทด์ขนาดเล็กที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ในขณะที่โปรตีนบางส่วนที่ไม่ละลายน้ำหรือยังไม่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ยังคงอยู่ในส่วน Pellet และไม่ได้นำมาวิเคราะห์ ตามที่ Karki และคณะ (2010) อธิบายว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme specificity) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะตัดพันธะเปปไทด์ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ทำให้ได้เปปไทด์ขนาดและคุณสมบัติที่ต่างกันไป นอกจากนี้การใช้คลื่นอัลตราโซนิกอาจส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย ตามที่ O'Sullivan และคณะ (2016) พบว่าอัลตราโซนิกสามารถทำให้เกิดการรวมตัวของโปรตีน (protein aggregation) ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) ทำให้โปรตีนบางส่วนตกตะกอนและอยู่ในส่วน Pellet การสังเกตเห็นค่า %Protein recovery และ %Extraction yield ที่ลดลงอย่างมากในสภาวะ Flavourzyme 2.5% และ 5.0% ที่ 120 นาทีร่วมกับอัลตราโซนิก ($6.33 \pm 0.56\%$ และ $7.02 \pm 0.60\%$, $5.04 \pm 0.45\%$ และ $5.75 \pm 0.50\%$ ตามลำดับ) อาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนมากเกินไป (over-hydrolysis) ซึ่งทำให้เปปไทด์ขนาดเล็กมากที่เกิดขึ้นบางส่วนสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) ตามที่ Umego และคณะ (2021) อธิบายว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลานานอาจทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาก (< 1 kDa) ซึ่งอาจสูญเสียไประหว่างกระบวนการตกตะกอนหรือทำแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Alzaydi และคณะ (2023) ซึ่งศึกษาการย่อย Okara ด้วยเอนไซม์โปรติเอสและพบว่าโปรตีนประมาณ 15-25% ยังคงอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำแม้จะผ่านการย่อยแล้ว ผลการทดลองในตาราง 45 จึงสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ในกรณีของ Alcalase การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตรา

โซนิคช่วยเพิ่มทั้ง %Protein content และ %Protein recovery ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่อัลตราโซนิคช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนให้เอื้อต่อการทำงานของ Alcalase และทำให้เปปไทด์ที่เกิดขึ้นละลายน้ำได้ดี

ตามที่ Lin และคณะ (2021) พบว่าอัลตราโซนิคสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนจาก Okara ผ่านการทำลายพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ การที่ %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield มีค่าที่แตกต่างกันและในบางกรณีมีค่าลดลงเมื่อใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์บางชนิด เกิดจากการเลือกวิเคราะห์เฉพาะส่วน Supernatant ซึ่งไม่ได้รวมโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำในส่วน Pellet รวมทั้งผลของปฏิสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างคลื่นอัลตราโซนิคและเอนไซม์ที่มีผลต่อโครงสร้างโปรตีน การละลาย และการกระจายตัวของเปปไทด์ขนาดต่างๆ ในระบบการพิจารณาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ระยะเวลา และการใช้อัลตราโซนิคจึงมีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ การเลือกใช้ Flavourzyme ความเข้มข้น 2.5% ที่ 90 และ 120 นาที สำหรับการศึกษาต่อไปมีเหตุผลที่สมเหตุสมผล เนื่องจาก Flavourzyme เป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอกโซเปปติเดสและเอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนสูง ให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่ดีที่สุด มีความสมดุลระหว่างการใช้อเอนไซม์และต้นทุน และช่วยเปิดโครงสร้างโปรตีนให้เหมาะสำหรับการผลิตไฮโดรไลเซตที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ อย่างไรก็ตามควรพิจารณาว่าการวัดผลที่เฉพาะส่วน Supernatant อาจไม่สะท้อนถึงประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนทั้งหมด เนื่องจากเปปไทด์บางส่วนอาจยังคงอยู่ในส่วน Pellet หรือมีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลายน้ำหลังการย่อยด้วยเอนไซม์

ตาราง 45 ปริมาณโปรตีน %Protein content, %Protein recovery และ %Extraction yield ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ที่ผ่านการฟัรริท
เม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคและยอยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ลำดับ	ตัวอย่าง	อัลตราโซนิค (นาทีก)	เอนไซม์	% ความเข้มข้น (% ฐานแห้งของโปรตีนเริ่มต้น)	เวลา (นาทีก)	%Protein content (% ฐานแห้ง)	%Protein recovery (% ฐานแห้ง)	%Extraction yield (% ฐานแห้ง)
1			Alcalase	2.5	90	62.34±1.45 ⁱ	9.89±0.68 ⁿ	11.60±0.79 ^m
2					120	65.51±1.56 ⁿ	14.62±0.85 ^d	16.33±0.92 ^d
3				5.0	90	63.22±1.48 ⁱ	10.79±0.72 ^k	12.49±0.82 ^k
4					120	64.77±1.52 ^q	8.04±0.65 ^q	9.08±0.68 ^f
5			Flavourzyme	2.5	90	62.46±1.45 ^s	17.75±0.95 ^a	20.78±1.15 ^a
6					120	66.12±1.58 ^l	17.40±0.94 ^b	19.25±1.10 ^b
7				5.0	90	67.29±1.65 ^f	9.72±0.69 ^o	10.57±0.75 ^p
8					120	69.15±1.75 ^t	13.77±0.84 ^e	14.56±0.87 ^f
9	โปรตีน เข้มข้น Okara		Alcalase+	2.5+2.5	90	68.79±1.70 ^h	10.43±0.72 ^l	11.09±0.78 ⁿ
10			Flavourzyme		120	68.33±1.68 ^h	12.17±0.80 ^h	13.03±0.84 ^l
11			Alcalase	2.5	90	70.34±1.78 ^c	12.65±0.82 ^f	13.79±0.85 ^s
12					120	71.34±1.82 ^b	15.29±0.88 ^c	16.42±0.92 ^c
13	45		Alcalase	5.0	90	69.65±1.76 ^e	12.32±0.81 ^s	13.56±0.85 ^h
14					120	70.11±1.80 ^d	9.65±0.70 ^p	10.55±0.75 ^q
15			Flavourzyme	2.5	90	77.11±2.20 ^a	10.89±0.76 ^j	10.83±0.76 ^o
16					120	69.12±1.72 ^s	6.33±0.56 ^f	7.02±0.60 ^s
17				5.0	90	65.66±1.55 ^m	10.82±0.75 ^j	12.63±0.82 ^j
18					120	67.14±1.65 ^k	5.04±0.45 ^s	5.75±0.50 ^t
19			Alcalase+	2.5+2.5	90	64.90±1.52 ^p	10.19±0.72 ^m	12.04±0.80 ^j
20			Flavourzyme		120	65.47±1.54 ^o	12.65±0.82 ^f	14.81±0.88 ^e

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

2. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

2.1 ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (ภาพ 29) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีครีมอมเหลืองอ่อน (light beige) มีการจับตัวเป็นก้อนเล็กๆบางส่วน แสดงถึงโครงสร้างที่มีความพรุนและมีความสามารถในการดูดความชื้นได้ (hygroscopic property) ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) ตามที่ Chalamaiyah และคณะ (2012) ได้อธิบายไว้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากแหล่งโปรตีนพืชมีสีตั้งแต่ครีมจนถึงน้ำตาลอ่อน ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) และปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต ความละเอียดของผงโปรตีนบ่งชี้ถึงการย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพ และการทดสอบโพลีเปปไทด์ให้มีขนาดสั้นลง



ภาพ 43 โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara

2.2 ค่าสี (L^* , a^* , b^*)

จากการวิเคราะห์ค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara (ตาราง 46) พบว่าการพริทท์หมักด้วยคลีนอัลตราโซนิกส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพด้านสีอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าความสว่าง (L^*) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพริทท์หมักด้วยคลีนอัลตราโซนิก (85.75 ± 0.42) สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการพริทท์หมัก (81.35 ± 0.25) คิดเป็นการเพิ่มขึ้น 5.4% ในขณะที่ค่า a^* ซึ่งแสดงถึงสีแดง-เขียว มีค่าลดลงเล็กน้อยจาก 2.15 ± 0.18 เป็น 1.95 ± 0.15 (ลดลง 9.3%) และค่า b^* ซึ่งแสดงถึงสีเหลือง-น้ำเงิน มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 21.45 ± 0.32 เป็น 23.55 ± 0.38 (เพิ่มขึ้น 9.8%)

การเปลี่ยนแปลงค่าสีนี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีที่พบในตาราง 47 โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจาก $62.46 \pm 1.45\%$ เป็น $77.11 \pm 2.20\%$ (เพิ่มขึ้น 23.4%) และการลดลงของไขมันจาก $6.15 \pm 0.28\%$ เป็น $3.75 \pm 0.22\%$ (ลดลง 39.0%) ซึ่งส่งผลต่อการสะท้อนแสงและลักษณะสีของผลิตภัณฑ์ ปรากฏการณ์นี้เกิดจากกลไกการเกิดควิเดชั่นจากคลีนอัลตราโซนิก ซึ่งสร้างแรงเฉือนสูงและความดันที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงและมีการกระจายตัวสม่ำเสมอมากขึ้น ทำให้การสะท้อนแสงเพิ่มขึ้นและค่า L^* สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eze และ Charalampopoulos (2022) ที่พบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara ได้มากกว่า 100% เมื่อเทียบกับวิธีสกัดแบบมาตรฐาน

การลดลงของค่า a^* และการเพิ่มขึ้นของค่า b^* อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนและการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวซิงในระดับที่แตกต่างกัน ตามที่ Chalamaiah และคณะ (2012) ได้อธิบายไว้ว่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) และปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากแหล่งอื่น เช่น การศึกษาของ Taheri และคณะ (2013) ที่รายงานค่า L^* ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเครื่องในปลาเทราท์ (68.9 ± 0.9) และจากผลพลอยได้จากสัตว์ปีก (78.8 ± 0.7) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการพริทท์หมักด้วยคลีนอัลตราโซนิกมีค่า L^* สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงความสว่างที่เป็นลักษณะพึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสท

ค่าสีที่ได้รับการปรับปรุงนี้ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีครีมอมเหลืองอ่อนที่สว่างกว่า ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ การวิเคราะห์ค่าสีนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าการพริทท์หมักด้วยคลีนอัลตราโซนิกช่วยเพิ่ม %Protein content ในโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara และทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะ

ทางกายภาพที่ดีขึ้น ตามที่ O'Sullivan และคณะ (2016) ได้อธิบายว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน โดยทำลายพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป บ่งชี้ว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพโปรตีนเท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพด้านสีซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค

ตาราง 46 สมบัติทางกายภาพค่าสี (L^* , a^* , b^*) Hunter lab ของ โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara

ค่าสี	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
L^*	81.35 ± 0.25^b	85.75 ± 0.42^a
a^*	2.15 ± 0.18^a	1.95 ± 0.15^b
b^*	21.45 ± 0.32^b	23.55 ± 0.38^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

3. การศึกษาสมบัติทางเคมี

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara (ตาราง 47) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพสูงของการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก $62.46 \pm 1.45\%$ เป็น $77.11 \pm 2.20\%$ (เพิ่มขึ้น 23.4%) ขณะที่องค์ประกอบที่ไม่พึงประสงค์ลดลงอย่างชัดเจน ได้แก่ ไขมันลดลงจาก $6.15 \pm 0.28\%$ เป็น $3.75 \pm 0.22\%$ (ลดลง 39.0%) เยื่อใยลดลงจาก $7.25 \pm 0.39\%$ เป็น $3.15 \pm 0.30\%$ (ลดลง 56.6%) และคาร์โบไฮเดรตลดลงจาก $15.04 \pm 0.48\%$ เป็น $5.99 \pm 0.38\%$ (ลดลง 60.2%) ในขณะที่ความชื้นและเถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจาก $4.25 \pm 0.35\%$ เป็น $4.65 \pm 0.40\%$ และจาก $4.85 \pm 0.42\%$ เป็น $5.35 \pm 0.45\%$ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของ Okara แห้งตั้งต้น (ตาราง 25) ที่มีโปรตีน $32.15 \pm 0.19\%$ ไขมัน $8.66 \pm 0.33\%$ เยื่อใย $10.55 \pm 0.85\%$ และคาร์โบไฮเดรต $42.8 \pm 0.42\%$ พบว่า

กระบวนการผลิตทั้งหมดสามารถเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนได้มากกว่า 2.4 เท่า และลดองค์ประกอบอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการสกัดโปรตีนด้วยต่างและการแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำออก ความแตกต่างระหว่างไฮโดรไลเซตทั้งสองชนิดชี้ให้เห็นว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการสกัดช่วยให้ได้โปรตีนเข้มข้นตั้งต้นที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในภาพ 37 ที่พบว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกช่วยเพิ่ม %Protein content จาก $73.14 \pm 0.84\%$ เป็น $76.65 \pm 1.32\%$

ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการเกิดคาวิตีเทชันจากคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันในตัวกลางของเหลว นำไปสู่การเกิดและการแตกตัวของฟองอากาศขนาดเล็ก (microbubbles) ส่งผลให้เกิดแรงเฉือนทางกลที่ช่วยทำลายผนังเซลล์และโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น ในขณะเดียวกันยังช่วยแยกองค์ประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eze และคณะ (2022) ที่พบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจาก Okara ได้มากกว่า 100% เมื่อเทียบกับวิธีสกัดแบบมาตรฐาน

เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์โปรตีนถั่วเหลืองเชิงพาณิชย์ พบว่าคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ (โปรตีน ~77%, ไขมัน <4%, เยื่อใย ~3%) มีลักษณะใกล้เคียงกับโปรตีนเข้มข้นจากถั่วเหลือง (Soy Protein Concentrate - SPC) ที่มีโปรตีน 65-90% และดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซต (Soy Protein Hydrolysate - SPH) ทั่วไปที่มีโปรตีน 50-70% แม้ว่าจะยังไม่ถึงระดับความบริสุทธิ์ของโปรตีนสกัดบริสุทธิ์ (Soy Protein Isolate - SPI) ที่มักมีโปรตีนสูงกว่า 90% นอกจากนี้ ค่า %Extraction yield ยังสูงกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมที่ Vishwanathan และคณะ (2011) รายงานไว้ที่เพียง $4.61 \pm 0.06\%$

องค์ประกอบทางเคมีที่ปรับปรุงแล้วนี้อาจส่งผลดีต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่และคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเซต เช่น ความสามารถในการละลาย การเกิดโฟม การอุ้มน้ำ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง การพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara โดยลดองค์ประกอบอื่นๆ ลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม

ตาราง 47 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara

องค์ประกอบทางเคมี (% ฐานเปียก)	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
ความชื้น	4.25±0.35 ^b	4.65±0.40 ^a
ไขมัน	6.15±0.28 ^a	3.75±0.22 ^b
โปรตีน	62.46±1.45 ^b	77.11±2.20 ^a
เถ้า	4.85±0.42 ^b	5.35±0.45 ^a
เยื่อใย	7.25±0.39 ^a	3.15±0.30 ^b
คาร์โบไฮเดรต	15.04±0.48 ^a	5.99±0.38 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

4. การศึกษากิจกรรมทางชีวภาพ

การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara (ตาราง 48) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสกัดโปรตีนและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์โปรติเอสสามารถเพิ่มศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Okara แห่งตั้งต้น (ตาราง 26) โดยการไฮโดรไลซิสทั้งชนิดที่ไม่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์และชนิดที่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่สูงขึ้น (ค่า IC₅₀ ลดลงจาก 6.45±0.01 เหลือ 4.85±0.25 และ 3.25±0.10 mg/g ตามลำดับ) ความสามารถในการรีดิวซ์ (FRAP) สูงขึ้น (จาก 11.47±0.58 เป็น 13.50±0.49 และ 16.75±0.28 mg/g ตามลำดับ) และความสามารถในการจับกับไอออนเหล็ก (Fe²⁺ chelating) สูงขึ้น (จาก 1.67±0.14 เป็น 2.10±0.26 และ 2.85±0.67 mg ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไฮโดรไลเซตทั้งสองชนิด พบว่ากลุ่มที่ผลิตจากโปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการฟิรทรีทเมนต์ในทุกพารามิเตอร์ที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ

การเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Figueiredo และคณะ (2019) ที่รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซิสอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าค่า ABTS radical scavenging activity

เพิ่มขึ้นจาก 58.29 เป็น 383.49 $\mu\text{m Trolox equivalent/g solids}$ และค่า FRAP เพิ่มขึ้นจาก 2.41 เป็น 15.32 $\mu\text{m Trolox equivalent/g solids}$ เมื่อผ่านการไฮโดรไลซิสที่สภาวะที่เหมาะสม ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระผ่านการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรือการจับกับไอออนโลหะที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน

กลไกการพริทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนผ่านกลไกควิเตชัน ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันในตัวกลางของเหลว นำไปสู่การเกิดและการแตกตัวของฟองอากาศขนาดเล็ก (microbubbles) ส่งผลให้เกิดแรงเฉือนทางกลที่ช่วยทำลายผนังเซลล์และโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โครงสร้างเปิดออกและเอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสมากขึ้น ดังที่สังเกตได้จากการลดลงของขนาดอนุภาคในภาพ 36 และการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก $62.46 \pm 1.45\%$ เป็น $77.11 \pm 2.20\%$ (ตาราง 47) ซึ่งการมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นนำไปสู่การเกิดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น

ผลการวิเคราะห์ยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) เพิ่มขึ้นจาก 1.15 ± 0.98 เป็น $1.65 \pm 0.66 \text{ mg GAE/g}$ (เพิ่มขึ้น 43.5%) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) เพิ่มขึ้นจาก 3.10 ± 0.18 เป็น $3.85 \pm 0.87 \text{ mg QE/g}$ (เพิ่มขึ้น 24.2%) ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ การที่อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลเสทอาจเกิดจากกลไกหลายประการร่วมกัน ได้แก่ อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ออกมาจาก Okara ในขั้นตอนการเตรียมโปรตีนเข้มข้น และการพริทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกอาจส่งผลให้เอนไซม์โปรตีเอสสามารถเข้าย่อยในตำแหน่งที่แตกต่างหรือมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงขึ้นหรือในปริมาณที่มากขึ้น

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าวัตถุดิบตั้งต้นอย่างมีนัยสำคัญ และการใช้เทคนิคอัลตราโซนิกพริทรีทเมนต์โปรตีนเข้มข้นก่อนการไฮโดรไลซิสเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสทสุดท้ายให้สูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่สูง โดยเฉพาะในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันและโรคที่เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชัน

ตาราง 48 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara

การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (% ฐานแห้ง)	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการฟรีทรีทเมนต์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการฟรีทรีทเมนต์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
DPPH ((IC50) (mg/g))	4.85±0.22 ^a	3.25±0.10 ^b
FRAP (mg/g)	13.50±0.49 ^b	16.75±0.28 ^a
Fe2+ chelating (mg)	2.10±0.26 ^b	2.85±0.67 ^a
TPC (mg GAE/g)	1.15±0.98 ^b	1.65±0.66 ^a
TFC (mg QE/g)	3.10±0.18 ^b	3.85±0.87 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Duncan

5. ปริมาณกรดอะมิโน (Amino acid profile)

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara (ตาราง 49) แสดงให้เห็นว่าการฟรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยยังคงรักษาโปรไฟล์ลักษณะเฉพาะของโปรตีนถั่วเหลืองไว้ กรดกลูตามิก (Glutamic acid) มีปริมาณสูงที่สุดในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการฟรีทรีทเมนต์ (5650 mg/100g) และที่ผ่านการฟรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (6460 mg/100g) คิดเป็นการเพิ่มขึ้น 14.3% รองลงมาคือลิวซีน (Leucine) ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก 3520 mg/100g เป็น 4075 mg/100g (เพิ่มขึ้น 15.8%) และกรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid) ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก 2850 mg/100g เป็น 3265 mg/100g (เพิ่มขึ้น 14.6%) การเพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนเดียวกันในกรดอะมิโนทุกชนิดประมาณ 1.15 ถึง 1.17 เท่านี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตาราง 47 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซตกลุ่มที่ผ่านอัลตราโซนิกมี %Protein content สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (77.11±2.20% เทียบกับ 62.46±1.45%)

การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลลัพธ์ที่สำคัญ โดยฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) เพิ่มขึ้นจาก 2590 mg/100g เป็น 3010 mg/100g (เพิ่มขึ้น 16.2%) ไทโรซีน (Tyrosine) เพิ่มขึ้นจาก 2450 mg/100g เป็น 2860 mg/100g (เพิ่มขึ้น 16.7%) และเมไธโอนีน

(Methionine) เพิ่มขึ้นจาก 395 mg/100g เป็น 460 mg/100g (เพิ่มขึ้น 16.5%) การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในตาราง 48 ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการฟัรริทเทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการฟัรริทเทเมนต์อย่างมีนัยสำคัญ

การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการฟัรริทเทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกสามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการเกิดควิเตชัน ซึ่งทำให้เกิดแรงเฉือนที่สูงและความดันที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนคลายตัวและเปิดออก ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงพันธะเปปไทด์ได้ดีขึ้น การฟัรริทเทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกไม่ได้เปลี่ยนแปลงสัดส่วนสัมพัทธ์ของกรดอะมิโนในโปรตีน Okara อย่างจำเพาะเจาะจง แต่ส่งผลให้โปรตีนเข้มข้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการไฮโดรไลซิสมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น และเมื่อนำโปรตีนเข้มข้นที่บริสุทธิ์กว่านี้ไปผลิตไฮโดรไลเสท จึงได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนทุกชนิดต่อหน่วยน้ำหนักสูงขึ้นตามสัดส่วนของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณากรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids) พบว่าการฟัรริทเทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกช่วยเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิดโดยเฉลี่ย 15-16% ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ โปรไฟล์กรดอะมิโนที่พบนี้แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเสทจาก Okara เป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพทางโภชนาการที่ดี มีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน แม้ว่าจะมีเมไธโอนีนและซิสทีนในปริมาณที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของโปรตีนจากถั่วเหลือง

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Eze และ Charalampopoulos (2022) ที่พบว่าการใช้อัลตราโซนิกสามารถเพิ่มปริมาณการสกัดโปรตีนจาก Okara ได้ถึง 84% (w/w) เมื่อเทียบกับการสกัดแบบธรรมดาที่ให้ผลผลิตเพียง 36% (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนในการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ratnayani และคณะ (2022) ที่รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara มีกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรไฟล์กรดอะมิโนร่วมกับข้อมูลด้านองค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สามารถสรุปได้ว่าการฟัรริทเทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกก่อนการสกัดโปรตีนเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara โดยกลไกหลักคือการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนในวัตถุดิบตั้งต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความเข้มข้นของกรดอะมิโนต่อหน่วย

น้ำหนักที่สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีคุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สูงขึ้นและเหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณภาพสูง

ตาราง 49 ปริมาณกรดอะมิโนโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara

Amino acid	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการฟรียทรีทเมนต์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการฟรียทรีทเมนต์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
Alanine (mg/100g)	1545 ^b	1780 ^a
Aspartic acid (mg/100g)	2850 ^b	3265 ^a
Cystine (mg/100g)	715 ^b	825 ^a
Glutamic acid (mg/100g)	5650 ^b	6460 ^a
Glycine (mg/100g)	1260 ^b	1450 ^a
*Histidine (mg/100g)	2130 ^b	2480 ^a
Hydroxylysine (mg/100g)	<20	<20
Hydroxyproline (mg/100g)	<20	<20
*Isoleucine (mg/100g)	2240 ^b	2620 ^a
*Leucine (mg/100g)	3520 ^b	4075 ^a
*Lysine (mg/100g)	2760 ^b	3170 ^a
*Methionine (mg/100g)	395 ^b	460 ^a
*Phenylalanine (mg/100g)	2590 ^b	3010 ^a
Proline (mg/100g)	1960 ^b	2285 ^a
Serine (mg/100g)	740 ^b	865 ^a
Threonine (mg/100g)	680 ^b	798 ^a
Tryptophan (mg/100g)	490 ^b	575 ^a
Tyrosine (mg/100g)	2450 ^b	2860 ^a
*Valine (mg/100g)	2270 ^b	2640 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

: * กรดอะมิโนจำเป็น

6. ระดับการย่อยสลาย

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (%Degree of hydrolysis, %DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara (ภาพ 43) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาในการย่อย และการพริทริทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค โดยภาพรวมพบว่า Flavourzyme ให้ค่า %DH สูงกว่า Alcalase ในทุกสภาวะการทดลอง และการพริทริทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญในทุกเงื่อนไข

การพริทริทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 45 นาทีก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ส่งผลให้ค่า %DH เพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการทดลองโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 27.9% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการพริทริทเมนต์ ตัวอย่างเช่น Flavourzyme 5.0% ที่ 120 นาที ค่า %DH เพิ่มขึ้นจาก 84.8% เป็น 108.5% และในกรณีของ Alcalase 2.5% ที่ 90 นาที ค่า %DH เพิ่มขึ้นจาก 40.5% เป็น 52.4% การเพิ่มขึ้นของ %DH จากการพริทริทเมนต์นี้สอดคล้องกับผลการทดลองในภาพ 36 ที่แสดงให้เห็นการลดลงของขนาดอนุภาคจาก 368 nm เหลือ 220 nm ซึ่งเป็นผลจากกลไกการเกิดควาเวชันของคลื่นอัลตราโซนิคที่สร้างแรงเฉือนระดับจุลภาคทำให้โครงสร้างโปรตีนคลายตัวและเพิ่มพื้นที่ผิวให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาตัดพันธะเปปไทด์ได้ง่ายขึ้น

ผลการทดลองแสดงให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละชนิด โดย Flavourzyme ให้ค่า %DH สูงกว่า Alcalase อย่างสม่ำเสมอในทุกสภาวะ ในกลุ่มที่ไม่ผ่านการพริทริทเมนต์ พบว่า Flavourzyme 5.0% ที่ 120 นาทีให้ค่า %DH สูงที่สุด (84.8%) ในขณะที่ Alcalase 2.5% ที่ 90 นาทีให้ค่า %DH ต่ำที่สุด (40.5%) สำหรับกลุ่มที่ผ่านการพริทริทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค Flavourzyme 5.0% ที่ 120 นาทีให้ค่า %DH สูงที่สุด (108.5%) ในขณะที่ Alcalase 2.5% ที่ 90 นาทียังคงให้ค่า %DH ต่ำที่สุด (52.4%) ความแตกต่างของประสิทธิภาพนี้อธิบายได้ด้วยกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดย Alcalase เป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ที่ตัดพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลโปรตีน ในขณะที่ Flavourzyme เป็นเอนไซม์ผสมที่มีทั้ง endopeptidase และ exopeptidase ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งภายในสายและที่ปลายสายเปปไทด์

