



ผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จาก  
กากถั่วเขียว

นางสาวสโรชา ทรัพย์เจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ผลของปฏิกิริยาเมลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพ  
ของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว

นางสาวสโรชา ทรัพย์เจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาลัทธิ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ



## ใบรับรองโครงงานวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เรื่อง ผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพของ  
เพปไทด์จากกากถั่วเขียว

โดย นางสาวสโรชา ทรัพย์เจริญ

ได้รับอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา  
เคมีอุตสาหกรรม

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย / หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ จันทรวีวัฒน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ญญา เลหากุลจิตต์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ช่อนกลิ่น)

กรรมการ

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อวัช วิเศษสัย)

กรรมการ

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวรักษ์ ปานกลาง)

ชื่อ : นางสาวโรชา ทรัพย์เจริญ  
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : ผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี  
 กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว  
 สาขาวิชา : เคมีอุตสาหกรรม  
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ  
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ช่อนกลิ่น  
 ปีการศึกษา : 2567

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลขนาดของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว และชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ด และศึกษาสมบัติทางกายภาพ สมบัติด้านกลิ่นรส สารประกอบระเหยได้ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และการต้านมะเร็ง ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่เกิดขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าเพปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 1 kDa (F4) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับน้ำตาลไรโบส มีค่าร้อยละของการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันเท่ากับ 69.17 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ระหว่างเพปไทด์ขนาดเล็กน้อย 1 kDa กับน้ำตาลไรโบส (RF4) มีคุณสมบัติต้านรสชาติและการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสโดยรวมสูง มีคุณลักษณะกลิ่นเนื้อ กลิ่นหวาน กลิ่นนมควั่น และรสอูร์อู (umami) พบสารประกอบ เฮเทอโรไซคลิก ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล 2,5-ไดเมทิลไพราซีน และ ไดเมทิลไตรซัลไฟด์ ซึ่งให้กลิ่นคาราเมลหรืออัลมอนด์ กลิ่นถั่ว และกลิ่นเนื้อในปริมาณสูง อีกทั้ง RF4 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, hydroxyl, superoxide และ FRAP สูงสุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.1302, 0.0508, 0.9045, 2.5473 mg/mL และ 0.3163 mM Fe<sup>2+</sup> ตามลำดับ รวมทั้ง RF4 มีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW264.7) โดยยับยั้งการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) เท่ากับ 4.29  $\mu$ mol/L ยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด Interleukin-6 (IL-6) และชนิด tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) เท่ากับ 542.81 และ 113.55 pg/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ได้แก่ เซลล์ที่ปนกับ LPS อย่างเดียว สามารถลดปริมาณการหลั่ง IL-6 ได้ประมาณ 6 เท่า และลดปริมาณการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ประมาณ 7 เท่า สาร RF4 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดมะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma; MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma; HCT-116) และมะเร็งปอด Human alveolar basal epithelial cell;

A549) ได้ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.700, 0.6645 และ 1.6060 mg/mL ตามลำดับ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ปกติ (Vero cell) ดังนั้น เพปไทด์กากถั่วเขียวที่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีศักยภาพที่ดีในการเป็นสารเสริมรสชาติและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถพัฒนาเป็นสารเสริมรสเชิงสุขภาพและประยุกต์ใช้ในอาหาร

(มีจำนวนทั้งสิ้น 153 หน้า)

คำสำคัญ : กากถั่วเขียว, ปฏิกิริยาเมลลาร์ด, เพปไทด์, ฤทธิ์ทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



Name : Miss Sarocha Sapcharoen  
Thesis Title : Effect of Maillard Reaction on Physical and Chemical Properties, Flavor Profile and Biological Activities of Mungbean meal Peptides  
Major Field : Industrial Chemistry  
King Mongkut's University of Technology North  
Bangkok  
Thesis Advisor : Assistant Professor Chanikan Sonklin, Ph.D.  
Academic Year : 2024

### ABSTRACT

This study investigated the effects of molecular weight of mung bean meal peptides and the type of reducing sugar on Maillard reaction products (MRPs). The physico-chemical properties, flavoring characteristics, volatile compounds, antioxidant activity, anti-inflammatory and anti-cancer properties of MRPs were determined. Peptide with a molecular weight of less than 1 kDa (F4) showed high reactivity with ribose, achieving a degree of glycation of 69.17%. Sensory analysis of RF4 revealed meaty flavor, sweet flavor, smoking flavor and umami taste. Key heterocyclic compounds including furfural, 2,5-dimethyl pyrazine and dimethyl trisulfide were identified as the predominant odorant. All MRPs contributed to antioxidant activity, RF4 exhibiting particularly strong DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, hydroxyl, and superoxide radical scavenging activity with IC<sub>50</sub> values of 0.1302, 0.0508, 0.9045, 2.5473 mg/mL, respectively, and FRAP value of 0.3163 mM Fe<sup>2+</sup>, respectively. Additionally, RF4 contributed to anti-inflammatory activity in macrophage cell (RAW 264.7), which suppressed NO release of 4.29 μmol/L. RF4 also inhibited the production of pro-inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6, 542.81 pg/mL and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ , 113.55 pg/m). Compared to the LPS-treated control, RF4 reduces IL-6 level (3227.40 pg/mL) approximately sixfold and TNF- $\alpha$  level (810.69 pg/mL) approximately sevenfold. RF4 additionally

explored potent anticancer activity, inhibiting the growth of human breast adenocarcinoma (MCF-7), human colorectal carcinoma (HCT-116) and human alveolar basal epithelial cell (A549) with  $IC_{50}$  value of 0.700, 0.6645 and 1.6060 mg/mL, respectively. Importantly, RF4 was non-toxic in normal cell (Vero cell) with the maximum concentration of 250  $\mu$ g/mL and  $IC_{50}$  value of  $707 \pm 7.90$   $\mu$ g/mL. In conclusion, Maillard reaction products derived from mung bean meal peptide not only enhance flavor characteristics, but also exhibit significant biological activity, developing them promising functional flavoring agents food application.

(Total 153 Pages)

Keywords: Mungbean meal, Maillard reaction, Antioxidant activity, Biological activity

---

Advisor



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ช่อนกลิ่น ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการดำเนินงานวิจัย และการปรับปรุงแก้ไขข้อมูล จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ และความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ รวมถึงอุปกรณ์ต่าง ๆ จากภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดาและมารดา รวมไปถึงครอบครัว เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ และเพื่อนนักศึกษาเคมีอุตสาหกรรม ที่ให้ความช่วยเหลือ การสนับสนุน และให้กำลังใจเป็นอย่างดี หากวิทยานิพนธ์ผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้

สโรชา ทรัพย์เจริญ

## สารบัญ

หน้า

|                                                                |          |
|----------------------------------------------------------------|----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                           | ง        |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                        | ฉ        |
| กิตติกรรมประกาศ .....                                          | ช        |
| สารบัญ.....                                                    | 9        |
| สารบัญตาราง.....                                               | 13       |
| สารบัญรูปภาพ.....                                              | 14       |
| <b>บทที่ 1 บทนำ .....</b>                                      | <b>1</b> |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย .....                    | 1        |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....                               | 1        |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....                                    | 4        |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....                            | 5        |
| <b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>             | <b>6</b> |
| 2.1 ถั่วเขียว.....                                             | 6        |
| 2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysate vegetable protein, HVP)..... | 22       |
| 2.3 เอนไซม์โบรมิเลน .....                                      | 24       |
| 2.4 สารให้กลิ่นรส.....                                         | 27       |
| 2.5 ปฏิกริยาเมลลาร์ด .....                                     | 39       |
| 2.6 วิธีการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....          | 47       |
| 2.7 การอักเสบ (Inflammation).....                              | 53       |
| 2.8 มะเร็ง (Cancer).....                                       | 57       |

|                |                                                                                                 |           |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9            | ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactivity).....                                                               | 58        |
| <b>บทที่ 3</b> | <b>วิธีการทดลอง.....</b>                                                                        | <b>62</b> |
| 3.1            | วัสดุและอุปกรณ์ .....                                                                           | 62        |
| 3.2            | สารเคมี.....                                                                                    | 63        |
| 3.3            | วิธีการทดลอง.....                                                                               | 64        |
| 3.3.1          | การสกัดแยกน้ำมันออกจากกากถั่วเขียว.....                                                         | 64        |
| 3.3.2          | การเตรียมตัวอย่างเพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียว.....                                 | 64        |
| 3.3.3          | ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (Maillard reaction products, MRPs).....                  | 65        |
| 3.3.4          | การวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสีของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว.....                                   | 66        |
| 3.3.5          | การวิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield).....                                             | 67        |
| 3.3.6          | การวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation).....                                           | 67        |
| 3.3.7          | วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar content).....                                      | 67        |
| 3.3.8          | การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน .....                                                        | 68        |
| 3.3.9          | การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ (Volatile compounds).....                               | 69        |
| 3.3.10         | วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....            | 69        |
| 3.3.11         | วิเคราะห์การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์จากถั่วเขียว..... | 70        |
| 3.3.12         | วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ .....                                                   | 71        |
| 3.3.13         | วิเคราะห์ความเป็นพิษในเซลล์ปกติด้วยวิธี MTT .....                                               | 73        |
| 3.3.14         | วิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) .....                                 | 74        |
| 3.3.15         | วิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer).....                                           | 75        |
| 3.3.4          | วิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis).....                                                   | 75        |
| <b>บทที่ 4</b> | <b>ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....</b>                                                             | <b>76</b> |

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว.....                                                                                      | 76  |
| 4.2 ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield) ของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากกากถั่วเขียว (Crude) .....                                                      | 77  |
| 4.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสีของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว .....                                                                           | 78  |
| 4.4 ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation).....                                                                                    | 80  |
| 4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) .....                                                                                         | 81  |
| 4.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน .....                                                                                                 | 83  |
| 4.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ (Volatile compounds) .....                                                                       | 86  |
| 4.8 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 97                                                          |     |
| 4.9 ผลการวิเคราะห์การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก เพปไทด์จากถั่วเขียว .....                                     | 101 |
| 4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....                                                                                  | 108 |
| 4.10.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....                                  | 108 |
| 4.10.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) ..... | 110 |
| 4.10.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity .....                                                     | 111 |
| 4.10.4 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity.....                                                    | 112 |
| 4.10.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) .....                                                 | 113 |
| 4.11 ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell).....                                                                                    | 114 |
| 4.12 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) .....                                                                      | 115 |
| 4.12.1 ความสามารถในการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) จากเพปไทด์จากถั่วเขียว... 115                                                                 |     |

|                                                                                 |            |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.12.2 ความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ ชนิด IL-6 และ TNF- $\alpha$ ..... | 117        |
| 4.13 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer) .....                | 119        |
| 4.13.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งเต้านม (MCF7).....                | 119        |
| 4.13.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งลำไส้ (HCT116).....               | 121        |
| 4.13.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งปอด (A549).....                   | 122        |
| <b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....</b>                                | <b>124</b> |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง .....                                                        | 124        |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ.....                                                             | 125        |
| บรรณานุกรม.....                                                                 | 126        |
| ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี .....                                  | 144        |
| ภาคผนวก ข ตารางผลการทดลอง .....                                                 | 150        |
| ประวัติผู้เขียน.....                                                            | 153        |

## สารบัญตาราง

หน้า

|                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียว (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง).....                                                                                                                                                                | 10  |
| ตารางที่ 2-2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของเมล็ดถั่วเขียว (g/16 gN).....                                                                                                                                                                                  | 11  |
| ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว.....                                                                                                                                                                                                   | 11  |
| ตารางที่ 2-4 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของกากถั่วเขียว.....                                                                                                                                                                                              | 12  |
| ตารางที่ 2-5 รสชาติของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบ L-form.....                                                                                                                                                                                         | 28  |
| ตารางที่ 2-6 ชนิดและลำดับของเพปไทด์ที่ให้กลิ่นรส.....                                                                                                                                                                                                | 33  |
| ตารางที่ 2-7 สารประกอบให้กลิ่นรสหลักในกระบวนการ thermal processing flavor.....                                                                                                                                                                       | 38  |
| ตารางที่ 2-8 ลักษณะกลิ่นของสารประกอบชนิดต่าง ๆ ใน HVP จากข้าวกล้อง.....                                                                                                                                                                              | 38  |
| ตารางที่ 2-9 แบบจำลองกระบวนการระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนในการเป็นสารให้กลิ่นรส.....                                                                                                                                                                   | 43  |
| ตารางที่ 2-10 แบบจำลองกระบวนการระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนในการเป็นสารให้กลิ่นรส.....                                                                                                                                                                  | 45  |
| ตารางที่ 2-11 การศึกษาคุณสมบัติของรสชาติผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ผ่านกระบวนการโปรตีนไฮโดรไลเซต.....                                                                                                                                              | 46  |
| ตารางที่ 2-12 ชนิดของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....                                                                                                                                                                       | 59  |
| ตารางที่ 2-13 ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ.....                                                                                                                                                              | 61  |
| ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว (% w/w).....                                                                                                                                                                                           | 76  |
| ตารางที่ 4-2 ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield) ของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว.....                                                                                                                                                                      | 77  |
| ตารางที่ 4-3 ค่าสีและลักษณะปรากฏของเพปไทด์จากกากถั่วเขียวก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด.....                                                                                                                                                         | 79  |
| ตารางที่ 4-4 แสดงองค์ประกอบกรดอะมิโนทั้งหมดของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ได้มาจากเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา เพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียว F1 (>10 kDa) F2 (5-10 kDa) F3 (1-5 kDa) และ F4 (<1 kDa) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไรโบส..... | 85  |
| ตารางที่ 4-5 สารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์จากกากถั่วเขียว.....                                                                                                                                                           | 90  |
| ตารางที่ 4-6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ด.....                                                                                                                                                                 | 92  |
| ตารางที่ 4-7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม ก่อนและหลังทดสอบด้วยเพปไทด์ RF4.....                                                                                                                                                              | 120 |

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพที่ 2-1 ต้นถั่วเขียว.....                                                                                                                           | 6  |
| ภาพที่ 2-2 ลักษณะของเมล็ดถั่วเขียว .....                                                                                                               | 7  |
| ภาพที่ 2-3 แผนผังการเตรียมโปรตีนถั่วเขียวให้เป็นเพปไทด์ถั่วเขียว.....                                                                                  | 16 |
| ภาพที่ 2-4 แผนผังการไฮโดรไลซิสเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีน .....                                                                                    | 23 |
| ภาพที่ 2-5 แผนผังประเภทของการไฮโดรไลซิสของโปรตีน.....                                                                                                  | 24 |
| ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของ Bromelain (Khalid และคณะ, 2016).....                                                                                           | 25 |
| ภาพที่ 2-7 กลไกการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน (Hale และคณะ, 2005) .....                                                                                    | 26 |
| ภาพที่ 2-8 การก่อตัวของสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีซิลเฟอร์โดยผ่าน Strecker degradation .....                                                           | 31 |
| ภาพที่ 2-9 Polypeptide.....                                                                                                                            | 32 |
| ภาพที่ 2-10 โครงสร้างน้ำตาลกลูโคส .....                                                                                                                | 36 |
| ภาพที่ 2-11 โครงสร้างน้ำตาลไรโบส .....                                                                                                                 | 36 |
| ภาพที่ 2-12 โครงสร้าง Thiamine.....                                                                                                                    | 37 |
| ภาพที่ 2-13 ปฏิกริยาเมลลาร์ด .....                                                                                                                     | 40 |
| ภาพที่ 2-14 กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ HAT กับ SET .....                                                                                                | 49 |
| ภาพที่ 2-15 ปฏิกริยา DPPH• กับสารต้านอนุมูลอิสระ .....                                                                                                 | 50 |
| ภาพที่ 2-16 ปฏิกริยาของ ABTS <sup>•+</sup> กับสารต้านอนุมูลอิสระ .....                                                                                 | 51 |
| ภาพที่ 2-17 ปฏิกริยาของ FRAP กับสารต้านอนุมูลอิสระ .....                                                                                               | 53 |
| ภาพที่ 2-18 แผนภาพแสดงการเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง .....                                                                                 | 55 |
| ภาพที่ 2-19 ตารางสรุปการทำงานของ cytokines ชนิดต่าง ๆ.....                                                                                             | 56 |
| ภาพที่ 2-20 วงจรชีวิตของเซลล์ .....                                                                                                                    | 57 |
| ภาพที่ 3-1 แผนภาพของการเตรียมผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาเมลลาร์ด.....                                                                                         | 66 |
| ภาพที่ 4-1 ร้อยละการเกิดไกลเคชัน (% Degree of glycation) ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์จากถั่วเขียวที่ขนาดมอลโมเลกุลแตกต่างกัน..... | 81 |
| ภาพที่ 4-2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปในปฏิกริยาเมลลาร์ด (mg/g sample).....                                                                         | 82 |

|                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ภาพที่ 4-3 แผนภาพแสดงสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจาก เพปไทด์กากถั่วเขียว (Heat map).....                                             | 91  |
| ภาพที่ 4-4 สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก F4 .....                                                                                          | 100 |
| ภาพที่ 4-5 แสดงผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทด้านรสชาติของเพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลและให้ความร้อน.....                                     | 102 |
| ภาพที่ 4-6 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียว Crude หรือ C ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด .....             | 105 |
| ภาพที่ 4-7 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดมากกว่า 10 kDa (F1) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด.....    | 106 |
| ภาพที่ 4-8 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดมากกว่า 5-10 kDa (F2) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ..... | 106 |
| ภาพที่ 4-9 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาด 1-5 kDa (F3) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด .....         | 107 |
| ภาพที่ 4-10 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดน้อยกว่า 1 kDa (F4) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด .....  | 107 |
| ภาพที่ 4-11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> , mg/mL).....                                                | 109 |
| ภาพที่ 4-12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> , mg/mL).....                                                | 111 |
| ภาพที่ 4-13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> , mg/mL).....                                            | 112 |
| ภาพที่ 4-14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide radical scavenging activity (IC <sub>50</sub> , mg/mL).....                                          | 113 |
| ภาพที่ 4-15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> /mg).....                                                                             | 114 |
| ภาพที่ 4-16 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ของ RF4 .....                                                                                              | 115 |
| ภาพที่ 4-17 การปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO released) ของเพปไทด์จากถั่วเขียว .....                                                                            | 117 |
| ภาพที่ 4-18 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของเพปไทด์จากถั่วเขียวต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ....                                                                     | 117 |
| ภาพที่ 4-19 ความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง cytokine ของเพปไทด์กากถั่วเขียว.....                                                                            | 119 |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ภาพที่ 4-20 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังบ่มด้วย RF4 .....         | 120 |
| ภาพที่ 4-21 ความสามารถในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) จากเพปไทด์กากถั่ว ..... | 122 |
| ภาพที่ 4-22 ความสามารถในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปอด (A549) จากเพปไทด์กากถั่วเขียว .... | 123 |



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาด้านวิจัย

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา โปรตีนจากพืชเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากแหล่งที่มาที่มีราคาไม่แพงและยั่งยืนกว่าเมื่อเทียบกับโปรตีนจากสัตว์ หนึ่งในนั้นคือการใช้โปรตีนจากกากถั่วเขียว โดยกากถั่วเขียว (mungbean meal) เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตวุ้นเส้น ซึ่งมีปริมาณโปรตีนคงเหลืออยู่สูงถึงร้อยละ 70 (โดยน้ำหนักแห้ง) ในประเทศไทยมีกากถั่วเขียวที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้นประมาณ 1200 ตันต่อปี อาจส่งผลทำให้เกิดขยะ มลพิษและปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากกากถั่วเขียวมีโปรตีนสูง ส่วนใหญ่ได้มีการนำกากถั่วเขียวมาใช้ประโยชน์โดยการนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งได้มูลค่าน้อย ดังนั้น จึงได้มีการเพิ่มมูลค่าของของกากถั่วเขียว โดยนำไปผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต (hydrolyzate vegetable protein) เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหาร เนื่องจากในกากถั่วเขียว พบกรดอะมิโนสำคัญในการให้กลิ่นรสที่ดี ได้แก่ กรดกลูตามิก และ แอสพาร์ติก กรดอะมิโนทั้งสองชนิดเป็นสารตั้งต้นของ กลูตาเมต และ แอสพาร์เตต ที่ให้รสอูมามิ และยังมีซิสเทอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสเนื้อในปริมาณสูง [1] นอกจากนี้ยังพบว่าในกากถั่วเขียวประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำสูง (hydrophobic amino acid) ได้แก่ ฮีสทิดีน โพรลีน เมไทโอนีน ซีสเทอีน ไทโรซีน ทรีปโตเฟน และฟีนอลอะลานีน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี [2] จากงานวิจัยพบว่าได้มีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียว โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตคือ 15% เอนไซม์โบรมิเลน ที่เวลาไฮโดรไลซิส 12 ชั่วโมง ให้รสชาติหวาน เค็ม ขมเล็กน้อย และมีกลิ่นเขียว นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> ได้ร้อยละ 80 และ 95 ตามลำดับ (C. Sonklin et al., 2018) อีกทั้งยังมีรายงานพบว่าเพปไทด์จาก กากถั่วเขียวมีขนาดน้อยกว่า 1 kDa ได้แก่ เพปไทด์ LAF, HC, CTN, CGN and CSGD ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นเดียวกัน [3] นอกจากนี้ ถั่วเขียวยังมีความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) จากงานวิจัยพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวที่มีขนาด 1165.28 Da มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง IL-1 $\beta$ , IL-6 ก่อให้เกิดการอักเสบ [4] รวมทั้งถั่วเขียวยังมี

ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer) จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิตและยังพบว่า เพปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้สูงถึงร้อยละ 86.35 [5] ดังนั้น จะเห็นได้ว่าถั่วเขียวเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท แต่เนื่องจากลักษณะของกลิ่นรส (flavor characteristics) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีกลิ่นที่ไม่ชัดเจน ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นกลิ่นใด สามารถบอกได้แค่ว่าเป็นกลิ่นไปทางคาว หรือหวาน การปรับปรุงเพื่อให้ได้กลิ่นรสเฉพาะเจาะจง เช่น กลิ่นไก่ กลิ่นเนื้อ สามารถปรับปรุงกลิ่นรสได้โดยผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) หรือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (brown pigment) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ใช่เอนไซม์ โดยเกิดระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ มีโครงสร้างของหมู่คาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบ เช่น หมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) หรือ คีโตน (-C=O) ซึ่งเป็นส่วนที่เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน เพปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งหากเป็นน้ำตาลที่ไม่รีดิวซ์ (Non-reducing sugar) เช่น ซูโครส (น้ำตาลทรายทั่วไป) ปฏิกิริยาเมลลาร์ดจะเกิดขึ้นได้ยากหรือไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากน้ำตาล ไม่รีดิวซ์โครงสร้างไม่มีหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ ดังนั้น น้ำตาลรีดิวซ์ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (amino group) ของกรดอะมิโน เพปไทด์หรือโปรตีน โดยผ่านความร้อน ได้เป็นผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด หรือ MRPs (Maillard reaction products) [6] ซึ่ง MRPs ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบระเหยง่าย (volatile compound) เช่น สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compound) เช่น ไพร์โรล (pyrrole) ฟูแรน (furan) ไทโอฟิน (thiophene) ไพราซีน (pyrazine) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีความสามารถในการให้กลิ่นรสในอาหาร สามารถนำไปประยุกต์ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีงานวิจัยหลายฉบับพบว่าสารประกอบระเหยง่ายแต่ละชนิดมีลักษณะของกลิ่นรสที่แตกต่างกัน เช่น ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเห็ด พบสาร 3-phenylfuran และ 2-octylfuran ให้กลิ่นรสคล้ายคาราเมล และ สาร 2-thiophenecarboxaldehyde, 3-methylbutanal ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อ [7] โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส และไรโบส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ทำปฏิกิริยากับไรโบส ให้กลิ่นรสอูมามิสูง กลิ่นคล้ายคาราเมล และ กลิ่นเนื้ออย่าง เนื่องจากพบสารประเภทระเหยได้ ได้แก่ furan pyrazine ketone และ aldehyde [8] เช่นเดียวกับในเมล็ดคามิเลียที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส และไรโบส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำปฏิกิริยากับไรโบส ให้

สารประกอบประเภทซัลเฟอร์ให้กลิ่นรสเนื้อมันสูง อาจเกิดจากซีสเตอีนทำปฏิกิริยากับไโรโบส ซึ่งส่งผลทำให้ได้กลิ่นรสเนื้อและรสอูมามิ [9] เป็นต้น ดังนั้น จึงได้มีการนำปฏิกิริยาเมลลาร์ดมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสให้มีความเฉพาะมากขึ้น นอกจากนี้สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compound) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดพบว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีงานวิจัยพบว่า ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก คิวโนว จากผลการศึกษาพบว่า มีสารประกอบ furan, furanones และ cyclopentanones มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า ORAC 94.80  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  [10] ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเห็ดรา พบว่าสารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบมีความสามารถในการเพิ่มกลิ่นรสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยมีค่า DPPH $\cdot$  ร้อยละ 90 [11] ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากถั่วเหลือง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลืองก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีค่า DPPH $\cdot$  ร้อยละ 65 ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดพบว่ามีความเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 90 เนื่องจากพบว่ามีสารประกอบ thiophenes, furans, thiazoles and pyrroles มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [12] ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากคิวโนว จากผลการศึกษาพบว่ามีความสามารถในการต้านอักเสบ ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL สามารถยับยั้งการปลดปล่อย Nitric oxide (NO) ได้ 38.12  $\mu\text{M}$  [13] ซึ่งจากรายงานวิจัยดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้งานวิจัยนี้ได้เลือกน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ กลูโคสและไโรโบส น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้ มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ซึ่งแตกต่างจากไโรโบสที่มีคาร์บอน 5 อะตอม จากรายงานส่วนใหญ่พบว่าน้ำตาล 2 ชนิด เมื่อทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับหมู่อะมิโน ได้ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ให้กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อลักษณะกายภาพและเคมีกลิ่นรส รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์จากถั่วเขียว อีกทั้งเพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการปรุงแต่งรสชาติอาหารโดยไม่ใช้เนื้อสัตว์ ซึ่งเหมาะกับบุคคลทั่วไป และกลุ่มบุคคลที่เป็นมังสวิรัต ได้สารปรุงแต่งรสชาติอาหารที่ได้ทั้งความอร่อยและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อลักษณะทางด้านกายภาพและเคมี ด้านกลิ่นรส และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เตรียมตัวอย่างกากถั่วเขียวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน ไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์โบรมิเลน จากนั้นแยกขนาดของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเขียวโดยใช้เครื่อง stirred cell ด้วย membrane ตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี AOAC, 2000

1.3.2 เตรียมผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว ที่เตรียมจากเพปไทด์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส (ribose) และ น้ำตาลกลูโคส (glucose)

1.3.3 ศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของผลิตภัณฑ์ เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว โดยวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี ร้อยละผลได้ (% yield) การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation) ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) สารให้กลิ่นระเหยได้ (volatile compounds) ด้วย Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) และลักษณะโครงสร้างทางเคมีด้วย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)

1.3.4 ศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อลักษณะกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว โดย วิเคราะห์การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติ โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ qualitative different ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test วางแผนการทดลองแบบ randomized completely Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT ด้วยโปรแกรม SAS

1.3.5 ศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อลักษณะการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว โดยวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity, ferric reduce antioxidant power, hydroxyl radical

scavenging activity และ superoxide radical scavenging activity เป็นต้น ทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ด้วยวิธี MTT ฤทธิ์ในด้านการอักเสบและการต้านมะเร็ง

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้กระบวนการปรับปรุงกลิ่นรสของเพปไทด์จากถั่วเขียวด้วยปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์

1.4.2 เพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ทางเลือกสำหรับผู้หลีกเลี่ยงการบริโภคเนื้อสัตว์ หรือกลุ่มผู้รักสุขภาพ

1.4.3 เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร



## บทที่ 2

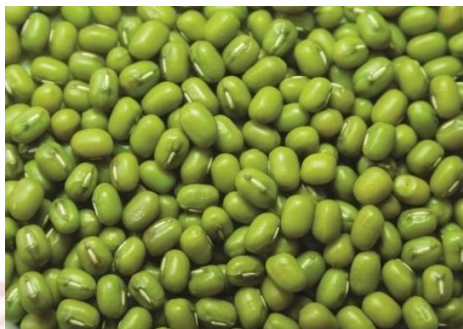
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ถั่วเขียว

ถั่วเขียว (mungbean) เป็นพืชล้มลุก จัดอยู่ในพืชตระกูลถั่ว มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vigna radiata* (L.) Wilczek จัดอยู่ในอาณาจักร Plantae หมวด Magnoliophyta ชั้น Magnoliopsida อันดับ Fabales วงศ์ Fabaceae วงศ์ย่อย Fabiodeae เผ่า Phaseoleae สกุล *Vigna* สปีชีส์ *V. radiata* ถั่วเขียวมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น ถั่วเขียวผิวมัน (mung bean หรือ green gram) ถั่วเขียวผิวทอง (gold gram) และถั่วเขียวผิวดำ (black gram หรือ urd) เมื่อก่อนถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวทอง ใช้ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phaseolus aureus* Roxb. และถั่วเขียวผิวดำ ใช้ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phaseolus mungo* Linn. ต่อมาได้มีการเปลี่ยนชื่อใหม่ โดย Wilczek และ Hepper โดยชื่อวิทยาศาสตร์ใหม่ของถั่วเขียวผิวมัน และถั่วเขียวผิวทองคือ *Vigna radiata* (L.) Wilczek และถั่วเขียวผิวดำคือ *Vigna mungo* (L.) Hepper โดยถั่วเขียวผิวมันจะมีลักษณะฝักที่ยาว ขนที่ฝักสั้นและเบาบาง มีเมล็ดกลมขนาดเล็ก มีสีเขียวหรือเขียวแกมเหลือง เปลือกนอกมีรอยนูนของ hypocotyl-radicle axis ส่วน hilum หรือตาเรียบ มีลักษณะตรง ไม่เว้า และมีอายุการเก็บเกี่ยวที่สั้น (ประมาณ 65-70 วัน) ส่วนถั่วเขียวผิวดำจะมีลักษณะฝักสั้น ขนที่ฝักยาวและแน่น มีเมล็ดที่ยาวกว่าและขนาดใหญ่ มีสีดำ ไม่มีรอยนูนของ hypocotyl-radicle axis ส่วน hilum มีลักษณะโค้ง เว้า มีอายุการเก็บเกี่ยวที่นานกว่า (ประมาณ 90-120 วัน) โดยถั่วเขียวได้รับความเชื่อถือว่า มีวิวัฒนาการมาจากพันธุ์ป่า ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna (Phaseolus) radiata* var. *subobata* (Roxb.) Verdc. หรือ *Vigna (Phaseolus)* (Wight and Arn.) Verdc. ซึ่งพันธุ์ป่าเหล่านี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย [14]



ภาพที่ 2-1 ต้นถั่วเขียว



ภาพที่ 2-2 ลักษณะของเมล็ดถั่วเขียว

การปลูกถั่วเขียวนิยมปลูกกันในหลายประเทศ เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย ปลูกได้ดีในดินเกือบทุกชนิด ยกเว้น ดินต่าง ต้องการน้ำน้อย มีวงจรการเจริญเติบโตสั้น สามารถขึ้นได้ดีในเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยส่วนใหญ่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย [15] ส่วนใหญ่ที่ประเทศจีน อินเดีย บังคลาเทศ ปากีสถาน และบางประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยถั่วเขียวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือถั่วเขียวผิวมัน อายุประมาณ 65-70 วัน ปลูกได้ตลอดทั้งปี และถั่วเขียวผิวดำ อายุประมาณ 90 วัน ส่วนใหญ่ปลูกปลายฝน โดยทั่วไปถั่วเขียวสามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ สำหรับการปลูกถั่วเขียวผิวดำ ปัจจุบันมีการปลูกมากในหลายจังหวัด มีแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ นครสวรรค์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ ลพบุรี กำแพงเพชร และอุตรดิตถ์ ส่วนถั่วเขียวผิวมัน มีแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ เพชรบูรณ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี ขอนแก่น และชัยภูมิ เป็นต้น ถั่วเขียวสามารถใช้ในระบบปลูกพืชหมุนเวียน เป็นปุ๋ยพืชสดที่ให้ปริมาณไนโตรเจนสูง อีกทั้งยังช่วยบำรุงรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน [16] โดยนิยมปลูกถั่วเขียวเป็นพืชหลังเก็บเกี่ยวพืชไร่หลัก เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ปอ เป็นต้น เพื่อตัดวงจรการระบาดของศัตรูพืช และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ถั่วเขียวที่ใช้ในประเทศส่วนใหญ่เป็นถั่วเขียวผิวมัน โดยมีการนำถั่วเขียวไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมที่สำคัญ ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตวุ้นเส้น ถั่วงอก แป้งมัน มีการใช้ถั่วเขียวในการเตรียมอาหารจำนวนมาก [17], [18] เนื่องจากถั่วเขียวมีบทบาทสำคัญในด้านโภชนาการที่สูง [19] โดยถั่วเขียวเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี มีประมาณ 20-25% อีกทั้งยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง 55-65% ไขมัน 2.1-2.7% วิตามินและเกลือแร่ โดยมีเกลือแร่ประมาณ 3.5-4.7% นอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการที่ได้รับแล้ว ถั่วเขียวยังให้คุณประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านอื่น ๆ โดยถั่วเขียวมีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ [20] หรือมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สร้างภูมิคุ้มกันโรคต่อร่างกาย [21] ลดคอเลสเตอรอล [22] ลดความดันโลหิต [23], [24] ลดการอักเสบ [25] ป้องกันตับ และต้านมะเร็ง [26], [21] นอกจากนี้ถั่วเขียวยังมีสรรพคุณ ดับร้อน ลดบวม ขับปัสสาวะ อาหารเป็นพิษ [27] อีกทั้งถั่วเขียวยังสามารถย่อยได้ง่ายเมื่อเทียบกับพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ [28], [29]

ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้ถั่วเขียวทำเป็นอาหารสำหรับเด็ก คนชรา ผู้พักฟื้นและยังเป็นทางเลือกสำหรับผู้ที่มีอาการมะเร็งลำไส้ โดยสามารถนำถั่วเขียวมาแปรรูปได้หลายแบบ เช่น เยลลี่ เค้ก วุ้นเส้น และเป็นที่นิยมสำหรับใช้ทำขนมไทย เช่น ถั่วเขียวต้มน้ำตาล ขนมถั่วกวน ขนมเปียะไส้ถั่ว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาแผนโบราณในประเทศจีนและอินเดีย อีกทั้งโปรตีนจากพืชสามารถช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้เมื่อเทียบกับโปรตีนจากสัตว์ จึงถือได้ว่าถั่วเขียวจัดเป็นพืชหลักที่สำคัญสำหรับมนุษย์

#### 2.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียว

องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียว ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ เป็นต้น โดยอาจแตกต่างกัน เนื่องจากจากพันธุ์ของถั่วเขียว ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว แหล่งเพาะปลูก และสภาพแวดล้อม โดยมีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีดังนี้

##### 2.1.1.1 คาร์โบไฮเดรต

ถั่วเขียวมีปริมาณแบ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตหลัก ประมาณร้อยละ 55-65 โดยคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วมีอัตราส่วนของอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) เท่ากับ 28.2 และยังพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ร้อยละ 0.2-0.4 แต่โดยส่วนมากอยู่ในรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ได้แก่ น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) น้ำตาลเวอร์บาสโกส (verbascose) และน้ำตาลสตาซีโอส (stachyose)

##### 2.1.1.2 โปรตีน

ถั่วเขียวเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 20-25% ซึ่งประกอบด้วย โกลบูลิน (Globulin) 60% และอัลบูมิน (Albumin) 25% [30] เป็นองค์ประกอบหลักในการกักเก็บรักษาโปรตีน นอกจากนี้ถั่วเขียวยังอุดมไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) ลิวซีน (Leucine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ไลซีน (lysine) ทรีโอนีน (threonine) เป็นต้น [31]

##### 2.1.1.3 ไขมัน

ถั่วเขียวมีปริมาณน้ำมันน้อยมาก (2.1-2.7%) และส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) 3.4-4.6 กรัมต่อกิโลกรัม กรดปาล์มมิก (palmitic acid) 2.8-4 กรัมต่อกิโลกรัม กรดโอเลอิก (oleic acid) 2.1-2.9 กรัมต่อกิโลกรัม กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) 1.9-2.4 กรัมต่อ

กิโลกรัม กรดสเตียริก (stearic acid) 1.4-1.7 กรัมต่อกิโลกรัม และ กรดอะราคิดิก (arachidic acid) 0.23-0.25 กรัมต่อกิโลกรัม [30]

#### 2.1.1.4 วิตามิน

วิตามินเป็นสารอาหารประเภทหนึ่งี่ร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย แต่มีความสำคัญต่อร่างกาย โดยในถั่วเขียวจะมีวิตามิน 100 กรัมต่อถั่วเขียวดิบ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ซึ่งมีปริมาณ 4.8 มิลลิกรัม วิตามินบี 1 (thiamin) 0.621 มิลลิกรัม ไรโบฟลา (ribofla) 0.33 มิลลิกรัม ไนอาซิน (niacin) 2.251 มิลลิกรัม กรดแพนโทธีนิก (pantothenic acid) 1.910 มิลลิกรัม วิตามินบี 6 (vitamin B6) 0.381 มิลลิกรัม โฟเลต (folate) 615 ไมโครกรัม โคลีน (choline) 97.9 มิลลิกรัม เบต้าแคโรทีน (beta Carotene) 68 ไมโครกรัม วิตามินเอ (vitamin A) 114 IU วิตามินอี (vitamin E) 0.51 มิลลิกรัม วิตามินเค (vitamin K) 9.0 ไมโครกรัม [30]

#### 2.1.1.5 แร่ธาตุ

ถั่วเขียวประกอบด้วยซีลีเนียม 3.1-4% [32] ซึ่งแสดงว่าถั่วเขียวมีปริมาณแร่ธาตุที่เห็นได้ชัดเจน โดยในถั่วเขียวมีแร่ที่สำคัญ เช่น เหล็ก แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และสังกะสี อยู่ในช่วง 3.4-4.4 มิลลิกรัม/100 กรัม 129-166 มิลลิกรัม/100 กรัม 8.7-13.2 มิลลิกรัม/100 กรัม 363-414 มิลลิกรัม/100 กรัม 81-114 มิลลิกรัม/100 กรัม และ 1.2-2.1 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ [32]

**ตารางที่ 2-1** องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียว (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)

| องค์ประกอบ         | ปริมาณ              |
|--------------------|---------------------|
| โปรตีน             | 20-25 กรัม          |
| คาร์โบไฮเดรต       | 62.3 กรัม           |
| - Reducing sugars  | 4.85 กรัม           |
| - Raffinose        | 0.41 กรัม           |
| - Stachyose        | 1.49 กรัม           |
| - Starch           | 54.88 กรัม          |
| ไขมัน              | 1.85 กรัม           |
| ไฟเบอร์            | 4.63 กรัม           |
| วิตามิน            |                     |
| - วิตามิน A (IU)   | 70-130 มิลลิกรัม    |
| - วิตามิน B1       | 0.52-0.66 มิลลิกรัม |
| - วิตามิน B2       | 0.22-0.29 มิลลิกรัม |
| - วิตามิน C        | 0-10 มิลลิกรัม      |
| - Thiamine         | 0.12-0.7 มิลลิกรัม  |
| - Riboflavin       | 0.23-0.47 มิลลิกรัม |
| - Niacin           | 1.1-3.1 มิลลิกรัม   |
| - Pantothenic acid | 1.9 มิลลิกรัม       |
| - Nicotinic acid   | 1.6 มิลลิกรัม       |
| แร่ธาตุ            |                     |
| - Sodium           | 12 มิลลิกรัม        |
| - Potassium        | 3.62 มิลลิกรัม      |
| - Calcium          | 84 มิลลิกรัม        |
| - Phosphorus       | 391 มิลลิกรัม       |
| - Magnesium        | 55.6 มิลลิกรัม      |
| - Iron             | 9.7 มิลลิกรัม       |
| - Manganese        | 1.7 มิลลิกรัม       |
| เถ้า               | 3.76 กรัม           |

ที่มา : Mabarak และคณะ (2005), Dahiya และคณะ (2015)

ตารางที่ 2-2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของเมล็ดถั่วเขียว (g/16 gN)

| ชนิดกรดอะมิโน | ปริมาณ |
|---------------|--------|
| Tyrosine      | 3.27   |
| Phenylalanine | 5.66   |
| Threonine     | 3.15   |
| Cystine       | 0.75   |
| Methionine    | 1.92   |
| Leucine       | 8.36   |
| Isoleucine    | 4.74   |
| Lysine        | 4.19   |
| Valine        | 5.20   |
| Tryptophan    | 0.97   |
| Aspartic acid | 13.5   |
| Glutamic acid | 21.7   |
| Proline       | 4.23   |
| Serine        | 4.95   |
| Glycine       | 4.26   |
| Alanine       | 4.35   |
| Arginine      | 6.33   |
| Histidine     | 2.49   |

ที่มา : Mabarak และคณะ (2005), Dahiya และคณะ (2015)

ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว

| องค์ประกอบ | ปริมาณร้อยละ |
|------------|--------------|
| โปรตีน     | 18.14        |
| ไขมัน      | 1.19         |
| ไฟเบอร์    | 17.46        |
| เถ้า       | 16.38        |
| แร่ธาตุ    |              |
| - แคลเซียม | 4.13         |
| - ฟอสฟอรัส | 0.30         |