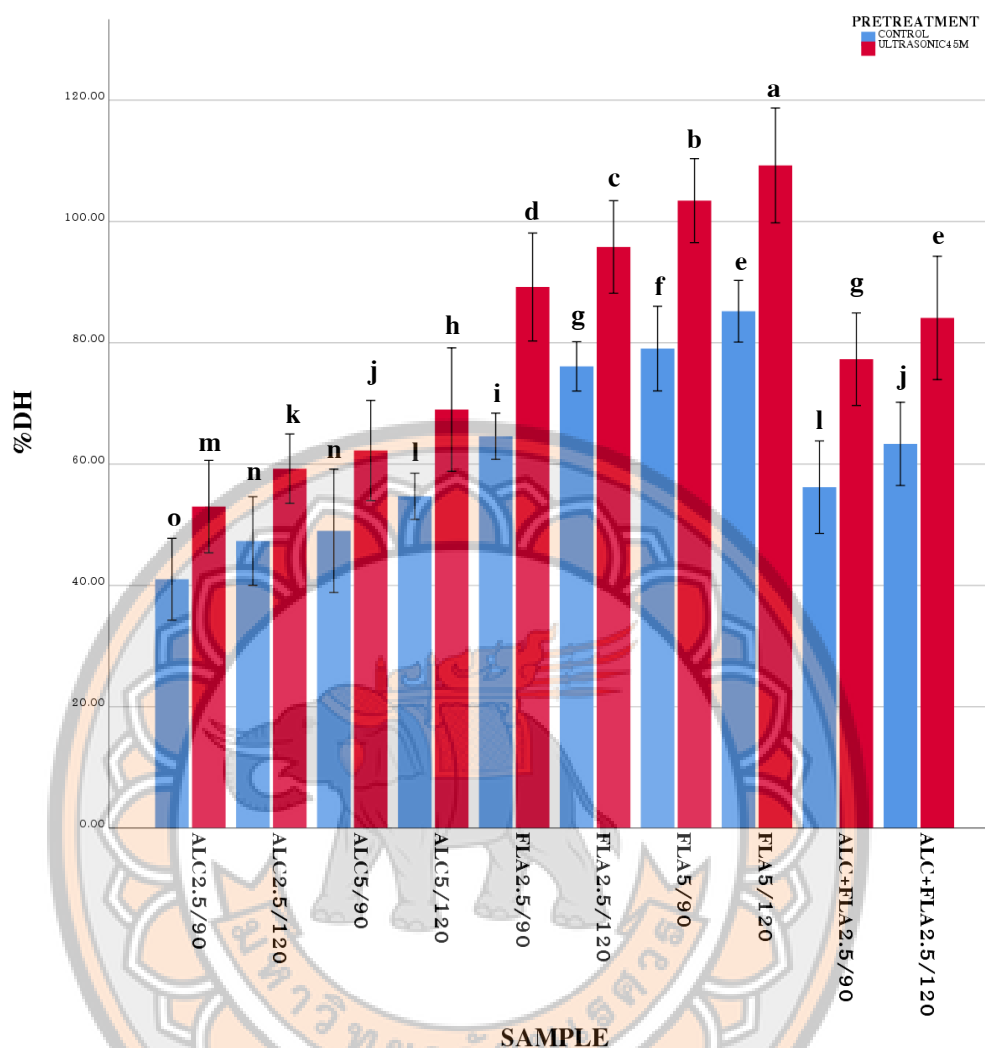
การใช้เอนไซม์ผสม (Alcalase+Flavourzyme) ที่ความเข้มข้น 2.5+2.5% ให้ค่า %DH อยู่ระหว่างการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดแยกกัน แสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์สองชนิดมีทั้งการเสริมฤทธิ์และการแข่งขันในการเข้าถึงพันธะเปปไทด์ การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 2.5% เป็น 5.0% ช่วยเพิ่มค่า %DH โดยเฉลี่ย 20.1% สำหรับกลุ่มที่ไม่ผ่านการพริทริทเมนต์และ 16.9%

สำหรับกลุ่มที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ เช่นเดียวกับการเพิ่มระยะเวลาในการย่อยจาก 90 นาทีเป็น 120 นาทีที่ช่วยเพิ่มค่า %DH โดยเฉลี่ย 17.0% และ 12.0% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามหลักการจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

การเชื่อมโยงระหว่างระดับการย่อยสลายกับคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเงื่อนไขที่ให้ %DH สูง (Flavourzyme 5.0% ที่ 120 นาที ร่วมกับการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิก) สอดคล้องกับผลการทดลองในตาราง 48 ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า และตาราง 49 ที่แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิด โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และเมไทโอนีน ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 16-17%

ผลการศึกษาแตกต่างจากรายงานของ Sbroggio และคณะ (2016) ที่พบว่า Alcalase มีประสิทธิภาพสูงกว่า Flavourzyme ในการย่อยโปรตีน Okara ความแตกต่างดังกล่าวอธิบายได้จากความแปรผันของปัจจัยต่างๆ เช่น สภาวะการทดลอง คุณสมบัติของซับสเตรท และวิธีการพรีทรีทเมนต์ ในการศึกษา การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกอาจทำให้โครงสร้างโปรตีน Okara เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่เอื้อต่อการทำงานของ Flavourzyme มากกว่า Alcalase

ระดับการย่อยสลายที่สูงขึ้นมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์ โดยการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำ และกิจกรรมทางชีวภาพต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจาก 62.46% เป็น 77.11% (ตาราง 47) และการปรับปรุงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่เห็นได้ชัดเจน การใช้ Flavourzyme ร่วมกับการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจึงเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่มีคุณภาพสูงและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่



ภาพ 44 ระดับการย่อยสลาย (%Degree of hydrolysis, %DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ และโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (45นาทื) และย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Alcalase, Flavourzyme, Alcalase ร่วมกับ Flavourzyme) ที่ความเข้มข้น 2.5, 2.5+2.5 และ 5.0% ที่ระยะเวลา 90 และ 120 นาที ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

7. การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่

จากการวิเคราะห์ตาราง 50 ซึ่งแสดงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซสจาก Okara พบว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการละลาย ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก $75.25 \pm 1.45\%$ ใน

โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ เป็น $85.45 \pm 1.60\%$ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก การเพิ่มขึ้นของการละลายนี้สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการเกิดคาวเตชันของคลีนอัลตราโซนิก ซึ่งทำให้เกิดแรงเฉือนและความดันสูงเฉพาะที่ ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนและเพปไทด์เปิดออกมากขึ้น เพพไทด์ที่ชอบน้ำ (hydrophilic groups) ทำให้มีปฏิสัมพันธ์กับน้ำได้มากขึ้น ตามที่ Eze และ Charalampopoulos (2022) ได้อธิบายไว้เกี่ยวกับผลของอัลตราโซนิกที่มีต่อโครงสร้างโมเลกุลโปรตีน การเพิ่มขึ้นของการละลายนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในตาราง 33 ที่พบว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที ช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนเข้มข้นจาก $40.06 \pm 0.23\%$ เป็น $66.30 \pm 1.06\%$

ในขณะเดียวกัน การดูดซับน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก (9.80 ± 1.15 g/g) ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ (10.55 ± 0.85 g/g) เล็กน้อย ในทางตรงกันข้าม การดูดซับน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 5.20 ± 1.10 g/g เป็น 6.45 ± 1.30 g/g หลังการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก ปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติระหว่างคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยคลีนอัลตราโซนิกอาจทำให้หมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic groups) ที่อยู่ภายในโครงสร้างโปรตีนเปิดเผยออกมามากขึ้น ทำให้สามารถจับกับโมเลกุลน้ำมันได้ดีขึ้น การใช้เทคโนโลยีอัลตราโซนิกสามารถปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดจาก Okara ได้ (Damodaran et al., 2014)

ด้านคุณสมบัติการเกิดโฟม พบว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิกช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิดโฟมจาก $20.70 \pm 1.63\%$ เป็น $25.09 \pm 1.41\%$ แต่ลดความคงตัวของโฟมจาก $30.11 \pm 1.80\%$ เป็น $28.33 \pm 1.79\%$ การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการเกิดโฟมอาจเป็นผลจากการที่โปรตีนและเพปไทด์มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างอากาศและน้ำได้ดีขึ้น เนื่องจากคลีนอัลตราโซนิกทำให้โครงสร้างของเพปไทด์เปิดออกและมีความยืดหยุ่นมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การลดลงของความคงตัวของโฟมอาจเกิดจากการที่เพปไทด์มีขนาดเล็กลงหลังการพรีทรีตเมนต์ ทำให้ไม่สามารถสร้างฟิล์มที่แข็งแรงรอบฟองอากาศได้ (O'Sullivan et al., 2016)

สำหรับคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน พบว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิกทำให้ทั้งสองค่าลดลง โดยการเกิดอิมัลชันลดลงจาก $31.25 \pm 1.30\%$ เป็น $27.87 \pm 1.18\%$ และความคงตัวของอิมัลชันลดลงจาก 25.68 ± 0.65 นาที เป็น 22.24 ± 1.20 นาที การลดลงนี้แตกต่างจากผลการทดลองในตาราง 33 ที่พบว่าการพรีทรีตเมนต์โปรตีนเข้มข้นด้วยคลีนอัลตราโซนิกช่วยเพิ่มการเกิดอิมัลชันจาก $50.11 \pm 0.23\%$ เป็น $65.12 \pm 0.87\%$ ความแตกต่างนี้อาจเกิด

จากผลของการไฮโดรไลซิสที่ทำให้โมเลกุลโปรตีนถูกตัดให้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ซึ่งแม้จะละลายน้ำได้ดีขึ้น แต่อาจมีประสิทธิภาพในการสร้างและรักษาความคงตัวของอิมัลชันลดลง เนื่องจากมีความสามารถในการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันและสร้างฟิล์มลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Brasili และคณะ (2021) ที่พบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับความร้อนช่วยเพิ่มการละลายของโปรตีนจาก Okara อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ Liu และคณะ (2022) ที่รายงานว่าอัลตราโซนิกกำลังปานกลาง (300-500 W) ทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลง โครงสร้างคลายตัว และละลายได้ดีขึ้น แต่การใช้กำลังสูงเกินไป (600 W) กลับทำให้โปรตีนจับตัวกัน ส่งผลเสียต่อการเกิดอิมัลชัน การพรีทรีตเมนต์โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกส่งผลให้การละลาย การดูดซับน้ำมัน และการเกิดโฟมเพิ่มขึ้น แต่ลดการดูดซับน้ำ ความคงตัวของโฟม การเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชัน การเปลี่ยนแปลงนี้มีความสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara เป็นส่วนประกอบ โดยโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีศักยภาพในการใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเหลวที่ต้องการการละลายสูง เช่น เครื่องดื่มโปรตีน ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์อาจเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันที่ดี เช่น อาหารประเภทซอส และมายองเนส

ตาราง 50 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ และผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

การทดสอบ	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
การละลาย (%)	75.25±1.45 ^b	85.45±1.60 ^a
การดูดซับน้ำ (g/g)	10.55±0.85 ^a	9.80±1.15 ^b
การดูดซับน้ำมัน (g/g)	5.20±1.10 ^b	6.45±1.30 ^a
การเกิดโฟม (%)	20.70±1.63 ^b	25.09±1.41 ^a
ความคงตัวของโฟม (%)	30.11±1.80 ^a	28.33±1.79 ^b
การเกิดอิมัลชัน (%)	31.25±1.30 ^a	27.87±1.18 ^b
ความคงตัวของอิมัลชัน (นาท)	25.68±0.65 ^a	22.24±1.20 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

8. การศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา

จากการวิเคราะห์ตาราง 51 ซึ่งแสดงผลการตรวจสอบสมบัติจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara พบว่าการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดซึ่งลดลงจาก 2.5×10^3 CFU/g ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ เป็น 3.6×10^2 CFU/g ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก คิดเป็นการลดลงประมาณ 85.6% การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดนี้สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการเกิดคาเวชันของคลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งทำให้เกิดแรงเฉือนที่รุนแรงและความดันเฉพาะที่สูงมากส่งผลให้เซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำลาย ตามที่ Aiello และคณะ (2021) ได้อธิบายไว้ว่าการใช้อัลตราโซนิกที่กำลัง 4 kW และระยะเวลา 0.5 นาที สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่าง Okara ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกยังส่งเสริมต่อการยับยั้งจุลินทรีย์อีกด้วย

ในทางตรงกันข้าม ผลการวิเคราะห์จำนวนยีสต์และราทั้งหมดกลับพบว่ามี的增加ขึ้นจาก 1.8×10^2 CFU/g ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ เป็น 2.4×10^2 CFU/g ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก คิดเป็นการเพิ่มขึ้นประมาณ 33.3% ปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจากการที่เซลล์ยีสต์และราบางชนิดมีความทนทานต่อแรงเฉือนจากคลื่นอัลตราโซนิกมากกว่าแบคทีเรีย และหลังจากการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ยีสต์และราที่เหลืออยู่อาจมีโอกาสเจริญได้ดีขึ้นเนื่องจากการแข่งขันจากแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตหลังการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกอาจสร้างสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญของยีสต์และราบางชนิด

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในตาราง 29 ซึ่งแสดงสมบัติจุลชีววิทยาของ Okara สดและแห้ง พบว่าการแปรรูป Okara เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ โดย Okara แห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.3×10^5 CFU/g และจำนวนยีสต์และราทั้งหมด 8.7×10^2 CFU/g ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพียง 2.5×10^3 CFU/g และจำนวนยีสต์และราทั้งหมด 1.8×10^2 CFU/g การลดลงนี้เกิดจากขั้นตอนในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ได้แก่ การสกัดโปรตีนในสภาวะต่าง การย่อยด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง และการกรอง ซึ่งล้วนช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Eze และ Charalampopoulos (2022) ที่พบว่าการใช้อัลตราโซนิกที่ความเข้ม 10-15 $\mu\text{m-pp}$ ในการสกัดโปรตีนจาก Okara ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ

การสกัดโปรตีนได้มากกว่า 2.5 เท่า (ได้ผลผลิตถึง 84%) เมื่อเทียบกับการสกัดแบบธรรมดา แม้ว่า การศึกษาดังกล่าวจะไม่ได้รายงานผลด้านจุลชีววิทยาโดยตรง แต่การใช้อัลตราโซนิกช่วยทำลาย โครงสร้างเซลล์ของ Okara ย่อมส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในเซลล์ถูกทำลายไปด้วย นอกจากนี้ Jafari และ Capanoglu (2022) ยังรายงานว่า การใช้อัลตราโซนิกที่กำลังเหมาะสม (300-500 W) ช่วย ปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของโปรตีน แต่การใช้กำลังสูงเกินไป (600 W) อาจส่งผลเสีย ต่อโครงสร้างโปรตีน ดังนั้นการเลือกใช้กำลังและระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟรีทรีหมั่นท์ด้วย คลื่นอัลตราโซนิกจึงมีความสำคัญต่อทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ การ ฟรีทรีหมั่นท์โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกช่วยลดจำนวนจุลินชีพทั้งหมดได้ อย่างมีประสิทธิภาพ แต่กลับส่งผลให้จำนวนยีสต์และราเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นข้อควร พิจารณาหรือระมัดระวังในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการลดลงของจำนวนจุลินชีพทั้งหมดถือ เป็นผลดีต่อคุณภาพและความปลอดภัยโดยรวมของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและ ลดความเสี่ยงจากแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อน

ตาราง 51 สมบัติจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara ที่ไม่ผ่านการฟรีทรีหมั่นท์ และ ผ่านการฟรีทรีหมั่นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

การทดสอบ	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ไม่ผ่านการฟรีทรี หมั่นท์	โปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการฟรีทรีหมั่นท์ ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
จำนวนจุลินชีพทั้งหมด (CFU/g)	2.5×10^{3a}	3.6×10^{2b}
จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (CFU/g)	1.8×10^{2b}	2.4×10^{2a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan

ตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้แบบจำลองสถานการณ์เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุน ระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก

ศึกษาสมดุลมวลสาร (Mass balance) และศึกษาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer ของตอนที่ 5 การศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการฟัรริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

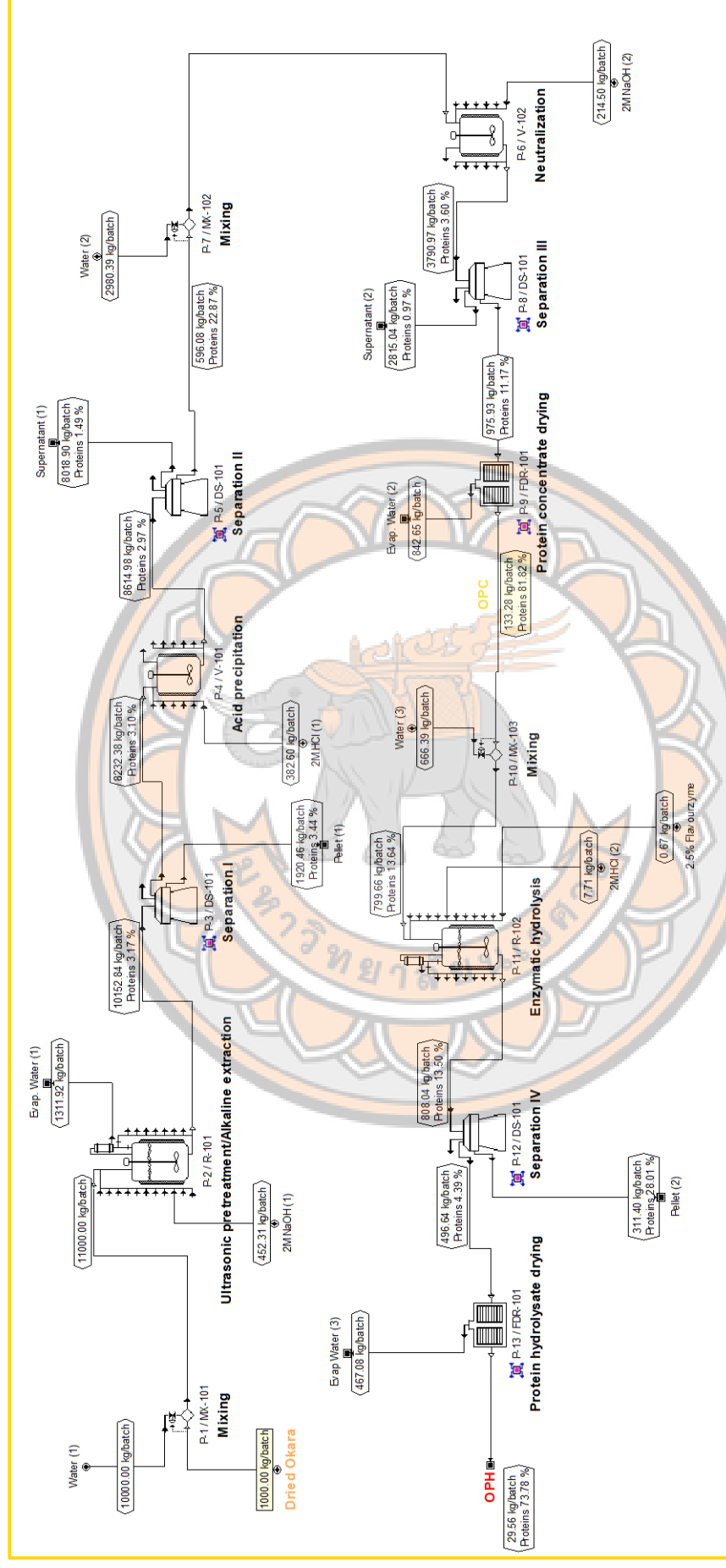
1. แบบจำลองการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการฟัรริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

ข้อมูลจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการถูกออกแบบจำลองกระบวนการผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara เป็นระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SuperPro® Designer V.11 แสดงดังภาพ 44 กระบวนการนี้เป็นกระบวนการแบบเบตส์เสร็จ (Batch Process) โดยเริ่มจากการนำ Okara แห้ง 1,000.00 กิโลกรัม ที่มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 32.15% (w/w) มาผสมกับน้ำปริมาณ 10,000.00 กิโลกรัมในถังปฏิกรณ์ชนิดกวน (P-1/MX-101) เพื่อเตรียมเป็นสารแขวนลอย (suspension) ในอัตราส่วน 1:10 (w/w) ตามที่กำหนดในตอน 2 ของการทดลอง

จากนั้นเข้าสู่กระบวนการฟัรริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก 37 kHz เป็นระยะเวลา 45 นาทีตามเงื่อนไขที่คัดเลือกจากตอนที่ 3.1 ของการทดลอง จากนั้นสกัดด้วยด่าง (P-2/R-101) โดยปรับ pH เป็น 11.5 ด้วยสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 452.31 กิโลกรัม ให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 60°C จากนั้นปล่อยให้เกิดกระบวนการสกัดโปรตีนด้วยด่างเป็นเวลา 90 นาที ในขั้นตอนนี้มีน้ำระเหยออกไป 1,311.92 กิโลกรัม จากนั้นทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิเป็น 30°C นำสารแขวนลอยไปแยกของแข็งและส่วนที่ละลายออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (P-3/DS-101) ตามวิธีการในตอน 2 ได้ส่วนใสปริมาณ 8,232.38 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 3.10% (w/w) และตะกอน (Pellet 1) ปริมาณ 1,920.46 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 3.44% (w/w) นำสารละลายส่วนใสไปตกตะกอนด้วยกรดในถังผสม (P-4/V-101) โดยการเติม 2M HCl ปริมาณ 382.60 กิโลกรัม เพื่อปรับ pH ที่ จุด isoelectric point ของโปรตีน จากนั้นนำสารละลายไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (P-5/DS-101) แยกสารละลายส่วนใสปริมาณ 8,018.90 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 1.49% (w/w) ทั้ง และนำส่วนที่เป็นตะกอน (Pellet 2) ปริมาณ 596.08 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 22.87% (w/w) ใส่ในถังปฏิกรณ์ชนิดกวน (P-6/V-102) เติมน้ำ 2,980.39 กิโลกรัม เพื่อให้เป็นสารแขวนลอย เติมสารละลาย 2M NaOH ปริมาณ 214.50 กิโลกรัม เพื่อปรับ pH 7.0 หลังจากการแยกส่วนที่สาม (P-8/DS-101) และการทำแห้งโปรตีนเข้มข้น (P-9/FDR-101) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ได้โปรตีนเข้มข้น 133.28 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 81.82% (w/w) (ฐานแห้ง) ที่พร้อมสำหรับการไฮโดรไลซิส จากนั้นนำมาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:5 (w/w) และเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (P-11/R-102) โดยให้ความร้อนแก่สารแขวนลอยจนอุณหภูมิถึง 50°C ปรับ pH 6.5 โดยการเติม 2M HCl ปริมาณ 7.71 กิโลกรัม หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น 2.5% ปริมาณ 0.67 กิโลกรัม ตามเงื่อนไขที่

คัดเลือกจากตอนที่ 5 ของการทดลอง และให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนทำงานที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นระยะเวลา 15 นาที ตามวิธีการในตอนต้นที่ 5 และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นนำสารละลายไปเหวี่ยง (P-12/DS-101) และไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในชั้นตอนสุดท้าย (P-13/FDR-101) จะได้โปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara แบบผงออกมาปริมาณ 29.56 กิโลกรัม ที่มีโปรตีน 73.78% (w/w) (ฐานแห้ง)





ภาพ 45 แบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

2. ข้อมูลปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีท- เม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิค

การวิเคราะห์ปริมาณวัตถุดิบ เอนไซม์ และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลีนอัลตราโซนิคด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer (ตาราง 52) แสดงให้เห็นถึงความต้องการทรัพยากรในการผลิตอย่างครอบคลุม โดยมีการใช้วัตถุดิบหลักคือ Dried Okara ปริมาณ 388,000 กิโลกรัมต่อปี หรือ 1,000.00 กิโลกรัมต่อแบทช์ ซึ่งคิดเป็น 33.83 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก ปริมาณวัตถุดิบหลักนี้สะท้อนถึงประสิทธิภาพการแปรรูปที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในตอนต้นที่ 1 ที่แสดงให้เห็นว่า Okara แห้งมีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 32.15% (w/w) และสามารถเพิ่มความเข้มข้นได้ถึง 81.37% (w/w) หลังจากกระบวนการสกัดโดยใช้คลีนอัลตราโซนิค

การใช้เอนไซม์ Flavourzyme ในปริมาณ 259 กิโลกรัมต่อปี หรือ 0.67 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็น 0.02 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก เป็นปริมาณที่สอดคล้องกับผลการทดลองในตอนต้นที่ 5 และการใช้สารเคมีในกระบวนการมีปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 2 M ที่ใช้ปริมาณ 151,438 กิโลกรัมต่อปี หรือ 390.3 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็น 13.2 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 M ที่ใช้ปริมาณ 258,723 กิโลกรัมต่อปี หรือ 666.81 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็น 22.56 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก การใช้สารเคมีในปริมาณมากนี้เป็นผลมาจากลักษณะของกระบวนการที่ต้องมีการปรับ pH หลายครั้ง ได้แก่ การสกัดโปรตีนที่ pH 11.5 ตามผลการทดลองในตอนต้นที่ 2 การตกตะกอนโปรตีนที่จุด isoelectric point และการปรับ pH กลับสู่ค่าเป็นกลางก่อนการไฮโดรไลซิส

น้ำเป็นทรัพยากรที่ใช้มากที่สุดในกระบวนการ โดยใช้ปริมาณ 5,294,951 กิโลกรัมต่อปี หรือ 13,646.78 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็น 461.65 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก การใช้น้ำในปริมาณมากนี้เป็นผลมาจากการผสมวัตถุดิบในอัตราส่วน 1:10 (w/w) ตามที่กำหนดในตอนต้นที่ 2 การล้างและการปรับความเข้มข้นในขั้นตอนต่างๆ รวมถึงการระเหยของน้ำในกระบวนการให้ความร้อนและการทำแห้ง อย่างไรก็ตามสัดส่วนการใช้น้ำนี้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเข้มข้น เมื่อพิจารณาจากคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีปริมาณโปรตีน 73.78% (w/w) และมีการดะมิโนครบถ้วนตามที่แสดงในผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

เมื่อพิจารณาปริมาณวัตถุดิบรวมทั้งหมด 6,093,371 กิโลกรัมต่อปี หรือ 15,704.56 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็น 531.26 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์หลัก แสดงให้เห็นว่าต้องใช้วัตถุดิบประมาณ 531 กิโลกรัมเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรตีนทั่วไป อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ของอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง การได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่สูงและกิจกรรมทางชีวภาพที่ดี

รวมถึงการลดปัญหาการจัดการของเสียจาก Okara ทำให้กระบวนการนี้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม

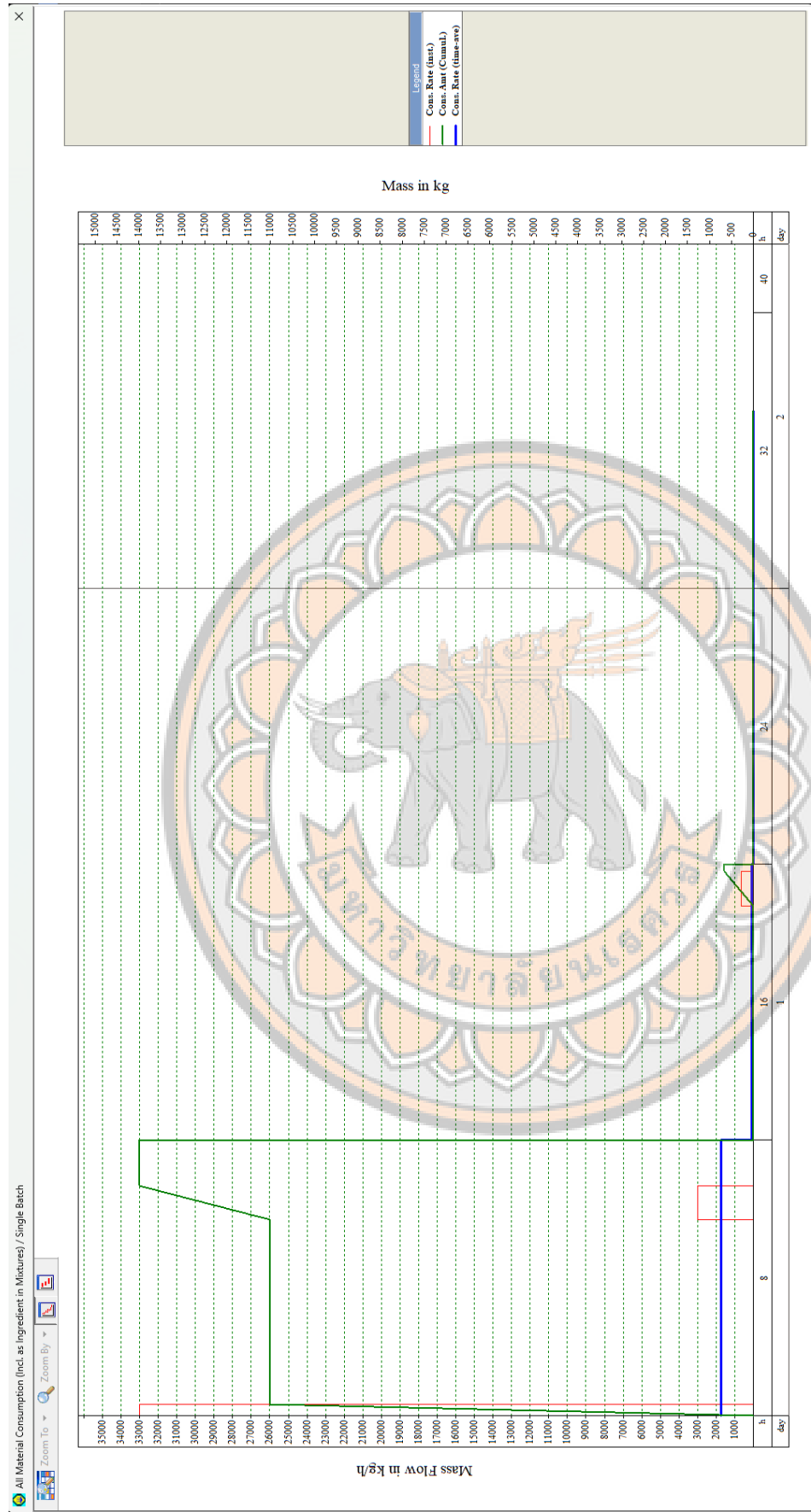
ตาราง 52 ปริมาณวัตถุดิบ เอนไซม์ และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ

วัตถุดิบ	กก./ปี	กก./แบตช์	กก./กก. MP
Dried Okara	388,000	1,000.00	33.83
Flavozyme	259	0.67	0.02
HCl (2 M)	151,438	390.3	13.2
NaOH (2 M)	258,723	666.81	22.56
Water	5,294,951	13,646.78	461.65
รวม	6,093,371	15,704.56	531.26

หมายเหตุ : *กก./ปี: กิโลกรัมต่อปี

*กก./แบตช์: กิโลกรัมต่อการผลิต 1 แบตช์

*กก./กก. MP: กิโลกรัมวัตถุดิบต่อกิโลกรัมผลิตภัณฑ์หลัก (Main Product)



ภาพ 46 แผนภูมิปริมาณการใช้วัสดุทั้งหมดต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโพรตีนไฮโดรไลเสสที่ผ่านการฟัรริฟิเคชันด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

3. ข้อมูลกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตรา-โซนิก

การวิเคราะห์ข้อมูลกระบวนการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer (ตาราง 53) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและข้อมูลเชิงปริมาณที่สำคัญของกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยมีเวลาการดำเนินงานต่อบ็อกแห่ง (เวลาการดำเนินงานรวม) 7,907.77 ชั่วโมงต่อปี ซึ่งคิดเป็นประมาณ 90.2% ของเวลาทำงานทั้งปี (8,760 ชั่วโมง) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการมีการใช้งานอุปกรณ์อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพสูง

กำลังการผลิตอ้างอิง (Unit Production Ref. Rate) ที่ 11,469.61 กก. MP/ปี เป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ของกระบวนการ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบ Dried Okara ปริมาณ 388,000 กิโลกรัมต่อปีจากตาราง 52 ที่วิเคราะห์ไว้ก่อนหน้านี้ สามารถคำนวณได้ว่าประสิทธิภาพการแปรรูป (Conversion efficiency) อยู่ที่ประมาณ 2.96% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นอัตราที่สอดคล้องกับลักษณะของกระบวนการสกัดและไฮโดรไลซิสโปรตีนที่ต้องผ่านการแยกและทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของคุณภาพโปรตีนจาก 32.15% (w/w) ใน Okara ดิบเป็น 73.78% (w/w) ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ตามที่แสดงในผลการทดลองก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสามารถเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบได้อย่างมีนัยสำคัญ

ขนาดแบทช์ (Batch Size) ที่ 29.56 กก. MP ต่อบรรจุการผลิตเป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (Semi-industrial scale) ซึ่งสามารถรองรับการผลิตในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการทดสอบตลาดและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เบื้องต้น

ระยะเวลาการผลิตต่อแบทช์ (Recipe Batch Time) ที่ 29.14 ชั่วโมงสะท้อนถึงความซับซ้อนของกระบวนการที่รวมการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การสกัดโปรตีนด้วยด่าง การตกตะกอน การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เวลานี้สั้นกว่าเวลา 40 ชั่วโมงที่แสดงในแผนภูมิแกนต์ (ภาพ 45)

รอบเวลาการผลิตต่อแบทช์ (Recipe Cycle Time) ที่ 20.36 ชั่วโมง คิดเป็นประมาณ 69.9% ของเวลาสุทธิการผลิตต่อแบทช์ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการมีประสิทธิภาพในการใช้เวลาดำเนินงานจริง โดยมีเวลาสำรองและเวลาเตรียมการประมาณ 30.1% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินงานที่มีความซับซ้อนสูงและต้องการความแม่นยำในการควบคุมคุณภาพ เวลาดำเนินงานจริงนี้ครอบคลุมขั้นตอนสำคัญต่างๆ ตั้งแต่การพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิก 45 นาทีตามที่ได้คัดเลือกจากตอนที่ 3.1 การสกัดโปรตีนที่ pH 11.5 เป็นเวลา 90 นาทีตามตอนที่ 2 และการไฮโดรไลซิสด้วย Flavourzyme เป็นเวลา 90 นาทีตามตอนที่ 5 จำนวนแบทช์ต่อปีที่ 388 แบทช์คำนวณได้จากการ

ทำงาน 330 วันต่อปีและเวลาสุทธิการผลิตต่อแบทช์ 29.14 ชั่วโมง ซึ่งให้ความสามารถในการผลิตประมาณ 1.18 แบทช์ต่อวัน

ตาราง 53 ข้อมูลกระบวนการผลิต

รายการ	ค่า
Annual Operating Time (เวลาการดำเนินงานต่อปี)	7,907.77 ชั่วโมง
Unit Production Ref. Rate (กำลังการผลิตอ้างอิง)	11,469.61 กก. MP/ปี
Batch Size (ขนาดแบทช์)	29.56 กก. MP
Recipe Batch Time (ระยะเวลาการผลิตต่อแบทช์)	29.14 ชั่วโมง
Recipe Cycle Time (รอบเวลาการผลิตต่อแบทช์)	20.36 ชั่วโมง
Number of Batches per Year (จำนวนแบทช์ต่อปี)	388 แบทช์

หมายเหตุ : * MP = อัตราการไหลรวมของสตริม 'โปรตีนไฮโดรไลเซต' (Protein Hydrolysate)

4. แผนภูมิแกนต์แสดงการใช้งานอุปกรณ์ต่อรอบการผลิต (Equipment Gantt Chart Single Batch) จากแบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

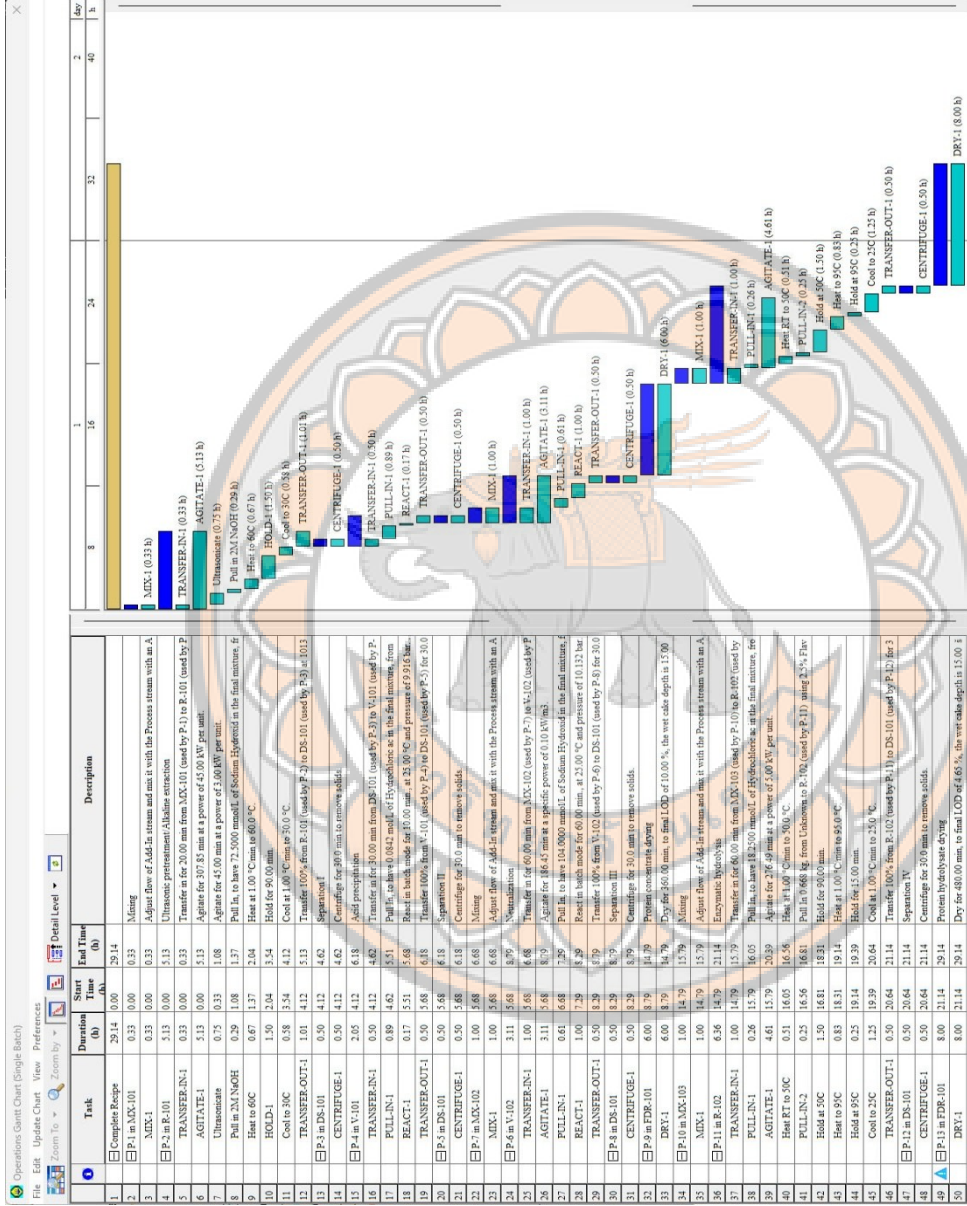
ในการออกแบบและจำลองกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก Okara นี้อยู่บนพื้นฐานของปริมาณ Okara แห้ง 1,000.00 กิโลกรัมต่อรอบการผลิต โดยมีปริมาณการใช้วัตถุดิบ สารเคมี และเอนไซม์ Flavourzyme ที่ใช้ในกระบวนการตามที่กำหนดในขั้นตอนการทดลองทั้ง 6 ตอน เมื่อกำหนดการทำงาน 388 การผลิตต่อปี ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินงานในแต่ละขั้นตอนแสดงดังรูปภาพ 45 โดยในแต่ละรอบการผลิตจะใช้เวลาทั้งสิ้น 29.14 ชั่วโมง ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินงานที่ซับซ้อนและต้องใช้เวลาเนื่องจากกระบวนการรวมเทคนิคการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคและกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

จากการวิเคราะห์แผนภูมิแกนต์ส่วนแรก พบว่ากระบวนการเริ่มต้นด้วยขั้นตอนการผสม P-1/MX-101 (Mixing) ใช้เวลา 0.33 ชั่วโมง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยจาก Okara แห้งและน้ำในอัตราส่วน 1:10 (w/w) ตามที่กำหนดในตอนี่ 2 ของการทดลอง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือ P-2/R-101 (Ultrasonic pretreatment/Alkaline extraction) ซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 5.13 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นกิจกรรมย่อยหลายขั้นตอน ได้แก่ การผสม (MIX-1) ใช้เวลา 1.00 ชั่วโมง การถ่ายโอนวัตถุดิบเข้าสู่ระบบ (TRANSFER-IN-1) ใช้เวลา 0.33 ชั่วโมง การกวนผสม (AGITATE-1) ใช้เวลา 5.13 ชั่วโมง

การใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) ใช้เวลา 0.75 ชั่วโมง (45 นาที) ตามเงื่อนไขที่คัดเลือกจากตอนที่ 3.1 การเติม 2M NaOH (Pull in 2M NaOH) ใช้เวลา 0.29 ชั่วโมง การให้ความร้อนถึง 60°C (Heat to 60C) ใช้เวลา 0.67 ชั่วโมง การคงอุณหภูมิ (HOLD-1) ใช้เวลา 1.50 ชั่วโมง (90 นาที) ตามเงื่อนไขการสกัดในตอนที่ 2 และการทำให้เย็นลงเหลือ 30°C (Cool to 30C) ใช้เวลา 0.58 ชั่วโมง ขั้นตอนการแยกส่วนครั้งที่หนึ่ง P-3/DS-101 (Separation I) ใช้เวลา 0.50 ชั่วโมง โดยประกอบด้วย การถ่ายโอนผลิตภัณฑ์ (TRANSFER-OUT-1) และการปั่นเหวี่ยง (CENTRIFUGE-1) ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งดำเนินการโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง DS-101 เพียงเครื่องเดียว ขั้นตอนการตกตะกอนด้วยกรด P-4/V-101 (Acid precipitation) ใช้เวลา 2.05 ชั่วโมง โดยรวมการถ่ายโอนวัตถุดิบเข้าสู่ระบบ (TRANSFER-IN-1) การเติมกรดไฮโดรคลอริก (PULL-IN-1) ใช้เวลา 0.89 ชั่วโมง และการทำปฏิกิริยาเพื่อตกตะกอนโปรตีน (REACT-1) ใช้เวลา 0.17 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์แผนภูมิแกนต์ส่วนที่สอง พบว่าขั้นตอนการแยกส่วนครั้งที่สอง P-5/DS-101 (Separation II) ใช้เวลา 0.50 ชั่วโมง เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนใส จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการปรับ pH กลับสู่ค่าเป็นกลาง P-6/V-102 (Neutralization) ใช้เวลา 3.11 ชั่วโมง โดยรวมการผสม (MIX-1) การถ่ายโอน (TRANSFER-IN-1) การกวนผสม (AGITATE-1) และการเติม 2M NaOH (PULL-IN-1) เพื่อปรับ pH เป็น 7.0 ตามวิธีการในตอนที่ 2 ขั้นตอนการผสมเพิ่มเติม P-7/MX-102 (Mixing) ใช้เวลา 1.00 ชั่วโมง ก่อนการแยกส่วนครั้งที่สาม P-8/DS-101 (Separation III) ใช้เวลา 0.50 ชั่วโมง ขั้นตอนการทำแห้งโปรตีนเข้มข้น P-9/FDR-101 (Protein concentrate drying) เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานที่สุดในกระบวนการทั้งหมด คือ 6.00 ชั่วโมง ซึ่งสะท้อนถึงธรรมชาติของกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ที่ต้องใช้เวลานานแต่ให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ดี หลังจากนั้นขั้นตอนการผสมสำหรับการไฮโดรไลซิส P-10/MX-103 (Mixing) ใช้เวลา 1.00 ชั่วโมง เพื่อเตรียมโปรตีนเข้มข้นให้พร้อมสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ การเติมน้ำในอัตราส่วน 1:5 (w/w) ตามที่กำหนดในตอนที่ 5

เวลาการดำเนินงานทั้งหมด 29.14 ชั่วโมงต่อรอบ เนื่องจากการเพิ่มขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและการใช้กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแทนการพ่นฝอย การจัดลำดับขั้นตอนในแผนภูมิแกนต์แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนส่วนใหญ่เป็นแบบต่อเนื่อง (Sequential) ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของกระบวนการแบบเบตส์เสร็จ (Batch Process) อย่างไรก็ตามสามารถพิจารณาการปรับปรุงประสิทธิภาพโดยการทำงานแบบขนาน (Parallel processing) ในบางขั้นตอนที่ไม่ขึ้นต่อกัน เช่น การเตรียมสารเคมีล่วงหน้าหรือการทำความสะอาดอุปกรณ์ขณะที่ขั้นตอนอื่นกำลังดำเนินอยู่ เพื่อลดเวลาการดำเนินงานรวมและเพิ่มผลิตภาพของระบบการผลิต ซึ่งสอดคล้องกับหลักการของ Lean Manufacturing ที่มุ่งเน้นการลดของเสียและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต



ภาพ 48 แผนภูมิแกนต์แสดงการใช้งานอุปกรณ์ต่อการอบการผลิตของกรดไขมันที่ผ่านการผลิตไปไดโนไลสที่หน่วยผลิตไขมันสัตว์

5. การประเมินทางเศรษฐศาสตร์จากแบบจำลองการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการฟัรริทหมั่นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

5.1 บทสรุปผู้บริหาร

การวิเคราะห์บทสรุปทางเศรษฐศาสตร์สำหรับผู้บริหารจากตาราง 59 แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์และความคุ้มค่าทางการลงทุนของโครงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการฟัรริทหมั่นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยมีเงินลงทุนโครงการรวม 7,959,000 บาท ซึ่งเป็นการลงทุนที่มีขนาดปานกลางสำหรับโรงงานผลิตโปรตีนเฉพาะทาง (specialty protein) และมีต้นทุนการดำเนินงานประจำปี 14,319,000 บาท/ปี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงลักษณะของกระบวนการที่ใช้สารเคมีและพลังงานสูงตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 52 ที่แสดงการใช้ HCl 151,438 กิโลกรัม/ปี และ NaOH 258,723 กิโลกรัม/ปี รวมถึงการใช้น้ำ 5,294,951 กิโลกรัม/ปี ขณะที่รายได้ประจำปี 18,351,000 บาท/ปี แสดงให้เห็นถึงศักยภาพทางการตลาดของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่สูง

กำลังการผลิตอ้างอิง 11,470 กิโลกรัม MP/ปี สอดคล้องกับข้อมูลกระบวนการที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 53 ที่แสดงขนาดแบทช์ 29.56 กิโลกรัม MP และจำนวนแบทช์ต่อปี 388 แบทช์ ด้วยเวลาการดำเนินงานใช้ได้ 7,900.0 ชั่วโมง และเวลาการใช้งานจริง 7,907.8 ชั่วโมง ซึ่งเกินกว่า 100% เล็กน้อยเนื่องจากการทำงานล่วงเวลาที่จำเป็นในบางขั้นตอนของกระบวนการ

ต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม MP และรายได้ต่อหน่วย 1,600.00 บาท/กิโลกรัม MP แสดงให้เห็นถึงอัตรากำไรขั้นต้น 21.97% ซึ่งอยู่ในระดับที่น่าพอใจสำหรับอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนเฉพาะทาง โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่เพิ่มขึ้นจากการฟัรริทหมั่นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิคตามที่แสดงในผลการทดลองตอนที่ 3.1 ที่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจาก 62.46% เป็น 77.11% และการปรับปรุงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

ค่าผลตอบแทนจากการลงทุน (ROI) 38.00% เป็นอัตราที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป ซึ่งมักอยู่ที่ 15-20% อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจของโครงการนี้สำหรับนักลงทุน ระยะเวลาคืนทุน 2.63 ปี อยู่ในระดับที่ยอมรับได้และดีกว่าค่าเฉลี่ยสำหรับอุตสาหกรรมเทคโนโลยีอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปต้องการระยะเวลาคืนทุน 3-5 ปี อัตราผลตอบแทนภายใน (IRR) หลังหักภาษี 30.09% สูงกว่าอัตราดอกเบี้ยต้นทุน (discount rate) ที่ 7.00% อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าทางการลงทุนที่ชัดเจน

มูลค่าปัจจุบันสุทธิ (NPV) 15,067,000 บาท ที่อัตราคิดลด 7.00% เป็นค่าบวกที่สูงมาก แสดงให้เห็นว่าโครงการสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มได้มากกว่าเงินลงทุนเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้ (Okara) ที่มีมูลค่าต่ำในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง (value-added product) ตามแนวคิดของ circular economy และ waste valorization

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาศรษฐศาสตร์โครงการอื่นๆ ในอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนจากพืช ค่าดัชนีทางการเงินของโครงการนี้อยู่ในระดับที่ดี โดยเฉพาะ ROI ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของอุตสาหกรรมอย่างมาก ซึ่งเป็นผลมาจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ตาราง 54 บทสรุปทางเศรษฐศาสตร์สำหรับผู้บริหาร

รายการ	ค่า	หน่วย
Investment (การลงทุน)	7,959,000	บาท
Investment Charged to this Project (การลงทุนที่เรียกเก็บจากโครงการนี้)	7,959,000	บาท
Annual Operating Cost (ต้นทุนการดำเนินงานรายปี)	14,319,000	บาท/ปี
Annual Revenue (รายได้รายปี)	18,351,000	บาท/ปี
Unit Production Reference Rate (อัตราการผลิตต่อหน่วยอ้างอิง)	11,459.81	กก. MP/ปี
Unit Production Cost (ต้นทุนการผลิตต่อหน่วย)	1323.7205	บาท/กก. MP
Unit Production Revenue (รายได้จากการผลิตต่อหน่วย)	1600	บาท/กก. MP
Batch Size (ขนาดแบตช์)	29.56	กก. MP
Available Time (เวลาใช้งานได้)	7520	ชั่วโมง
Actual Time Used (เวลาที่ใช้จริง)	7907.8	ชั่วโมง
Maximum Batches per Year (จำนวนแบตช์สูงสุดต่อปี)	388	แบตช์
Actual Batches per Year (จำนวนแบตช์จริงต่อปี)	388	แบตช์
Gross Margin (กำไรขั้นต้น)	21.97	%
Return on Investment - ROI (อัตราผลตอบแทนจากการลงทุน)	38.00	%
Payback Time (ระยะเวลาคืนทุน)	2.63	ปี
Internal Rate of Return - IRR (After Tax) (อัตราผลตอบแทนภายในหลังหักภาษี)	30.09	%
Net Present Value at 7.00% (มูลค่าปัจจุบันสุทธิที่ 7.00%)	15,067,000	บาท

5.2 รายละเอียดของเครื่องมือและราคา

การวิเคราะห์รายละเอียดเครื่องมือและราคาจากตารางแสดงให้เห็นถึงการออกแบบและการเลือกใช้อุปกรณ์สำหรับกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกอย่างเหมาะสมตามหลักการทางวิศวกรรมและเศรษฐศาสตร์ โดยมีเงินลงทุนในเครื่องมือหลักรวม 9,070,000 บาท ซึ่งแบ่งเป็นอุปกรณ์หลัก 6 รายการและอุปกรณ์เสริมที่ไม่ระบุรายละเอียด 91,000 บาท

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบจานซ้อน DS-101 (Disk-Stack Centrifuge) มีราคาสูงสุด 3,266,000 บาท ด้วยกำลังการผลิต 200,000.00 ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น 36.0% ของเงินลงทุนรวม แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของขั้นตอนการแยกส่วนในกระบวนการผลิต จึงมีความจำเป็นต้องลดต้นทุนการผลิต โดยการใช้เพียงเครื่องเดียวตลอดกระบวนการผลิต โดยกำลังการผลิตที่สูงนี้สอดคล้องกับปริมาณสารแขวนลอยที่ต้องแยกจากการวิเคราะห์ตารางก่อนหน้าที่แสดงปริมาณสารผสมในแต่ละขั้นตอนสูงถึงหลายหมื่นลิตรต่อแบทช์ ส่วนเครื่องปฏิกรณ์แบบกวน R-101 (Stirred Reactor) มีราคา 2,500,000 บาท ด้วยปริมาตรถึง 12,755.77 ลิตร ซึ่งเป็นอุปกรณ์หลักสำหรับการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและการสกัดด้วยต่าง ขนาดถังที่ใหญ่ขึ้นจำเป็นสำหรับการรองรับปริมาณสารแขวนลอยของ Okara 11,041.54 ลิตร ตามที่วิเคราะห์ในตาราง R-101 ก่อนหน้า รวมถึงพื้นที่สำรองสำหรับการเติมสารเคมีและการขยายตัวของสารผสมระหว่างกระบวนการ

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง FDR-101 (Freeze Dryer) มีราคา 1,371,000 บาท ด้วยกำลังการทำแห้งแบบซับลิเมชัน 842.65 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 15.1% ของเงินลงทุนรวม แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการรักษาคุณภาพโปรตีนในขั้นตอนสุดท้าย โดยกำลังการทำแห้งนี้สอดคล้องกับปริมาณน้ำที่ต้องกำจัดจากการวิเคราะห์ตาราง FDR-101 ก่อนหน้าที่แสดงประสิทธิภาพการกำจัดน้ำสูงถึง 87.05-94.45% ส่วนเครื่องปฏิกรณ์แบบกวน R-102 (Stirred Reactor) มีราคา 1,143,000 บาท ด้วยปริมาตรถึง 914.30 ลิตร ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ขนาดถังที่เล็กกว่า R-101 อย่างมีนัยสำคัญสะท้อนถึงปริมาณโปรตีนเข้มข้นที่ลดลงหลังจากการแยกส่วนและการทำแห้งแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารผสม 795.92-822.87 ลิตร ตามที่วิเคราะห์ในตาราง R-102 ก่อนหน้า

ถังผสม V-101 (Blending Tank) มีราคา 400,000 บาท ด้วยปริมาตรถึง 9,609.94 ลิตร และถังผสม V-102 (Blending Tank) มีราคา 300,000 บาท ด้วยปริมาตรถึง 4,216.95 ลิตร ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนโปรตีนและการปรับ pH ตามลำดับ อัตราส่วนราคาต่อปริมาตรของ V-101 และ V-102 อยู่ที่ 41.6 บาท/ลิตร และ 71.1 บาท/ลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า V-102 มีราคาต่อหน่วยสูงกว่าเนื่องจากต้องการวัสดุที่ทนทานต่อสารเคมีมากกว่า โดยเฉพาะการใช้ NaOH ในการปรับ pH กลับสู่ค่าเป็นกลาง ตามที่วิเคราะห์ในตาราง V-101 และ V-102 ก่อนหน้า