ที่มา : Oo และคณะ (2017)

ตารางที่ 2-4 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของกากถั่วเขียว

| ชนิดกรดอะมิโน | ปริมาณร้อยละ |
|---------------|--------------|
| Tyrosine      | 3.38         |
| Phenylalanine | 6.12         |
| Threonine     | 3.58         |
| Cystine       | 0.71         |
| Leucine       | 6.64         |
| Isoleucine    | 3.38         |
| Lysine        | 7.73         |
| Valine        | 3.38         |
| Methionine    | 1.33         |
| Aspartic acid | 12.15        |
| Glutamic acid | 18.92        |
| Proline       | 5.50         |
| Serine        | 7.22         |
| Glycine       | 4.58         |
| Alanine       | 4.59         |
| Arginine      | 8.46         |
| Histidine     | 2.34         |

ที่มา : Susilowati และคณะ (2010)

## 2.1.2 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเขียว

### 2.1.2.1 ความสามารถในการละลาย (Solubility)

ความสามารถในการละลายเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีน ซึ่งความสามารถในการละลายจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ด้านสิ่งแวดล้อม วิธีการสกัด อุณหภูมิ ค่า pH การแช่แข็ง การให้ความร้อน และการอบแห้ง นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน โดยความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเขียวส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับค่า pH

ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเขียวพันธุ์ต่างๆ อยู่ที่ประมาณ 51% ถึง 75% ซึ่งสูงกว่าความสามารถในการละลายของ 7S globulin ของถั่วเหลือง (40.31%) [33] นอกจากนี้ โปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการละลายต่ำที่สุดในช่วง pH 4–5 ซึ่งตอบสนองต่อจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนถั่วเขียว ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนถั่วเขียวมีประจุสุทธิ 0 ที่จุดไอโซอิเล็กทริก โปรตีนจะรวมตัวกันและมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำบนพื้นผิวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการละลายลดลงอย่างมากในทางตรงกันข้าม ที่สภาวะ pH นอกจุดไอโซอิเล็กทริก แรงผลักทางไฟฟ้าสถิตของโปรตีนถั่วเขียวจะเพิ่มขึ้นในระดับที่แตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น [34] เป็นผลให้โปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการละลาย >40% ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดมากที่สุดที่ pH 2 และสามารถละลายได้ถึง 90% ในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง [35] รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเขียว เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไอออน และ phosphorylation โดยหลักแล้วเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน แรงผลักไฟฟ้าสถิตระหว่างตัวทำละลายโปรตีนหรือ/และปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำระหว่างโปรตีน-โปรตีน [35]

2.1.2.2 ความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water Absorption Capacity, WAC) และความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (Oil Absorption Capacity, OAC)

ความสามารถในการดูดซับน้ำและความสามารถในการดูดซับน้ำมัน แสดงถึงปริมาณสูงสุดของน้ำและน้ำมันที่สามารถยึดเกาะต่อหน่วยของโปรตีนได้ตามลำดับ คุณสมบัติทั้งสองนี้ของโปรตีนสามารถใช้เพื่อเสริมสร้างเนื้อสัมผัสและรสชาติของอาหารแปรรูปได้ โดย WAC ใช้ในการสะท้อนความคงตัวและความเหนียวของอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลจากโครงสร้างของโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนที่มีขั้ว OAC มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงรสชาติและกลิ่นของอาหารอบและผลิตภัณฑ์เนื้อเทียม ความแตกต่างของ OAC นั้นเกี่ยวข้องกับหมู่ด้านข้างของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว ซึ่งสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำกับสายไฮโดรคาร์บอนของลิพิดได้ โดยการปรับปรุงโปรตีนถั่วเขียวอย่างเหมาะสมยังช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำ (WAC) และความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (OAC) ได้อีกด้วย รายงานจาก Hadidi และคณะ (2021) แสดงให้เห็นว่า OAC และ WAC ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวเพิ่มขึ้นเป็น 2.88 กรัม/กรัม และ 5.11 กรัม/กรัม ตามลำดับ หลังจากการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไป [35] ในทำนองเดียวกัน WAC และ OAC ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยการทำ acetylation และ succinylation นอกจากนี้ WAC และ OAC ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวที่ผ่านการทำแห้งด้วยสเปรย์ยังมีค่าต่ำกว่าการทำแห้งด้วยวิธีอื่น ๆ ดังนั้นการเลือกวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง [36]

### 2.1.2.3 ความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming Capacity, FC)

ความสามารถในการเกิดฟอง หมายถึงความสามารถของโปรตีนในการสร้างฟองหลังจากการตีอย่างแรง และ ความคงตัวของฟอง (Foaming Stability, FS) สะท้อนถึงอัตราการสลายตัวของฟอง FC และ FS มีความสัมพันธ์หลักกับคุณสมบัติโครงสร้างของโปรตีน โปรตีนที่มีความนุ่มและสามารถละลายได้ดีจะช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของส่วนต่อประสานระหว่างอากาศและของเหลว และลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดฟองที่คงตัวได้ [93,94] โดยโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวมีค่า FC อยู่ที่ 89.66% ซึ่งดีกว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีค่า FC อยู่ที่ 68.66% แต่ FS ของโปรตีนถั่วเขียวกลับต่ำกว่าของโปรตีนถั่วเหลือง ค่าเฉลี่ย FC และ FS ของโปรตีน 8S vicilin จากถั่วเขียว 15 สายพันธุ์ อยู่ที่ 69.63% (ช่วง 47.33%-106.00%) และ 61.62% (ช่วง 39.33%-97.33%) ซึ่งสูงกว่าค่า FC และ FS ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวจาก 16 สายพันธุ์ [33] นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงในเทคนิคการแปรรูปและองค์ประกอบของสารละลายที่ใช้จะมีผลต่อความสามารถในการเกิดฟอง และความคงตัวของฟองของโปรตีนจากถั่วเขียว การเติมหมู่ฟอสเฟตเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการดัดแปลงโปรตีน โดยหมู่ฟอสเฟตที่ถูกเติมจะช่วยเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลโปรตีน ซึ่งจะช่วยปรับปรุงทั้ง FC และ FS ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวได้ [35] รวมถึงยังพบว่าคุณสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนจากถั่วเขียวเปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH ในสภาพที่เป็นกรด โปรตีนจะเกิดการจับตัวกัน (aggregation) เนื่องจากอยู่ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) การรวมตัวของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ทำให้ความยืดหยุ่นลดลง และเพิ่มความไม่ชอบน้ำที่เยื่อหุ้มส่วนต่อประสาน ทำให้เกิดปรากฏการณ์ drainage phenomena และนำไปสู่ความไม่เสถียรของเยื่อหุ้ม ตรงกันข้าม ในสภาพที่เป็นกลางหรือด่าง โปรตีนจะอยู่ในสถานะสมดุลในด้านการละลายและความไม่ชอบน้ำภายใต้ปฏิสัมพันธ์ทางไฟฟ้าสถิต ซึ่งเอื้อต่อการกระจายตัวของโปรตีนที่ส่วนต่อประสานน้ำ/แก๊สได้ดีกว่า [37]

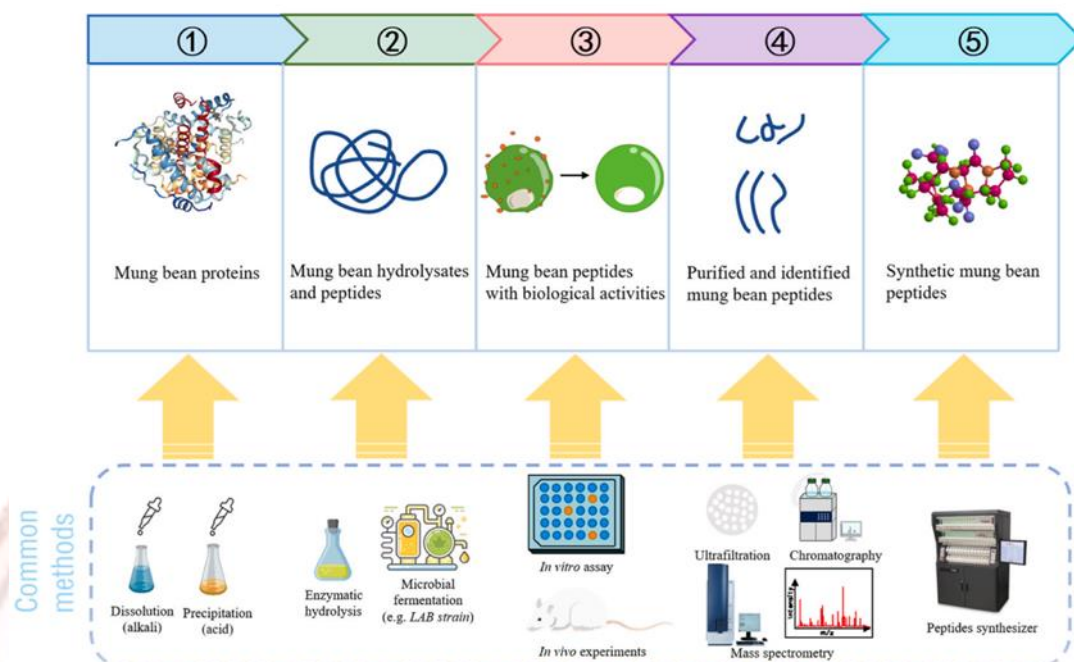
### 2.1.2.4 การเกิดเจล (Gelation)

การเกิดเจล หมายถึงโครงสร้างสามมิติที่เกิดจากความสมดุลของแรงดึงดูดและแรงผลักระหว่างโมเลกุลโปรตีน ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนสภาพและการรวมตัวของโปรตีน [38] การเกิดเจลของโปรตีนสามารถเกิดได้โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ ค่า pH หรือการเติมไอออนของโลหะ เอนไซม์ เป็นต้น โดยปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำและพันธะไดซัลไฟด์เป็นแรงหลักที่มีอิทธิพลต่อการเกิดเจลของโปรตีน [39] โครงสร้างเครือข่ายสามมิติที่เกิดจากเจลโปรตีนสามารถกักเก็บน้ำจำนวนมากและ

สร้างเนื้อสัมผัสเหมาะสำหรับทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีความเข้มข้น โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดเจลของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวอยู่ที่ 12% (เงื่อนไขการแปรรูปให้ความร้อน 1 ชั่วโมงที่ 100 องศาเซลเซียส ในสภาวะเป็นกลาง) ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเจลของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง (14%) อย่างไรก็ตาม การเกิดเจลของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะการแปรรูป โดยความเข้มข้น 13% ของโปรตีนสกัดจากถั่วเขียวในสภาวะ pH 3 หรือ pH 5 ไม่สามารถเกิดเจลได้หลังจากให้ความร้อน 1 ชั่วโมงที่ 95 องศาเซลเซียส แต่สามารถเกิดเจลได้ที่ค่า pH 7 หรือ pH 9 [40] นอกจากนี้ เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนลดลงเหลือ 7.5% การรวมตัวกันของโปรตีนสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดและสร้างเจลที่เสถียรได้หลังจากให้ความร้อน 6 ชั่วโมงที่ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นลดลงเหลือ 5% จะต้องเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อนเป็น 16 ชั่วโมง [41]

### 2.1.3 ความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วเขียว

โดยโปรตีนจากถั่วเขียวมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากอุดมไปด้วยกรดอะมิโน โปรตีน กลูตาเมต อาร์จินีน ลิวซีน และ ฟีนิลอะลานีน ดังนั้นจึงถือได้ว่าเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และยังพบว่าสามารถย่อยและดูดซึมได้ง่าย [28] นอกจากนี้โปรตีนถั่วเขียวยังช่วยเพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเพปไทด์ของถั่วเขียว โดยทั่วไป เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 2-7 ตัว ซึ่งได้จากเทคนิค ultrafiltration และ chromatography หลังจากไฮโดรไลเซตโดยใช้เอนไซม์หรือย่อยสลายด้วยการหมัก [42] ปัจจุบันมีการรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [43] ป้องกันโรคเบาหวาน [44] ป้องกันความดันโลหิตสูง [45] ต้านมะเร็ง [5] ด้านการอักเสบ [46] และช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน



ภาพที่ 2-3 แผนผังการเตรียมโปรตีนถั่วเขียวให้เป็นเปปไทด์ถั่วเขียว

#### 2.1.2.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การศึกษาพบว่าเปปไทด์จากโปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, hydroxyl, superoxide และ FRAP ซึ่งสามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) (Wen et al., 2020; Wong et al., 2020). เช่น

Sonklin และคณะ (2018) ศึกษาลักษณะประสาธสัมพันธ์ทางด้านกลีรสรและการต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน จากผลการศึกษาพบว่า ที่เอนไซม์ 15% เอนไซม์โบรมิเลน (w/w) ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa พบกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำสูง (Hydrophobic amino acid) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> ได้ร้อยละ 80 และ 95 ตามลำดับ [47]

Sonklin และคณะ (2018) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ที่แยกตามน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด (น้อยกว่า 1 kDa) หรือ F4 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด โดยสามารถต้านอนุมูล DPPH<sup>•</sup> มีค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ

0.53 mg/mL, superoxide, hydroxyl มีค่าการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 54.50 และ 65.10 ตามลำดับ [48]

Sonklin และคณะ (2021) ศึกษาการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน พบว่าที่สภาวะเอนไซม์ 15% (w/w) pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง และเมื่อนำไปหาลำดับเปปไทด์ พบเปปไทด์ทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ HC, CGN, LAN, CTN, LAF, CSGD, MMGW, QFAAD, ERF, EYW, FLQL และ QFAW โดยพบว่าเปปไทด์ CTN, HC, CGN และ CSGD ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> โดยมีค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.30, 0.29, 0.28, และ 0.30 mg/mL ตามลำดับ เปปไทด์ LAF, HC, CTN, CGN และ CSGD ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl โดยมีค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.31, 0.56, 0.64, 0.74 และ 0.78 mg/mL ตามลำดับ และนอกจากนี้ ยังพบว่าเปปไทด์ LAF มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide สูงที่สุด โดยมีค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.02 mg/mL รวมถึงเปปไทด์ HC, CSGD และ CTN มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP โดยมีค่าเท่ากับ 0.71, 0.16 และ 0.11 ตามลำดับ [49]

Lui และคณะ (2022) ศึกษาการประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวร่วมกับการใช้คลื่นเสียงพลังงานสูง โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) เพื่อประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหารในเชิงของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการวิจัย พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดน้อยกว่า 4.9 kDa สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> (mg/mL) ของ ABTS<sup>•+</sup>, hydroxyl และ FRAP เท่ากับ 0.1087, 1.796, 1.003 mg/mL และ 0.185 (mM Fe<sup>2+</sup>) ตามลำดับ เนื่องจากพบว่าประกอบด้วยอะโรมาติกและกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acid) ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว [50]

Xie และคณะ (2019) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup>, hydroxyl และ superoxide ได้ร้อยละ 74.23, 58 และ 72 ตามลำดับ [24]

Xia และคณะ (2020) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว โดยใช้เอนไซม์ protease พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จากนั้นเมื่อนำไปหาลำดับของเปปไทด์ พบว่ามีเปปไทด์ 7 ชนิด ที่ให้ฤทธิ์ในการต้าน

อนุมูลอิสระที่สูง ได้แก่ Trp-Asn (WN), Trp-Gly-Asn (WGN), Ala-Trp (AW), Arg-Gly-Trp-Glu (RGWYE), Phe-Trp (FW) และ Gly-Val-Pro-Trp (GVPPFW) จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เพปไทด์ RGWYE, FW และ GVPPFW มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ร้อยละ 57.19, 45.02 และ 44.36 เพปไทด์ WGN และ RGWYE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl ร้อยละ 32.16 และ 27.74 ตามลำดับ นอกจากนี้เพปไทด์ Ala-Trp และ WN มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ร้อยละ 41.02 และ 39.59 ตามลำดับ เนื่องจากในสายเพปไทด์มีองค์ประกอบของ hydrophobic amino acid สูง นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน Asp (D), Pro (P), Tyr (Y) และ Trp (W) สามารถช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยการให้โปรตอนไปยังอนุมูลอิสระทำให้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ [51]

Zheng และคณะ (2020) ศึกษาลักษณะทางกายภาพและการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวมีความเข้มข้นในช่วง 8.67 ถึง 16.22 µg/mL ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 [52]

#### 2.1.2.2 ความสามารถในการลดความดันโลหิต (Anti-hypertensive)

การศึกษาพบว่าเพปไทด์จากโปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการลดความดันโลหิต เช่น

Sonklin และคณะ (2020) ศึกษาความสามารถในการลดความดันโลหิตโดยยับยั้งเอนไซม์ ACE และเรนิน จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว ผลการศึกษาพบว่า เพปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa สามารถยับยั้งเอนไซม์ ACE และ เรนิน ซึ่งพบ 5 เพปไทด์ ได้แก่ LPRL, YADLVE, LRLESF, HLNWVEN และ PGSGCAGTDL โดยเฉพาะเพปไทด์ LRLESF สามารถยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.4 µM ซึ่งตรงข้ามกับเพปไทด์ YADLVE สามารถยับยั้งเรนินได้สูงสุดที่ร้อยละ 97% [23]

Karami และคณะ (2022) ศึกษาความสามารถในการลดความดันโลหิตจากโปรตีนไฮโดรไลเซตถั่วเขียว โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ Alcalase และ Flavourzyme จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์ Alcalase มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้สูงสุด ร้อยละ 91.83 และมีค่า IC<sub>50</sub> ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 48.7±2.5 µg/mL โดยพบเพปไทด์ทั้งหมด 5 เพปไทด์ ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1 kDa ได้แก่ เพปไทด์ FNKKPQ, FDSSEPPQ, LLPQLR, NGAFPPQ และ LTRPPQ เพปไทด์เหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้ง ACE เนื่องจากมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็ก ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acid) เช่น Proline และ Leucine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักในสายเพปไทด์

นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่ากรดอะมิโน Tyrosine, Tryptophan, Phenylalanine และ Proline อยู่บริเวณปลายสาย C-terminal ของสายเพปไทด์ จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้ง ACE [45]

### 2.1.2.3 ความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การศึกษาพบว่าเพปไทด์จากโปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการต้านการอักเสบ เช่น

Diao และคณะ (2019) ศึกษาการการเพิ่มภูมิคุ้มกันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว (Mung Bean Protein Hydrolysate, MBPH) โดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ Alcalase, Trypsin, Neutrase และ Flavourzyme ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 1,450 Da มีฤทธิ์ยับยั้งตัวกลางการอักเสบที่มีความรุนแรงโดยขึ้นกับขนาดของปริมาณที่ใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว โดย MPH ที่ขนาดความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/mL}$  สามารถยับยั้งการปล่อย NO ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยการลดการแสดงออกของ iNOS รวมถึง อินเตอร์ลิวคิน (IL)-6 และ IL-1 $\beta$  ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ร้อยละ 52.6, 53.2, 48.4 และ 49.7 ตามลำดับในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้ MBPH ยังช่วยเพิ่มการหลั่ง IL-10 จาก 789 เป็น 3,678 pg/mL นอกจากนี้ MBPH ยังสามารถยับยั้งการย้ายตำแหน่งของโปรตีน NF- $\kappa$ B ในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยการยับยั้ง I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation ซึ่งกระบวนการนี้ช่วยป้องกันการย้ายตำแหน่งของโปรตีน p65 เข้าสู่ นิวเคลียส ดังนั้นกลไกที่เป็นไปได้ของ MBPH คือการควบคุมการแสดงออกของปัจจัยการอักเสบผ่านทางเส้นทาง NF- $\kappa$ B ซึ่งช่วยยับยั้งปฏิกิริยาของการเกิดการอักเสบ ซึ่งสรุปได้ว่ากลไกการเกิดการอักเสบเกิดจาก เมื่อมาโครฟาจ (Macrophage) ถูกกระตุ้นด้วย LPS ปล่อย cytokine หลายชนิด เพื่อมาป้องกันเซลล์ รวมถึง cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 [53] และไซโตไคน์ที่ต่อต้านการอักเสบ เช่น IL-10 (Rodríguez-Carrio, Fernandez, Riera, & Suárez, 2014) โดย MBPH จะไปกระตุ้นปฏิกิริยาให้เพิ่มภูมิคุ้มกันในมาโครฟาจ ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิต IL-1 $\beta$  และ IL-6 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยเสริมการผลิต IL-10 ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยพบในเพปไทด์โปรตีนจากอัลมอนต์ที่ยับยั้งการผลิต IL-1 $\beta$  [54] นอกจากนี้ยังมี NF- $\kappa$ B เป็นตัวควบคุมหลักของกระบวนการหลายๆ อย่าง รวมถึงการตอบสนองการอักเสบของเซลล์ การแบ่งแยกเซลล์ และการตายของเซลล์ (Bauerle & Baltimore, 1996) เมื่อ I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and p65 ย้ายตำแหน่งเข้าสู่ นิวเคลียสเป็นสัญญาณของการ NF- $\kappa$ B ถูก

activate NF- $\kappa$ B pathways ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนในนิวเคลียส ทำให้เกิดการปลดปล่อย cytokine เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังนั้น MBPH ลดการผลิต cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่ง MBPH จะไปบล็อก NF- $\kappa$ B pathways โดยการลดการย้ายตำแหน่งของ p65 เข้าสู่นิวเคลียสและการยับยั้ง I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation ดังนั้น MBPH สามารถยับยั้งการอักเสบได้อาจเนื่องมาจากขนาดของน้ำหนักรโมเลกุลซึ่งมีอิทธิพลต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกัน โดยโปรตีนที่มีน้ำหนักรโมเลกุลต่ำจะมีการออกฤทธิ์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันที่มีสูงกว่าโปรตีนน้ำหนักรโมเลกุลมาก [55] MBPH มีศักยภาพในการนำไปใช้พัฒนาอาหารเสริมที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ [56]