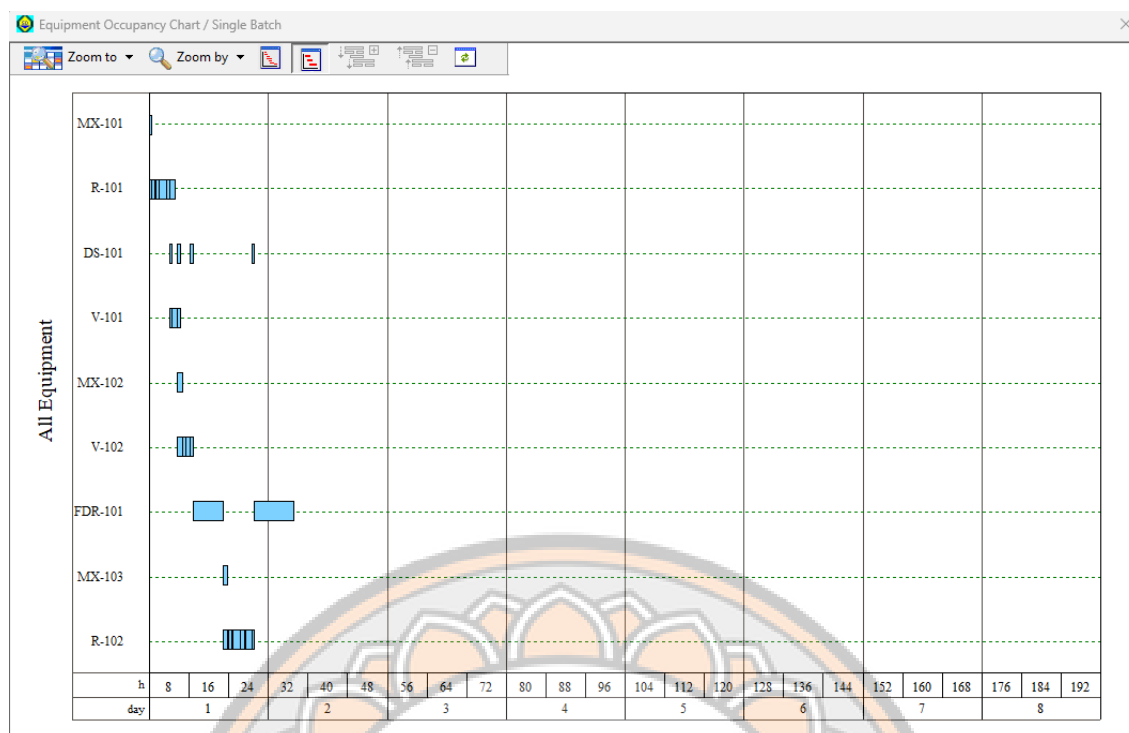
เมื่อพิจารณาการกระจายของเงินลงทุนพบว่าอุปกรณ์แยกส่วนและการทำแห้ง (DS-101 และ FDR-101) คิดเป็น 51.1% ของเงินลงทุนรวม สะท้อนถึงความสำคัญของการควบคุมคุณภาพและประสิทธิภาพการแยกในกระบวนการผลิต ขณะที่อุปกรณ์ปฏิกรณ์ (R-101 และ R-102) คิดเป็น 40.2% แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการควบคุมปฏิกิริยาทางเคมีและชีวเคมี การเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทพบว่าการลงทุนในอุปกรณ์ปฏิกรณ์

ที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิและการกวนผสมที่แม่นยำมีความจำเป็นสำหรับการรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์และคุณภาพของผลิตภัณฑ์

อุปกรณ์เสริมที่ไม่ระบุรายละเอียด 91,000 บาท คิดเป็น 1.0% ของเงินลงทุนรวม ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับอุปกรณ์ประกอบและระบบควบคุมต่างๆ เช่น ระบบควบคุมอุณหภูมิ ระบบการกวนผสม และอุปกรณ์วัดและควบคุมการทำงาน การวิเคราะห์ต้นทุนต่อกำลังการผลิตพบว่าเงินลงทุนรวม 9,070,000 บาท ต่อกำลังการผลิต 11,459.6077 กิโลกรัม MP/ปี ให้อัตราส่วน 791.4 บาท/กิโลกรัม MP/ปี ซึ่งเป็นอัตราที่แข่งขันได้เมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนเฉพาะทางอื่นๆ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาถึงคุณภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การออกแบบและการเลือกใช้อุปกรณ์นี้สะท้อนถึงการประยุกต์ใช้หลักการทางวิศวกรรมกระบวนการอย่างเหมาะสม โดยคำนึงถึงทั้งประสิทธิภาพการผลิต ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ และคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

ตาราง 55 รายละเอียดของเครื่องมือและราคา

จำนวน/ ลำรอง/ แบ่งชั้น	ชื่อ	รายละเอียด	ราคาต่อหน่วย (บาท)	ราคารวม (บาท)
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 200000.00 L/h	3,266,000	3,266,000
1 / 0 / 0	R-101	Stirred Reactor Vessel Volume = 12755.77 L	2,500,000	2,500,000
1 / 0 / 0	FDR-101	Freeze Dryer Sublimation Capacity = 842.65 kg	1,371,000	1,371,000
1 / 0 / 0	R-102	Stirred Reactor Vessel Volume = 914.30 L	1,143,000	1,143,000
1 / 0 / 0	V-101	Blending Tank Vessel Volume = 9609.94 L	400,000	400,000
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 4216.95 L	300,000	300,000
		Unlisted Equipment		91,000
		รวม		9,070,000



ภาพ 49 แผนภูมิการใช้งานอุปกรณ์ต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

5.3 ค่าแรงงาน ค่าวัตถุดิบ และค่าสาธารณูปโภค

5.3.1 ค่าแรงงาน

การวิเคราะห์ต้นทุนค่าแรงงานจากตาราง 61 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างค่าใช้จ่ายด้านบุคลากรที่มีประสิทธิภาพสำหรับการดำเนินงานโครงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยมีการใช้แรงงานเพียงประเภทเดียวคือ Operator ด้วยต้นทุนต่อหน่วย 55 บาท/ชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราค่าจ้างที่เหมาะสมสำหรับผู้ปฏิบัติงานที่มีทักษะเฉพาะทางในอุตสาหกรรมอาหารและต้องการความรู้ในการควบคุมกระบวนการที่ซับซ้อน เช่น การพรีทรีทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การสกัดด้วยด่าง การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง R-101, R-102 และ FDR-101 ก่อนหน้า

ปริมาณการใช้แรงงานรายปี 15,487 ชั่วโมง สอดคล้องกับเวลาการดำเนินงานจริงของระบบ 7,907.8 ชั่วโมง ที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 53 โดยคิดเป็นอัตราส่วนแรงงานต่อเวลาการดำเนินงาน 1.96:1 แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการมีแรงงานสำรองและการทำงานในหลายกะเพื่อรองรับการผลิต 388 แบทช์ต่อปี ด้วยขนาดแบทช์ 29.56 กิโลกรัม MP ตามที่กำหนดไว้ รวมถึงเวลาสำหรับการเตรียมการ การทำความสะอาด และการบำรุงรักษาอุปกรณ์ระหว่างการผลิต ต้นทุนค่าแรงงานรายปี 851,786 บาท คิดเป็น 5.95% ของต้นทุนการดำเนินงานประจำปี 14,319,000 บาท ที่วิเคราะห์ไว้ในบทสรุปผู้บริหารก่อนหน้า แสดงให้เห็นถึงลักษณะของกระบวนการที่เน้นการใช้เครื่องจักรและสารเคมี

มากกว่าแรงงาน (capital intensive และ chemical intensive) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้อุปกรณ์ที่มีเทคโนโลยีสูง เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบจานซ้อน DS-101 ราคา 3,266,000 บาท และเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง FDR-101 ราคา 1,371,000 บาท ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตารางรายละเอียดเครื่องมือและราคา

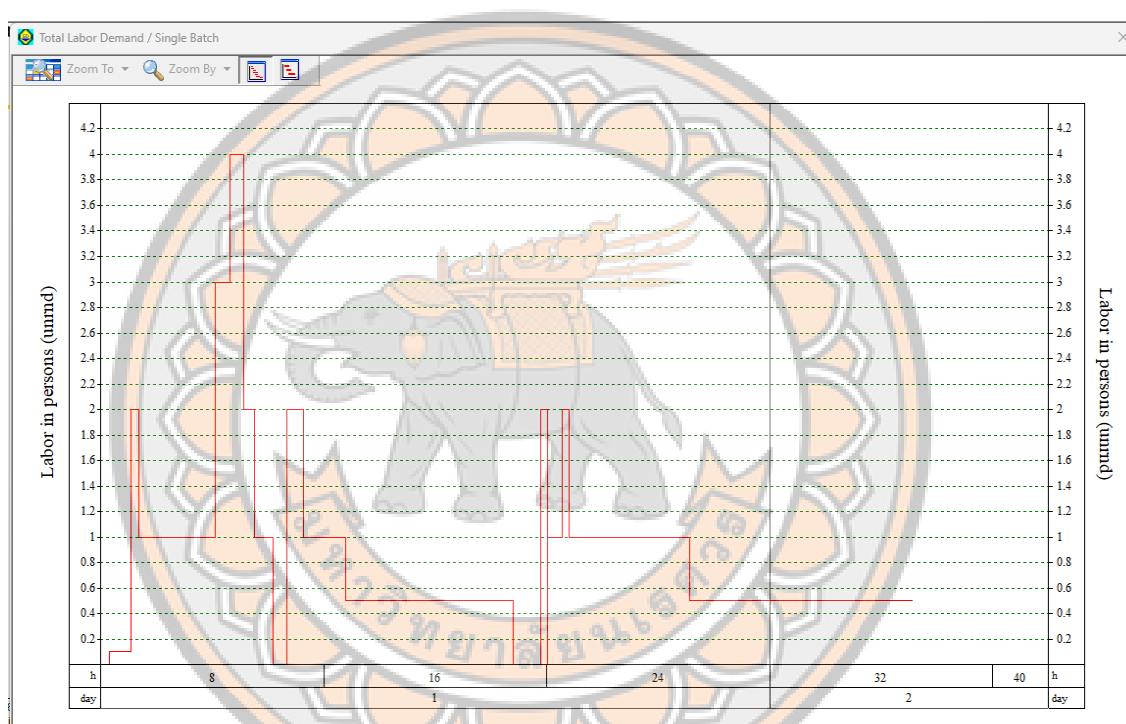
เมื่อกำนวณต้นทุนแรงงานต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ได้ 74.23 บาท/กิโลกรัม MP (851,786 บาท ÷ 11,470 กิโลกรัม MP/ปี) ซึ่งคิดเป็น 5.95% ของต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม MP แสดงให้เห็นว่าค่าแรงงานมีสัดส่วนต่ำในโครงสร้างต้นทุน ทำให้โครงการมีความเสี่ยงต่ำจากการเปลี่ยนแปลงของอัตราค่าจ้างแรงงาน และมีความสามารถในการแข่งขันที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตโปรตีนแบบดั้งเดิมที่ต้องใช้แรงงานมาก การมีแรงงานเพียงประเภทเดียว (100% เป็น Operator) สะท้อนถึงการออกแบบกระบวนการที่เน้นการทำงานแบบอัตโนมัติและการควบคุมด้วยระบบ ซึ่งช่วยลดความซับซ้อนในการจัดการบุคลากรและเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมคุณภาพ โดยเฉพาะในขั้นตอนที่ต้องการความแม่นยำสูง เช่น การควบคุม pH ในช่วง 11.5 สำหรับการสกัดและ pH 7.0 สำหรับการไฮโดรไลซิส ตามที่ระบุในผลการทดลองตอนที่ 2 และ 5 ก่อนหน้า

เมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนจากพืชอื่นๆ สัดส่วนค่าแรงงานที่ต่ำนี้เป็นข้อได้เปรียบทางการแข่งขัน โดยเฉพาะในยุคที่ต้นทุนแรงงานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของโครงการจะขึ้นอยู่กับการพัฒนาทักษะของ Operator ให้สามารถดูแลระบบการผลิตที่ซับซ้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงการรักษาคุณภาพและมาตรฐานความปลอดภัยในการทำงานกับสารเคมีและเครื่องจักรที่มีเทคโนโลยีสูง การวิเคราะห์ต้นทุนค่าแรงงานนี้ยืนยันความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ของโครงการ โดยแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างต้นทุนที่เหมาะสมและยั่งยืนสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่มีคุณภาพสูงและคุณสมบัติเชิงหน้าที่เพิ่มขึ้นจากการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

ตาราง 56 ต้นทุนค่าแรงงาน (ราคาปี 2568)

ประเภทแรงงาน	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท/ชั่วโมง)	ปริมาณรายปี (ชั่วโมง)	ต้นทุนรายปี (บาท)	ร้อยละ
Operator	55	15,487	851,786	100
รวม		15,487	851,786	100



ภาพ 50 แผนภูมิปริมาณแรงงานที่ใช้ต่อหนึ่งรอบการผลิตของการศึกษาผลการผลิตโปรตีน
ไฮโดรไลเสตที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

5.3.2 คำจำกัดความ

การวิเคราะห์ต้นทุนค่าวัตถุดิบจากตาราง 62 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างต้นทุนที่มี Dried Okara เป็นวัตถุดิบหลักด้วยต้นทุนต่อหน่วย 24.42 บาท/กิโลกรัม โดยคำนวณต้นทุน Dried Okara เบื้องต้นจากโปรแกรม SuperPro® Designer V.11 จากขั้นตอนที่ 1 การศึกษากระบวนการเตรียม Okara สด/แห้งและการวิเคราะห์ ปริมาณการใช้รายปี 388,000 กิโลกรัม คิดเป็นต้นทุนรายปี 9,474,960 บาท ซึ่งครอบคลุมสัดส่วน 85.59% ของต้นทุนวัตถุดิบรวม 11,069,624 บาท ซึ่ง

สอดคล้องกับปริมาณการใช้ 1,000.00 กิโลกรัม/แบทช์ ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 52 ก่อนหน้า และสะท้อนถึงความได้เปรียบทางต้นทุนของการใช้ผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลืองที่มีราคาต่ำเมื่อเทียบกับแหล่งโปรตีนอื่น เอนไซม์ Flavourzyme มีต้นทุนต่อหน่วยสูงสุด 3,300.00 บาท/กิโลกรัม จากบริษัท Scidict Plus แต่เนื่องจากปริมาณการใช้น้อย 259 กิโลกรัม/ปี จึงมีต้นทุนรายปี 855,838 บาท คิดเป็น 7.73% ของต้นทุนรวม สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการรวมกันมีสัดส่วน 5.86% ได้แก่ HCl (2 M) ต้นทุน 2.04 บาท/กิโลกรัม จากบริษัท Qingdao Sincere Chemical Co., Ltd. ปริมาณ 151,438 กิโลกรัม/ปี คิดเป็น 309,267 บาท (2.79%) และ NaOH (2 M) ต้นทุน 1.31 บาท/กิโลกรัม จากบริษัท Qingdao Sincere Chemical Co., Ltd. ปริมาณ 258,723 กิโลกรัม/ปี คิดเป็น 339,886 บาท (3.07%) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สารเคมีในกระบวนการสกัดด้วยด่างที่ pH 11.5 และการตกตะกอนที่จุด isoelectric point ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง V-101 และ V-102 ก่อนหน้า ขณะที่น้ำมีต้นทุนต่ำที่สุด 0.02 บาท/กิโลกรัม แม้จะใช้ปริมาณมาก 5,294,951 กิโลกรัม/ปี แต่มีต้นทุนเพียง 89,672 บาท (0.81%) แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการตั้งโรงงานในพื้นที่ที่มีแหล่งน้ำสะอาดและราคาถูก เมื่อคำนวณต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ได้ 964.76 บาท/กิโลกรัม MP (11,069,624 บาท ÷ 11,470 กิโลกรัม MP/ปี) ซึ่งคิดเป็น 77.28% ของต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม MP ที่วิเคราะห์ไว้ในบทสรุปผู้บริหารก่อนหน้า

ตาราง 57 ต้นทุนค่าวัตถุดิบ (ราคาปี 2568)

วัตถุดิบหลัก	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท)	ปริมาณรายปี	หน่วย	ต้นทุนรายปี (บาท)	ร้อยละ
Dried Okara	24.42	388,000	กก.	9,474,960	85.59
Flavozyme	3,300.00	259	กก.	855,838	7.73
HCl (2 M)	2.04	151,438	กก.	309,267	2.79
NaOH (2 M)	1.31	258,723	กก.	339,886	3.07
Water	0.02	5,294,951	กก.	89,672	0.81
รวม				11,069,624	100

5.3.3 ค่าสาธารณูปโภค

การวิเคราะห์ต้นทุนค่าสาธารณูปโภคจากตาราง 63 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างการใช้พลังงานที่หลากหลายสำหรับการดำเนินงานโครงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการพริทที่เน้นที่ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก โดยมีต้นทุนค่าสาธารณูปโภครวม 1,802,980 บาท/ปี ซึ่งคิดเป็น 12.59% ของต้นทุนการดำเนินงานประจำปี 14,319,000 บาท ที่วิเคราะห์ไว้ในบทสรุปผู้บริหารก่อนหน้า แสดง

ให้เห็นถึงลักษณะของกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมที่ใช้พลังงานสูง

ไฟฟ้า (Std Power) เป็นสาธารณูปโภคหลักด้วยต้นทุนสูงสุด 769,430 บาท/ปี คิดเป็น 42.68% ของต้นทุนสาธารณูปโภครวม ด้วยปริมาณการใช้ 185,405 kW-h/ปี ที่อัตรา 4.15 บาท/kW-h จากข้อมูลราคาไฟฟ้าอุตสาหกรรมในประเทศไทย มกราคม - เมษายน 2568 ซึ่งสอดคล้องกับการใช้งานเครื่องจักรที่ต้องการพลังงานไฟฟ้าสูง เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบจานซ้อน DS-101 ที่มีกำลังการผลิต 200,000.00 ลิตร/ชั่วโมง และเครื่องปฏิกรณ์แบบกวน R-101 และ R-102 ที่ต้องการพลังงานสำหรับการกวนผสมและการควบคุมระบบคลื่นอัลตราโซนิกตามที่วิเคราะห์ไว้ในตารางเครื่องมือและราคาก่อนหน้า

ไอน้ำ (Steam) มีต้นทุน 551,669 บาท/ปี คิดเป็น 30.60% ของต้นทุนสาธารณูปโภครวม ด้วยปริมาณการใช้ 1,393 MT/ปี ที่อัตรา 396 บาท/MT จากข้อมูลราคาไอน้ำสำหรับอุตสาหกรรมในประเทศไทยและเปรียบเทียบกับราคาตลาดปัจจุบันจาก Finansia Research (2022) ซึ่งสอดคล้องกับความต้องการไอน้ำสำหรับการควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการต่างๆ โดยเฉพาะในเครื่องปฏิกรณ์ R-101 ที่ใช้ไอน้ำ 15.04 กิโลกรัม ในขั้นตอนแรกและ 2.59 กิโลกรัม ในขั้นตอนหลัง และเครื่องปฏิกรณ์ R-102 ที่ใช้ไอน้ำ 1.08 กิโลกรัม ตลอดกระบวนการไฮโดรไลซิสตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง R-101 และ R-102 ก่อนหน้า รวมถึงการให้ความร้อนที่ 60°C สำหรับการสกัดและ 50°C สำหรับการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ตามที่กำหนดในผลการทดลองตอนที่ 2 และ 5

น้ำเย็น (Chilled Water) มีต้นทุน 481,881 บาท/ปี คิดเป็น 26.72% ของต้นทุนสาธารณูปโภครวม ด้วยปริมาณการใช้ 36,506 MT/ปี ที่อัตรา 13.2 บาท/MT จากข้อมูลอุตสาหกรรมในประเทศไทยใช้อัตรา 13.2 บาท/MT ซึ่งได้จากการประมาณการต้นทุนน้ำประปาพื้นฐานสำหรับอุตสาหกรรมที่ 13.00 บาท/ลูกบาศก์เมตร จาก Metropolitan Waterworks Authority (MWA, 1999) รวมกับต้นทุนพลังงานในการทำน้ำเย็นซึ่งมีความสำคัญสำหรับการควบคุมอุณหภูมิในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนและการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในกระบวนการ V-101 ที่ใช้น้ำเย็น 8,648.95 กิโลกรัม สำหรับการควบคุมอุณหภูมิระหว่างปฏิกิริยา exothermic ของการทำให้เป็นกลางระหว่าง NaOH และ HCl ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง V-101 ก่อนหน้า และการทำให้น้ำเย็นลงถึง 30°C หลังจากการให้ความร้อนใน R-101 เพื่อเตรียมสำหรับขั้นตอนการแยกส่วนต่อไป

เมื่อคำนวณต้นทุนสาธารณูปโภคต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ได้ 157.22 บาท/กิโลกรัม MP (1,802,980 บาท ÷ 11,470 กิโลกรัม MP/ปี) ซึ่งคิดเป็น 12.59% ของต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม MP แสดงให้เห็นว่าค่าสาธารณูปโภคมีสัดส่วนปานกลางในโครงสร้างต้นทุนซึ่งต่ำกว่าต้นทุนวัตถุดิบ 964.76 บาท/กิโลกรัม MP (77.28%) ที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 62 ก่อนหน้า แต่สูงกว่าต้นทุนแรงงาน 74.23 บาท/กิโลกรัม MP (5.95%) ที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 61 การกระจาย

ของต้นทุนสาธารณูปโภคที่มีไฟฟ้าเป็นหลักสะท้อนถึงลักษณะของกระบวนการที่เน้นการใช้เครื่องจักร และระบบควบคุมแบบอัตโนมัติ ขณะที่การใช้ไอน้ำและน้ำเย็นในสัดส่วนที่สูงแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการควบคุมอุณหภูมิในการรักษาคุณภาพโปรตีนและประสิทธิภาพของเอนไซม์ตลอดกระบวนการผลิต

ตาราง 58 ต้นทุนค่าสาธารณูปโภค (ราคาปี 2568)

สาธารณูปโภค	ต้นทุนต่อหน่วย (บาท)	ปริมาณรายปี	หน่วย อ้างอิง	ต้นทุนรายปี (บาท)	ร้อยละ
Std Power	4.15	185,405	kW-h	769,430	42.68
Steam	396	1,393	MT	551,669	30.6
Chilled Water	13.2	36,506	MT	481,881	26.73
รวม				1,802,980	100

5.4 ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อปี

การวิเคราะห์ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อปีจากตารางแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกอย่างครอบคลุม โดยมีต้นทุนการดำเนินงานรวม 14,319,000 บาท/ปี ซึ่งสะท้อนถึงลักษณะของกระบวนการที่มีความซับซ้อนและต้องการการควบคุมคุณภาพสูง

วัตถุดิบ (Raw Materials) เป็นองค์ประกอบหลักของต้นทุนด้วยมูลค่า 11,070,000 บาท คิดเป็น 77.31% ของต้นทุนรวม ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ตาราง 62 ก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่า Dried Okara, เอนไซม์ Flavourzyme และสารเคมีต่างๆ เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดต้นทุนการผลิต การมีสัดส่วนวัตถุดิบที่สูงนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการจัดหาวัตถุดิบที่มีคุณภาพและราคาเหมาะสม โดยเฉพาะการสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองเพื่อรับประกันการจัดหา Okara อย่างต่อเนื่อง

ค่าสาธารณูปโภค (Utilities) มีมูลค่า 1,803,000 บาท คิดเป็น 12.59% ของต้นทุนรวม แสดงให้เห็นถึงการใช้พลังงานที่สำคัญในกระบวนการ โดยเฉพาะการทำงานของเครื่องหมุนเหวี่ยง DS-101, เครื่องปฏิกรณ์ R-101 และ R-102, และเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง FDR-101 ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตารางกระบวนการก่อนหน้า สัดส่วนค่าสาธารณูปโภคที่ปานกลางนี้สะท้อนถึงการออกแบบกระบวนการที่มีประสิทธิภาพการใช้พลังงาน

ค่าแรงงาน (Labor-Dependent) มีมูลค่า 852,000 บาท คิดเป็น 5.95% ของต้นทุนรวม ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ตาราง 61 ก่อนหน้าที่แสดงการใช้แรงงาน Operator เพียงประเภทเดียว

ด้วยอัตรา 55 บาท/ชั่วโมง และปริมาณการใช้ 15,487 ชั่วโมง/ปี สัดส่วนค่าแรงงานที่ต่ำนี้สะท้อนถึงลักษณะของกระบวนการที่เน้นการใช้เครื่องจักรและเทคโนโลยีมากกว่าแรงงาน ทำให้มีความเสี่ยงต่ำจากการเปลี่ยนแปลงของอัตราค่าจ้าง

ค่าจัดการของเสีย (Waste Treatment/Disposal) มีมูลค่า 467,000 บาท คิดเป็น 3.26% ของต้นทุนรวม โดยมีค่าการกำจัด Solid Waste อยู่ที่ 0.50 บาท/กิโลกรัม คิดเป็น 432,980 บาท/ปี และค่ากำจัด Aqueous Liquid อยู่ที่ 0.01 บาท/กิโลกรัม คิดเป็น 33,629 บาท/ปี

ค่าห้องปฏิบัติการและควบคุมคุณภาพ (Laboratory/QC/QA) มีมูลค่า 128,000 บาท คิดเป็น 0.89% ของต้นทุนรวม ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่สูง

ตาราง 59 ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่อปี (ราคาปี 2568)

รายการต้นทุน	บาท	ร้อยละ
Raw Materials (วัตถุดิบ)	11,070,000	77.31
Labor-Dependent (แรงงานขึ้นอยู่กับการผลิต)	852,000	5.95
Laboratory/QC/QA (ห้องปฏิบัติการ/การควบคุมคุณภาพ/การประกันคุณภาพ)	128,000	0.89
Consumables (วัสดุสิ้นเปลือง)	0	0
Waste Treatment/Disposal (การบำบัดของเสีย/การกำจัดขยะ)	467,000	3.26
Utilities (สาธารณูปโภค)	1,803,000	12.59
Advertising/Selling (การโฆษณา/การขาย)	0	0
Running Royalties (ค่าตอบแทนการใช้สิทธิ์)	0	0
Failed Product Disposal (การกำจัดผลิตภัณฑ์เสียหาย)	0	0
รวม	14,319,000	100

5.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำกำไร

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำกำไรจากตาราง 65 แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ของโครงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก โดยมีการลงทุนรวม 7,959,000 บาท ประกอบด้วยเงินทุนคงที่โดยตรง 6,349,000 บาท (79.77%) เงินทุนหมุนเวียน 1,292,000 บาท (16.24%) และต้นทุนเริ่มต้น 317,000 บาท (3.98%) ซึ่งสะท้อนถึงลักษณะของโครงการที่เน้นการลงทุนในเครื่องจักรและอุปกรณ์มากกว่าเงินทุนหมุนเวียน สอดคล้องกับการใช้เทคโนโลยีขั้นสูงตามที่วิเคราะห์ไว้ในตารางรายละเอียดเครื่องมือและราคา

หน้า โดยเฉพาะเครื่องหมุนเหวี่ยง DS-101 และเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง FDR-101 ที่มีราคารวมกว่า 4.6 ล้านบาท

กำลังการผลิต 11,470 กิโลกรัม/ปี ด้วยราคาขาย 1,600.00 บาท/กิโลกรัม สร้างรายได้รวม 18,351,372 บาท/ปี ซึ่งสอดคล้องกับขนาดแบทช์ 29.56 กิโลกรัม MP และจำนวนแบทช์ 388 แบทช์/ปี ตามที่วิเคราะห์ไว้ในตาราง 53 ก่อนหน้า ราคาขายที่สูงนี้สะท้อนถึงการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากคุณสมบัติเชิงหน้าที่ดีขึ้นหลังจากการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิกตามที่แสดงในผลการทดลองตอนที่ 3.1 ที่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจาก 62.46% เป็น 77.11% และการปรับปรุงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงผลการทดลองตอนที่ 5 ที่แสดงค่า %DH ถึง 108.5% หลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Flavourzyme ต้นทุนการดำเนินงานรายปี 14,319,000 บาท คิดเป็นต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาท/กิโลกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับราคาขายให้อัตรากำไรขั้นต้น 21.97% (กำไรขั้นต้น 4,033,000 บาท/ปี) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการควบคุมต้นทุนที่ดี โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างต้นทุนที่วิเคราะห์ไว้ก่อนหน้านี้ที่แสดงว่าต้นทุนวัตถุดิบครอบคลุม 77.28% ของต้นทุนรวม โดย Okara แห่งเป็นต้นทุนหลัก 85.59% ของต้นทุนวัตถุดิบ และเอนไซม์ Flavourzyme 7.73% ขณะที่ค่าแรงงานมีสัดส่วนเพียง 5.95% ของต้นทุนรวม สะท้อนถึงประสิทธิภาพของกระบวนการอัตโนมัติ

อัตราผลตอบแทนจากการลงทุน (ROI) 38.00% เป็นค่าที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของอุตสาหกรรมอาหาร (15-20%) แสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าของการลงทุนในเทคโนโลยีการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลีนอัลตราโซนิก ระยะเวลาคืนทุน 2.63 ปี อยู่ในระดับที่ยอมรับสำหรับอุตสาหกรรมเทคโนโลยีอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปต้องการระยะเวลาคืนทุน 3-5 ปี การคำนวณกำไรสุทธิ 3,024,000 บาท/ปี หลังหักภาษี 25% (1,008,000 บาท/ปี) และรวมค่าเสื่อมราคาแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสร้างกระแสเงินสดที่แข็งแกร่งอย่างต่อเนื่อง

ตาราง 60 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำกำไร (ราคาปี 2568)

รายการ	ค่า
Investment Data (ข้อมูลการลงทุน)	
A. Direct Fixed Capital (เงินทุนคงที่โดยตรง)	6,349,000 บาท
B. Working Capital (เงินทุนหมุนเวียน)	1,292,000 บาท
C. Startup Cost (ต้นทุนเริ่มต้น)	317,000 บาท
D. Up-Front R&D (ค่าวิจัยและพัฒนาล่วงหน้า)	0 บาท
E. Up-Front Royalties (ค่าตอบแทนการใช้สิทธิ์ล่วงหน้า)	0 บาท
F. Total Investment (A+B+C+D+E) (การลงทุนรวม)	7,959,000 บาท
G. Investment Charged to This Project (การลงทุนที่เรียกเก็บจากโครงการนี้)	7,959,000 บาท
Revenue/Savings Rates (อัตราการผลิต/การประหยัด)	
OPH (Main Revenue) (โปรตีนไฮโดรไลเซต - รายได้หลัก)	11,470 (กก./ปี)
Revenue/Savings Price (ราคาการขาย/การประหยัด)	
OPH (Main Revenue) (โปรตีนไฮโดรไลเซต - รายได้หลัก)	1,600.00 (บาท/กก.)
Revenues/Savings (รายได้/การประหยัด)	
OPH (Main Revenue) (โปรตีนไฮโดรไลเซต - รายได้หลัก)	18,351,372 (บาท/ปี)
1. Total Revenues (รายได้รวม)	18,351,372 (บาท/ปี)
2. Total Savings (การประหยัดรวม)	0 (บาท/ปี)
Annual Operating Cost - AOC (ต้นทุนการดำเนินงานรายปี)	
1. Annual AOC (ต้นทุนการดำเนินงานรายปี)	14,319,000 (บาท/ปี)
2. Net AOC (K1-J2) (ต้นทุนการดำเนินงานสุทธิ)	14,319,000 (บาท/ปี)
Unit Production Cost/Revenue (ต้นทุน/รายได้การผลิตต่อหน่วย)	
Unit Production Cost (ต้นทุนการผลิตต่อหน่วย)	1,248.41 (บาท/กก. ผลิตภัณฑ์หลัก)
Net Unit Production Cost (ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยสุทธิ)	1,248.41 (บาท/กก. ผลิตภัณฑ์หลัก)
Unit Production Revenue (รายได้การผลิตต่อหน่วย)	1,600.00 (บาท/กก. ผลิตภัณฑ์หลัก)
Financial Performance Indicators (ตัวชี้วัดประสิทธิภาพทางการเงิน)	
M. Gross Profit (J-K) (กำไรขั้นต้น)	4,033,000 (บาท/ปี)
N. Taxes (25%) (ภาษี 25%)	1,008,000 (บาท/ปี)
O. Net Profit (M-N + Depreciation) (กำไรสุทธิ)	3,024,000 (บาท/ปี)
Key Performance Metrics (ตัวชี้วัดประสิทธิภาพหลัก)	
Gross Margin (อัตรากำไรขั้นต้น)	21.97%
Return On Investment (อัตราผลตอบแทนจากการลงทุน)	38.00%
Payback Time (ระยะเวลาคืนทุน)	2.63 (ปี)

บทที่ 5

บทสรุป

งานวิจัยนี้มุ่งเพิ่มมูลค่าให้กับกากถั่วเหลือง (Okara) ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมนมถั่วเหลือง โดยพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสทอย่างมีประสิทธิภาพผ่านการศึกษา 6 ขั้นตอนหลักอย่างเป็นระบบ ผลการศึกษาขั้นตอนที่ 1 การเตรียม Okara สดและแห้ง พบว่าการอบแห้ง Okara สด (ความชื้น $75.49 \pm 0.23\%$) ที่ 60°C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง ลดความชื้นเหลือ $2.69 \pm 0.31\%$ ใน Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่งผลให้ความเข้มข้นขององค์ประกอบทางเคมีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยโปรตีนเพิ่มจาก $10.91 \pm 0.08\%$ เป็น $32.15 \pm 0.19\%$ ไขมันจาก $1.25 \pm 0.44\%$ เป็น $8.66 \pm 0.33\%$ คาร์โบไฮเดรตจาก $5.81 \pm 0.52\%$ เป็น $42.8 \pm 0.42\%$ และเยื่อใยจาก $5.68 \pm 0.67\%$ เป็น $10.55 \pm 0.85\%$ การทำแห้งยังปรับปรุงสมบัติทางกายภาพโดย Okara แห้งมีความสว่าง (L^*) เพิ่มขึ้นจาก 63.03 ± 0.11 เป็น 78.65 ± 0.03 และเพิ่มศักยภาพต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC_{50} ของ DPPH ลดลงจาก $15.36 \pm 0.005 \text{ mg/g}$ เป็น $6.45 \pm 0.01 \text{ mg/g}$ และค่า FRAP เพิ่มขึ้นจาก $4.87 \pm 0.18 \text{ mg/g}$ เป็น $11.47 \pm 0.58 \text{ mg/g}$ รวมถึงการเพิ่มขึ้นของ TPC จาก $2.09 \pm 0.07 \text{ mg GAE/g}$ เป็น $6.52 \pm 0.06 \text{ mg GAE/g}$ และ TFC จาก $0.75 \pm 0.05 \text{ mg QE/g}$ เป็น $2.31 \pm 0.05 \text{ mg QE/g}$ ปริมาณกรดอะมิโนใน Okara แห้งสูงกว่า Okara สดทุกชนิดอย่างมีนัยสำคัญ โดยกลูตามิกเป็นหลัก ($4,614 \text{ มก./100ก.}$) และลิซีนเป็นกรดอะมิโนจำเป็นสูงสุด ($2,912 \text{ mg/100g}$) อย่างไรก็ตามสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของ Okara สด เช่น การละลายน้ำ ($22.24 \pm 1.25\%$) และการเกิดอิมัลชัน ($30.65 \pm 1.06\%$) ยังคงสูงกว่า Okara แห้งอย่างมีนัยสำคัญ ด้านจุลชีววิทยา การทำแห้งลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจาก $3.0 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ เป็น $4.3 \times 10^5 \text{ CFU/g}$ และยีสต์/ราทั้งหมดจาก $4.2 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ เป็น $8.7 \times 10^2 \text{ CFU/g}$ อย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห้ง พบว่าสภาวะที่ pH 11.5 เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein content สูงสุด ($73.14 \pm 0.84\%$) ขณะที่ pH 12.0 เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein recovery สูงสุด ($51.21 \pm 0.05\%$) และ %Extraction yield สูงสุด ($23.33 \pm 0.48\%$) การเปรียบเทียบระหว่าง Okara สดและแห้งแสดงให้เห็นว่า Okara แห้งให้ประสิทธิภาพการสกัดเชิงปริมาณดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยให้ %Protein recovery และ %Extraction yield สูงกว่า Okara สดในทุกสภาวะที่ทดสอบ ซึ่งเป็นผลมาจากการเข้มข้นของ

องค์ประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนระหว่างการทำแห้งที่ช่วยเพิ่มการเข้าถึงของตัวทำละลายต่าง

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาผลของการพรีทรีทเมนต์ก่อนการสกัดโปรตีน แบ่งเป็น 2 เทคนิคหลัก โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (37 kHz) กับ Okara แห้งเป็นเวลา 45 นาที สามารถลดขนาดอนุภาคโปรตีนจาก 368 นาโนเมตร เหลือ 220 นาโนเมตร และเพิ่มศักย์ซีตาเป็นลบสูงสุด (-45 มิลลิโวลต์ ที่ 30 นาที) ส่งผลให้เพิ่ม %Protein recovery สูงสุด ($45.12 \pm 0.13\%$ ที่ 45 นาที) และ %Extraction yield สูงสุด ($19.93 \pm 0.55\%$ ที่ 15 นาที) ใน Okara แห้ง รวมถึงเพิ่ม %Protein content ใน Okara สด (สูงสุด $77.64 \pm 1.24\%$ ที่ 45 นาที) ด้านสมบัติเชิงหน้าที่ คลื่นอัลตราโซนิกช่วยเพิ่มการละลายน้ำ การดูดซับน้ำ การเกิดโฟม และการเกิดอิมัลชัน แต่ลดความคงตัวของโฟมและอิมัลชัน การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์กับ Okara แห้ง พบว่า Viscozyme 5% เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein recovery สูงสุด ($70.65 \pm 0.54\%$) Xylanase 5% เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein content สูงสุด ($84.91 \pm 1.28\%$) และ Cellulase 5% เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Extraction yield สูงสุด ($27.57 \pm 0.37\%$) ขณะที่ Pectinase มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดในทุกพารามิเตอร์ การใช้เอนไซม์ช่วยลดขนาดอนุภาคโปรตีนและเพิ่มศักย์ซีตาเป็นลบ รวมถึงปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการละลายและการดูดซับน้ำ อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์กับ Okara สดให้ประสิทธิภาพต่ำกว่า Okara แห้งอย่างชัดเจน และแบบจำลองทางเศรษฐศาสตร์ชี้ให้เห็นว่าต้นทุนของเอนไซม์สูงกว่าคลื่นอัลตราโซนิกอย่างมาก

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษาการผลิตโปรตีนเข้มข้นหลังการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ โดยใช้ Okara แห้งผ่านคลื่นอัลตราโซนิก 45 นาที ตามด้วย Xylanase 3% เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein content $77.12 \pm 1.83\%$ %Protein recovery $49.65 \pm 0.72\%$ และ %Extraction yield $20.45 \pm 0.06\%$ แม้จะมีประสิทธิภาพที่ดี แต่ไม่เกินประสิทธิภาพสูงสุดของการใช้เอนไซม์เดี่ยวหรือคลื่นอัลตราโซนิกเดี่ยว การวิเคราะห์ต้นทุนแสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกเดี่ยวมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์มากกว่าการใช้เอนไซม์หรือเทคนิคผสม

ขั้นตอนที่ 5 การศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้โปรตีนเข้มข้นที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก 45 นาที พบว่าการย่อยด้วย Flavourzyme 2.5% เป็นเวลา 90 นาที ให้ %Protein content ในส่วน Supernatant สูงสุด ($77.11 \pm 2.20\%$) ซึ่งสูงกว่าการไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิก ($62.46 \pm 1.45\%$) อย่างมีนัยสำคัญ ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสทที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีความสว่าง (L^*) สูงกว่า (85.75 ± 0.42 เทียบกับ 81.35 ± 0.25) ปริมาณโปรตีนสูงกว่า และองค์ประกอบอื่นต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ

ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านคลื่นอัลตราโซนิกดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญในทุกการทดสอบ โดยมีค่า DPPH (IC50) ต่ำกว่า (3.25 ± 0.10 mg/g เทียบกับ 4.85 ± 0.22 mg/g) ค่า FRAP สูงกว่า (16.75 ± 0.28 mg/g เทียบกับ 13.50 ± 0.49 mg/g) และค่า Fe^{2+} chelating สูงกว่า ($82.25 \pm 1.25\%$ เทียบกับ $78.50 \pm 1.75\%$) ปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดสูงกว่า 1.15-1.17 เท่า และ %DH สูงขึ้นถึง 108.5% เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ผ่านคลื่นอัลตราโซนิก ด้านสมบัติเชิงหน้าที่ คลื่นอัลตราโซนิกช่วยเพิ่มการละลายน้ำ ($85.45 \pm 1.60\%$ เทียบกับ $75.25 \pm 1.45\%$) และการเกิดโฟม ($25.09 \pm 1.41\%$ เทียบกับ $20.70 \pm 1.63\%$) แต่ลดการเกิดอิมัลชัน ($27.87 \pm 1.18\%$ เทียบกับ $31.25 \pm 1.30\%$) อย่างมีนัยสำคัญ ด้านจุลชีววิทยา คลื่นอัลตราโซนิกช่วยลดจุลินทรีย์ทั้งหมดจาก 2.5×10^3 CFU/g เหลือ 3.6×10^2 CFU/g แต่เพิ่มยีสต์/ราจาก 1.8×10^2 CFU/g เป็น 2.4×10^2 CFU/g อย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนที่ 6 การประยุกต์ใช้แบบจำลองทางเศรษฐศาสตร์ด้วยโปรแกรม SuperPro® Designer เพื่อหาปริมาณต้นทุนการผลิตและจุดคุ้มทุนในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก พบว่าการผลิตโปรตีนเข้มข้นจาก Okara แห่งด้วยการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (37 kHz) เป็นเวลา 45 นาที สามารถผลิตโปรตีนเข้มข้นที่มีปริมาณโปรตีน 81.82% ได้ผลผลิต 133.28 กิโลกรัมต่อแบทช์จากการใช้ Okara แห่ง 1,000 กิโลกรัม คิดเป็นอัตราการผลิตประจำปี 11,470 กิโลกรัม จากการดำเนินงาน 388 แบทช์ต่อปี การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนเข้มข้นดังกล่าวด้วยเอนไซม์ Flavourzyme 2.5% ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีน 73.78% ได้ผลผลิต 29.56 กิโลกรัมต่อแบทช์ คิดเป็นอัตราการผลิตประจำปี 11,470 กิโลกรัม การวิเคราะห์ทางเศรษฐศาสตร์แสดงให้เห็นว่าโครงการมีความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์สูง โดยมีเงินลงทุนโครงการรวม 7,959,000 บาท ต้นทุนการดำเนินงานประจำปี 14,319,000 บาท รายได้ประจำปี 18,351,000 บาท ให้ผลตอบแทนจากการลงทุน (ROI) 38.00% ระยะเวลาคืนทุน 2.63 ปี อัตราผลตอบแทนภายใน (IRR) หลังหักภาษี 30.09% และมูลค่าปัจจุบันสุทธิ (NPV) 15,067,000 บาท ที่อัตราคิดลด 7.00% โครงสร้างต้นทุนประกอบด้วยต้นทุนวัตถุดิบ 11,069,624 บาท (77.28%) ค่าสาธารณูปโภค 1,802,980 บาท (12.59%) และค่าแรงงาน 851,786 บาท (5.95%) แสดงให้เห็นถึงลักษณะของกระบวนการที่เน้นการใช้วัตถุดิบและเครื่องจักรมากกว่าแรงงาน ต้นทุนการผลิตต่อหน่วย 1,248.41 บาทต่อกิโลกรัม และรายได้ต่อหน่วย 1,600.00 บาทต่อกิโลกรัม ให้อัตรากำไรขั้นต้น 21.97%

จากผลการศึกษาทั้งหมด สรุปได้ว่าการใช้ Okara แห่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นร่วมกับการพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (37 kHz, 45 นาที) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์สำหรับการผลิตโปรตีนเข้มข้นและโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก Okara โดยสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี

ปริมาณโปรตีนสูง กิจกรรมด้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น และสมบัติเชิงหน้าที่ที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและสุขภาพ การพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน แต่ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายและลดต้นทุนการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ ซึ่งแม้จะให้ประสิทธิภาพการสกัดที่สูงกว่าแต่มีต้นทุนสูงมากจนไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมอาหารเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิด circular economy และ waste valorization ที่มีความสำคัญในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

การขยายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรม: แม้แบบจำลองจะแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก แต่การขยายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่จะมีปัจจัยเพิ่มเติมที่ต้องพิจารณา ควรมีการศึกษาต้นทุนและประสิทธิภาพในระดับที่ใหญ่ขึ้น รวมถึงการวิเคราะห์ผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม การจัดการน้ำเสีย และการลดการใช้พลังงาน โดยเฉพาะในกระบวนการทำแห้งและการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

การพัฒนาประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน: แม้การใช้คลื่นอัลตราโซนิกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด แต่ค่า Protein recovery โดยรวมยังมีศักยภาพในการปรับปรุงเพิ่มเติม ควรศึกษาการปรับสภาวะการสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น เช่น การปรับ pH ความเข้มข้นของสารละลายต่าง อุณหภูมิ และระยะเวลา หรือการใช้เทคนิคการสกัดแบบอื่นๆ ที่อาจให้ผลผลิตสูงกว่า เช่น การสกัดแบบ pulsed electric field หรือ high pressure processing

การศึกษาคุณสมบัติเชิงลึกของโปรตีนไฮโดรไลเสท: ควรมีการวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพิ่มเติม เช่น การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ คุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ) การประเมินคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส และการศึกษาความปลอดภัยทางชีวภาพ เพื่อสร้างฐานข้อมูลที่ครอบคลุมสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์

การพัฒนาการใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้: กระบวนการผลิตก่อให้เกิดของเสียจากการแยกส่วนและการทำแห้ง ควรศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากกากตะกอนและส่วนที่ไม่ได้ใช้ ในกระบวนการ เช่น การผลิตเยื่อใยอาหาร การผลิตแอลกอฮอล์หรือกรดอินทรีย์ผ่านกระบวนการ

หมัก หรือการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลังงานทดแทน เพื่อเพิ่มมูลค่าโดยรวมของกระบวนการ และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

การศึกษาความคงตัวและอายุการเก็บรักษา: ควรมีการศึกษาความคงตัวของโปรตีนเข้มข้น และโปรตีนไฮโดรไลเสทระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง และบรรยากาศต่างๆ รวมถึงการพัฒนาเทคนิคการบรรจุและการเก็บรักษาที่เหมาะสม เพื่อประเมินอายุ การเก็บรักษาและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์

การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่: การพรีทรีทเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกส่งผลให้ความคงตัวของ โฟมและอิมัลชันลดลง หากต้องการนำโปรตีนไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติเหล่านี้ ควรศึกษา การปรับเปลี่ยนสภาวะการพรีทรีทเมนต์ การใช้สารช่วยเพิ่มความคงตัว หรือการดัดแปรโปรตีนด้วยวิธี อื่นๆ เช่น การใช้ transglutaminase หรือการสร้างพันธะไขว้ทางเคมี

การพัฒนาการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน: ควรพัฒนาระบบการควบคุมคุณภาพที่ ครอบคลุม รวมถึงการกำหนดมาตรฐานสำหรับผลิตภัณฑ์โปรตีนจาก Okara การพัฒนาวิธีการ วิเคราะห์ที่รวดเร็วและแม่นยำ และการศึกษาความปลอดภัยทางอาหารในระยะยาว เพื่อเตรียมความ พร้อมสำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์และการส่งออก





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมการค้าภายใน สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย และสถาบันอาหาร. (2564). กากถั่วเหลือง
พิกัด 2304.00.90.
- กรมวิชาการเกษตร. (2547). เอกสารวิชาการ ถั่วเหลือง. หจก. ไอเดีย สแควร์
กรุงเทพฯ. 150 หน้า
- ทิพวรรณ ทองสุข. (2559). การสกัดโปรตีนและน้ำตาลจากรำข้าวสาคัดน้ำมัน. นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 12:
ธัญพืช จันทรแสนโรจน์. (2550). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอย
เป่าฮื้อ *Halotis asinnine*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- น้ำทิพย์ วงษ์ประทีป. (2547). การปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีน
จากถั่วเขียว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์/กรุงเทพฯ.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
กรุงเทพฯ 440 หน้า.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์
แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปาริฉัตร ทักษะสุด. (2539). การใช้เอนไซม์ดัดแปลงสมบัติการให้ฟองของโปรตีนจากกากถั่วเหลือง.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย/กรุงเทพฯ.
- ภรณ์ ศรีเสาวลักษณ์. (2540). การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากไขมันสำปะหลังโดยการปรับสภาพด้วยความ
ความร้อนและสารเคมี. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.บัณฑิตวิทยาลัย
- วนิดา เทวฤทธิ์ ชิตีสรณ์กุล. (2561). วารสารวิชาการอาหาร. กากถั่วเหลืองคุณค่าที่ถูกทิ้ง. ปีที่ 48
ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน. วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ.
- สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. (2527). ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.
สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2568). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2568
[Situation of key agricultural products and trends for 2025]. กระทรวงเกษตรและ
สหกรณ์. <https://www.oae.go.th/view/1/สถานการณ์สินค้าเกษตร/TH-TH>
- สุปราณี แยมพราย. (2539). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็น
อิมัลซิไฟเออร์. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการ
อาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 119 หน้า.

- สุภาวดี ทรัพย์ศิริไพบูลย์. (2550). ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง/กรุงเทพฯ.
- อภิญญา นาพรม และปาริฉัตร หงสประภาส. (2550). ผลของความร้อนต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเขียวเข้มข้น.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 : สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 363-371.
- Aaslyng, D. M., Magnl, M., Leif, P., Per, N., Hanne, F., & Lone, M. L. (1998). Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 481-489.
- Accardo, F., Leni, G., Tedeschi, T., Prandi, B., & Sforza, S. (2022). Structural and chemical changes induced by temperature and pH hinder the digestibility of whey proteins. *Food chemistry*, 387, 132884.
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., & Utsumi, S. (2003). Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7395–7400.
- Adams, M. R., Golden, D. L., Franke, A. A., Potter, S. M., Smith, H. S., & Anthony, M. S. (2004). Dietary soy β -conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 511–516.
- Adams, M. R., Golden, D. L., Register, T. C., Anthony, M. S., Hodgins, J. B., Maeda, N., & Williams, J. K. (2002). The atheroprotective effect of dietary soy isoflavones in apolipoprotein E–/– mice requires the presence of estrogen receptor- α . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), 1859–1864.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein*. Vanderbilt New York.
- Aiello, G., Pugliese, R., Rueller, L., Bollati, C., Bartolomei, M., Li, Y., ... & Lammi, C. (2021). Assessment of the physicochemical and conformational changes of ultrasound-driven proteins extracted from soybean okara byproduct. *Foods*, 10(3), 562.

- Al-Wahsh, I. A., Horner, H. T., Palmer, R. G., Reddy, M. B., & Massey, L. K. (2005). Oxalate and phytate of soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5670–5674.
- Alcorta, A., Porta, A., Tárrega, A., Alvarez, M. D., & Vaquero, M. P. (2021). Foods for plant-based diets: Challenges and innovations. *Foods*, 10(2), 293.
- Alexandersen, P., Toussaint, A., Christiansen, C., Devogelaer, J.-P., Roux, C., Fechtenbaum, J., ... Reginster, J. Y. (2001). Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *Jama*, 285(11), 1482–1488.
- Alzaydi, A. (2023). *Extraction, digestion, and antioxidant properties of bioactive peptides produced from spent soybean residue (Okara)* (Doctoral dissertation, University of Guelph).
- An, J., Wicaksana, F., Liu, C., Tian, J., & Yao, Y. (2024). Current food processing methods for obtaining umami peptides from protein-rich foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 104704.
- Anand, S. S., Hawkes, C., de Souza ScD, R. J., Mente, A., Dehghan, M., Nugent, R., ... Popkin, B. M. (2015). Food consumption and its impact on cardiovascular disease: Importance of solutions focused on the globalized food system: a report from the workshop convened by the World Heart Federation. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(14), 1590–1614.
- Anderson, J. W., Smith, B. M., & Gustafson, N. J. (1994). Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 1242S–1247S.
- Arik Kibar, E. A., & Aslan, Ö. (2024). Ultrasound-Assisted Extraction of Chickpea Proteins and Their Functional and Technological Properties. *Food Technology and Biotechnology*, 62(4), 488-500.

- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.
- Au-Kumar-Om, L. B., Sasikia, & Kannur, S. B. (1992). *Food Sci. Technol, Mysore*, 29, 111-112.
- Badjona, A., Bradshaw, R., Millman, C., Howarth, M., & Dubey, B. (2024). Optimization of ultrasound-assisted extraction of faba bean protein isolate: Structural, functional, and thermal properties. Part 2/2. *Ultrasonics sonochemistry*, 110, 107030.
- Bau, H. W., Chandrasiri, V., Nicolas, J. P., & Mejan, L. (1992). Composition and nutritional value of okara fermented by *Rhizopus oligosporus*. *Sciences Des Aliments (France)*.
- Berk, Z. (1992). Technology of production of edible flours and protein products from soybean. *FAO Agricultural Services Bulletin (FAO)*, No. 97.
- Biswas, B., Muttathukattil, A. N., Reddy, G., & Singh, P. C. (2018). Contrasting effects of guanidinium chloride and urea on the activity and unfolding of lysozyme. *Acs Omega*, 3(10), 14119-14126.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Britannica. (2025, June 18). Protein - Denaturation, structure, function. สืบค้นเมื่อ 20 มิถุนายน 2568 จาก <https://www.britannica.com/science/protein/Protein-denaturation>
- Campbell, G. M., & Mougeot, E. (1999). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 283-296.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, 135(4), 3020-3038.

- Chan, W. M., & Ma, C. Y. (1999). Acid modification of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*, 32(2), 119–127.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(5), 951–957.
- Chau, C. F., & Cheung, P. C. K. (1998). Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61(4), 429–433.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Cheng, F., Shu, G., Chen, L., Dai, C., Wan, H., Chen, H., & Dong, X. (2021). Ultrasound-microwave assisted extraction of proteins from *Moringa oleifera* leaves: Comparative optimization study and LC-MS analysis of the protein concentrate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6), e15547.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2600–2609.
- Cheng, J., & Cui, L. (2021). Effects of high-intensity ultrasound on the structural, optical, mechanical and physicochemical properties of pea protein isolate-based edible film. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, 105809.
- Choi, E. J., & Kim, G.-H. (2013). Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ER α /c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 7(3), 781–784.