Diao และคณะ (2022) ศึกษาความต่างขนาดของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว (MBPH) ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ใน RAW 264.7 รวมถึงทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบในหลอดทดลอง เมื่อนำ MBPH มาทำการแยก fractions ด้วย chromatography sephadex G15 จะได้ MBPH แบ่งเป็น 3 ขนาด ได้แก่ MBPH-I (2400.58 Da), MBPH-II (1900.41 Da) และ MBPH-III (1165.28 Da) จากผลการทดลองพบว่า RAW 264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เวลาต่างกัน ได้แก่ 2, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง โดย LPS จะทำให้เกิดการผลิต cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ได้แก่ IL-6, IL-1 $\beta$ , และ TNF- $\alpha$  ในมาโครฟาจ แต่เมื่อได้รับการรักษาด้วย MBPH-I, MBPH-II และ MBPH-III พบว่า MBPH-III ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยสุด มีความสามารถในการยับยั้งที่สูงกว่า MBPH กลุ่มอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย MBPH สามารถช่วยลดการปลดปล่อย IL-6, IL-1 $\beta$ , และ TNF- $\alpha$  ที่เกินกว่าปกติในเซลล์มาโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS ได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบได้สูงสุดอยู่ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่ม MBPH-III ลดการแสดงออกของ p65 และ I $\kappa$ B $\alpha$  ในมาโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS สูงกว่าในกลุ่มอื่น ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดที่แตกต่างกันของ MBPH ส่งผลต่อการยับยั้ง I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation ซึ่งแสดงว่า MBPH มีผลต่อการยับยั้ง phosphorylation I $\kappa$ B $\alpha$  นำไปสู่การยับยั้ง NF- $\kappa$ B ซึ่งอาจจะคาดการณ์ได้ว่าความสามารถในการต้านการอักเสบของ MBPH เกิดจากการยับยั้งเส้นทาง NF- $\kappa$ B จากผลจะเห็นได้ว่า MBPH มีความสามารถในการต้านการอักเสบที่ดี ซึ่งขึ้นอยู่กับ ความยาว ลำดับและองค์ประกอบของกรดอะมิโน [57] จากผล MBPH-III มีขนาดน้ำหนักรโมเลกุลน้อยกว่า 1165 Da มีฤทธิ์ในการต้านปรับภูมิคุ้มกันและต้านการอักเสบที่ดี เนื่องจากขนาดของน้ำหนักรโมเลกุลที่เล็กของ MBPH-III ซึ่งช่วยให้ช่วยให้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และส่งไปยังเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น [58] นอกจากนี้ยังมีการยืนยันจากการศึกษาหลายฉบับพบว่า น้ำหนักรโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตสัมพันธ์กับกิจกรรมทางภูมิคุ้มกัน

ของมัน [59] รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ พบว่าเคซีนจากวัวประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสองชนิด คือ Leu-Leu-Try และ Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Tyr (Zeng et al, 2004) ยืนยันว่า hexapeptides ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองมีความสามารถในการกระตุ้นการจับกินของมาโครฟาจ เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกันเหล่านี้มีลักษณะเป็นน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า MBPH ช่วยเพิ่มมาโครฟาจและยับยั้งไซโตไคน์ เช่น IL-1 $\beta$ , IL-6, และ TNF- $\alpha$  ที่ก่อให้เกิดการอักเสบในเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่แข็งแกร่งที่ 12 ชั่วโมง และยับยั้งการย้ายตำแหน่งของโปรตีน p65 ไปยังนิวเคลียส, IKK $\alpha$  phosphorylation และการยับยั้งเส้นทางสัญญาณของ NF-KB. [4]

#### 2.1.2.4 ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer)

การศึกษาพบว่าเปปไทด์จากโปรตีนถั่วเขียวมีความสามารถในการต้านมะเร็ง เช่น

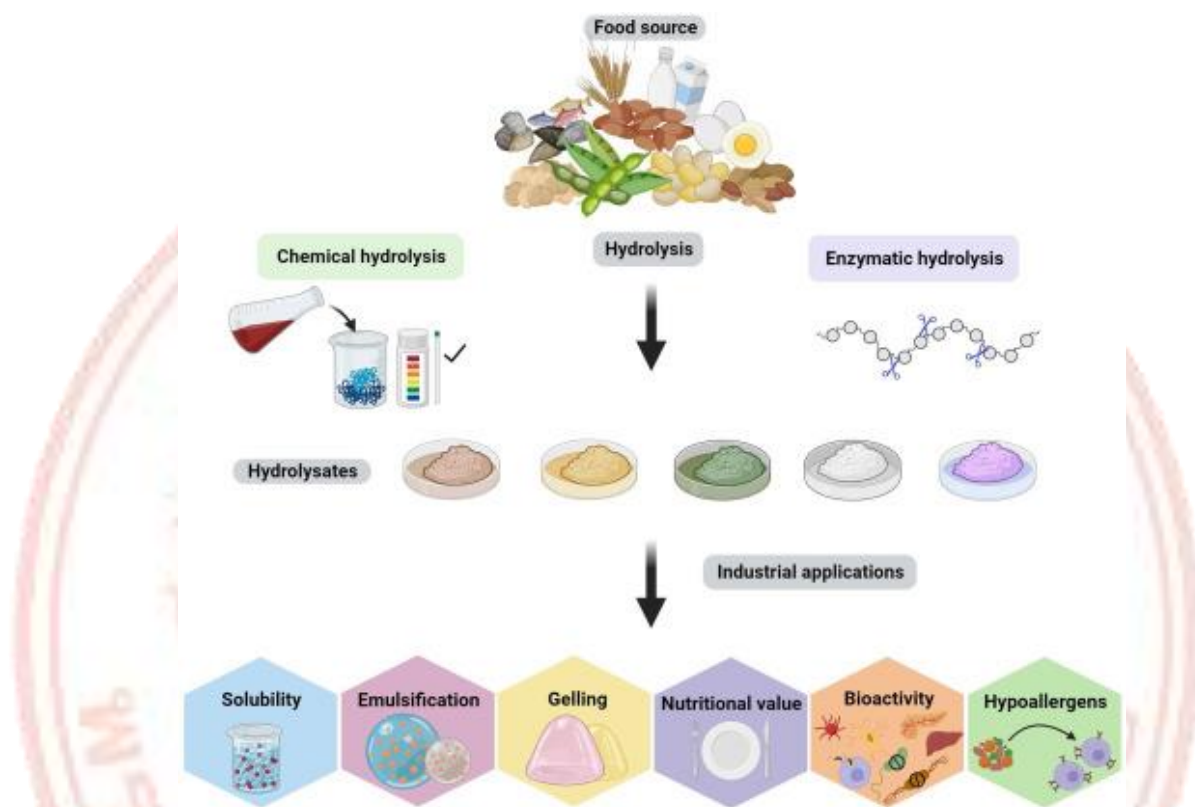
Li และคณะ (2019) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งมะเร็งตับของเปปไทด์จากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์ปาเปน ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเขียวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในหนูทดลอง ยังช่วยเพิ่มค่าเม็ดเลือดขาวช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในหนู รวมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงสุดร้อยละ 86.35 ที่ความเข้มข้น 2.99 mg/mL นอกจากนี้ยังพบลำดับของเปปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 เปปไทด์ 4 ชนิด ได้แก่ VEGINKIVTGNL, PQGEVSTSVAAOQ, LAFGINAENNQRN และ EGAPLEDIAEEEEQ ที่มีการยับยั้งของเซลล์มะเร็งในสัดส่วนที่สูง ซึ่งลำดับเปปไทด์เหล่านี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโน ได้แก่ กลูตาเมต (Glu) แอสพาราจีน (Asn) และกลูตามีน (Gln) และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ ไกลซีน (Gly) อะลานีน (Ala) วาลีน (Val) และไอโซลูซีน (Ile) โดยเฉพาะส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acid) ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 โดยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์สามารถในการต้านมะเร็งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 3-25 ตัว [60] จากรายงานพบเปปไทด์ที่ได้จากพืชที่สามารถต้านมะเร็ง ได้แก่ เปปไทด์ (EQRPR) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งถูกแยกออกจากรำข้าว [61] เปปไทด์สามชนิด (EDLPGCPRE, AAFVWAGT และ LTKYNITT) จากข้าวโพด ซึ่งมี Glu, Pro, Ala, และ Thr เป็นกรดอะมิโนหลัก มีผลในการควบคุม ROS และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HepG2 [62] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเปปไทด์ที่มี

Glu สูงเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลองได้ [63] โดยการศึกษาที่เพิ่มเติม พบว่าเปปไทด์จากอาหารมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และกรดอะมิโนหลักในเปปไทด์เหล่านี้คือกรดอะมิโนที่มีลักษณะไฮโดรโฟบิก เช่น Gly, Leu, Ala, และ Pro รวมถึงกรดอะมิโนหนึ่งตัวหรือมากกว่านั้น เช่น Glu, Lys, Arg, และ Thr [64] [65] [60] กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจะสามารถเพิ่มการมีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งกับชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็ง (Lipid bilayers) ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง [64] [66] อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งยังไม่ชัดเจน แต่สามารถคาดการณ์ได้ว่า เปปไทด์จากถั่วเขียวมีกรดอะมิโนที่พบร่วมในเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในต้านมะเร็งอื่นๆ เพื่อยืนยันผลเหล่านี้เพิ่มเติม เปปไทด์เหล่านี้จำเป็นต้องถูกสังเคราะห์และทดสอบผลการต้านมะเร็งในสิ่งมีชีวิต ดังนั้น เห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่สำหรับยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ [5]

## 2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysate vegetable protein, HVP)

โปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysate vegetable protein, HVP) หรือ Hydrolysate plant protein (HPP) เป็นผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์ และสารประกอบอื่น ๆ เช่น เกลือ [67] ซึ่งได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนจากพืช โดยที่การไฮโดรไลเซตมาจากไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาเคมีที่พันธะเคมีถูกทำลายหรือทำให้แตกออกจากกัน เนื่องจากการทำปฏิกิริยากับน้ำ โดยสารโมเลกุลชีวภาพ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิก มีความไวต่อการไฮโดรไลซิส ซึ่งโปรตีนในอาหารประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนหนึ่งหรือมากกว่า ซึ่งการจัดเรียงกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ จะกำหนดลักษณะเฉพาะของโปรตีน โปรตีนแต่ละชนิดมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน โดยกรดอะมิโนเชื่อมโยงกันด้วยพันธะเปปไทด์ ในสายโซ่โพลีเปปไทด์ [68] ดังนั้น HVP ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารเสริมกลิ่นรส (flavor enhancer) ของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกับสารประกอบที่เกิดขึ้นในระหว่างการหุงต้ม อีกทั้ง HVP ยังสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยตรง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีในอาหารแปรรูปต่าง ๆ หลายชนิดทั้งอาหารคาวและหวานทั้งในรูปแบบของซूपก้อน ซอส ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นมและกาแฟ นอกจากนี้จะเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสยังในการเพิ่มคุณสมบัติของอาหารหรือโปรตีนในอาหาร เช่น ความสามารถในการละลาย (Solubility) ปรับปรุงคุณสมบัติการทำงาน เช่น การเกิดโฟม (Foaming), ความเป็นอิมัลชัน (Emulsion) และการก่อตัวเป็นเจล

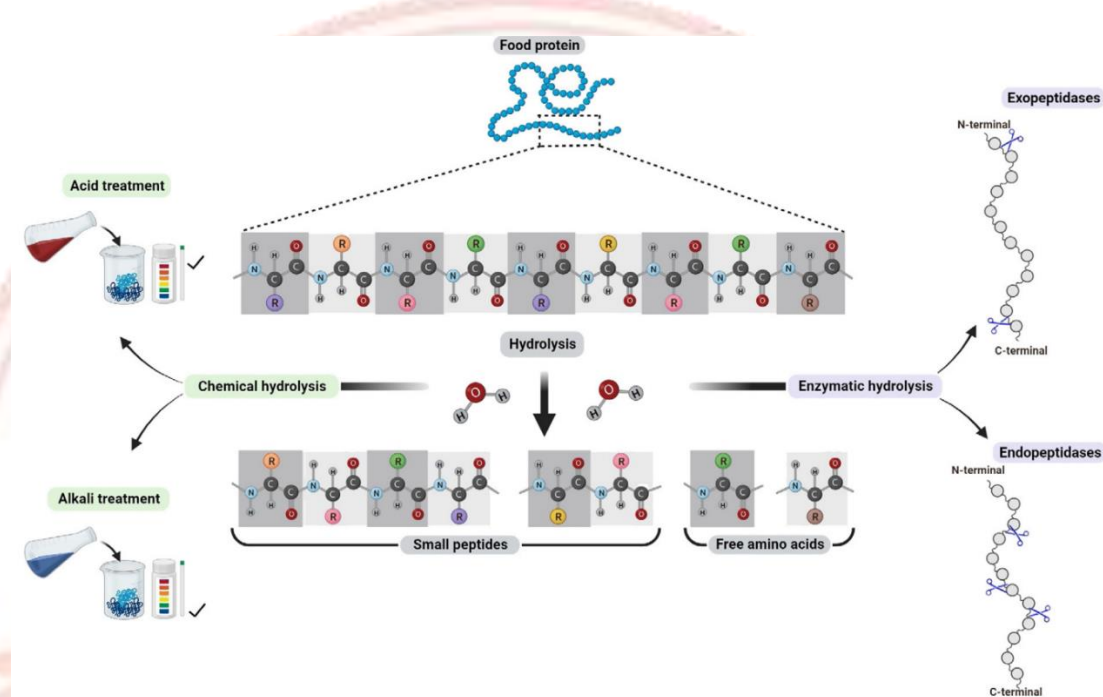
(Gelation) รวมถึงการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ต้านอนุมูลอิสระ หรือส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน



ภาพที่ 2-4 แผนผังการไฮโดรไลซิสเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีน

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต HVP เป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาไม่แพง ตัวอย่างของแหล่งโปรตีนจากพืชที่ใช้ในการผลิต HVP เช่น ทานตะวัน [69] มันหวาน [70] ข้าวโพด [71] ถั่วเหลือง [7] และถั่วเขียว [72] เป็นต้น โดยถั่วเขียวมีมากในประเทศไทย ส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมวุ้นเส้น ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นแป้ง (starch) เท่านั้นส่วนกากถั่วเขียวที่เหลือจากการแยกแป้งออกไป มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 70 (น้ำหนักแห้ง) [73] ดังนั้น การนำเอากากถั่วเขียวที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาผลิตเป็น HVP จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรรวมทั้งช่วยลดมลพิษด้านสิ่งแวดล้อม

โปรตีนสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยวิธีการทางเคมีหรือการใช้เอนไซม์ เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ ได้แก่ กรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้น [74] ดังภาพที่ 2-5



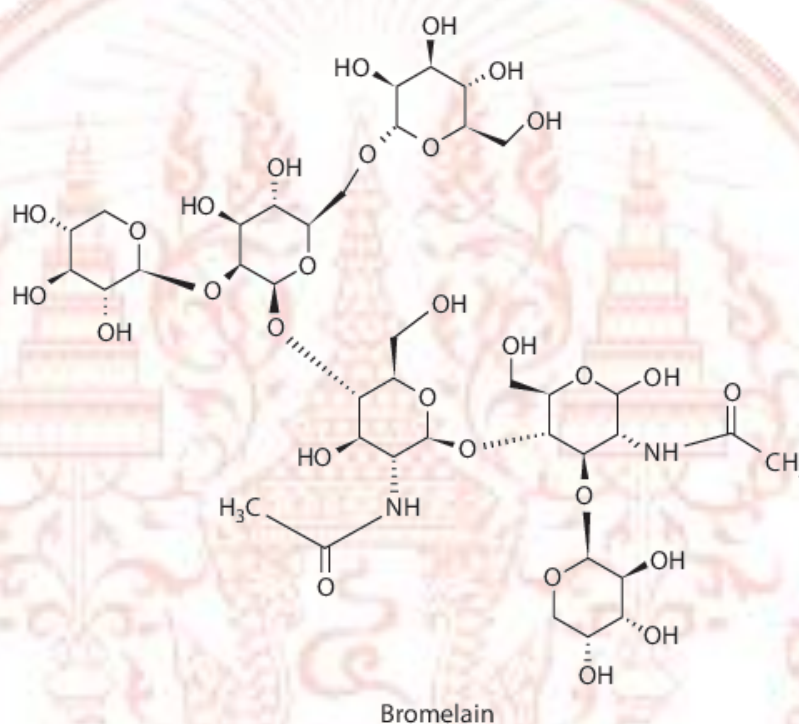
ภาพที่ 2-5 แผนผังประเภทของการไฮโดรไลซิสของโปรตีน

### 2.3 เอนไซม์โบรมิเลน

โบรมิเลน (bromelain) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแกนสับปะรด (pineapple stem) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของสารประเภทโปรตีน จัดอยู่ในกลุ่มของซิสเตอีน ซึ่งเป็น endopeptidases เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ โดยเอนไซม์โบรมิเลนนั้นพบได้ในส่วนเนื้อเยื่อ ลำต้น ผล และใบของสับปะรด โดยพบในส่วนของเนื้อมากที่สุด คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลน (E.C. 3.4.22.32) เป็นสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน (glycoprotein) โดยมีส่วนโมเลกุลของโอลิโกแซ็กคาไรด์หนึ่งกลุ่มต่อหนึ่งโมเลกุลเอนไซม์ โดยในหนึ่งกลุ่มจะประกอบด้วยน้ำตาล แมนโนส 3 โมล (mannose) กลูโคส 1 โมล (glucose) ไกลโคส 1 โมล (xylose) และเอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) 2 โมล ต่อ 1 โมเลกุลของโบรมิเลน ซึ่งจับคู่

อยู่กับสายพอลิเพปไทด์ด้วยพันธะโควาเลนต์ [75] ซึ่งสายพอลิเพปไทด์ประกอบไปด้วยเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 285 ตัว ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีกรดอะมิโนที่เป็นเบสมากกว่ากรด ในโมเลกุลของเอนไซม์จะมีไกลซีน (glycine) อยู่ทางด้าน C-terminal และวาลีน (valine) อยู่ทางด้าน N-terminal โมเลกุลประกอบด้วย disulfide bridge 5 ตำแหน่งต่อโมเลกุล แต่จะมีกลุ่มซัลไฟดริลเพียง 1 กลุ่มต่อโมเลกุล ซึ่งจำเป็นสำหรับเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ [76] รูปที่ 2-7 โครงสร้างของเอนไซม์โบรมิเลน

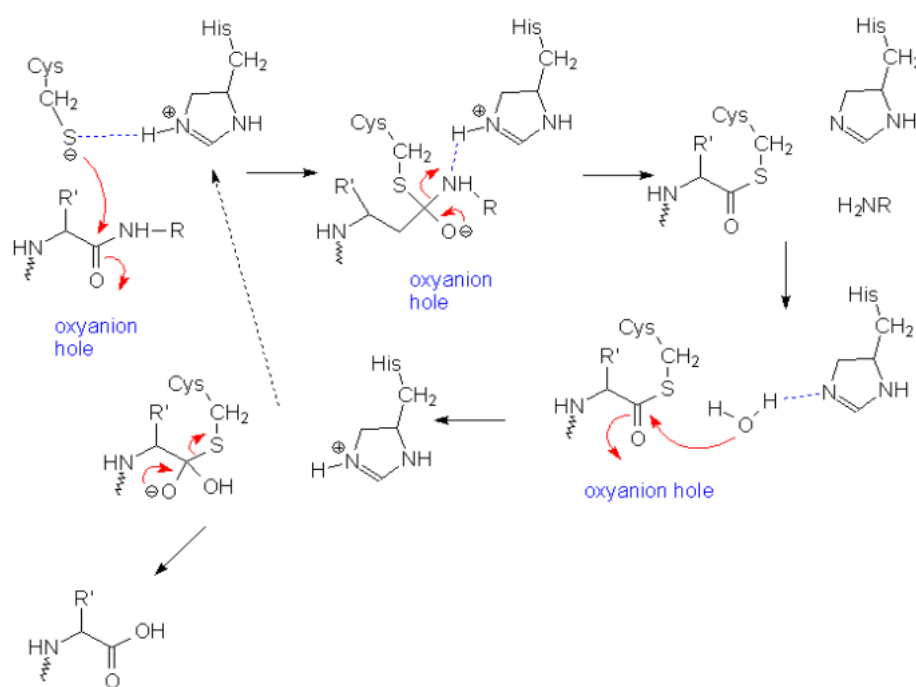


ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของ Bromelain (Khalid และคณะ, 2016)

### 2.3.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายประเภทโปรตีน โดยจะทำงานได้ดีในช่วง pH = 6.0-7.5 ซึ่งในการเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นจะใช้กลุ่มไทออล (-SH) ของซิสเตอีน และกลุ่มอิมิดาโซล (imidazole group) อยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) ดังรูปที่ 2-8 ทำให้เกิดการย่อยพันธะของสารตั้งต้น โดยมีหมู่คาร์บอกซิลทำหน้าที่เป็น general acid ส่วนหมู่อิมิดาโซลทำหน้าที่เป็น general base กลไกการทำปฏิกิริยาอธิบายได้คือ หมู่อิมิดาโซลดึง  $H^+$  ของหมู่ -SH- ทำให้ S ในหมู่ -SH เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิล (-CO-) ในซับสเตรตได้ง่ายและรวดเร็ว เกิดเป็น ES complex จากนั้นหมู่ -SH ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เกิดการหลุดของ acyl (R) เกิดเป็น acyl-enzyme ในรูปของ thiol ester (ES-CO-R) ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า acylation จากนั้น ES-CO-R เข้า

สู่ขั้นตอน diacylation โดยหมู่ฮิสตามีนทำหน้าที่เป็นเบส แยก  $H^+$  ออกจากน้ำ  $OH^-$  ของน้ำเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลใน acyl-enzyme มีผลให้เกิดการหลุดของหมู่ acyl คือ  $HO-OC-R$  และเอนไซม์ (E.SH) กลับคืนสู่สภาวะปกติ [77] ซึ่งจุดตัดพันธะเพปไทด์ของโบรมิเลน คือ บริเวณไลซีน อะลานีน ไทโรซีน และไกลซีน [78]



ภาพที่ 2-7 กลไกการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน (Hale และคณะ, 2005)

### 2.3.2 ประโยชน์เอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประเภทโปรตีนได้ เช่น เนื้อวัว หมู ไก่ เป็นต้น ปัจจุบันความต้องการของเอนไซม์โบรมิเลนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ทำให้เนื้อนุ่ม ใช้ในการผลิตเบียร์ เพื่อช่วยป้องกันการเกิดความขุ่นของเบียร์ขณะเก็บรักษา [79] รวมถึงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต [80] อีกทั้งยังช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติการย่อยสลายของเส้นใยโปรตีน [81] และการย่อยสลายหรือละลายเส้นใยโปรตีนบางส่วนจากไหมและขนสัตว์ [81], [82] สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยในเครื่องสำอางโบรมิเลนถูกใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าและผิวกาย [83] ช่วยทำให้ผิวนุ่มและเนียนขึ้น [84] นอกจากนี้โบรมิเลนยังถูกนำมาใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม มีการใช้เอนไซม์โบรมิเลนในตัวยาช่วยย่อยอาหาร ยาถ่ายพยาธิ [85] ใช้เป็นยาแก้แสบ [86] รักษา

อาการอักเสบในช่องปากสำหรับผู้ป่วยมะเร็ง [87] ยับยั้งการแข็งตัวของเกล็ดเลือด ไซนัสอักเสบ แผลผ่าตัด [88] โรคร้ายและการย่อยอาหาร รวมถึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก [89] อีกทั้ง โบรมิเลนสามารถดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ได้ง่ายและไม่สูญเสียกิจกรรมทางชีวภาพ [87], [90]

การที่โบรมิเลนมีความสามารถในการตัดจำเพาะที่กว้าง จึงมีการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนอย่างเช่น Wagner และ Ortiz (2002) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีน ถั่วเหลืองศึกษาเชิงโครงสร้าง สมบัติ การละลาย และสมบัติการเพิ่มฟองโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน พบว่าเมื่อปรับ pH เท่ากับ 8.0 และให้ ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แก่โปรตีน ถั่วเหลืองก่อนไฮโดรไลซ์ เป็นการเพิ่มคุณสมบัติการละลายของโปรตีนและการเกิดฟองได้ การลดความเป็นอะโรมาติกของเพปไทด์ลงจะช่วยเพิ่มการละลายของเพปไทด์ได้ [91]

## 2.4 สารให้กลิ่นรส

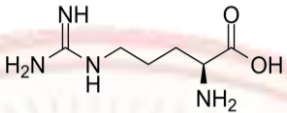
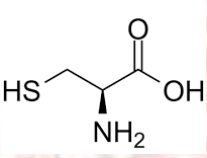
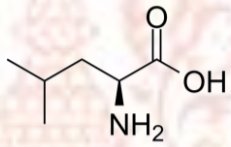
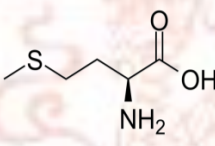
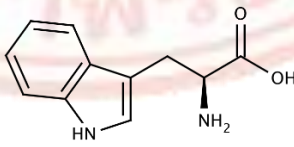
สารปรุงแต่งกลิ่นรสถูกสร้างขึ้นจากสารตั้งต้นโดยผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดหรือปฏิกิริยาการให้ความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการแปรรูปและการเตรียมอาหาร เช่น การทำอาหาร ได้แก่ การย่าง การอบ การทอด การปิ้ง การต้ม [92], [93] สารตั้งต้นจึงมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารแต่งกลิ่นรส ในกระบวนการรวมถึงกรดอะมิโน น้ำตาลรีดิวซ์ วิตามินและนิวคลีโอไทด์และสารประกอบอื่น ๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น dialdehydes เป็นต้น [94]

โดยการย่อยสลายโปรตีนจากพืช (HVP) ได้องค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์ โดยสารที่ให้รสอาหารส่วนใหญ่ได้แก่ กรดอะมิโน เพปไทด์ น้ำตาลรีดิวซ์ วิตามินและนิวคลีโอไทด์ชนิดต่าง ๆ โดยสารเหล่านี้สามารถเกิดเป็นสารประกอบให้กลิ่นรสเนื้อ และปลดปล่อยกลิ่นในระหว่างกระบวนการให้ความร้อน [95]

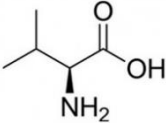
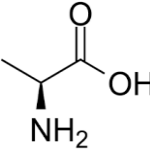
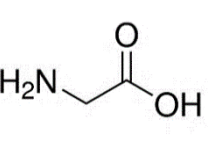
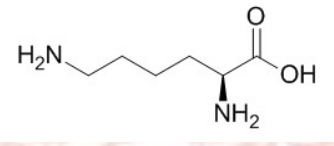
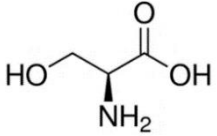
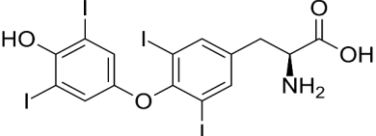
### 2.4.1 กรดอะมิโน

กรดอะมิโนเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการกำหนดคุณสมบัติของกลิ่นรสในกระบวนการ [96] โดยกรดอะมิโนแต่ละชนิดให้กลิ่นรสที่แตกต่างกัน [97] เช่น รสหวาน ขม อูมามิ เปรี้ยว หรือเค็ม [98] ดังตารางที่ 2-6

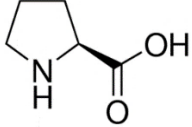
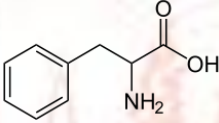
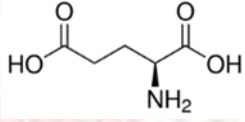
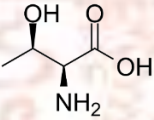
ตารางที่ 2-5 รสชาติของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบ L-form

| กรดอะมิโน  | สูตรโครงสร้าง                                                                        | รสชาติ       |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| อาร์จินีน  |     | หอมหวาน      |
| ซิสเตอีน   |     | เค็มเล็กน้อย |
| ลิวซีน     |    | ขม           |
| เมทไธโอนีน |   | หวาน ขม      |
| ทริปโตเฟน  |  | ขมเล็กน้อย   |

ตารางที่ 2-5 รสชาติของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบ L-form (ต่อ)

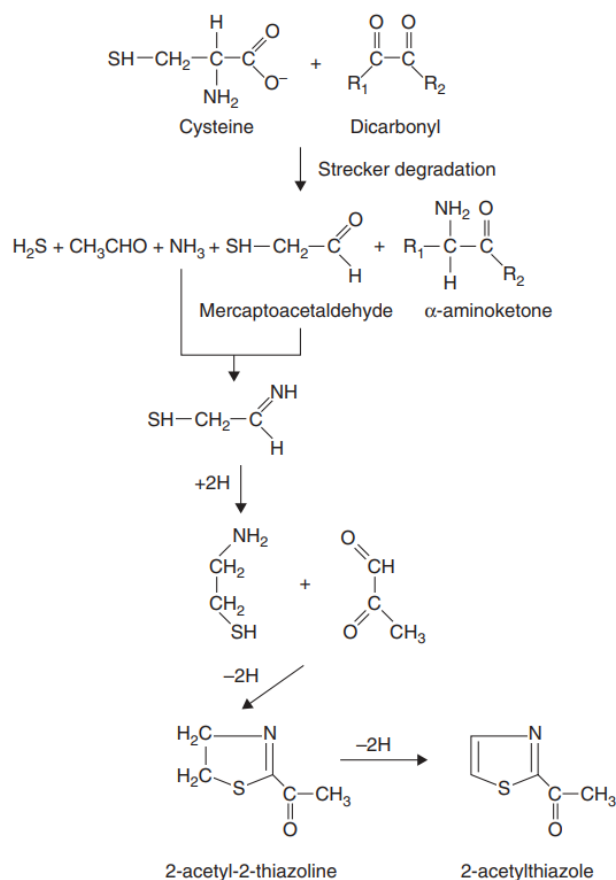
| กรดอะมิโน | สูตรโครงสร้าง                                                                        | รสชาติ          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| วาลีน     |     | หวานขม          |
| อะลานีน   |     | หอมหวาน         |
| ไกลซีน    |     | ขม              |
| ไลซีน     |  | กลิ่นสดเล็กน้อย |
| กรดอะมิโน | สูตรโครงสร้าง                                                                        | รสชาติ          |
| เซอรีน    |   | หวานเปรี้ยวมาก  |
| ไทโรซีน   |  | ไม่มีกลิ่นรส    |

ตารางที่ 2-5 รสชาติของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบ L-form (ต่อ)

| กรดอะมิโน    | สูตรโครงสร้าง                                                                       | รสชาติ          |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| โพรลีน       |    | หวานและขมมาก    |
| ฟีนิลอะลานีน |    | ขม              |
| กรดกลูตามิก  |   | หวานอมเปรี้ยว   |
| ทรีโอนีน     |  | หวาน เปรี้ยว ขม |

ที่มา : Dzanic และคณะ (1985)

โดยสารตั้งต้นที่ใช้ในอุตสาหกรรมกระบวนการผลิตรสชาติ (process flavors) ส่วนใหญ่มักเป็นซิสเตอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นแหล่งกำมะถันในการสร้างกลิ่นรสเนื้อ โดยมีกระบวนการสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสดัง ภาพที่ 2-9



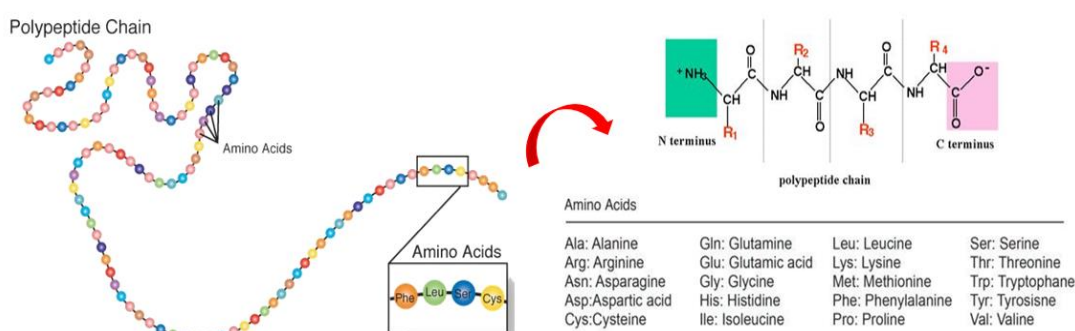
ภาพที่ 2-8 การก่อตัวของสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีซัลเฟอร์โดยผ่าน Strecker degradation

งานวิจัยจำนวนมากได้แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนมีความจำเป็นในกระบวนการผลิตรสชาติ [99], [100], [101] เช่น ซิสเตอีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสได้กลิ่นรสเนื้อ เช่น ฟูแรนไธออล (furanthiols) [99] นอกจากกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เป็นตัวหลักในการให้กลิ่นรสสำคัญแล้ว กรดอะมิโนกลูตามิกและโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตรสชาติเช่นเดียวกัน โดยชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในสายโปรตีน ส่งผลต่อกลิ่นรสที่แตกต่างกัน โปรตีนจากถั่วเขียวมีองค์ประกอบของ อาร์จินีน ซิสเตอีน ลิวซีน ฟินีลอะลานีน แอสพาร์ติกและกลูตามิกที่สูง จึงทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากถั่วเขียวมีรสชาติหวาน เค็ม ขม เล็กน้อย และมีรสชาติที่ร่อยหรอหรืออูมามิ [72] นอกจากนี้ยังมีโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายพบว่า มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเทอริน อาจีนีน และ อะลานีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวาน กลูตามิก และแอสพาร์ติกเป็นกรดอะมิโนให้รสอูมามิ ดังนั้นรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายจึงมีรสหวานและรสอูมามิ [102] โปรตีนไฮโดรไลเซตจากดอกทานตะวันมีองค์ประกอบของ อาร์จินีน เมทไธโอนีน และฮิสทีดีนสูง จึงทำให้รสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีรสชาติค่อนข้างขม [103] ได้

ทำการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเห็ดพบว่าโปรตีนเห็ดมีองค์ประกอบของกลูตามิกและแอสพาร์ติกสูง รสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จึงมีรสชาติอูมามิ [104]

#### 2.4.2 เพปไทด์ (peptide)

ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ มาเชื่อมต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ประมาณ 2-30 กรดอะมิโน โดยโครงสร้างของเพปไทด์จะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกต่อกับหมู่อะมิโนด้วยพันธะเพปไทด์ ภายในสายโปรตีน ดังภาพที่ 2-10



ภาพที่ 2-9 Polypeptide

โดยลำดับและชนิดของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ที่แตกต่างกันส่งผลให้ได้กลิ่นรสแตกต่างกัน ดังเช่นตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 ชนิดและลำดับของเพปไทด์ที่ให้กลิ่นรส

| Type and number of peptides | Amino acid sequence | Source                              | Taste        | Authors                              |
|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| Dipeptides                  | Asp-Ala             | Soy sauce                           | Umami        | Oka and Nagata (1974)                |
|                             | Ala-Asp             | Synthesized                         | Bitter>Umami | Ohyama et al.,1988                   |
|                             | Ala-Glu             | Synthesized                         | Umami        | Ohyama et al.,1988                   |
|                             | Asp-Asp             | Synthesized                         | Salty/Umami  | Tamura et al., 1989                  |
|                             | Asp-Leu             | Synthesized                         | Salty/Umami  | Tamura et al., 1989                  |
|                             | Glu-Asp             | Proteinase-modified soybean protein | Brothy       | Arai et al.,1972                     |
|                             | pGlu-Pro            | Deamidated wheat gluten hydrolysate | MSG-like     | Schlichtherle-Cerny and Amado (2002) |
|                             | Thr-Glu             | Fish protein                        | MSG-like     | Noguchi et al.,1975                  |
|                             | Val-Asp             | hydrolysate                         | Bitter>Umami | Ohyama et al.,1988                   |
|                             | Val>Glu             | Synthesized                         | Umami>Bitter | Ohyama et al.,1988                   |

ตารางที่ 2-6 ชนิดและลำดับของเปปไทด์ที่ให้กลิ่นรส (ต่อ)

| Type and number of peptides | Amino acid sequence | Source                              | Taste             | Authors                              |
|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Tripeptides                 | Ala-Asp-Ala         | Synthesized                         | Umami>Bitter      | Ohyama et al.,1988                   |
|                             | Ala-Glu-Ala         |                                     |                   |                                      |
|                             | Ala-Glu-Ser         | Synthesized                         | Umami             | Ohyama et al.,1988                   |
|                             | Glu-Gly-Ser         |                                     |                   | Noguchi et al., 1975                 |
|                             | Leu-Glu-Glu         | Fish protein hydrolysate            | MSG-like          | Arai et al., 1972                    |
|                             | pGlu-Pro-Gln        | Proteinase-modified soybean protein | Brothy            |                                      |
|                             | Val-Glu-Val         | Synthesized                         | Umami             | Frerot and Escher (1998)             |
| Tetrapeptide                | Glu-Ser-Leu-Ala     | Deamidated wheat gluten hydrolysate | MSG-like          | Schlichtherle-Cerny and Amado (2002) |
|                             |                     | Synthesized                         | Umami             | Ohyama et al.,1988                   |
|                             |                     |                                     |                   |                                      |
| Pentapeptide                | Glu-Glu-Asp-Gly-Lys | Synthesized                         | Sour/umami /sweet | Nakata et al.,1995                   |

ตารางที่ 2-6 ชนิดและลำดับของเปปไทด์ที่ให้กลิ่นรส (ต่อ)

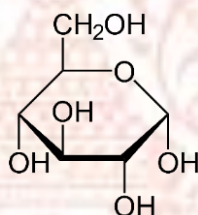
| Type and number of peptides | Amino acid sequence                         | Source             | Taste                                      | Authors                     |
|-----------------------------|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| Hexapeptides                | Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala                     | Synthesized        | Sour > astringent > umami > sweet > bitter | Yamasaki and Maekawa (1980) |
|                             | Cys-Cys-Asn-Lys-Ser-Val                     | Jinhua hams        | Umami                                      | Dang et al.,2014            |
| Heptapeptide                | Ala-His-Ser-Val-Arg-Phe-Tyr                 | Parma hams         | Umami                                      | Dang et al.,2014            |
| Octapeptides                | Lys-Gly-Ser-Leu-Ala-Asp-Glu-Glu             | Synthesized        | Sour/umami/sweet                           | Nakata et al.,1995          |
|                             | Ser-Leu-Ala-Asp-Glu-Glu-Lys-Gly             | Synthesized        | Umami/sour                                 | Nakata et al.,1995          |
|                             | Ser-Ser-Arg-Asn-Glu-Gln-Ser-Arg             | Peanut hydrolysate | Umami                                      | Su et al.,2012              |
| Undecapeptide               | Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Pro-Asp-Gly-Ser-Ser-Arg | Peanut hydrolysate | Umami                                      | Su et al.,2012              |

ที่มา : Zhangและคณะ (2017)

### 2.4.3 น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

#### 2.4.3.1 น้ำตาลกลูโคส

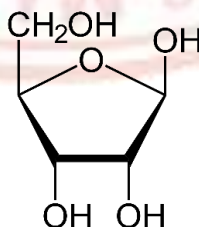
กลูโคส (glucose) อาจเรียกว่า dextrose หรือน้ำตาลองุ่น (grape sugar) เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กที่สุด มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยสายคาร์บอนที่มีการเรียงตัวออกซิเจนและไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 6 อะตอม (hexose) ดังรูปที่ 2-5 น้ำตาลกลูโคสพบมากในผลไม้ที่มีรสหวาน เช่น องุ่น เชอร์รี่ และน้ำผึ้ง โดยกลูโคสมีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลผลไม้ (fructose) และน้ำตาลอ้อย (sucrose) ซึ่งกลูโคสเป็นโมเลกุลพื้นฐานที่สำคัญที่สุดทางโภชนาการเพราะเป็นส่วนประกอบของน้ำตาลที่สำคัญแทบทุกชนิด เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) เป็นต้น โดยน้ำตาลกลูโคสให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรีต่อกรัม ซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบอยู่ในเลือด (blood sugar) ร่างกายสามารถดูดซึมได้เร็ว เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์



ภาพที่ 2-10 โครงสร้างน้ำตาลกลูโคส

#### 2.4.3.2 น้ำตาลไรโบส

ไรโบส (Ribose) จัดเป็นน้ำตาลในกลุ่มอัลโดเพนโทส (aldopentose) เนื่องจากคาร์บอนอยู่ในโมเลกุล 5 อะตอม (รูปที่ 2-6) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) ที่พบมากในกรดนิวคลีอิก โดยเป็นส่วนประกอบของไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA)