- Chuan, H. T., Xian, S. W. and Xian, Q. Y. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Food Chemistry*, 114, 1484-1490.
- Civitelli, R., & Villareal, D. T. (1994). Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. *Nutrition*, 10(5), 409-412.
- d'Adduzio, L., Fanzaga, M., Capriotti, A. L., Taglioni, E., Boschini, G., Laganà, A., ... & Lammi, C. (2024). Ultrasonication coupled to enzymatic hydrolysis of soybean okara proteins for producing bioactive and bioavailable peptides. *Current research in food science*, 9, 100919.
- Dalaka, E., Politis, I., & Theodorou, G. (2023). Antioxidant activity of sweet whey derived from bovine, ovine and caprine milk obtained from various small-scale cheese plants in Greece before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Antioxidants*, 12(9), 1676.
- Damodaran, S. (1996). Functional properties. In *Food proteins* (pp. 167-234). Springer.
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). Amino acids, peptides, and proteins. In *Fennema's food chemistry* (pp. 235-356). CRC press.
- Damodaran, S., Parkin, K., and Fennema, O. R. (2008). *Fennema's Food Chemistry* (4th ed.). New York: Marcel Dekker.
- Das, D., Panesar, P. S., & Saini, C. S. (2023). Ultrasonic extraction of soy protein isolate: Characterization and comparison with microwave and enzymatic extraction methods. *Journal of Food Science*, 88(7), 2758-2779.
- de Figueiredo, V. R. G., Yamashita, F., Vanzela, A. L. L., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2018). Action of multi enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. *Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1508-1517.

- Delfiya, DS Aniesrani, et al. (2022). Drying kinetics of food materials in infrared radiation drying: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 45(6), e13810. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13810>
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(1), 161-169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>
- Endres, J. G. (2001). *Soy protein products: Characteristics, nutritional aspects, and utilization*. Illinois: AOCS Press.
- Eze, O. F. (2019). *Extraction of proteins from soybean residue (okara) and investigation of their physicochemical properties and their application as emulsifiers* (Doctoral dissertation, University of Reading).
- Eze, O. F., Chatzifragkou, A., & Charalampopoulos, D. (2022). Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara). *Food Chemistry*, 368, 130837.
- Faller, J. F., Faller, J. Y., & Klein, B. P. (2000). Physical and sensory characteristics of extruded corn/soy breakfast cereals. *Journal of Food Quality*, 23(1), 87–102.
- FAO/WHO. (1991). Protein quality evaluation. *Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation, FAO Food and Nutrition Paper 51*, 10–26.
- FAO/WHO/UNU. (1985). Energy and protein requirements: report of a Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organization/United Nations University. *WHO Technical Report Series No.724*.
- FAO/WHO/UNU. (1999). Report of Expert Work Group on Energy and Protein Requirements. *WHO Technical Report Series No. 724*, World Health Organisation Geneva.
- FDA, U. S. (1999). FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease. *FDA Talk Paper T99*, 48.

- Fei, L., Yang, L., & Bo, L. (2013). Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of okara foods. *Food Science and Human Wellness*, 2(3-4), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.001>
- Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. S. Damodaran, & K. L. Parkin (Eds.). Boca Raton: CRC press.
- Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Emulsifying and foaming properties of okara protein hydrolysates. *Cereal Chemistry*, 93(1), 71–76.
- Figueiredo, V. R. G. D., Justus, A., Pereira, D. G., Georgetti, S. R., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2019). Production of hydrolysate of okara protein concentrate with high antioxidant capacity and aglycone isoflavone content. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19180478.
- Fischer, M., Kofod, L. V., Schols, H. A., Piersma, S. R., Gruppen, H., & Voragen, A. G. (2001). Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4463-4469.
- Fletcher, R. J. (2003). Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. *British Journal of Nutrition*, 89(S1), S39–S43.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 42(1), 1-11.
- Gama, R., Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2015). Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes. *3 Biotech*, 5(6), 1075-1087.
- Garcia, M. C., Torre, M., Laborda, F., & Marina, M. L. (1997). Rapid separation of soybean globulins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 758, 75–83.

- García-Alonso, A., Mateos-Aparicio, I., Tenorio-Sanz, M. D., Villanueva-Suarez, M. J., & Redondo-Cuenca, A. (2022). Okara: A Soybean By-Product with Interesting Properties in Nutrition and Health. In *Phytochemicals in Soybeans* (pp. 259-284). CRC Press.
- Gavin, M., & Wettstein, A. (1990). *Soy milk and other Soya products from the traditional method of Production to the new manufacturing processes*. Buhler Ltd. Uzwil, Switzerland.
- Golbitz, P. (1995). Traditional soyfoods: Processing and products. *The Journal of Nutrition*, 125, 570S-572S.
- Golbitz, P., & Jordan, J. (2006). Soyfoods: Market and Products. In *Soy Applications in Food* (pp. 1-21). New York: CRC Press.
- Grases, F., & Costa-Bauza, A. (1999). Phytate (IP6) is a powerful agent on preventing calcification in biological fluids. Usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Research*, 19(5), 3717-3722.
- Green, A. J., Littlejohn, K. A., Hooley, P., & Cox, P. W. (2013). Formation and stability of food foams and aerated emulsions: Hydrophobins as novel functional ingredients. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 292-301.
- Greger, J. L. (1999). Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1434S-1435S.
- Guerrero, L., Ebrahim, A., Riley, B. T., Kim, M., Huang, Q., Finke, A. D., & Keedy, D. A. (2024). Pushed to extremes: distinct effects of high temperature versus pressure on the structure of STEP. *Communications Biology*, 7(1), 59.
- Guermani, L., Villaume, C., Genovese, M. I., Barbosa, A. C. L., Pinto, M. D. S., & Lajolo, F. M. (2007). Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(2), 53-58.
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food chemistry*, 106(1), 345-351.

- Guiné, R. (2018). The drying of foods and its effect on the physical-chemical, sensorial and nutritional properties. *International Journal of Food Engineering*, 2(4), 93-100. <http://dx.doi.org/10.18178/ijfe.4.2.93-100>
- Hailing, P. J., & Walstra, P. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(2), 155-203.
- Hajirostamloo, B. (2009). Comparison of nutritional and chemical parameters of soymilk and cow milk. *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*, 57(9), 436-438.
- Harland, B. F., Smith, S. A., Howard, M. P., Ellis, R., & Smith, J. J. C. (1988). Nutritional status and phytate: zinc and phytate x calcium: zinc dietary molar ratios of lacto-ovo vegetarian Trappist monks: 10 years later. *Journal of the American Dietetic Association*, 88(12), 1562-1566.
- Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (2008). *Food emulsifiers and their applications* (Vol. 19). Springer.
- Hayakawa, S., & Nakai, S. (1985). Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *Journal of Food Science*, 50, 486-491.
- Hayashi, H., Asabu, Y., Murao, S., & Arai, M. (1995). New okaramide congeners, okaramides D, E, and F, from *Penicillium simplicissimum* ATCC 90288. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59, 246-250.
- Hayashi, H., Takluchi, K., Murao, S., & Arai, M. (1989). Structure and insecticidal activity of new indole alkaloids, okaramines A and B, from *Penicillium simplicissimum* AK-40. *Agric Biol. Chem*, 53, 461-470.
- He, J., Wang, S., Zhou, M., Yu, W., Zhang, Y., & He, X. (2015). Phytoestrogens and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *World Journal of Surgical Oncology*, 13(1), 231.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

- Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1998). Functional properties of soy proteins. In *Functional properties of proteins and lipids* (pp. 80–95). Washington, DC: American Chemical Society.
- Holt, S., Muntyan, I., & Likver, L. (1996). Soya-based diets for diabetes mellitus. *Alternative and Complementary Therapies*, 2(2), 79–82.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., ... & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food hydrocolloids*, 30(2), 647–655.
- Hutabarat, L. S., Greenfield, H., & Mulholland, M. (2001). Isoflavones and Coumestrol in Soybeans and Soybean Products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 43–58.
- Hu, Z., Zhu, X., Dong, G., Naibaho, J., Hannon, S., Sun, D. W., & Tiwari, B. K. (2024). Valorization of potato by-products as a source of plant proteins: novel extraction techniques and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17.
- Illanes, A., Wilson, L., & Cauerhff, A. (2019). Enzyme kinetics. In A. Illanes (Ed.), *Enzyme biocatalysis: Principles and applications* (pp. 41–91). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25126-9_2
- IMARC Group. (2023). Soybean meal pricing report 2024: Price trend, chart, market analysis, news, demand, historical and forecast data. สืบค้นเมื่อ 19 มิถุนายน 2568 จาก <https://www.imarcgroup.com/soybean-meal-pricing-report>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2011). *Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance* (Vol. 8). Springer Science & Business Media.
- Irakli, M., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2020). Comparative evaluation of the nutritional, antinutritional, functional, and bioactivity attributes of rice bran stabilized by different heat treatments. *Foods*, 10(1), 57.

- Jafari, S. M., & Capanoglu, E. (2022). Extraction, processing and encapsulation of food bioactive compounds. *Food Chem*, 381, 132117.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of food engineering*, 93(4), 386-393.
- Jantawat, P., Chinprahast, N. and U. Siripatrawan. (1998). Effects of hydrolysing conditions on chemical and sensory properties of hydrolysed mungbean protein. *Journal of the Scientific Society*, 24, 147–154.
- Japan Tofu Association. (2023). Okara - Nutrition facts.
http://www.tofu-as.com/english/nutrition_facts/01effects/02.html
- Jariwalla, R. J., Sabin, R., Lawson, S., & Herman, Z. S. (1990). Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *Journal of Applied Nutrition*, 42(1), 18–28.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Jenkins, A. L., Augustin, L. S. A., Ludwig, D. S., ... Anderson, J. W. (2003). Type 2 diabetes and the vegetarian diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 610S-616S.
- Jiang, J., Xiong, Y. L., Newman, M. C., & Rentfrow, G. K. (2012). Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. *Food Chemistry*, 132(4), 1944–1950.
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., ... & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food research international*, 62, 595-601.
- Johnson, D. W., & Kikuchi, S. (1989). *Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*. USA: AOCS Press.

- Jung, S., Lamsal, B. P., Stepien, V., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2006). Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(1), 71-78.
- Jung, Stephanie, Murphy, P. A., & Johnson, L. A. (2005). Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science*, 70(2), C180–C187.
- Kabawa, B., Sampers, I., & Raes, K. (2023). Effect of ultrasonic treatment on enzymes: Decoupling the relation between the ultrasonic driven conformational change and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106720.
- Kang, S., Zhang, J., Guo, X., Lei, Y., & Yang, M. (2022). Effects of ultrasonic treatment on the structure, functional properties of chickpea protein isolate and its digestibility in vitro. *Foods*, 11(6), 880.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Sato, K., & Marshall, M. (2012). Structure–Function Relationship. In *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization* (pp. 49–85). London: CRC Press.
- Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J. (Hans), Pometto, A. L., Grewell, D., & Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 270–278.
- Kasai, N., Murata, A., Inui, H., Sakamoto, T., & Kahn, R. I. (2004). Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5709-5716.
- Kaur, M., & Badhan, R. K. S. (2015). Phytoestrogens modulate breast cancer resistance protein expression and function at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 132–154.
- Kavimughil, M., Dutta, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Sonication of egg and its effect on foaming behavior. *Sustainable Food Technology*, 1(4), 511-527.

- Kempka, A. P., Honaiser, T. C., Fagundes, E., & Prestes, R. C. (2014). Functional properties of soy protein isolate of crude and enzymatically hydrolysed at different times. *International Food Research Journal*, 21(6), 2229–2236.
- Khanal, S. K., Montalbo, M., van Leeuwen, J. (., Srinivasan, G., & Grewell, D. (2007). Ultrasound enhanced glucose release from corn in ethanol plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(5), 978–985.
- Khare, S. K., Jha, K., & Gandhi, A. P. (1995b). Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bior Tech*, 54(3), 323-325.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242-258. <https://doi.org/10.1007/BF02671468>
- Kleekayai, T., Khalesi, M., Amigo-Benavent, M., Cermeño, M., Harnedy-Rothwell, P., & FitzGerald, R. J. (2023). Enzyme-assisted extraction of plant proteins. In *Green protein processing technologies from plants: Novel extraction and purification methods for product development* (pp. 131-178). Cham: Springer International Publishing.
- Kobayashi, T. (1997). Fat-and oll-coated okara for cakes and its manufacture. *Jpn. Patent JP 09, 285,251*.
- Kong, X., Guo, M., Hua, Y., Cao, D. and Zhang, C. (2008). Enzymatic preparation of Immune modulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology*, 99, 8873–8879.
- Kris-Etherton, P. M., Etherton, T. D., Carlson, J., & Gardner, C. (2002). Recent discoveries in inclusive food-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 13(4), 397–407.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysate : productivity, biochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40, 43-81.
- Krokida, M. K., & Maroulis, Z. B. (1997). Effect of drying method on shrinkage and porosity. *Drying Technology*, 15(10), 2441 - 2458 .
<https://doi.org/10.1080/07373939708917369>

- Kronenberg, H., & Hang, Y. D. (1984). Biochemical changes in okara during meitauza fermentation. *Food Sci Technol. Abstr.*, 85-03-G0002.
- Kudelka, W., Kowalska, M., & Popis, M. (2021). Quality of soybean products in terms of essential amino acids composition. *Molecules*, 26(16), 5071.
- Kumar, V., Rani, A., & Hussain, L. (2016). Essential amino acids profile of differentially processed soy products and their efficiency in meeting daily requirement. *Nutrition & Food Science*, 46(2), 237-245.
- Kumar, V., Rani, A., & Husain, L. (2016). Investigations of amino acids profile, fatty acids composition, isoflavones content and antioxidative properties in Soy okara. *Asian Journal of Chemistry*, 28(4), 903–906.
- L'Hocine, L., Boye, J. I., & Arcand, Y. (2006). Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *Journal of Food Science*, 71(2), C137-C145.
- Lafarga, T., Aguiló-Aguayo, I., & Hayes, M. (2019). Optimisation of the enzymatic hydrolysis of bovine haemoglobin for the generation of peptides with in vitro dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity. *Food & Function*, 10(12), 7936-7946.
- Lampe, J. W. (2003). Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *The Journal of Nutrition*, 133(3), 956S-964S.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gase, F., Cros, G. and Teissedre, P. L. (2001). Antioxidant capacity and phenolics levels of france wine from different varieties and vintages. *J. Agric. Food chem.*, 49, 3341-3348.
- Lavigne, C., Marette, A., & Jacques, H. (2000). Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 278(3), E491–E500.
- Lee, K., & Brennand, C. P. (2005). Physico-chemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(5), 501–508.

- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., & Trèche, S. (2005). Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry*, 89(3), 421–425.
- Lewicki, P. P. (2004). Water as the determinant of food engineering properties. A review. *Journal of food engineering*, 61(4), 483–495. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00219-X)
- Li, B., Qiao, M., & Lu, F. (2012). Composition, nutrition, and utilization of okara (soybean residue). *Food Reviews International*, 28(3), 231-252.
- Li, B., Yang, W., Nie, Y., Kang, F., Goff, H. D., & Cui, S. W. (2019). Effect of steam explosion on dietary fiber, polysaccharide, protein and physicochemical properties of okara. *Food Hydrocolloids*, 94, 48-56.
- Li, S., Zhu, D., Li, K., Yang, Y., Lei, Z., & Zhang, Z. (2012). Soybean Curd Residue: Composition, Functional Properties, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6867-6875.
- Liener, I. E. (1981). / *Amer. Oil Chem. Soc.*, 58, 406. (Note: More details needed for a complete APA citation)
- Lin, D., Zhang, Q., Xiao, L., Huang, Y., Yang, Z., Wu, Z., ... & Li, S. (2021). Effects of ultrasound on functional properties, structure and glycation properties of proteins: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(15), 2471-2481.
- Lin, N., Hu, A., & Liu, Z. (2020). Effect of different treatments on antioxidative stability of the scallop protein hydrolysates. *Food and Nutrition Sciences*, 11(7), 603-614.
- Liu, K. (1997). *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*. Springer Science & Business Media.
- Ma, C. Y., Liu, W. S., Kwok, K. C., & Kwok, F. (1996). Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara) *. *Food Research International*, 29(8), 799-805.

- Maeda, K., Yokoi, S., Kamada, K., & Kamimura, M. (1991). Foam Stability and Physicochemical Properties of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(1), 14–18.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food chem.*, 100, 1409-1418.
- Malhotra, A., & Coupland, J. N. (2004). The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 101-108.
- Manley, C. H. and Fagerson, I. S. (1971). Aspects of aroma and taste characteristics of hydrolyzed vegetable protein. *The Flavor Industry*, 2(12), 686-690.
- Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of food science and technology*, 52, 3235-3241.
- Mann, J. I., & Cummings, J. H. (2009). Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(3), 226–229.
- Manukumar, H. M., & Madhu, C. S. (2013). Comparative evaluation of technique efficiency on antioxidant activity of red gram (*Cajanus cajan*) seed coat extracts. *Int. J. Rec. Sci. Res*, 4(9), 1395-1399.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*, 63(1), 85–95.
- Maruyama, N., Mohamed Salleh, M. R., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., Utsumi, S. (2002). Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin heterotrimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4323– 4326.

- Maruyama, N., Sato, R., Wada, Y., Matsumura, Y., Goto, H., Okuda, E., Utsumi, S. (1999). Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5278–5284.
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253–S260.
- Mateos-aparicio, I., & Redondo-cuenca, A. (2010). Pea pod , broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1467–1470.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., & Villanueva-Suárez, M. J. (2010). Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from legume by-products: Okara (soymilk residue), pea pod and broad bean pod. *Food Chemistry*, 122(1), 339–345.
- Matsumoto H., & Take T. (1980). Studies on the utilization of tofukasu (okara). Selection of *Bacillus natto* strain. *Food Sci Technol. Abstr.*, 84-03-G0220.
- Matsuo, M. (1990). Effects of rice bran on properties of "okara tempe". *Biol. Abstr.*, 90, 98533.
- Mbaeyi-Nwaoha, I. E., & Uchendu, N. O. (2016). Production and evaluation of breakfast cereals from blends of acha and fermented soybean paste (okara). *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 50–70.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), 293–299.
- McClements, D. J. (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 305–313.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 439s-450s.

- Messina, M., HOS, & Alekel, D. L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones a review of the clinical trial and epidemiological data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6, 649-658.
- Miranda, C. G., Speranza, P., Kurozawa, L. E., & Sato, A. C. K. (2022). Lentil protein: Impact of different extraction methods on structural and functional properties. *Heliyon*, 8(11), e11775. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11775>
- Moore, S. and Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388.
- Moser, P. B., Reynolds, R. D., Acharya, S., Howard, M. P., Andon, M. B., & Lewis, S. A. (1988). Copper, iron, zinc, and selenium dietary intake and status of Nepalese lactating women and their breast-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47(4), 729-734.
- Mozaffarian, D., & Ludwig, D. S. (2010). Dietary guidelines in the 21st century—a time for food. *The Journal of the American Medical Association*, 304(6), 681-682.
- Mujoo, R., Trinh, D. T., & Ng, P. K. W. (2003). Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chemistry*, 82(2), 265-273.
- Munro, I. C., Harwood, M., Hlywka, J. J., Stephen, A. M., Doull, J., Flamm, W. G., & Adlercreutz, H. (2003). Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Reviews*, 61(1), 1- 33.
- Nair, K. S., & Short, K. R. (2005). Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *The Journal of Nutrition*, 135(6 Suppl), 1547S-1552S. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1547S>
- Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 676-683.

- Ng, A., Greenshields, R. N., & Waldron, K. W. (1997). Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydrate Research*, 303(4), 459-462.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food hydrocolloids*, 39, 301-318.
- Nolan, A. L. (1983). Tradition combines with technology. Flavored tofu. *Food Eng.*, 55, 45.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of food biochemistry*, 43(1), e12761.
- Ochoa-Rivas, A., & Nava-Valdez, Y. (2021). Sequential ultrasound and microwave application for peanut protein extraction. *Food Processing and Technology*, 15(2), 89-95.
- O'Dell, B. L. (1979). In *Soy Protein on Human Nutrition* (H. L. Wilcle, D. T. Hopkins, & D. H. Waggle, Eds., p. 187). Academic Press, New York.
- Ohno, A., Ano, T., & Shoda, M. (1995a). Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-stage fermentation. *Ferment Bioeng*, 80, 517-519.
- Ohno, A., Ano, T., & Shoda, M. (1995b). Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Biotechnol Bloeng*, 47, 209-214.
- O'sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food hydrocolloids*, 53, 141-154.
- O'Toole, D. K. (1999). Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 363-371.

- O'Toole, D. K. (2004). Soybean. In *Soy milk*, & O. C. Wrigley (Eds.), *Encyclopedia of grain science* (pp. 185–195). Cambridge: Elsevier Ltd.
- Pereira, M. A., Goldbourt, U., Liu, S., & Walter, C. (2004). Dietary Fiber and Risk of Coronary Heart Disease. *Archives of Internal Medicine*, 164, 370–376.
- Phanthumchinda, N., Thitiprasert, S., Tanasupawat, S., Assabumrungrat, S., & Thongchul, N. (2018). Process and cost modeling of lactic acid recovery from fermentation broths by membrane-based process. *Process Biochemistry*, 68, 205–213.
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). *Structure–function properties of food proteins*. San Diego, California: Academic Press.
- Piekarz, A. V., & Ward, W. E. (2007). Effect of neonatal exposure to genistein on bone metabolism in mice at adulthood. *Pediatric Research*, 61(1), 48.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control*, 31(2), 593–606.
- Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., & Erdman Jr, J. W. (1998). Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1375S–1379S.
- Poysa, V., & DeGrandis, S. (2002). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37(10), 1117–1123.
- Preece, K. E., Hooshyar, N., & Zuidam, N. J. (2017). Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 163–172.

- Procurement Resource. (2024). Soybean meal price trend and forecast. สืบค้นเมื่อ 19 มิถุนายน 2568 จาก <https://www.procurementresource.com/resource-center/soybean-meal-price-trends>
- Puechkamut, Y., & Panyathitipong, W. (2012). Characteristics of proteins from fresh and dried residues of soy milk production. *Agriculture and Natural Resources*, 46(5), 804-811.
- Quintero-Quiroz, J., Celis-Torres, A., Ciro-Gómez, G., Torres, J., Corrales-García, L., & Rojas, J. (2021). Physicochemical properties and functional characteristics of ultrasound-assisted legume-protein isolates: a comparative study. *Journal of Food Science and Technology*, 1-12.
- Quitain, A. T., Oro, K., Katoh, S., & Moriyoshi, T. (2006). Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. *Bioresource Technology*, 97(13), 1509–1514.
- Rao, P. S., Nolasco, E., Handa, A., Naldrett, M. J., Alvarez, S., & Majumder, K. (2020). Effect of pH and heat treatment on the antioxidant activity of egg white protein-derived peptides after simulated in-vitro gastrointestinal digestion. *Antioxidants*, 9(11), 1114.
- Ratnayani, K., Ratnayani, O., & Pane, I. A. (2022). Antioxidant Activity and Amino Acid Composition of Okara Protein Hydrolysate. *KnE Life Sciences*, 352-357.
- Razavizadeh, B. M., Vahabzadeh, F., & Bozorgi-Koshalshahi, M. (2023). Valorization and food applications of okara (soybean residue). PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10345676/>
- ReAnIn. (2024). Global Soy Milk and Cream Market Growth, Share, Size, Trends and Forecast. ReAnIn. Retrieved from <https://www.reanin.com/reports/global-soy-milk-and-cream-market>
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., & Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry*, 108(3), 1099–1105.

- Ren, L., Fan, J., Yang, Y., Xu, Y., Chen, F., Bian, X., ... & Zhang, N. (2021). Enzymatic hydrolysis of broken rice protein: Antioxidant activities by chemical and cellular antioxidant methods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 788078.
- Reynolds, K., Chin, A., Lees, K. A., Nguyen, A., Bujnowski, D., & He, J. (2006). A meta analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *The American Journal of Cardiology*, 98(5), 633–640.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Roche, J., & Royer, C. A. (2018). Lessons from pressure denaturation of proteins. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(147), 20180244.
- Rosset, M., Acquaro, V. R., & Beléia, A. D. P. (2014). Protein extraction from defatted soybean flour with V iscozyme L pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 784-790.
- Rotem, I., & Almog, N. (2006). Method for processing okara. *US Patent US 20060034977 A1*.
- Sandström, B., Almgren, A., Kivistö, B., & Cederblad, Å. (1989). Effect of protein level and protein source on zinc absorption in humans. *The Journal of Nutrition*, 119(1), 48–53.
- Santos, D. C. D., Oliveira Filho, J. G. D., Silva, J. D. S., Sousa, M. F. D., Vilela, M. D. S., Silva, M. A. P. D., & Egea, M. B. (2019). Okara flour: Its physicochemical, microscopical and functional properties. *Nutrition & Food Science*, 49(6), 1252–1264.
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., FIGUEIREDO, V. R. G. D., Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36, 375-381.

- Scheiber, M. D., Liu, J. H., Subbiah, M. T. R., Rebar, R. W., & Setchell, K. D. R. (2001). Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause*, 8(5), 384–392.
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 330–375.
- ScienceDaily. (2017). Retrieved from <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/05/170517143625.htm>.
- Sert, D., Rohm, H., & Struck, S. (2022). Ultrasound-assisted extraction of protein from pumpkin seed press cake: impact on protein yield and techno-functionality. *Foods*, 11(24), 4029.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Shakeel, A., Saeed, M., Khuram, H., Aslam, W., Naheed, N., Shoaib, M., ... Noor, A. (2015). Extraction of soya milk from different varieties of soya beans and comparative study for better nutrition with Buffalo milk. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, 3(4), 146–151.
- Shamsuddin, A. M. (1995). Inositol phosphates have novel anticancer function. *The Journal of Nutrition*, 125, 725S–732S.
- Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysate. *Food Chem*, 60(2), 263–271.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 14–28.

- Sonklin, C., Laohakunjit, N. and Kerchoechuen, O. (2011). Physicochemical and flavor characteristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8475-8483.
- Stanojevic, S. P., Barac, M. B., Pesic, M. B., & Vucelic-Radovic, B. V. (2012). Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9221-9228.
- Stanojevic, S. P.; Barac, M. B.; Pesic, M. B.; Zilic, S. M.; Kresovic, M. M.; Vucelic-Radovic, B. V. (2014). Mineral elements, lipoxygenase activity, and antioxidant capacity of okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. *J. Agric. Food Chem*, 62, 9017–23.
- Surel, O., & Couplet, B. (2005). Influence of the dehydration process on active compounds of okara during its fractionation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(December 2004), 1343–1349.
- Tang, J., Zhu, X., Dong, G., Hannon, S., Santos, H. M., Sun, D. W., & Tiwari, B. K. (2024). Comparative studies on enhancing pea protein extraction recovery rates and structural integrity using ultrasonic and hydrodynamic cavitation technologies. *LWT - Food Science and Technology*, 185, 115158.
- Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout. *Iranian journal of fisheries sciences*, 12(1), 154-169.
- Takahashi, T., Egashira, Y., Sanada, H., Ayano, Y., Maeda, H. and Terashima, M. (1992). Effects of soybean dietary fibre on growth rate, digestibility and gastrointestinal transit time in rats. *Food Sci Technol. Abstr*, 93-02-10141.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2020). Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. In *Water activity in foods: Fundamentals and applications* (pp. 323-355).