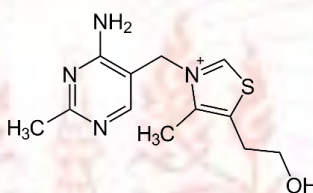


ภาพที่ 2-11 โครงสร้างน้ำตาลไรโบส

Hofmann & Schieberle [99] (1995) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางด้านกลิ่นรสจากปฏิกิริยาระหว่างซิสเตอีนกับน้ำตาลไรโบส ผลจากการศึกษาพบว่า ซิสเตอีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสโดยผ่านปฏิกิริยาความร้อนให้กลิ่นรสเนื้อ [99]

#### 2.4.3.3 วิตามิน (Vitamin)

ไทอามีน (Thiamine) หรือ วิตามินบี 1 เป็นสารตั้งต้นกลิ่นรสที่สำคัญ เมื่อให้ความร้อนจะเกิดการสลายตัวได้เป็นสารประกอบที่เป็นซัลเฟอร์ ซึ่งมีความสำคัญในด้านการให้กลิ่นรสเนื้อ [105]



ภาพที่ 2-12 โครงสร้าง Thiamine

#### 2.4.3.4 ไรโบนิวคลีโอไทด์

ไรโบนิวคลีโอไทด์ (Ribonucleotides) เป็นแหล่งของไรโบสและสารปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น IMP ซึ่งเกิดจาก adenosine-59-triphosphate (ATP) เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นหอมที่สำคัญในการพัฒนากลิ่นรสเนื้อ โดย IMP ช่วยทำให้กลิ่นรสเนื้อสูงขึ้น โดยผ่านปฏิกิริยาความร้อน [106], [107] โดยมีสารประกอบหลัก คือ furfural และ 2-furfurylthiol

#### 2.4.3.5 สารประกอบที่ระเหยได้

กรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญต่อกลิ่นรสในด้านการเป็นสารเริ่มต้น (precursor) ของสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น ฟูราโนน (furanone) ไพราซีน (pyrazines) และสารประกอบซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะกลิ่นรสที่ได้จากสารประกอบแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 2-8 และ 2-9

ตารางที่ 2-7 สารประกอบให้กลิ่นรสหลักในกระบวนการ thermal processing flavor

| Key aromatic compounds | Range of flavor type           |
|------------------------|--------------------------------|
| Aldehyde               | Fruity, Green                  |
| Pyrazines              | Roasted, Green, Popcorn        |
| Furanones              | Sweet caramel                  |
| Furans                 | Sweet-burnt, Rum-like, Roasted |
| Thiazoles/thiazolines  | Cooked onion, Mustard-like     |
| Thiophenes             | Fried onion, Mustard-like      |
| Polysulfides           | Onion, Garlic                  |

ที่มา : Zhang และคณะ (2017)

ตารางที่ 2-8 ลักษณะกลิ่นของสารประกอบชนิดต่าง ๆ ใน HVP จากข้าวกล้อง

| ชนิดของสารประกอบ     | ลักษณะของกลิ่น                     |
|----------------------|------------------------------------|
| 2-Pentyl furan       | Fruity, green, earthy              |
| Octanal              | Aldehydic, citrus with a green     |
| 2-Heptenal           | Green, vegetable, fatty            |
| 1-Hexanol            | Alcoholic, sweet with a green top  |
| Nonanal              | Aldehydic, waxy, citrus            |
| 1-Octen-3-ol         | Earthy, green, fungal              |
| ชนิดของสารประกอบ     | ลักษณะของกลิ่น                     |
| 2-Acetyl-1-pyrroline | Sweet, woody, bread, caramel       |
| 2-Ethyl-1-hexanol    | Citrus, fresh, floral, oily, sweet |
| Benzaldehyde         | Almond, fruity, nutty              |
| 1-Octanol            | Green, floral with a sweet         |
| Benzeneacetaldehyde  | Green, sweet, floral, honey, cocoa |
| Hexanoic acid        | Sour, fatty, sweat, cheese         |
| Phenylethyl alcohol  | Sweet, floral, rose                |
| Sweet, floral, rose  | Sweet, fruity, pineapple, fatty    |

ตารางที่ 2-8 ลักษณะกลิ่นของสารประกอบชนิดต่าง ๆ ใน HVP จากข้าวกล้อง (ต่อ)

| ชนิดของสารประกอบ    | ลักษณะของกลิ่น                |
|---------------------|-------------------------------|
| 1-Dodecanol         | Earthy, fatty, honey, coconut |
| Dodecanoic acid     | Mild fatty, coconut           |
| n-Hexadecanoic acid | Creamy, waxy, fatty           |
| Vanillin            | Sweet, vanilla, creamy        |

ที่มา : Selamassakul (2020)

เนื่องจากกรดอะมิโนและเพปไทด์ที่ได้จากการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตมีกลิ่นรสที่ไม่ชัดเจน ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นกลิ่นไหน บอกได้แค่มีกลิ่นไปขาว ดังนั้นจึงต้องนำมาปรับปรุงให้มีกลิ่นรสเฉพาะและชัดเจน เช่น กลิ่นหมู กลิ่นไก่อบ กลิ่นซีฟู้ด โดยใช้ปฏิกิริยาเมลลาร์ด

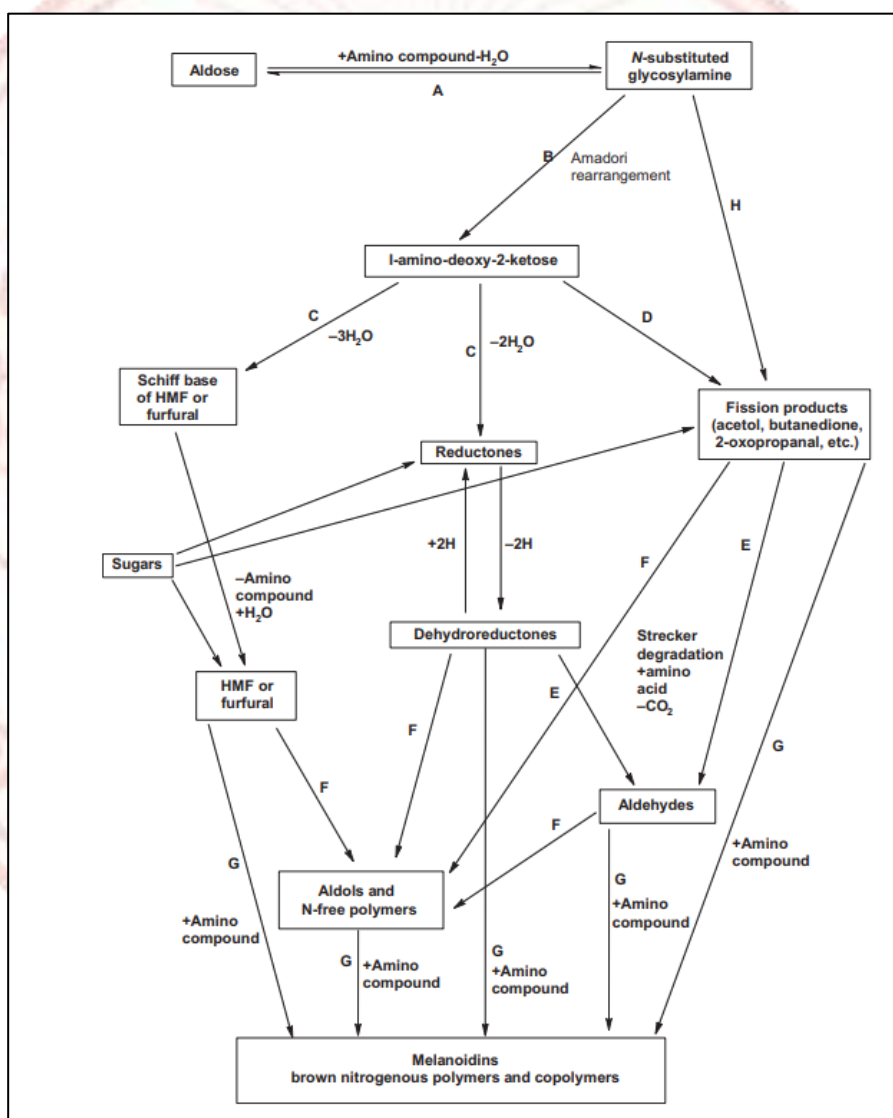
## 2.5 ปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Browning reaction) ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzyme) ในอาหาร สามารถเกิดขึ้นระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร [108] โดยปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ถูกอธิบายครั้งแรกโดยนักวิจัยชาวฝรั่งเศส Louis-Camille Maillard ผู้ค้นพบปฏิกิริยาเมลลาร์ดในปี 1912 ในสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพและการแพทย์ [109] ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างกลุ่มเอมีนของกรดอะมิโน (เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ และโปรตีน) หรือสารประกอบไนโตรเจนใด ๆ ในอาหารกับกลุ่มคาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ อัลดีไฮด์ หรือคีโตน [110] โดยผ่านความร้อน และเรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดว่า MRPs (Maillard reaction products) [6] ซึ่ง MRPs ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบระเหยง่าย (volatile compound) เช่น สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compound) เช่น ไพร์โรล (pyrrole) ฟูแรน (furan) ไทโอฟิน (thiophene) ไพราซีน (pyrazine) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีความสามารถในการให้กลิ่นรสในอาหาร สามารถนำไปประยุกต์ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงยังมีความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ [111]

โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด แบ่งออกเป็นสามขั้นตอนหลัก ได้แก่ ขั้นตอนเริ่มต้น (Initial stage) ขั้นตอนกลาง (Intermediate stage) และขั้นตอนสุดท้าย (Final stage)

- ขั้นตอนเริ่มต้น (Initial stage) ประกอบด้วย Sugar-amine condensation (A) และ Amadori rearrangement (B) ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้จะไม่มีสี

- ขั้นตอนกลาง (Intermediate stage) ประกอบด้วย Sugar dehydration (C), Sugar fragmentation (D) และ Strecker degradation (E) ซึ่งผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน
- ขั้นตอนสุดท้าย (Final stage) ประกอบด้วย Aldol condensation (F), Aldehyde-amine polymerization และการสร้างสารประกอบ Heterocyclic ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Heterocyclic nitrogen) (G) ซึ่งผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้มีสีน้ำตาลเข้มอย่างชัดเจน



ภาพที่ 2-13 ปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์/รด์ (MRPs) สามารถใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการละลาย อิมัลซิไฟเออร์ ความเสถียรทางความร้อน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ anti-allergenicity ในทำนองเดียวกัน ปฏิกิริยาเมลลาร์ก็ยังนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลซ์ (โปรตีนไฮโดรไลเซต) ได้อีกด้วย [112] ปฏิกิริยาเมลลาร์ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ เวลา pH ลักษณะและปริมาณของสารตั้งต้น water activity และพื้นผิวในการเข้าทำปฏิกิริยา [10] นอกจากนี้ ประเภทของน้ำตาลยังเป็นหนึ่งในหลายปัจจัยที่ควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาและการเลือกน้ำตาลก็มีความสำคัญ เนื่องจากส่งผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพหรือคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ MRP [113] น้ำตาลและส่วนผสมของอะมิโนหลายชนิดทำปฏิกิริยาต่างกัน ส่งผลให้โครงสร้างและประเภทของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายต่างกัน [114] [115]

- ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์หรือเอมีนมีผลโดยตรงต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์และชนิดของสารประกอบที่เกิดขึ้น
- น้ำตาลอัลโดสมีความว่องไวมากกว่าน้ำตาลคีโตส
- Trioses มีความว่องไวกว่า tetroses และ tetroses มีความว่องไวกว่าเพนโทส (เช่น ไรโบส) ซึ่งเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าเฮกโซส (เช่น กลูโคส ฟรุคโตส)
- น้ำตาลรีดิวซ์โมโนแซ็กคาไรด์มีความว่องไวมากกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ประเภทไดแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์
- อนุพันธ์ของ  $\alpha$ -Dicarbonyl ทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าอัลดีไฮด์ซึ่งมีความว่องไวมากกว่าคีโตน น้ำตาลรีดิวซ์ยังเกิดปฏิกิริยาได้น้อยกว่า รองลงมาคือกรดออกโซ
- น้ำตาลอะไซคลิกทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าน้ำตาลไซคลิก น้ำตาลที่แสดงการเปิดวงได้อย่างรวดเร็วทำให้เกิดไกลเคชันเร็วขึ้นและสูงขึ้น

Shang และคณะ (2020) เลือกใช้น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์สามชนิด (ไรโบส ไชโลส และกลูโคส) มอลโตส และไซลูลิโกแซ็กคาไรด์ ทำปฏิกิริยาเมลลาร์โดยใช้ระบบง่าย ๆ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไฮโดรไลเซตจากเมล็ดดอกบัติน (PSH) และ L-cysteine เพื่อประเมินผลกระทบของประเภทน้ำตาลต่อ MRP พบว่าประเภทของน้ำตาลส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างและรสชาติของ MRP ที่ได้รับจาก PSH อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ความเข้มข้นของการเกิดสีน้ำตาล ระดับการแทนที่ (Degree of substitution ,DS) และลักษณะทางประสาทสัมผัสของ MRP แบบโมโนแซ็กคาไรด์มีค่ามากกว่า MRP ของมอลโตสและไซลูลิโกแซ็กคาไรด์ เนื่องจากโมโนแซ็กคาไรด์มีปริมาณกรดอะมิโนขมต่ำกว่า

ไดแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งจะช่วยลดรสขมที่เกิด นอกจากนี้ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ต่ำกว่ามีอยู่ในโมโนแซ็กคาไรด์ MRP มากกว่าไดแซ็กคาไรด์และโซลูลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งบ่งชี้ว่าซึ่งบ่งชี้ว่าโมโนแซ็กคาไรด์จับกับกรดอะมิโนอิสระได้ง่ายกว่า สรุปได้ว่าโมโนแซ็กคาไรด์ถูกคอนจูเกตกับโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ง่ายกว่าไดแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ [116]

Jiang และคณะ (2013) จากการศึกษาได้ผลลัพธ์ยืนยันว่าปฏิกิริยาของน้ำตาลในปฏิกิริยาเมลลาร์ดลดลงตามลำดับของน้ำตาลเพนโทส เฮกโซส และไดแซ็กคาไรด์ ตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลของ MRP ที่ได้จากโปรตีนพลาสมา porcine และน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ดังนั้นประเภทยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีอิทธิพลอย่างมากต่ออัตราการเกิดสีน้ำตาล ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์เคซีนจากวัว ตัวอย่างเช่น ไรบโสมมีปฏิกิริยามากที่สุดในบรรดาน้ำตาลสามชนิด และ MRP จากไรบโสม-เพปไทด์เคซีนจากวัว (bovine casein peptide ,BCP) สามารถไปถึงขั้นเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นแล้วปฏิกิริยาของน้ำตาลอาจสัมพันธ์กับความยาวของแกนหลักคาร์บอน สายโซ่คาร์บอนที่สั้นกว่าอาจมีส่วนทำให้เกิดน้ำตาลแบบสายโซ่เปิด หรือที่เรียกว่าน้ำตาลในรูปแบบแอคทีฟในปฏิกิริยาเมลลาร์ด [113]

จุฑาภรณ์ ลิ้มสุวรรณมณี และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (MRP) ของ non-protein nitrogenous (NPN) ที่ได้จากปลากระเบน โดยใช้น้ำตาลที่แตกต่างกันสามชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และฟรุคโตส พบว่า NPN-ฟรุคโตส แสดงกิจกรรมการจับ ABTS<sup>•+</sup> สูงสุด การสังเกตนี้แสดงให้เห็นว่า MRP ที่สร้างขึ้นจาก NPN- sugar มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพที่จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุมูลอิสระที่ชอบน้ำ/ประจุบวก MRP สามารถยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระโดยการจัดหาอะตอมไฮโดรเจนให้กับอนุมูล นอกจากนี้ MRP ที่ได้จาก NPN-sugar มีความแตกต่างในแง่ของความสามารถการกำจัดอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับแหล่งน้ำตาลและขั้วของอนุมูลอิสระ [117]

Zhou และคณะ (2020) ได้ศึกษาการปรับปรุงรสชาติของสารตัวกลาง (intermediate) ปฏิกิริยาเมลลาร์ด ที่ได้จากการไฮโดรไลเซตโปรตีนจากถั่ว โดยเตรียมปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ 80 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์รสชาติใช้ electronic tongue ร่วมกับการประเมินทางประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่า จากการประเมินผลแสดงให้เห็นว่า enzymatic hydrolysate ของโปรตีนถั่วมีความขมลดลงแต่มีรสชาติอูมามิเพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยที่ความเข้มข้นของอูมามิและความเค็มมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของ MRIs แม้ว่าปริมาณของ MPis จะเป็น 0.1% (w/w) แต่สามารถลดปริมาณ NaCl ได้ถึง 20% โดยที่ความเค็มยังคงอยู่ ซึ่งอาจใช้เป็นสาร

ทดแทนในการลดเกลือลงได้ ในทางกลับกัน MRIs ที่เพิ่มขึ้นส่งเสริมการหลั่ง aldosterone ใน น้ำลายซึ่งอาจเพิ่มการรับรสเค็มของมนุษย์ได้ [118]

จากที่กล่าวมาข้างต้นสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Shen และคณะ (2018) ที่ศึกษา คุณสมบัติทางกายภาพ (น้ำหนัก ปริมาตร สี C-cell และ texture profiles) ปริมาณเมลานอยด์ดิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ MRP ขนปังแซนวิช (white pan bread) กับน้ำตาล ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และโรโบส พบว่าขนมปังที่มีโรโบสจะมีน้ำตาลเป็นเปลือกด้าน นอกที่เข้มที่สุด มีปริมาณเมลานอยด์ดินสูงสุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุดใน บรรดาน้ำตาลทุกประเภท โดยเมลานอยด์ดินที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า เมลานอยด์ดินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เนื่องจากความสามารถในการรีดิวซ์และความว่องไวในการ เกิดปฏิกิริยาของโรโบสที่สูงระหว่างปฏิกิริยาเมลลาร์ด ในการศึกษาอื่น ๆ MRPs จากกลูโคสแสดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า MRP จากฟรุคโตสในการชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ ขนมปังที่ทำจากน้ำตาลกลูโคสมีสีเปลือกด้านนอกอ่อนกว่าเล็กน้อย เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสสามารถ หมักได้อย่างสมบูรณ์และง่ายกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลประเภทอื่น [119]

**ตารางที่ 2-9** แบบจำลองกระบวนการระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนในการเป็นสารให้กลิ่นรส

| Flavor types of processed sugar–amino acid model mixtures. |            |                     |                        |
|------------------------------------------------------------|------------|---------------------|------------------------|
| Sugar                                                      | Amino acid | Temperature<br>(°C) | Flavor<br>description  |
| Glucose                                                    | Cysteine   | 100–140             | Meaty, beefy           |
| Ribose                                                     | Cysteine   | 100                 | Meaty, roast<br>beef   |
| Ascorbic acid                                              | Threonine  | 140                 | Beef extract,<br>meaty |
| Ascorbic acid                                              | Cysteine   | 140                 | Chicken                |
| Ascorbic acid                                              | Threonine  | 140                 | Beef extract,<br>meaty |
| Ascorbic acid                                              | Cysteine   | 140                 | Chicken                |

ตารางที่ 2-9 แบบจำลองกระบวนการระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนในการเป็นสารให้กลิ่นรส

| Flavor types of processed sugar-amino acid model mixtures. |                           |                  |                    |
|------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|--------------------|
| Sugar                                                      | Amino acid                | Temperature (°C) | Flavor description |
| Glucose                                                    | Leucine                   | 100              | Chocolate          |
| Glucose                                                    | Threonine                 | 100              | Chocolate          |
| Glucose                                                    | Phenylalanine             | 100–140          | Floral, chocolate  |
| Ribose or xylose                                           | Threonine                 | 140              | Almond, marzipan   |
| Glucose                                                    | Proline                   | 100–140          | Nutty              |
| Glucose                                                    | Proline or hydroxyproline | 180              | Bread, baked       |
| Glucose                                                    | Alanine                   | 100–220          | Caramel            |
| Glucose                                                    | Lysine                    | 110–120          | Caramel            |
| Xylose                                                     | Lysine                    | 100              | Caramel, buttery   |
| Ribose                                                     | Lysine                    | 140              | Toast              |
| Glucose                                                    | Valine                    | 100              | Rye bread          |
| Glucose                                                    | Arginine                  | 100              | Popcorn            |
| Glucose                                                    | Methionine                | 100–140          | Cooked potatoes    |
| Glucose                                                    | Isoleucine                | 100              | Celery             |
| Glucose                                                    | Glutamine or asparagine   | —                | Nutty              |

ที่มา : Kerler และคณะ (2010)

ตารางที่ 2-10 แบบจำลองกระบวนการระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนในการเป็นสารให้กลิ่นรส

| Sugar         | Amino acid                      | Temperature (°C) | Flavor description  | Compounds                                                         |
|---------------|---------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Glucose       | Cysteine                        | 100–140          | Meaty, beefy        | 2-Methyl-3-furanthiol, 2-(1-Mercaptoethyl)furan, 2-Thenylthiol    |
| Ribose        | Cysteine                        | 100              | Meaty, roast beef   | 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Furfurylthiol, 2-Methyl-3-thiophenethiol |
| Ascorbic acid | Threonine                       | 140              | Beef extract, meaty | 2-methylpyrazine, 2,5dimethylpyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine   |
| Ascorbic acid | Cysteine                        | 140              | Chicken             | 4,5dimethylthiazole, 5-ethyl-2,4-dimethylthiazole                 |
| Glucose       | Serine or glutamine or tyrosine | 100–220          | Chocolate           | Acetylpyrazine                                                    |
| Glucose       | Leucine                         | 100              | Chocolate           | 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal                                    |
| Glucose       | Threonine                       | 100              | Chocolate           | 2,3,5-trimethylpyrazine (TMP)                                     |
| Glucose       | Phenylalanine                   | 100–140          | Floral, chocolate   | Phenylacetaldehyde                                                |

ที่มา : Kerler และคณะ (2010)

**ตารางที่ 2-11** การศึกษาคุณสมบัติของรสชาติผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ผ่านกระบวนการโปรตีนไฮโดรไลเซท

| Protein hydrolysate/Peptide      | Sugar       | Reaction conditions        | Flavor properties                                                                                       |
|----------------------------------|-------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sunflower protein hydrolysate    | Xylose      | 120 min, 2 h, pH 7.4       | Greater mouthfulness and continuity                                                                     |
| Poultry protein hydrolysate      | Glucosamine | pH 7.0, 37 or 50°C, 3.5 h  | Saltier taste and savoriness                                                                            |
| Sunflower, corn, soybean peptide | Xylose      | 115 °C, 2 h, pH 7.4        | Improved mouthfulness and continuity                                                                    |
| Salmon hydrolysate               | Xylose      | 45-50°C, 4-6 h, pH 5.5-7.5 | Masking fish odor                                                                                       |
| Chicken peptide                  | Xylose      | 80-140 °C, 0.5-2 h, pH 6.5 | Increased meaty aroma at high temperature (>100 °C). Umami and kokumi taste at mild temperature (80 °C) |
| Soybean protein hydrolysate      | Xylose      | pH 7.4, 120 °C             | Improved mouthfulness, umami and meaty flavor                                                           |

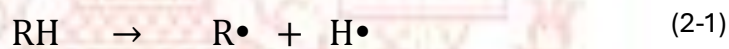
ที่มา : Kerler และคณะ (2010)

## 2.6 วิธีการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

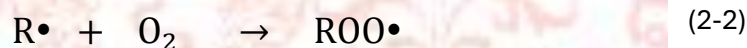
### 2.6.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร (unstable) จึงทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ตัวอย่างอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion hydroxy radical โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นอีกต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ [120] อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นหลายประเภท ได้แก่ รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species หรือ ROS) เช่น superoxide radical, hydroxy radical) โดยปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ (Radical chain reaction) อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบลูกโซ่ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

Initiation



Propagation



Termination



สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย โดยสารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ [121]

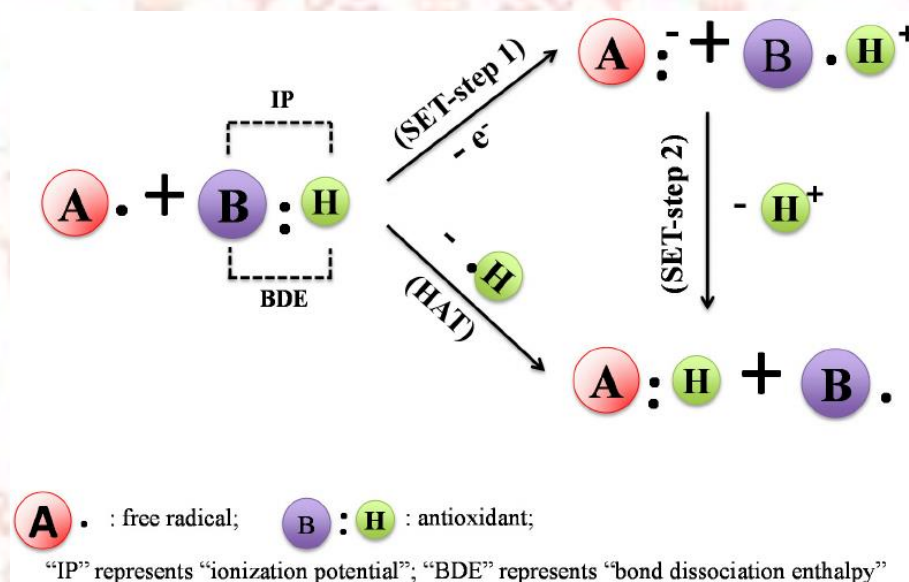
1. Preventive antioxidant หมายถึง ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant หมายถึง ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant หมายถึง ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

#### 2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการบริจาคไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ซึ่งประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ลักษณะทางกายภาพ อุณหภูมิ คุณสมบัติทางโครงสร้าง คุณสมบัติของสารที่ไวต่อการออกซิเดชัน ความเข้มข้น [122] โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งแบบสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), butylated hydroxyanisole (BHA) และ tert-butylhydroquinone (TBHQ) แบบธรรมชาติ เช่น สารในกลุ่ม phenolic compounds, กรดอะมิโน และเพปไทด์ เป็นต้น ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้รับความนิยมมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความนิยมมากที่สุด ได้แก่ Butylated Hydroxytoluene (BHT), Propyl Gallate (PG), Butylated Hydroxyanisole (BHA) และ Tert-butylhydroquinone (TBHQ) ซึ่งมีราคาถูก แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากมีความเป็นพิษที่อาจส่งผลต่อร่างกายได้ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงเป็นที่สนใจในปัจจุบัน [123]

### 2.6.3 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant mechanism)

Antioxidant หรือสารต้านอนุมูลอิสระ คือสารประกอบที่สามารถยับยั้งการสลายตัวของสารอื่นที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โดยสามารถให้หรือรับ  $e^-$  radical จากอนุมูลอิสระ (Free radical) และทำให้ปฏิกิริยาหยุดลง โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระมี 2 วิธี ได้แก่วิธีแรกคือ Hydrogen atom transfer เป็นการให้ไฮโดรเจนหรือโปรตรอนไปจับกับอนุมูลอิสระ ซึ่งกลไกนี้จะได้แก่วิธีการทดสอบ DPPH $^{\bullet}$ , ABTS $^{\bullet+}$  และวิธีที่สองคือ Single electron transfer เป็นการให้อิเล็กตรอนไปจับกับอนุมูลอิสระ โดยกลไกนี้จะได้แก่วิธีการทดสอบ ABTS $^{\bullet+}$ , Hydroxyl (OH $^{\bullet}$ ), Superoxide (O $_2^{\bullet-}$ ) และ FRAP [124]ซึ่งกลไกทั้งสองนี้ดังภาพที่ 2-26



ภาพที่ 2-14 กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ HAT กับ SET

### 2.6.4 ทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 5 วิธี

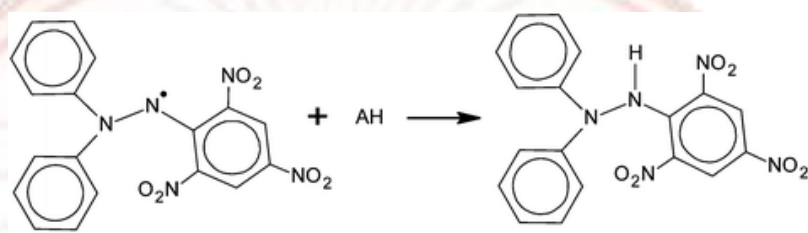
#### 2.6.4.1 วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

อนุมูล DPPH $^{\bullet}$  เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง โดยการวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการ

ทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลาย DPPH• มีสีม่วงในนอลและเมื่อได้รับไฮโดรเจนอะตอมจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง [125] ดังสมการที่ 2-27



สีม่วง      ตัวอย่างทดสอบ      สีเหลือง



ภาพที่ 2-15 ปฏิกริยา DPPH• กับสารต้านอนุมูลอิสระ

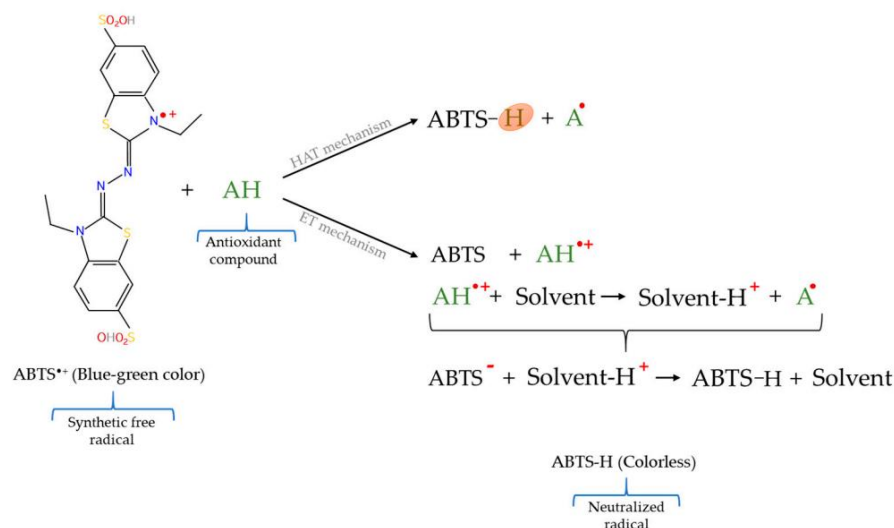
ข้อดี ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

ข้อเสีย อนุมูลอิสระ DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดขึ้นในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงได้

2.6.4.2 วิธี ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity

การทดสอบ ABTS เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดอนุมูล  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ที่เกิดจาก water phase โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (อนุพันธ์ของวิตามิน E ที่ละลายน้ำได้) ซึ่ง ABTS ถูกสร้างขึ้นโดยการทำปฏิกิริยา oxidize ด้วย potassium permanganate หรือ potassium persulfate กับสาร  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  โดยการวิเคราะห์จะวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งหรือลดอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าเขียว โดยวิธีนี้สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงค่า pH ที่หลากหลาย ทั้งในระบบตัวทำละลายน้ำและอินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังไม่สามารถ

เชื่อมโยงหรืออธิบายเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (In vivo)  $ABTS^{\bullet+}$  [126] ซึ่งกลไกการต้านอนุมูลอิสระ  $ABTS^{\bullet+}$  ดังภาพที่ 2-28

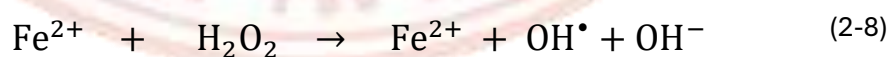


ภาพที่ 2-16 ปฏิกริยาของ  $ABTS^{\bullet+}$  กับสารต้านอนุมูลอิสระ

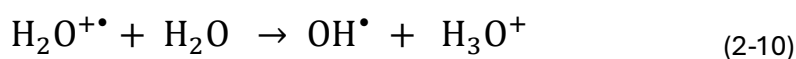
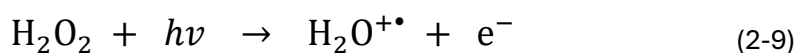
#### 2.6.4.3 วิธี Hydroxyl ( $OH^{\bullet}$ ) radical scavenging activity

Hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถจับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย โดยการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่อย่างต่อเนื่อง [127] สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง  $OH^{\bullet}$  radical โดย 2 กลไก ได้แก่

- ก. ปฏิกริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ  $H_2O_2$  ได้  $OH^{\bullet}$  เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ



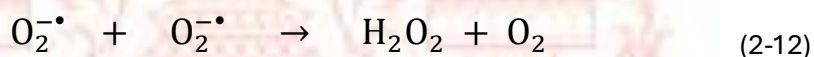
การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ



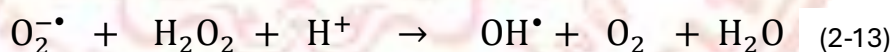
ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง  $\text{OH}^\bullet$  radical ของสารตัวอย่างต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical จากน้ำตาล deoxyribose เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ น้ำตาล Trichoroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง  $\text{OH}^\bullet$  radical จะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร [128]

#### 2.6.4.4 วิธี Superoxide radical scavenging

Superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้อนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ อีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย ซึ่งการเกิด  $\text{O}_2^{\bullet-}$  เป็นดังสมการ



เมื่อ  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ทำปฏิกิริยากับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  จะทำให้เกิด  $\text{OH}^\bullet$  เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction ดังสมการ

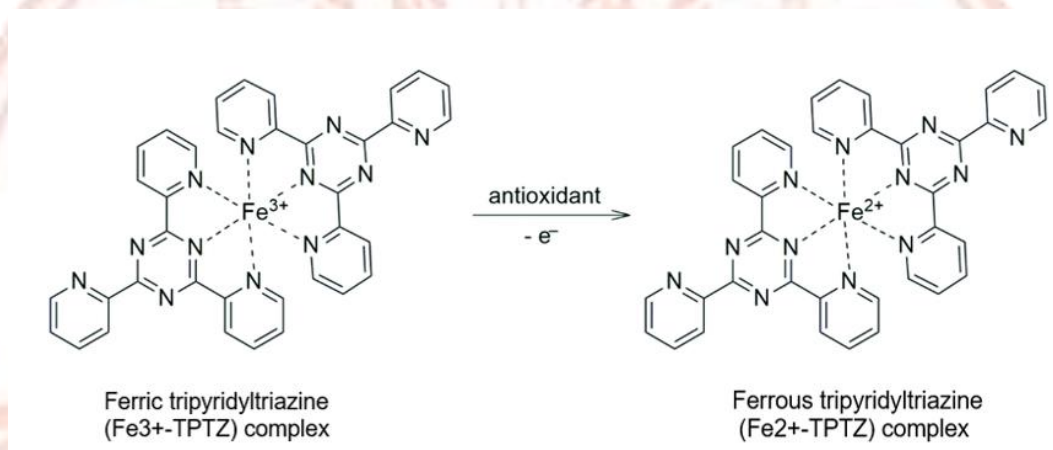


โดยอนุมูล  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง ซึ่งปฏิกิริยาระหว่าง  $\text{O}_2^{\bullet-}$  กับสาร NBT ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีสีน้ำเงิน และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 นาโนเมตร [129]

#### 2.6.4.5 วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

FRAP เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอน (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-link colorimetric โดยที่ ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์อนุมูลอิสระที่สามารถให้

อิเล็กตรอนได้ ทำให้เปลี่ยนเป็น  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม โดยจะวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แม้ว่าการทดสอบ FRAP ดั้งเดิมจะใช้ TPTZ เป็นลิแกนด์ที่จับกับเหล็ก แต่มีการใช้ลิแกนด์อื่นในการจับกับ  $\text{Fe}^{3+}$  เช่น ferrozine แต่เมื่อไม่นานมานี้ potassium ferricyanide ได้เป็นสาร ferric ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการทดสอบ FRAP ในกรณีนี้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้น คือ Prussian blue การทดสอบโดยใช้วิธี FRAP นี้ มีข้อดีคือ เกิดปฏิกิริยาไว ไม่แพงและง่ายต่อการทดสอบ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถวัด proton transfer ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น SH group (thiol) และไม่สามารถวัดกลไกทางชีวภาพของร่างกายได้ [126] ซึ่งกลไก FRAP ดังภาพที่ 2-29



ภาพที่ 2-17 ปฏิกิริยาของ FRAP กับสารต้านอนุมูลอิสระ

## 2.7 การอักเสบ (Inflammation)

การอักเสบ (Inflammation) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย เช่น เชื้อโรค (Pathogens) เซลล์ได้รับความเสียหาย สารพิษ หรือรังสี โดยมีหน้าที่กำจัดสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดอันตรายและเริ่มกระบวนการฟื้นฟู [130] [131] ดังนั้นการอักเสบจึงสำคัญต่อสุขภาพ [132]

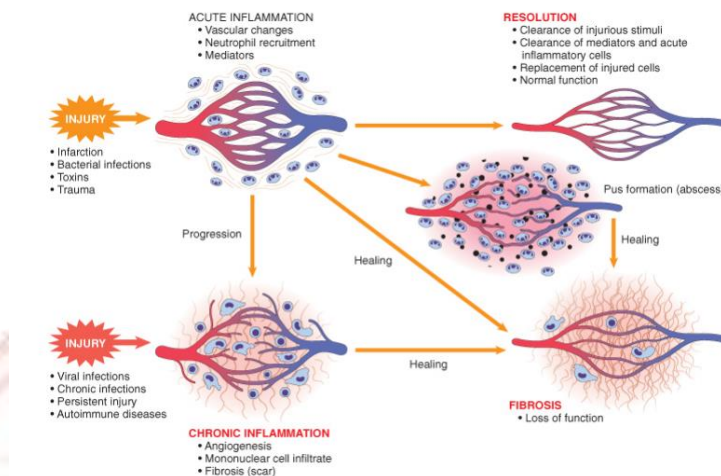
### 2.7.1 การอักเสบมี 2 ประเภท

#### 2.7.1.1 การอักเสบเฉียบพลัน (Acute inflammation)

การอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือเป็นนาทีก่อนได้รับสิ่งกระตุ้น มักไม่เกินภายใน 1 สัปดาห์ ซึ่งลักษณะสำคัญของการอักเสบเฉียบพลัน คือ การบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (exudate) ภายในเนื้อเยื่อ และพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils โดยกระบวนการนี้ช่วยฟื้นฟูสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) และยุติการอักเสบเฉียบพลันได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม หากการอักเสบเฉียบพลันไม่สามารถควบคุมได้ อาจพัฒนาไปสู่การอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation) ซึ่งเป็นการอักเสบเรื้อรังหลายชนิด [133]

#### 2.7.1.2 การอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation)

การอักเสบเรื้อรัง หมายถึงการอักเสบที่เกิดขึ้นเป็นเวลานานเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน อาจเกิดหลังการอักเสบเฉียบพลัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง สามารถพบได้ในหลายกรณี เช่น การติดเชื้อโรค เชื้อรา และเชื้อปรสิตบางชนิดเป็นเวลานาน ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น Rheumatoid และ Systemic lupus erythematosus (SLE) สารสัมผัสสารแปลกปลอม เช่น ซิลิกา และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติของเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยการอักเสบชนิดนี้จะมีลักษณะ คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ lymphocytes



ภาพที่ 2-18 แผนภาพแสดงการเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง

การอักเสบจะมีลักษณะเด่น คือ อาการแดง บวม ร้อน เจ็บปวด และการสูญเสียการทำงาน ของเนื้อเยื่อ ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ระบบหลอดเลือด ที่เกี่ยวข้องกับการ อักเสบต่อการติดเชื้อหรือการบาดเจ็บ โดยเหตุการณ์ที่สำคัญที่เกิดระหว่างกระบวนการอักเสบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability changes) การเคลื่อนที่ และสะสมของเม็ดเลือดขาว (leukocyte recruitment and accumulation) และการปลดปล่อยสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (inflammatory mediator release) [134] ปัจจัยก่อโรคต่างๆ เช่น การติดเชื้อ การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ หรือภาวะกล้ามเนื้อ หัวใจตาย (cardiac infarction) สามารถกระตุ้นการอักเสบโดยทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ สาเหตุของการอักเสบอาจมาจากการติดเชื้อ (infectious) หรือไม่ติดเชื้อ (non-infectious) ได้ เมื่อ เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ ร่างกายจะเริ่มกระบวนการส่งสัญญาณทางเคมี (chemical signaling cascade) เพื่อกระตุ้นการตอบสนองที่มุ่งเน้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบ สัญญาณเหล่านี้ จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่ได้รับความเสียหาย (leukocyte chemotaxis) จากระบบไหลเวียนเลือด เมื่อเม็ดเลือดขาวถูกกระตุ้น จะปล่อยไซโตไคน์ (cytokines) ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองการอักเสบ [134] การตอบสนองการอักเสบ (inflammatory response) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเส้นทางส่งสัญญาณ (signaling pathways) เพื่อควบคุมระดับของสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (inflammatory mediators) ทั้งในเซลล์เนื้อเยื่อที่ อยู่ในบริเวณนั้น และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ถูกดึงมาจากเลือด [134]

การอักเสบเป็นกระบวนการที่พบได้ในพยาธิสภาพของโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคลำไส้ โรคเบาหวาน โรคข้ออักเสบ และโรคมะเร็ง [135] แม้ว่ากระบวนการตอบสนองการอักเสบจะขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสิ่งกระตุ้นเริ่มต้นและตำแหน่งที่เกิดในร่างกาย แต่ทุกกระบวนการมีกลไกที่เหมือนกัน 1. ตัวรับบนผิวเซลล์ (Cell surface pattern receptors) ตรวจจับสิ่งกระตุ้น 2. เส้นทางการอักเสบ (Inflammatory pathways) ถูกกระตุ้น 3. สารที่ก่อให้เกิดการอักเสบถูกปลดปล่อย (Inflammatory markers) และ 4. เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory cells) ถูกดึงเข้ามาในบริเวณที่ได้รับผลกระทบ