- Tawalbeh, D., Ahmad, W. A. N. W., & Sarbon, N. M. (2022). Effect of ultrasound pretreatment on the functional and bioactive properties of legumes protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Food Reviews International*, 39, 5423-5445.
- Tezuka, M., Yagasaki, K., & Ono, T. (2004). Changes in characters of soybean glycinin groups I, IIa, and IIb caused by heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1693-1699.
- Thanh, V. H., & Shibasaki, K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of beta-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 692-695.
- The Business Plus. (2023, August 23). เปิด 5 แบรินด์หลัก 'Plant Based Milk' ซิงมาร์เก็ตแซร์ปีนี้ 1.89 หมื่นล้านบาท. The Business Plus. Retrieved from <https://www.thebusinessplus.com/plant-based-milk/>
- Toldrà, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2020). Generation of bioactive peptides from food processing wastes. In F. Toldrà & L. M. L. Nollet (Eds.), *Food industry wastes* (pp. 583-605). CRC Press.
- Tong, X., Cao, J., Tian, T., Lyu, B., Miao, L., Lian, Z., ... & Jiang, L. (2022). Changes in structure, rheological property and antioxidant activity of soy protein isolate fibrils by ultrasound pretreatment and EGCG. *Food Hydrocolloids*, 122, 107084.
- Tran, H. C., Le, H. A. T., Le, T. T., & Phan, V. M. (2021). Effects of enzyme types and extraction conditions on protein recovery and antioxidant properties of hydrolysed proteins derived from defatted Lemna minor. *Applied Science and Engineering Progress*, 14(3), 360-369.
- Tridge. (2025). Thailand soybean meal market overview 2024. สืบค้นเมื่อ 19 มิถุนายน 2568 จาก <https://www.tridge.com/intelligences/soybean-meal/TH>
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 38(3), 255-261.

- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry*, 93(4), 713-718. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.038>
- Umego, E. C., He, R., Ren, W., Xu, H., & Ma, H. (2021). Ultrasonic-assisted enzymolysis: Principle and applications. *Process Biochemistry*, 100, 59-68.
- United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. (2025, June). Oilseeds: World markets and trade. <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>
- Utsumi, S., & Kinsella, J. E. (1985). Structure-function relationships in food proteins: Subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 297-303.
- Utsumi, S., Matsumura, Y., & Mori, T. (1997). Structure-function relationships of soy proteins. In *Food Science and Technology* (pp. 257-292). New York: Marcel Dekker.
- U.S. Soybean Export Council. (2024). Thailand market snapshot. สืบค้นเมื่อ 19 มิถุนายน 2568 จาก https://ussec.org/wp-content/uploads/2024/02/USSEC_Country_Market_Snapshot_2024_V2_Thailand.pdf
- Van den Berg, L. A., Mes, J. J., Mensink, M., & Wanders, A. J. (2022). Protein quality of soy and the effect of processing: A quantitative review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1004754.
- Van der Riet, W. B.; Wight, A. W.; Cilliers, J. J. L.; Datel, J. M. (1989). Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chem*, 34, 193-202.
- Van den Wouwer, B., Oliveira, J., Brijs, K., & Raes, K. (2025). Impact of combined enzyme and ultrasound treatments on protein extraction from potato trimmings and soybean okara. *Food Bioscience*, 63, 105691.

- Velasquez, M. T., & Bhathena, S. J. (2007). Role of dietary soy protein in obesity. *International Journal of Medical Sciences*, 4(2), 72.
- Villegas, R., Gao, Y.-T., Yang, G., Li, H.-L., Elasy, T. A., Zheng, W., & Shu, X. O. (2008). Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai Women's Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 162–167.
- Vinha, A. F., Moreira, J., & Barreira, S. V. (2013). Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Agricultural Science*, 5(12), 100.
- Vishwanathan, K. H., Govindaraju, K., Singh, V., & Subramanian, R. (2011). Production of Okara and Soy Protein Concentrates Using Membrane Technology. *Journal of Food Science*, 76(1), 158–164.
- Vishwanathan, K. H., Singh, V., & Subramanian, R. (2011). Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 240–246.
- Vojdani, F. (1996). Solubility. In George M Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st Ed., pp. 11–55). London: Blackie Academic & Professional.
- Wagner, J R, & Anon, M. C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *Journal of Food Science*, 55(3), 765–770.
- Wang, B., Atungulu, G. G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y., & Wu, B. (2015). Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ACE-inhibitory peptides from oat-isolated protein. *Food Biophysics*, 10, 244–252.
- Wang, T., Wang, N., Li, N., Ji, X., Zhang, H., Yu, D., & Wang, L. (2022). Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties, microstructure, and stability of soy protein isolate-pectin emulsion. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105871.

- Wang, Y., Li, B., Guo, Y., Liu, C., Liu, J., Tan, B., ... & Jiang, L. (2022). Effects of ultrasound on the structural and emulsifying properties and interfacial properties of oxidized soybean protein aggregates. *Ultrasonics sonochemistry*, 87, 106046.
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., & Zhou, L. (2014). Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *Journal of chemistry*, 2014(1), 475389.
- Watanabe, K., Kanoh, H., Yamanaka, S., Oklyama, A., & Kawanishi, T. (1997). Low calorie foodstuff, aqueous paste composition, as well as its production process thereof. *U.S. Patent US 5690981*.
- Weggemans, R. M., & Trautwein, E. A. (2003). Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: A meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(8), 940.
- Whitaker, J. R. (1994). The proteolytic enzyme. In *principles of enzymology for the food science* (pp. 469-498). New york: Marcel DeKker Inc.
- WHO. (2018). Available online:
[http://www.who.int/news-room/fact?sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact?sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), pp. 1.
- Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. In *Methods of testing protein functionality* (Vol. 1, pp. 110–152). London: Chapman and Hall.
- Xu, B., & Chang, S. K. C. (2012). Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*, 134(3), 1287–1296.
- Yamaguchi, F., Ota, Y., & Hatanaka, C. (1996). Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean okara and enzymatic analysis of their structures. *Carbohydrate Polymers*, 30(4), 265–273.
- Yamaguchi, S., & Ninomiya, K. (2000). Umami and food palatability. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 921S-926S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.921S>

- Yang, J. S., Dias, F. F., & de Moura Bell, J. M. (2025). Optimizing alkaline and enzymatic extraction of black bean proteins: a comparative study of kinetics, functionality, and nutritional properties. *Sustainable Food Technology*, 3(1), 188-203.
- YCharts. (2025). Soybean meal price (any origin). สืบค้นเมื่อ 19 มิถุนายน 2568 จาก https://ycharts.com/indicators/soybean_meal_price_any_origin
- Yokota, T., Hattori, T., Ohishi, H., Ohami, H., & Watanabe, K. (1996). Effect of oral administration of crude antioxidant preparation from fermented products of okara (bean curd residue) on experimentally induced inflammation. *Lebensm-Wiss Technol*, 29, 304-309.
- Zhan, S., & Ho, S. C. (2005). Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2), 397– 408.
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X. and Yao, H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Res. Tech.*, 229, 70-719.
- Zhang, Y., Pitkänen, L., Douglade, J., Tenkanen, M., Remond, C., & Joly, C. (2011). Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 852-859.
- Zheng, B., & Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of Cereal Science*, 79, 204–209.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>
- Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., & Li, S. (2009). Comparison of the efficiency of different methods for the extraction of wheat germ protein. *Food Technology and Biotechnology*, 47(3), 344-349.

Zhou, J., Yu, L., Mai, Z., & Blackburn, G. L. (2004). Combined inhibition of estrogen-dependent human breast carcinoma by soy and tea bioactive components in mice. *International Journal of Cancer*, 108(1), 8–14.



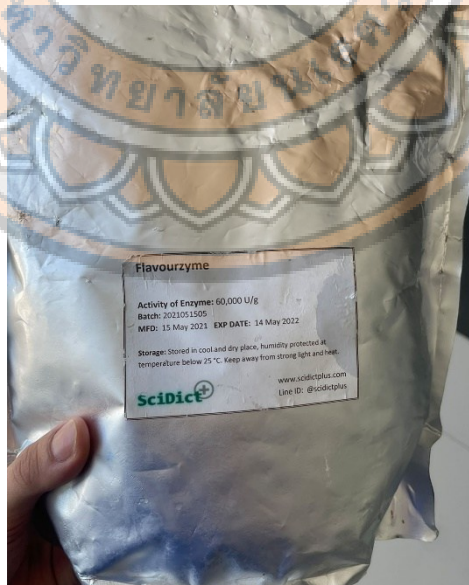


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก รูปภาพการทดลอง



ภาพ 51 เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช Pectinase, Xylanase, Cellulase และ Viscozyme
(ตามลำดับ)



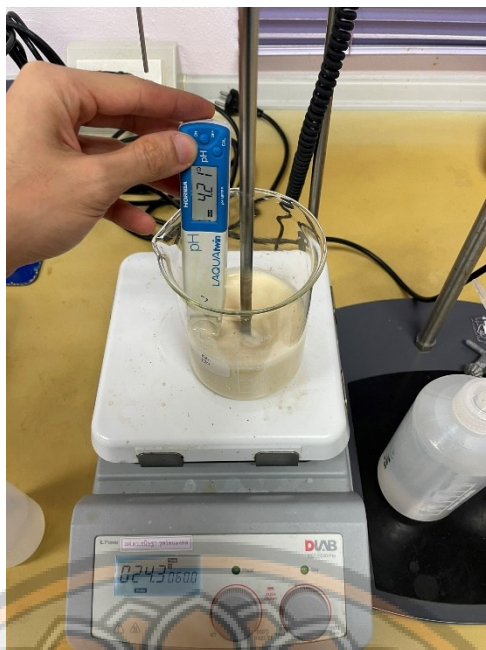
ภาพ 52 เอนไซม์โปรตีนเอส Flavourzyme



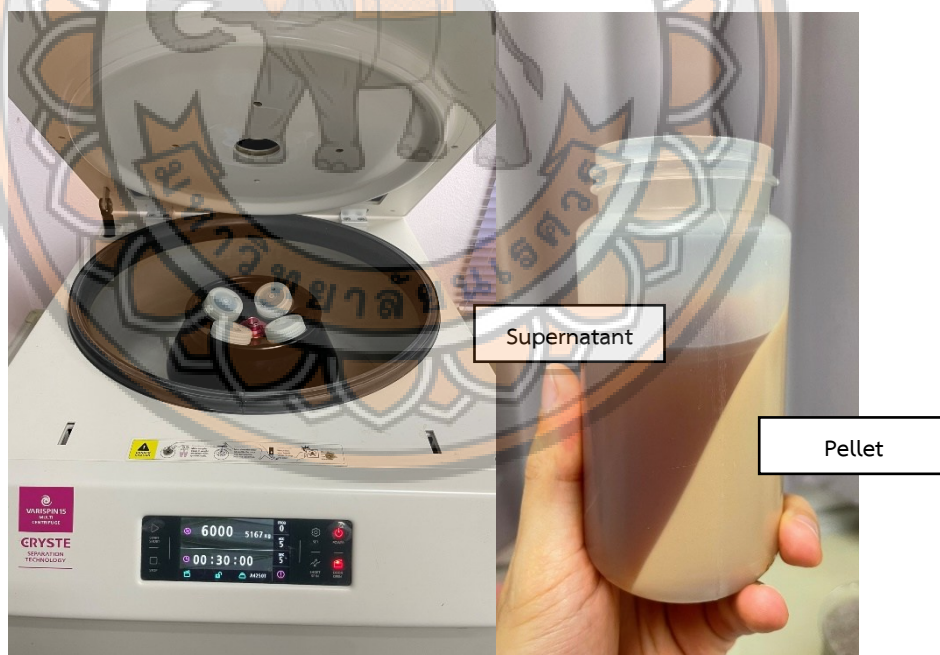
ภาพ 53 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest



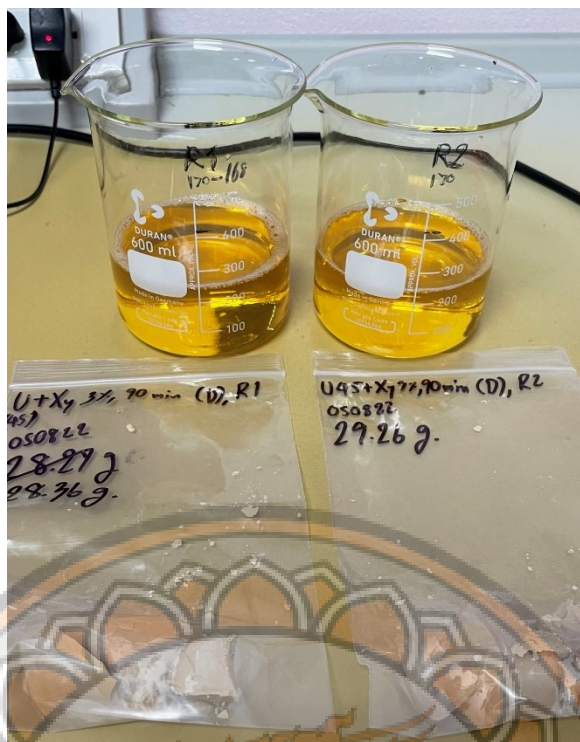
ภาพ 54 สภาวะการสกัดโปรตีนด้วย 2M NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C pH 11.5



ภาพ 55 สภาวะการตกตะกอนโปรตีนด้วย 2M HCl ที่ pH 4.2



ภาพ 56 ลักษณะของ Okara protein solution หลังการปั่นเหวี่ยง



ภาพ 59 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate ที่ผ่านกระบวนการฟัรริทเม้นท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช



ภาพ 60 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein concentrate ที่ผ่านการปรับสภาวะให้เป็นกลางที่ pH 7.0



ภาพ 61 ลักษณะของ Supernatant และ Pellet ของ Okara protein hydrolysate ที่ผ่าน
การพรีทรีทเมนต์ และไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate Analysis)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานดำเนินการตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) หรือวิธีที่ดัดแปลงตามความเหมาะสม ดังนี้

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture Content) (อ้างอิงตาม AOAC Official Method 934.01)

หลักการ: หาปริมาณความชื้นโดยการระเหยน้ำออกจากตัวอย่างด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปคิดเป็นปริมาณความชื้น

อุปกรณ์:

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นพร้อมฝาปิด
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ควบคุมอุณหภูมิได้
3. โถดูดความชื้น (Desiccator) พร้อมสารดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)

วิธีการวิเคราะห์:

1. อบภาชนะหาความชื้นพร้อมฝาเปิดในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 +/- 2 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง
2. นำภาชนะออกจากตู้อบ ปิดฝาทันที และวางให้เย็นในโถดูดความชื้น (ประมาณ 30 นาที) ชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมฝา บันทึกน้ำหนัก ทำซ้ำขั้นตอนนี้จนได้น้ำหนักคงที่ (ผลต่างไม่เกิน 0.001 กรัม)
3. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน, W_s) ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว ปิดฝา ชั่งน้ำหนักรวม บันทึกน้ำหนัก (W_1)
4. นำภาชนะพร้อมตัวอย่าง (เปิดฝาหรือแฉกฝาลึกน้อย) เข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 +/- 2 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่
5. นำภาชนะออกจากตู้อบ ปิดฝาทันที วางให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักรวม
6. อบซ้ำครั้งละประมาณ 1 ชั่วโมง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5 จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ผลต่างไม่เกิน 0.001 กรัม) บันทึกน้ำหนักสุดท้าย (W_2)
7. คำนวณหาปริมาณความชื้น (% Moisture) จากสูตร:

$$\% \text{ Moisture} = ((W_1 - W_2) / W_s) * 100$$
 เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของภาชนะพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (กรัม) W_2 คือ น้ำหนักของภาชนะพร้อมตัวอย่างหลังอบจนน้ำหนักคงที่ (กรัม) W_s คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม) ($W_s = W_1 - \text{น้ำหนักภาชนะ}$)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม (Crude Protein) (วิธี Kjeldahl อ้างอิงตาม AOAC Official Method 984.13)

หลักการ: ย่อยสลายสารอินทรีย์ในตัวอย่างด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นและตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อเปลี่ยนไนโตรเจนในโปรตีนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นกลั่นแอมโมเนียออกมาด้วยต่างแก๊ แล้วดักจับแอมโมเนียในสารละลายกรดบอริก และนำไปไตเตรทหาปริมาณด้วยสารละลายกรดมาตรฐาน คำนวณปริมาณไนโตรเจนและแปลงเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้แฟกเตอร์การแปลงค่า

อุปกรณ์:

1. ชุดเครื่องย่อยโปรตีน (Kjeldahl digestion unit) พร้อมระบบกำจัดไอน้ำกรด
2. ชุดเครื่องกลั่นโปรตีน (Kjeldahl distillation unit)
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 หรือ 250 มิลลิลิตร (mL)
4. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 mL
5. ปิเปตต์ (Pipette) ขนาด 5, 10 และ 25 mL
6. บิวเรตต์ (Burette) ขนาด 25 หรือ 50 mL ความละเอียด 0.05 mL
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. ลูกแก้วกันเดือด (Boiling chips)

สารเคมี:

1. ตัวเร่งปฏิกิริยาผสม (Kjeldahl catalyst mixture): ผสม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ กับ K_2SO_4 อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก หรือใช้เม็ด Catalyst สำเร็จรูป
2. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น (98%) เกรดวิเคราะห์
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 40% (w/v)
4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4% (w/v)
5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาตรฐาน เข้มข้น 0.1 N (ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน)
6. อินดิเคเตอร์ผสม (Mixed indicator): เช่น Tashiro's indicator หรือ ส่วนผสมของ Methyl red, Methylene blue, Bromocresol green ในเอทานอล อัตราส่วนเหมาะสม

วิธีการวิเคราะห์:

ขั้นตอนการย่อย (Digestion):

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1-2 กรัม (บันทึกน้ำหนัก Ws) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน Kjeldahl
2. เติมตัวเร่งปฏิกิริยาผสมประมาณ 5 กรัม และลูกแก้วกันเดือด 2-3 เม็ด
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 mL อย่างระมัดระวัง (ในตู้ดูดควัน)
4. นำหลอดย่อยใส่ในชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่เชื่อมต่อกับระบบกำจัดไอน้ำกรด

5. ให้ความร้อนตามโปรแกรมเครื่อง หรือ เริ่มที่ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพิ่มเป็น 400-420 องศาเซลเซียส ย่อยต่อจนสารละลายใส (ประมาณ 60-90 นาทีหลังสารละลายใส)
 6. ปิดเครื่องย่อย ปล่อยให้หลอดย่อยเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
- ขั้นตอนการกลั่น (Distillation) และการไทเตรท (Titration):
1. เตรียมขวดรูปชมพู่รองรับสารกลั่น ใส่สารละลายกรดบอริก 4% ปริมาตร 25 mL และหยดอินดิเคเตอร์ผสม 3-5 หยด
 2. ตั้งค่าเครื่องกลั่นโปรตีน เปิดน้ำหล่อเย็น เริ่มให้ความร้อนแหล่งกำเนิดไอน้ำ
 3. ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นประมาณ 20-50 mL ลงในหลอดย่อยที่เย็นแล้ว เพื่อเจือจาง
 4. ต่อหลอดย่อยเข้ากับเครื่องกลั่น วางขวดรูปชมพู่รองรับสารกลั่น ให้ปลายท่อควบแน่นจุ่มได้ระดับกรดบอริก
 5. เติมสารละลาย NaOH 40% ปริมาณ 50-70 mL (หรือจนสารละลายเป็นด่างแก่) ลงในหลอดย่อย
 6. เริ่มทำการกลั่นด้วยไอน้ำ เก็บสารกลั่นจนปริมาตรในขวดรูปชมพู่ได้ประมาณ 100-125 mL
 7. ลดระดับขวดรูปชมพู่ลง ล้างปลายท่อควบแน่นด้วยน้ำกลั่น แล้วหยุดการกลั่น
 8. นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไทเตรทด้วยสารละลาย HCl มาตรฐาน 0.1 N จนถึงจุดยุติ (สีเปลี่ยนจากเขียวเป็นชมพูม่วง/เทา) บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ (V_{sample})
 9. ทำการทดลองชุดควบคุม (Blank) โดยไม่ใส่ตัวอย่าง บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ (V_{blank})

การคำนวณ:

$$\% \text{ Nitrogen} = [(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}}) * \text{NHCl} * 14.007] / (W_s * 1000)] * 100 \% \text{ Crude}$$

$$\text{Protein} = \% \text{ Nitrogen} * F$$

เมื่อ V_{sample} คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเตรทตัวอย่าง (mL)

V_{blank} คือ ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเตรทชุดควบคุม (mL)

NHCl คือ ความเข้มข้น (Normality) ของสารละลาย HCl มาตรฐาน

(N) 14.007 คือ มวลอะตอมของไนโตรเจน

W_s คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)

F คือ แฟกเตอร์แปลงไนโตรเจนเป็นโปรตีน (ใช้ $F = 6.25$ สำหรับถั่วเหลือง)

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวม (Crude Fat) (วิธี Soxhlet Extraction อ้างอิงตาม AOAC Official Method 920.39)

หลักการ: สกัดไขมันออกจากตัวอย่างแห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (ปิโตรเลียมอีเทอร์ หรือ เฮกเซน) อย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องสกัด Soxhlet จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก และชั่งน้ำหนักไขมันที่เหลือ

อุปกรณ์:

1. ชุดเครื่องสกัด Soxhlet
2. กระบอกสกัด (Extraction thimble) หรือกระดาดกรอง
3. สำลีปราศจากไขมัน (Defatted cotton)
4. ตู้อบลมร้อน
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. โถดูดความชื้น
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือแผ่นให้ความร้อน
8. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)

สารเคมี:

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, boiling range 40-60 องศาเซลเซียส) หรือ เฮกเซน (n-Hexane) เกรดวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์:

1. อบขวดกันกลที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (Wflask) ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่
2. ชั่งตัวอย่างแห้งประมาณ 3-5 กรัม (Ws) ห่อด้วยกระดาดกรอง หรือใส่ในกระบอกสกัด อุดด้านบนด้วยสำลี
3. นำกระบอกสกัดใส่ในตัวสกัด Soxhlet
4. เติมตัวทำละลายลงในขวดกันกลประมาณ 2/3 ของปริมาตรขวด หรือให้พอท่วมตัวอย่างในกระบอกสกัดเมื่อเกิดกาลักน้ำ
5. ประกอบชุดเครื่องสกัด Soxhlet วางบนแหล่งให้ความร้อน เปิดน้ำหล่อเย็น
6. ให้ความร้อนเพื่อกวนตัวทำละลาย อัตราการเกิดกาลักน้ำประมาณ 4-6 รอบต่อชั่วโมง สกัดเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง หรือจนกว่าการสกัดจะสมบูรณ์
7. หยุดให้ความร้อน ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลกลับลงขวดกันกลจนหมด นำกระบอกสกัดออก
8. ระเหยตัวทำละลายออกจากขวดกันกลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ หรือบนอ่างน้ำในตู้ดูดควัน

9. นำขวดก้นกลมพร้อมไขมันไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
10. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (Wflask+fat)
11. อบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนน้ำหนักคงที่ (ผลต่างไม่เกิน 0.001 กรัม)
12. คำนวณหาปริมาณไขมัน (% Crude Fat) จากสูตร:

$\% \text{ Crude Fat} = ((W_{\text{flask+fat}} - W_{\text{flask}}) / W_s) * 100$ เมื่อ

$W_{\text{flask+fat}}$ คือ น้ำหนักขวดพร้อมไขมันหลังอบ (กรัม)

W_{flask} คือ น้ำหนักขวดเปล่า (กรัม)

W_s คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) (อ้างอิงตาม AOAC Official Method 942.05)

หลักการ: เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิสูง (550 องศาเซลเซียส) เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ทั้งหมด เหลือ

เฉพาะแร่ธาตุในรูปออกไซด์ (เถ้า)

อุปกรณ์:

1. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Porcelain crucible)
2. เตาเผา (Muffle furnace) ควบคุมอุณหภูมิได้
3. แผ่นให้ความร้อน หรือตะเกียงเบนเสน (สำหรับ pre-ashing)
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. คีมคีบถ้วยกระเบื้อง

วิธีการวิเคราะห์:

1. เผาถ้วยกระเบื้องเปล่าในเตาเผาที่ 550 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่
2. นำถ้วยออกจากเตาเผา วางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (W_1) ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่
3. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-3 กรัม (W_s) ใส่ในถ้วยกระเบื้อง
4. นำถ้วยพร้อมตัวอย่างไปเผาไล่ควันเบื้องต้นบนแผ่นให้ความร้อน หรือตะเกียงเบนเสนจนหมดควัน (Pre-ashing) (ในตู้ดูดควัน)
5. นำถ้วยเข้าเตาเผา ค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิถึง 550 องศาเซลเซียส เผาค้างไว้ 3-4 ชั่วโมง หรือจนเถ้าเป็นสีขาว/เทาอ่อน
6. ปิดเตาเผา รอให้อุณหภูมิลดลง นำถ้วยออก วางให้เย็นในโถดูดความชื้น
7. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้า (W_2)

8. นำกลับไปเผาซ้ำที่ 550 องศาเซลเซียส ครั้งละ 1 ชั่วโมง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 6 และ 7 จนน้ำหนักคงที่ (ผลต่างไม่เกิน 0.001 กรัม)
9. คำนวณหาปริมาณเถ้า (% Ash) จากสูตร:

$$\% \text{ Ash} = ((W2 - W1) / Ws) * 100$$
 เมื่อ W2 คือ น้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้าหลังเผา (กรัม)
 W1 คือ น้ำหนักถ้วยเปล่า (กรัม)
 Ws คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยหยาบ (Crude Fiber) (วิธี Acid-Alkali Digestion อ้างอิงตาม AOAC Official Method 962.09)

หลักการ: ย่อยสลายตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยสารละลายกรดและด่างเจือจางตามลำดับ เพื่อกำจัดโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ เหลือส่วนที่ไม่ละลายคือเยื่อใยหยาบ นำส่วนนี้ไปอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก แล้วเผา น้ำหนักที่หายไปหลังการเผาคือปริมาณเยื่อใยหยาบ

อุปกรณ์:

1. ชุดอุปกรณ์หาปริมาณเยื่อใยหยาบ หรือ ปีกเกอร์ทนความร้อน 600 mL พร้อมแผ่นให้ความร้อนและชุดควบแน่น
2. กระดาษกรอง Whatman No. 41 หรือเทียบเท่า หรือ ถ้วยกรอง (Filter crucible)
3. กรวยกรอง Buchner และขวดกรอง
4. บีกส์สุญญากาศ
5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรณีใช้กระดาษกรอง)
6. ตู้อบลมร้อน
7. เตาเผา (Muffle furnace)
8. โถดูดความชื้น
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี:

1. สารละลายกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) 1.25% (w/v) (0.255 N)
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.25% (w/v) (0.313 N)
3. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethanol) 95% (v/v)

วิธีการวิเคราะห์:

1. เตรียมกระดาษกรอง/ถ้วยกรองโดยอบ/เผา ทำให้เย็น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้ว (Defatted sample) ประมาณ 1-2 กรัม (Ws) ใส่ในภาชนะย่อย
3. เติมสารละลาย H₂SO₄ 1.25% ที่ร้อน/เดือด 200 mL
4. ต้มภายใต้เครื่องควบแน่น (Reflux) นาน 30 นาทีพอดี
5. กรองขณะร้อน ล้างกากด้วยน้ำร้อนจนเป็นกลาง
6. ถ่ายกากกลับลงภาชนะเดิม เติมสารละลาย NaOH 1.25% ที่ร้อน/เดือด 200 mL
7. ต้มภายใต้เครื่องควบแน่น (Reflux) นาน 30 นาทีพอดี
8. กรองขณะร้อน ล้างกากด้วยน้ำร้อนจนเป็นกลาง
9. ล้างกากด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 15-20 mL
10. นำกากพร้อมกระดาษกรอง/ถ้วยกรอง ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่
11. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W_{fiber+ash})
12. นำไปเผาในเตาเผาที่ 550 องศาเซลเซียส จนเถ้าเป็นสีขาว
13. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเถ้า (W_{wash})
14. คำนวณหาปริมาณเยื่อใยหยาบ (% Crude Fiber) จากสูตร:

$$\% \text{ Crude Fiber} = ((W_{\text{fiber+ash}} - W_{\text{wash}}) / W_s) * 100$$
 เมื่อ W_{fiber+ash} คือ น้ำหนักกากเยื่อใยพร้อมเถ้าหลังอบแห้ง (กรัม)
 W_{wash} คือ น้ำหนักเถ้าหลังเผา (กรัม)
 W_s คือ น้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่าง (กรัม)

1.6 การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ (Nitrogen-Free Extract - NFE)

คำนวณโดยการหักเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบอื่นๆ (บนฐานน้ำหนักเดียวกัน) ออกจาก 100:

$$\% \text{ NFE} = 100 - (\% \text{ Moisture} + \% \text{ Crude Protein} + \% \text{ Crude Fat} + \% \text{ Ash} + \% \text{ Crude Fiber})$$

2. การวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)

2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) (ดัดแปลงจาก Brand-Williams et al., 1995)

หลักการ: วัดความสามารถของสารสกัดในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ DPPH สีม่วง ให้เป็นสารสีเหลือง วัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) หรือ Microplate reader
2. คิวเวทท์ หรือ Microplate (96-well)

3. ขวดวัดปริมาตร
4. ไมโครปิเปตต์
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

สารเคมี:

1. สารละลาย DPPH ประมาณ 0.1 mM ในเมทานอล/เอทานอล (เตรียมสด เก็บในที่มืด)
2. เมทานอล หรือ เอทานอล เกรดวิเคราะห์
3. สารมาตรฐาน (เช่น Trolox, Ascorbic acid)

วิธีการวิเคราะห์:

เป็นการดัดแปลงวิธีการจาก Brand-Williams et al. (1995) ซึ่งเดิมเป็นการศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยา (Kinetic study) มาเป็นการวัดผลที่เวลาที่กำหนด (Endpoint assay) เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 มิลลิโมลาร์ (ข้อดัดแปลงที่ 1) และปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.8 – 1.0 เพื่อเป็นสถานะเริ่มต้นมาตรฐานสำหรับการทดลอง ซึ่งเป็นการปรับจากวิธีดั้งเดิมที่ใช้ความเข้มข้นจำเพาะที่ 6×10^{-5} โมลาร์
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. เตรียมชุดควบคุม (Control) โดยใช้ตัวทำละลายแทนตัวอย่าง
4. ผสมสารละลายตัวอย่าง (หรือชุดควบคุม) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 750 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) (ข้อดัดแปลงที่ 2) ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ปรับเพื่อให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ในคิวเวทท์หรือไมโครเพลท แตกต่างจากวิธีดั้งเดิมที่ใช้สัดส่วนตัวอย่างต่อรีเอเจนต์ที่สูงกว่ามาก (1:39)
5. ผสมให้เข้ากันทันที และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที (ข้อดัดแปลงที่ 3) โดยเป็นการกำหนดเวลาที่แน่นอนสำหรับการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแตกต่างจากวิธีดั้งเดิมที่ต้องวัดค่าอย่างต่อเนื่องจนกว่าปฏิกิริยาจะเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) ซึ่งอาจใช้เวลามากกว่าหนึ่งชั่วโมง
6. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) จากสูตร:

$$\% \text{ Inhibition} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}) * 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

8. สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับ % Inhibition เพื่อหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50%) รายงานผลเป็น mg/mL หรือ microgram/mL

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กด้วยวิธี FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power assay) (ตามวิธี Benzie & Strain, 1996)

หลักการ: วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ Fe(III)-TPTZ complex ให้เป็น Fe(II)-TPTZ complex สีน้ำเงินเข้ม วัดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือ Microplate reader
2. คิวเวทท์ หรือ Microplate
3. ขวดวัดปริมาตร
4. ไมโครปิเปตต์
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สารเคมี:

1. Acetate buffer 300 mM, pH 3.6
2. สารละลาย TPTZ 10 mM ใน HCl 40 mM
3. สารละลาย FeCl₃·6H₂O 20 mM
4. FRAP reagent (เตรียมสด): ผสม Acetate buffer : TPTZ : FeCl₃ ในอัตราส่วน 10:1:1
อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนใช้
5. สารมาตรฐาน Trolox หรือ FeSO₄·7H₂O

วิธีการวิเคราะห์:

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสกัด
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. ปิเปตตัวอย่าง (หรือสารมาตรฐาน/Blank) 200 ไมโครลิตร (ตาม text) ลงในหลุมไมโครเพลท/คิวเวทท์
4. เติม FRAP reagent ที่อุ่นไว้ 1000 ไมโครลิตร (ตาม text) ผสมให้เข้ากัน
5. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 4-30 นาที (ระบุเวลาที่ใช้)
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm
7. สร้างกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น vs Abs₅₉₃)
8. คำนวณค่า FRAP ของตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานผลเป็น micromol TE/g หรือ micromol Fe(II)/g

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับไอออนเหล็ก (Fe^{2+} Chelating Activity) (ดัดแปลงจาก Dinis et al., 1994)

หลักการ: เป็นการวัดความสามารถของสารตัวอย่างในการเข้าไปแย่งจับ (Chelate) กับไอออนของเหล็กในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) แข่งกับสารชี้วัดสีคือ Ferrozine หากสารตัวอย่างมีความสามารถในการจับกับไอออนเหล็กสูง จะทำให้ Ferrozine ไม่สามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดงกับ Fe^{2+} ได้เต็มที่ ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายลดลง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือ Microplate reader
2. คิวเวทท์ หรือ Microplate
3. ขวดวัดปริมาตร
4. ไมโครปิเปตต์

สารเคมี:

1. สารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM
2. สารละลาย Ferrozine 5 mM
3. สารมาตรฐาน EDTA

วิธีการวิเคราะห์:

เป็นการดัดแปลงวิธีการจาก Dinis et al. (1994) เพื่อให้เหมาะสมกับสารเคมีที่มีในห้องปฏิบัติการ และปรับปรุงวิธีการรายงานผลให้เป็นมาตรฐานเชิงปริมาณ โดยมีขั้นตอนดังนี้:

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. เตรียมชุดควบคุม (Control) โดยใช้ตัวทำละลายแทนตัวอย่าง
3. เติมสารละลาย Ferrous sulfate (FeSO_4) 2 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ข้อดัดแปลงที่ 1 และ 2) โดยเป็นการเปลี่ยนแหล่งของไอออนเหล็กจาก Ferrous chloride (FeCl_2) และปรับเพิ่มปริมาตรของรีเอเจนต์จากวิธีดั้งเดิม (ซึ่งใช้ FeCl_2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) จากนั้นผสมให้เข้ากัน
4. เติมสารละลาย Ferrozine 5 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ซึ่งเป็นการปรับเพิ่มปริมาตรจากวิธีดั้งเดิมที่ใช้ 40 ไมโครลิตร) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการเกิดสี ผสมให้เข้ากันทันที
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 นาที
6. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับเหล็ก (% Chelating Activity):

$$\% \text{ Chelating Activity} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}) * 100$$

เมื่อ Acontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

8. รายงานผลเป็นค่า IC50 หรือ mg EDTA equivalent/g

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content - TPC) (วิธี Folin-Ciocalteu, อ้างอิงตาม Gong et al., 2012)

หลักการ: สารประกอบฟีนอลิกรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ในสภาวะต่าง เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760-765 nm เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือ Microplate reader
2. คิวเวทท์ หรือ Microplate
3. ขวดวัดปริมาตร
4. ไมโครปิเปตต์

สารเคมี:

1. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้)
2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 7.5% (w/v) หรือ NaOH 0.35 M (ตาม text)
3. สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

วิธีการวิเคราะห์:

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสกัด
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (เช่น 0-500 mg/L)
3. ปิเปตตัวอย่าง (หรือสารมาตรฐาน/Blank) 50 ไมโครลิตร (ตาม text)
4. เติม Folin-Ciocalteu reagent เจือจาง 50 ไมโครลิตร (ตาม text) ผสม ตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที
5. เติมสารละลาย Na_2CO_3 7.5% หรือ NaOH 0.35 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ตาม text) ผสมให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที (Text ระบุ 3 นาที ซึ่งอาจไม่เพียงพอ)
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760-765 nm
8. สร้างกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น Gallic acid vs Abs)
9. คำนวณปริมาณ TPC ในตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานผลเป็น mg GAE/g dry weight

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content - TFC) (วิธี Aluminum chloride colorimetric, ดัดแปลงจาก Pourmorad et al., 2006)

หลักการ: ฟลาโวนอยด์เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองกับ $AlCl_3$ ในสารละลายเมทานอล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm เทียบกับสารมาตรฐานเคอควิซีน

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือ Microplate reader
2. คิวเวทท์ หรือ Microplate
3. ขวดวัดปริมาตร
4. ไมโครปิเปตต์

สารเคมี:

1. สารละลาย Aluminum chloride ($AlCl_3$) 10% (w/v) ในเมทานอล
2. สารละลาย Potassium acetate (CH_3COOK) 1 M
3. เมทานอล เกรดวิเคราะห์
4. สารมาตรฐานเคอควิซีน (Quercetin)

วิธีการวิเคราะห์:

เป็นการประยุกต์ใช้วิธีการของ Pourmorad et al. (2006) กับตัวอย่างโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลส (ข้อดัดแปลงที่ 1) ซึ่งอาจมีสารประกอบรบกวนที่แตกต่างจากสารสกัดจากพืชสมุนไพรในงานวิจัยต้นฉบับ โดยมีขั้นตอนดังนี้:

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสกัดในเมทานอล
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอควิซีน (เช่น 0-100 mg/L)
3. ปิเปตตัวอย่าง (หรือสารมาตรฐาน/Blank) 0.3 mL
4. เติมนเมทานอลปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร (ข้อดัดแปลงที่ 2) โดยเป็นการปรับปริมาตรของตัวอย่างและตัวทำละลายจากวิธีดั้งเดิม (ซึ่งใช้ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร และเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร) เพื่อให้เหมาะสมกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์
5. เติมสารละลาย $AlCl_3$ 10% ปริมาตร 0.1 mL
6. เติมสารละลาย CH_3COOK 1 M ปริมาตร 0.1 mL
7. เติมน้ำกลั่น 2.8 mL ผสมให้เข้ากัน
8. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm
10. สร้างกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น Quercetin vs Abs415)

11. คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน และรายงานผลเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของเคออสตินต่อกรัมของน้ำหนักรากแห้ง (mg QE/g dry weight) (ข้อดัดแปลงที่ 3) ซึ่งเป็นการกำหนดรูปแบบการรายงานผลเชิงปริมาณที่ชัดเจนและเป็นมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างตัวอย่างต่างๆ

3. การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ (Functional Properties)

3.1 ดัชนีการละลายน้ำ (Water Solubility Index - WSI) และ ดัชนีการดูดซับน้ำ (Water Absorption Index - WAI) (อ้างอิงตาม Anderson et al., 1969)

หลักการ: WSI วัดสัดส่วนของแข็งที่ละลายน้ำได้ ส่วน WAI วัดความสามารถในการดูดซับน้ำ เกิดเป็นเจล/ตะกอน

อุปกรณ์:

1. หลอดหมุนเหวี่ยง 50 mL พร้อมฝา (ทราบน้ำหนักแน่นอน)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่อง Vortex mixer หรือแท่งแก้วคน
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
5. ภาชนะอะลูมิเนียม (ทราบน้ำหนักแน่นอน)
6. ตู้อบลมร้อน
7. โถดูดความชื้น

วิธีการวิเคราะห์:

1. ชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม (Ws) ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยง (ทราบน้ำหนัก Wtube)
2. เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิห้อง 30 mL
3. ผสมให้เข้ากันอย่างต่อเนื่อง 30 นาที
4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2200-3000 rpm นาน 15 นาที
5. WSI: รินส่วนใสลงในภาชนะอะลูมิเนียม (ทราบน้ำหนัก Wdish) อบที่ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก (Wdish+solid)
6. WAI: เทส่วนใสทั้ง ชั่งน้ำหนักหลอดพร้อมตะกอน (Wtube+pellet)
7. คำนวณ:

$$WSI (\%) = ((W_{dish+solid} - W_{dish}) / W_s) * 100 \quad WAI (g/g) = (W_{tube+pellet} - W_{tube}) / W_s$$

3.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying Activity Index - EAI) และ เสถียรภาพของอิมัลชัน (Emulsion Stability Index - ESI) (ดัดแปลงจาก Pearce & Kinsella, 1978)

หลักการ: EAI วัดประสิทธิภาพการสร้างพื้นที่ผิวระหว่างเฟส คำนวณจากความขุ่นทันทีหลัง ผสม ESI วัดความเสถียรโดยวัดการเปลี่ยนแปลงความขุ่นเมื่อเวลาผ่านไป

อุปกรณ์:

1. เครื่องผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer) ความเร็วสูง (เช่น 20,000 rpm)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
3. คิวเวทท์
4. ไมโครปิเปตต์
5. เครื่อง Vortex mixer
6. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมี:

1. น้ำมันพืช
2. สารละลายโปรตีนตัวอย่างในบัฟเฟอร์ (ระบุชนิด/pH) ที่ความเข้มข้น C (g/m³ หรือ mg/mL)
3. สารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1% (w/v)

วิธีการวิเคราะห์:

1. ผสมสารละลายโปรตีน 6 มิลลิกรัม กับน้ำมันพืช 2 มิลลิกรัม ในภาชนะที่เหมาะสม (ข้อดัดแปลงที่ 1) โดยเป็นการปรับปริมาตรรวมให้เหมาะสมกับเครื่องมือ แต่ยังคงรักษาสัดส่วนของวัฏภาคน้ำมัน (oil volume fraction, ϕ) ไว้ที่ 0.25 เช่นเดียวกับวิธีดั้งเดิม
2. นำส่วนผสมไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
3. ณ เวลาเริ่มต้น ($t = 0$ นาที) ดูดตัวอย่างอิมัลชันที่เกิดขึ้นทันทีปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเจือจางในสารละลาย SDS 0.1% ปริมาตร 5 มิลลิตร (ข้อดัดแปลงที่ 2) ซึ่งเป็นการปรับอัตราส่วนการเจือจาง (Dilution Factor, DF) เป็น 1:101 เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสง (A_{10}) ที่วัดได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมของเครื่องมือ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที
4. ตั้งทิ้งอิมัลชันที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ ณ เวลา 10 นาที ($t = 10$ นาที) ทำการดูดตัวอย่างและเจือจางซ้ำตามขั้นตอนที่ 3 เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (A_{10})

5. คำนวณ:

Turbidity (T) = $(2.303 * A_0) / L$ (L คือ path length, m) EAI (m²/g) = $(2 * T * DF) / (\phi * C)$ (ϕ คือ oil volume fraction = 0.25, C คือ Protein conc., g/m³) ESI (min) = $(A_0 / (A_0 - A_{10})) * 10$ ($\Delta t = 10$ min)

3.3 ความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming Capacity - FC) และความเสถียรของโฟม (Foam Stability - FS) (ดัดแปลงจาก Sze-Tao and Sathe, 2000)

หลักการ: FC วัดปริมาณโฟมที่เพิ่มขึ้นหลังการตี FS วัดการคงปริมาณโฟมเมื่อเวลาผ่านไป

อุปกรณ์:

1. เครื่องผสมอาหารพร้อมหัวตี
2. กระบอกตวง
3. นาฬิกาจับเวลา
4. (สำหรับ FS แบบใน text) กรวยกรองพลาสติก

วิธีการวิเคราะห์:

- FC:
 1. เตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนความเข้มข้น 2% (w/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บันทึกปริมาตรเริ่มต้น (V_{initial}) (ข้อดัดแปลงที่ 1) ซึ่งเป็นการปรับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนจากวิธีดั้งเดิมที่ใช้ความเข้มข้น 3%
 2. นำสารละลายไปตีด้วยเครื่องผสมอาหารโดยใช้ความเร็วระดับ 6 เป็นเวลา 3 นาที (ข้อดัดแปลงที่ 2) โดยเป็นการปรับลดระดับความเร็วและระยะเวลาในการตีจากวิธีดั้งเดิม (ซึ่งใช้ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที) เพื่อประเมินคุณสมบัติในสภาวะที่ใกล้เคียงกับการใช้งานจริงมากขึ้น
 3. เทลงกระบอกตวงทันที อ่านปริมาตรรวม (V_{foam})
 4. $FC (\%) = ((V_{foam} - V_{initial}) / V_{initial}) * 100$
- FS (แบบวัดปริมาณโฟมคงเหลือ):
 1. หลังจากวัด V_{foam} ที่ t=0 แล้ว ตั้งทิ้งไว้
 2. อ่านปริมาณโฟมที่เหลือ (V_{foam,t}) ณ เวลา t ต่างๆ (เช่น 15, 30, 60 นาที)
 3. $FS (\%) \text{ at time } t = (V_{foam,t} / V_{foam,0}) * 100$ (V_{foam,0} คือ ปริมาตรโฟมเริ่มต้น = V_{foam} - V_{initial})

3.4 การวัดค่าสี (Color Measurement) (ระบบ CIE Lab*)

หลักการ: ใช้เครื่องวัดสีวัดค่าการสะท้อนแสงและแสดงผลเป็นค่า L^* , a^* , b^*

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดสี (Colorimeter/Chroma meter) เช่น รุ่น CR-400
2. แผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาว

วิธีการวิเคราะห์:

1. ปรับเทียบเครื่องวัดสีด้วยแผ่นมาตรฐาน
2. เตรียมตัวอย่างให้มีผิวหน้าเรียบ
3. วางหัววัดสัมผัสผิวหน้าตัวอย่าง กดวัดค่า
4. บันทึกค่า L^* , a^* , b^* (วัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง/ตำแหน่ง)
5. (ถ้าต้องการ) คำนวณ

Whiteness Index (WI): $WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2}$

3.5 การวัดระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis - %DH) (วิธี TNBS อ้างอิงตาม Nielsen et al., 2001)

หลักการ: วัดปริมาณหมู่เอมีโนอิสระที่เพิ่มขึ้นจากการตัดพันธะเปปไทด์ โดยทำปฏิกิริยากับ TNBS เกิดสารสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm เทียบกับหมู่เอมีโนทั้งหมด

อุปกรณ์:

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. คิวเวท หรือ Microplate
3. ไมโครปิเปตต์
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
5. หลอด/ขวดทนความร้อนพร้อมฝาปิด (สำหรับ Total hydrolysis)
6. ตู้อบ/Heating block 110 องศาเซลเซียส (สำหรับ Total hydrolysis)

สารเคมี:

1. Sodium phosphate buffer 0.2125 M, pH 8.2
2. สารละลาย TNBS 0.1% (w/v) (เตรียมสด/เก็บในที่มืดและเย็น)
3. สารละลาย Sodium sulfite (Na_2SO_3) 0.1 M
4. HCl 6 N
5. NaOH สำหรับปรับ pH
6. สารมาตรฐาน L-Leucine

วิธีการวิเคราะห์:

1. เตรียมตัวอย่าง: เจือจางไฮโดรไลเสท (เวลา t) และโปรตีนตั้งต้น (เวลา 0) ด้วย Phosphate buffer pH 8.2
2. วัดหมู่อะมิโนอิสระ (At และ A0):
 - ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 125 ไมโครลิตร
 - เติม Phosphate buffer 1.0 mL
 - เติม TNBS 0.1% 1.0 mL ผสม
 - บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 60 นาที ในที่มืด
 - หยุดปฏิกิริยาด้วย Na2SO3 0.1 M 2.0 mL ผสม
 - ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที วัด Abs ที่ 420 nm (ได้ค่า At หรือ A0)
3. วัดหมู่อะมิโนทั้งหมด (Amax):
 - ไฮโดรไลซ์โปรตีนตั้งต้นด้วย HCl 6 N ที่ 110 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
 - ทำให้เป็นกลาง (pH 8.2) ปรับปริมาตร
 - นำไปทำปฏิกิริยากับ TNBS และวัด Abs420 ตามข้อ 2 (ได้ค่า Amax)
4. สร้างกราฟมาตรฐาน Leucine (แนะนำ): เตรียม Leucine ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ TNBS วัด Abs420 สร้างกราฟ (Leucine conc. vs Abs420)
5. คำนวณ %DH:
 - วิธี 1 (จาก Text): $\%DH = ((At - A0) / (Amax - A0)) * 100$
 - วิธี 2 (ใช้ Leucine standard): แปลงค่า A เป็น Leucine equivalent (ht, h0, httotal) แล้วคำนวณ $\%DH = ((ht - h0) / (httotal - h0)) * 100$

4. การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological Analysis) (ตามวิธี FDA BAM, 2001 หรือเทียบเท่า)

4.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count - TPC) (วิธี Pour Plate)

หลักการ: นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียแอโรบิกที่เจริญบน Plate Count Agar (PCA) หลังบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส

วัสดุและอุปกรณ์:

1. ถัง Stomacher หรือ ขวดผสมปลอดเชื้อ
2. เครื่อง Stomacher หรือ เครื่องเขย่า
3. สารละลายเจือจางปลอดเชื้อ (เช่น BPW 0.1%)

4. ปิเปตต์ปลอดเชื้อ
5. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ปลอดเชื้อ
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)
7. ตู้บ่มเชื้อ 35 +/- 1 องศาเซลเซียส
8. เครื่องนับโคโลนี

วิธีการวิเคราะห์:

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมน้ำละลายเจือจาง 225 mL (เจือจาง 10^{-1}) ผสมให้เข้ากัน
2. ทำการเจือจางแบบอนุกรม (Serial dilution) 1:10 จนได้ระดับที่เหมาะสม
3. ปิเปตตัวอย่าง 1 mL จากแต่ละระดับความเจือจาง ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (ทำซ้ำ 2-3 จาน/ระดับ)
4. เทอาหาร PCA ที่หลอมเหลว (45-50 องศาเซลเซียส) ประมาณ 15-20 mL ลงในแต่ละจาน
5. หมุนจานเบาๆ ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้แข็งตัว
6. คำนวณ บ่มที่ 35 +/- 1 องศาเซลเซียส 48 +/- 3 ชั่วโมง
7. เลือกจานที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนีเพื่อนับ
8. คำนวณและรายงานผลเป็น CFU/g หรือ log CFU/g

4.2 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (Yeast and Mold Count) (วิธี Surface Plate)

หลักการ: นับจำนวนโคโลนียีสต์และราที่เจริญบนอาหารจำเพาะ (เช่น PDA หรือ DRBC) หลังบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส

วัสดุและอุปกรณ์: (เหมือน TPC ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิบ่ม และเพิ่มแท่งเกลี่ย)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ DRBC (อาจเติมน้ำยับยั้งแบคทีเรีย)
- ตู้บ่มเชื้อ 25 +/- 1 องศาเซลเซียส
- แท่งแก้วรูปตัวแอลปลอดเชื้อ (Spreader)

วิธีการวิเคราะห์:

1. เตรียมตัวอย่างและเจือจางแบบอนุกรมเหมือน TPC
2. ปิเปตตัวอย่าง 0.1 mL จากแต่ละระดับความเจือจาง หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้ง
3. ใช้แท่งแก้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้า
4. วางจานทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งเล็กน้อย
5. ปิดฝา (ไม่ต้องคว่ำจาน) บ่มที่ 25 +/- 1 องศาเซลเซียส 5-7 วัน
6. เลือกจานที่มีจำนวนโคโลนี 15-150 โคโลนีเพื่อนับ (อาจแยกนับยีสต์และรา)

7. คำนวณและรายงานผลเป็น CFU/g หรือ log CFU/g

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน (Amino Acid Profile) (ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, อ้างอิงตาม Alireza Naseri et al., 2020)

หลักการ: วิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนหลังจากไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยกรดแก่ แล้วแยกและตรวจวัดด้วย LC-MS/MS

อุปกรณ์:

1. เครื่อง LC-MS/MS พร้อมระบบที่เกี่ยวข้อง
2. คอลัมน์แยกกรดอะมิโน (เช่น C18)
3. หลอดแก้วทนความร้อนสำหรับไฮโดรไลซิส
4. ตู้อบ/Heating block 110 องศาเซลเซียส
5. เครื่องระเหยสุญญากาศ/Freeze dryer
6. เครื่องกรองเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. ไมโครปิเปตต์

สารเคมี:

1. HCl 6 N (ปราศจากโลหะหนัก)
2. สารมาตรฐานกรดอะมิโนผสม
3. Internal standard (ถ้าใช้)
4. ตัวทำละลายสำหรับ Mobile phase เกรด LC-MS
5. ก๊าซไนโตรเจนความบริสุทธิ์สูง

วิธีการวิเคราะห์: (แนวทางทั่วไป)

1. การไฮโดรไลซิสโปรตีน:
 - ชั่งตัวอย่างโปรตีนแห้ง (OPC/OPH) ประมาณ 10-50 mg
 - เติมน้ำ HCl 6 N (1-5 mL)
 - (อาจต้องทำการ Oxidation ก่อน หากต้องการวิเคราะห์ Cys/Met แม่นยำ)
 - (ต้องไฮโดรไลซ์ด้วยต่าง หากต้องการวิเคราะห์ Trp)
 - ใส่ภาชนะด้วย N₂ ปิดฝาสนิท
 - ไฮโดรไลซ์ที่ 110 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
 - กำจัด HCl ส่วนเกิน (ระเหย/ทำให้เป็นกลาง)
 - ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ปรับปริมาตร

2. การเตรียมตัวอย่างสำหรับ LC-MS/MS:
 - กรองสารละลายกรดอะมิโนผ่านฟิลเตอร์ 0.22 ไมโครเมตร
 - (อาจต้องทำ Derivatization)
 - เจือจาง (ถ้าจำเป็น)
3. การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS:
 - ตั้งค่าสภาวะ LC และ MS/MS (เช่น คอลัมน์, อุณหภูมิ, mobile phase, gradient, ionization mode, scan mode (MRM))
 - สร้าง Method (กำหนด Retention time, Transitions)
 - สร้าง Calibration curve จากสารมาตรฐาน
 - ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง
4. การประมวลผลและการคำนวณ:
 - ประมวลผลโครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัม
 - ระบุชนิดและคำนวณปริมาณกรดอะมิโนโดยเทียบกับสารมาตรฐานและ Calibration curve
 - รายงานผลเป็น mg/100g sample