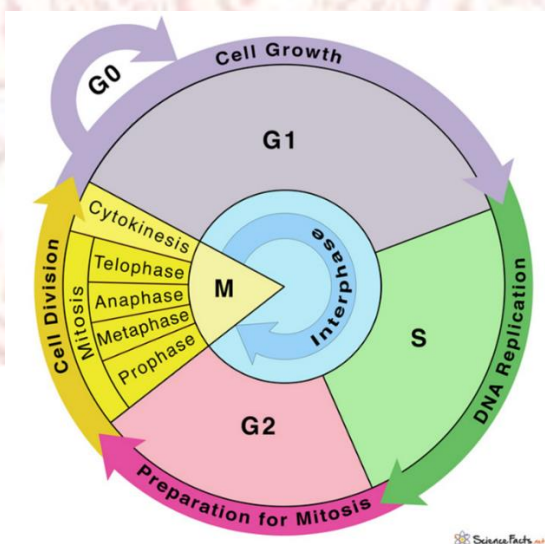
| Cytokine      | Family | Main sources                                                   | Function                                                                             |
|---------------|--------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-1 $\beta$  | IL-1   | Macrophages, monocytes                                         | Pro-inflammation, proliferation, apoptosis, differentiation                          |
| IL-4          | IL-4   | Th-cells                                                       | Anti-inflammation, T-cell and B-cell proliferation, B-cell differentiation           |
| IL-6          | IL-6   | Macrophages, T-cells, adipocyte                                | Pro-inflammation, differentiation, cytokine production                               |
| IL-8          | CXC    | Macrophages, epithelial cells, endothelial cells               | Pro-inflammation, chemotaxis, angiogenesis                                           |
| IL-10         | IL-10  | Monocytes, T-cells, B-cells                                    | Anti-inflammation, inhibition of the pro-inflammatory cytokines                      |
| IL-12         | IL-12  | Dendritic cells, macrophages, neutrophils                      | Pro-inflammation, cell differentiation, activates NK cell                            |
| IL-11         | IL-6   | Fibroblasts, neurons, epithelial cells                         | Anti-inflammation, differentiation, induces acute phase protein                      |
| TNF- $\alpha$ | TNF    | Macrophages, NK cells, CD4 <sup>+</sup> lymphocytes, adipocyte | Pro-inflammation, cytokine production, cell proliferation, apoptosis, anti-infection |
| IFN- $\gamma$ | INF    | T-cells, NK cells, NKT cells                                   | Pro-inflammation, innate, adaptive immunity anti-viral                               |
| GM-CSF        | IL-4   | T-cells, macrophages, fibroblasts                              | Pro-inflammation, macrophage activation, increase neutrophil and monocyte function   |
| TGF- $\beta$  | TGF    | Macrophages, T cells                                           | Anti-inflammation, inhibition of pro-inflammatory cytokine production                |

ภาพที่ 2-19 ตารางสรุปการทำงานของ cytokines ชนิดต่าง ๆ

## 2.8 มะเร็ง (Cancer)

มะเร็ง (Cancer) หมายถึง โรคชนิดหนึ่งโดยเซลล์จะมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ในแบบที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยเซลล์ที่ถูกแบ่งนี้สามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย เช่น การเจริญเติบโตโดยตรงบนเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือการย้ายเซลล์ไปตำแหน่งที่ไกลๆ โดยปกติเซลล์ในร่างกายส่วนใหญ่จะมีการสร้างหรือผลิตตัวเองขึ้นมาใหม่ โดยเซลล์จะเริ่มแก่และตายไปในที่สุดและเซลล์ตัวใหม่ก็จะมีการเริ่มผลิตเซลล์ขึ้นมาแทนที่ ซึ่งในการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์จะมีการควบคุมการแบ่งเซลล์ไปตามลำดับขั้นตอน แต่ในกรณีเซลล์ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวได้ จะทำให้เกิดก้อนเนื้อที่เรียกว่า เนื้องอก (tumor) โดยเนื้องอกที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเติบโตและขัดขวางการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น ระบบไหลเวียนเลือด ระบบประสาท ระบบย่อยอาหาร ส่งผลทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายได้ (Crosta, 2013)

กลไกการเกิดมะเร็ง คือ การที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากเซลล์ที่ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง มีหลายสาเหตุที่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น การผ่าเหล่า (random mutation) หรือจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (gene rearrangement), การถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำโดยสารเคมี เช่น polycyclic aromatic hydrocarbon) และ aromatic amine เป็นต้น โดยปัจจัย เช่น รังสี เป็นต้น วงจรชีวิตของเซลล์ จะมีขั้นตอนหลักๆ คือ ระยะ G1 S G2 และ M ดังภาพที่ 2-33



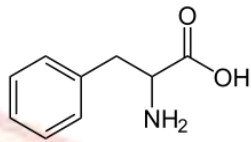
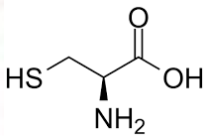
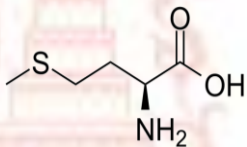
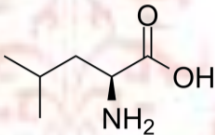
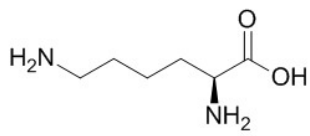
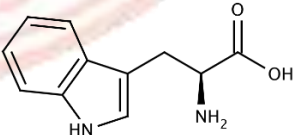
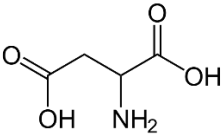
ภาพที่ 2-20 วงจรชีวิตของเซลล์

จากภาพ ระยะเวลา G1 จะเป็นขั้นตอนเริ่มต้น โดยมีการเจริญเติบโตของเซลล์เกิดขึ้น ในระยะ S จะเป็นขั้นตอนที่สร้าง DNA (Deoxyribonucleic acid) เมื่อพอมาถึงระยะ G2 จึงเป็นขั้นตอนที่เซลล์เตรียมจะแบ่งตัวแล้ว พอถึงระยะ M ก็จะมีการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งตัวควบคุมการเจริญเติบโตและควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายไป เรียกว่า ยีนมะเร็ง (oncogenes) มีหน้าที่ในการหยุดยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S เรียกว่า ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) หากไม่มีการแบ่งเซลล์ตามวงจรจะทำให้เกิดการเติบโตของเซลล์หรือเซลล์ มีการแบ่งตัวแบบควบคุมไม่ได้ซึ่งก็คือ การกลายพันธุ์ของยีนมะเร็ง (oncogenes) หรือการกลายพันธุ์ของยีน ต้านมะเร็ง (tumour suppressor genes) โดยเราเรียกว่า มิวเทชัน (mutation) หากเกิดการกลายพันธุ์ เซลล์ก็เติบโตมากผิดปกติและต่อมาจะลุกลามไปยังบริเวณข้างเคียงและกระจายเข้าสู่กระแสโลหิตและต่อมน้ำเหลืองอีกทั้งกระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างออกไป

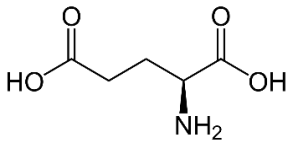
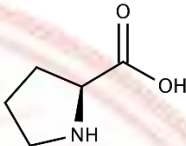
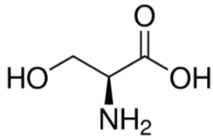
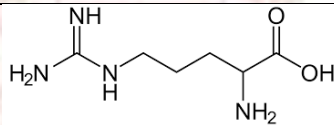
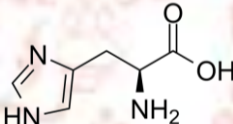
## 2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactivity)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) คือ สารประกอบที่มีกิจกรรม (activity) ต่อสิ่งมีชีวิต อาจให้ผลดีหรือผลเสียขึ้นอยู่กับชนิดของสารและปริมาณที่ได้รับ โดยกรดอะมิโน เปปไทด์ นอกจากจะมีความสามารถในการเป็นสารให้กลิ่นรสแล้ว ยังมีความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย [136] เช่นเดียวกับสารประเภทเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compounds) เช่น ไพร์โรล (pyrrole) ฟูแรน (furan) ไทโอฟิน (thiophene) ไพราซีน (pyrazine) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้มีความสามารถในการให้สีและกลิ่นรสในอาหาร และยังมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [137], [138]

ตารางที่ 2-12 ชนิดของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

| กรดอะมิโน     | สูตรโครงสร้าง                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Phenylalanine |     |
| Cysteine      |    |
| Methionine    |   |
| Leucine       |  |
| Lysine        |   |
| Tryptophan    |   |
| Aspartic acid |  |

ตารางที่ 2-12 ชนิดของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

| กรดอะมิโน     | สูตรโครงสร้าง                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Glutamic acid |    |
| Proline       |   |
| Serine        |  |
| Arginine      |  |
| Histidine     |  |

ที่มา : Sonklin และคณะ (2018)

ตารางที่ 2-13 ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

| Peptides                                                             | Source    | Authors               |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|
| Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr                              | Sunflower | Jun et al., 2004      |
| Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr<br>Ala-Asn-Gln-Gln-Leu-Ser           | Soy bean  | Je et al, 2007        |
| Pro-Ser-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Val                                      | Rye       | Ren et al., 2008      |
| Pro-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Thr-Gly-Pro                                  | wheat     | Lee et al., 2010      |
| Leu-Ala-Arg-Leu, Gly-Gly-Glu, Leu-His-Tyr<br>Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-His | Peanut    | Bougatef et al., 2010 |

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.1.1 กากถั่วเขียว จากบริษัท สิทินันท์ จำกัด
- 3.1.2 เอนไซม์โบรมิเลน (enzymatic activity= 97,540 CDU) จากบริษัท K-Much Industry Company Limited
- 3.1.3 กระดาษกรอง (Whatman No.1)
- 3.1.4 ชุดกรองแบบลดความดัน บริษัท HCT รุ่น 180/125 ประเทศเยอรมนี
- 3.1.5 ปั๊ม (Pump) บริษัท Rocker รุ่น Rocker 300 บริษัท Rocker
- 3.1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Buchi รุ่น B-480 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.7 เครื่องแยกขนาดเพปไทด์ (stirred cell) รุ่น UFSC05001 บริษัท Millipore ประเทศเยอรมนี
- 3.1.8 pH meter รุ่น SevenCompactTM Duo S213 pH/Conductivity meter บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.9 เครื่องวัดสี บริษัท HunterLab
- 3.1.10 เครื่อง Rotary evaporation บริษัท Buchi
- 3.1.11 เครื่อง Autoclave รุ่น SA-300VL บริษัท STURDY
- 3.1.12 เครื่อง Freeze dry บริษัท LABCO
- 3.1.13 เครื่อง UV spectrometer บริษัท Thermo SCIENTIFIC
- 3.1.14 เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น Pioneer Series PX224 บริษัท Ohaus
- 3.1.15 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น spectrum 100 ยี่ห้อ PerkinElmer ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.16 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent 1100 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.17 เครื่อง Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

ยี่ห้อ Agilent

3.1.18 เครื่อง Microplate รุ่น Infinite M200 บริษัท TECAN ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.1.19 เครื่อง Centrifuge รุ่น UNIVERSAL 320 บริษัท Andreas Hettich GmbH & Co.  
KG ประเทศเยอรมัน

3.1.20 GC-7890A ประเทศจีน

### 3.2 สารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Merck, Fisher และ BIOTECH AND SCIENTIFIC เฮกเซน (Hexane,  $C_6H_{14}$ ) Food grade, เอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain enzyme,  $C_{39}H_{66}N_2O_{29}$ ), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, HCl), น้ำกลั่น (Distilled water,  $H_2O$ ), น้ำตาลไรโบส (Ribose sugar,  $C_5H_{10}O_5$ ), น้ำตาลกลูโคส (Glucose sugar,  $C_6H_{12}O_6$ ), O-phathaldialdehyde (OPA,  $C_6H_4(CHO)_2$ ), Sodium dodecyl sulphate (SDS,  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ), Sodium tetraborate buffer (pH 9.7),  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $HSCH_2CH_2OH$ ), 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS,  $C_7H_4N_2O_7$ ), Sodium potassium tartaric acid ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ), Potassium bromide (KBr), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid,  $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ ), Potassium persulphate ( $K_2S_2O_8$ ), Ethanol ( $C_2H_6O$ ), Sodium phosphate buffer (pH 7.4), 1,10 phenantroline ( $C_{12}H_8N_2$ ), Ferrous sulphate ( $FeSO_4$ ), Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), Tris-HCl buffer (pH 8.3), Pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA,  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), Acetate buffer (pH 3.6), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ,  $C_{18}H_{12}N_6$ ), Iron (III) chloride hexahydrate ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), Ferrous sulfate heptahydrate ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### การเตรียมตัวอย่างกากถั่วเขียว

##### 3.3.1 การสกัดแยกน้ำมันออกจากกากถั่วเขียว

เตรียมกากถั่วเขียวโดยนำกากถั่วเขียวมาคัดแยกขนาด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช (ตะแกรง มาตรฐานของสหรัฐอเมริกา) จากนั้นสกัดน้ำมันออกจากกากถั่วเขียวด้วยเฮกเซนตามวิธีของ Sonklin et al. (2011) เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน โดยสกัดน้ำมันออกจากกากถั่วเขียวสอง ครั้งด้วยอัตราส่วนของกากถั่วเขียวต่อเฮกเซน 1:1 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควัน 24 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน  $1.0-1.3 \times 10^5$  Pa ที่อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

##### 3.3.2 การเตรียมตัวอย่างเพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียว

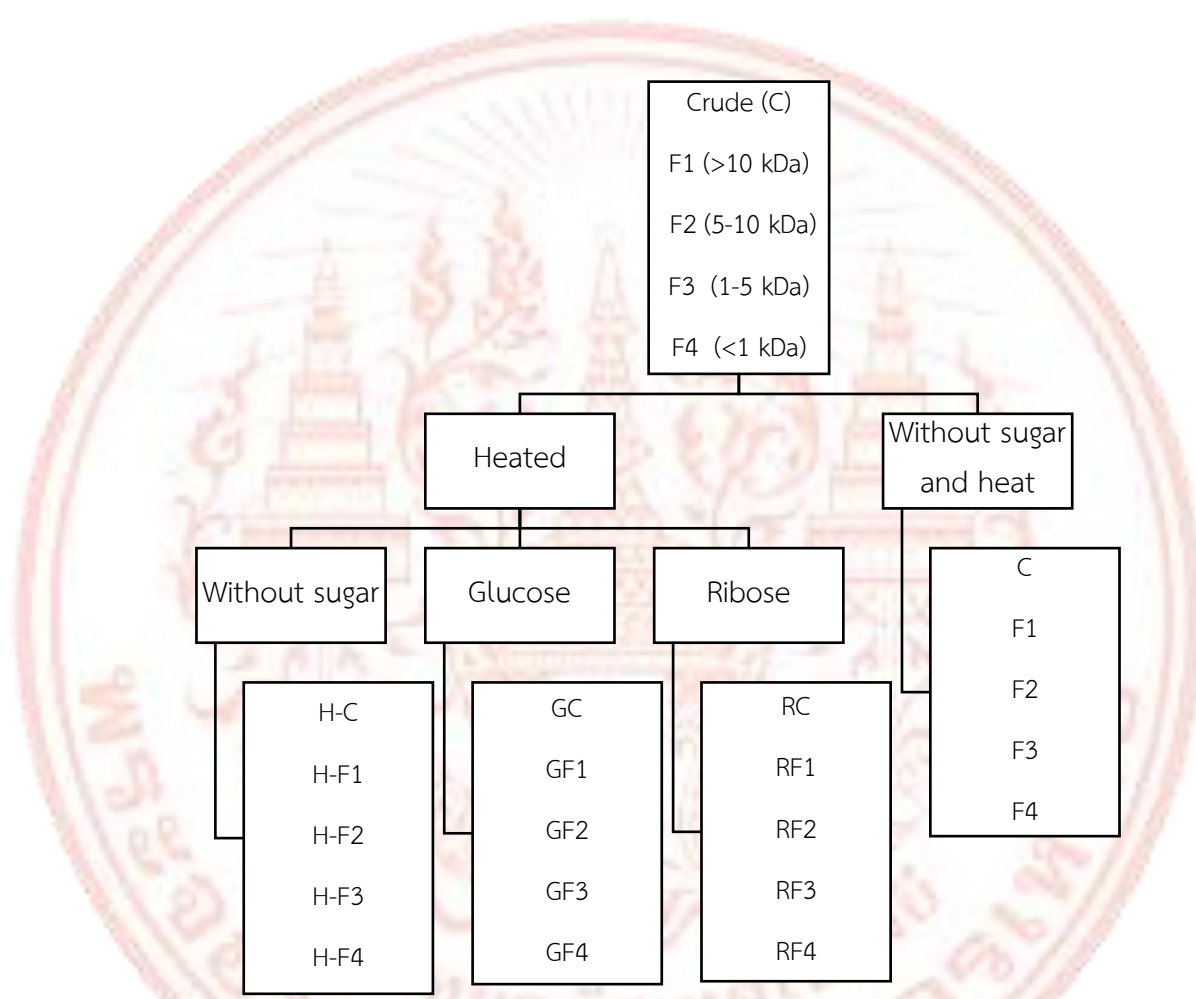
เตรียมตัวอย่างเพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตตามวิธีของ (C. Sonklin, N. Laohakunjit, O. Kerdchoechuen, et al., 2018) นำกากถั่วเขียวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน 10 g ต่อน้ำ 100 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL จากนั้นเติมเอนไซม์โบรมิเลน 15% (w/v) และปรับให้ pH เท่ากับ 6.0 ด้วย 2 M NaOH หรือ 2 M HCl ที่อุณหภูมิ  $50^\circ\text{C}$  เป็น 12 ชั่วโมง ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบระยะเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ  $95^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 เก็บโปรตีนไฮโดรไลเซตในส่วนใสที่ได้จากการกรอง เรียกส่วนนี้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว (Crude mungbean meal protein hydrolysate, Crude MMPH หรือ C) จากนั้นนำ Crude-MMPH ไปแยกขนาดของเพปไทด์ ตามน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน (Molecular weight cut-off) โดยใช้เครื่อง stirred cell (Millipore, Germany) ด้วยเมมเบรนที่มีขนาดต่างกัน (Molecular weight cut-off membrane, MWCO) ได้แก่ ขนาด 10, 5 และ 1 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ ทำให้ได้เพปไทด์จาก Crude-MMPH ที่มีขนาดแตกต่างกัน 4 ส่วน (fraction) คือ F1 มีขนาดโมเลกุล  $>10$  kDa F2 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 5-10 kDa F3 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ MW 1-5 kDa และ F4 มีขนาดโมเลกุล  $<1$  kDa นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) และเก็บที่อุณหภูมิ  $-20^\circ\text{C}$  วิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) และหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี AOAC, 2000

### 3.3.3 ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (Maillard reaction products, MRPs)

#### 3.3.3.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์จากถั่วเขียว

นำเพปไทด์จากถั่วเขียว ได้แก่ Crude-MMPH, F1, F2, F3 และ F4 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 มาทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาล กลูโคสและไรโบส ในการทดลองนี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) ตัวอย่างเพปไทด์ที่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดแต่ไม่ใช้น้ำตาล ได้แก่ HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4 (2) ตัวอย่างเพปไทด์ที่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4 (3) ตัวอย่างเพปไทด์ที่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4 (4) ตัวอย่างก่อนทำปฏิกิริยา (Crude-MMPH, F1, F2, F3 และ F4) แผนภาพแสดงดัง (ภาพที่ 3-1) โดยเตรียมตัวอย่างเพปไทด์ ได้แก่ Crude-MMPH, F1, F2, F3 และ F4 ปริมาณ 1.2 g ลงในขวดรูปชมพู่แต่ละขวด เติมน้ำตาล กลูโคส หรือ น้ำตาลไรโบส 1.2 กรัม และน้ำ Milli-Q ปริมาตร 40 mL ลงในแต่ละขวดตามลำดับ และปรับ pH เท่ากับ 9.0 ด้วย 6 M NaOH นำสารละลายที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยการให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C เป็นเวลา 120 นาที เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยา ด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไป freeze dry และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับวิเคราะห์ ในขั้นต่อไป เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดว่า ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction products, MRPs) โดยผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ผ่านความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล สามารถเตรียมได้ในขั้นตอนนี้เช่นเดียวกัน และเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด นำตัวอย่างทั้งหมดท ได้แก่ เพปไทด์ที่ไม่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้แก่ C, F1, F2, F3 และ F4, เพปไทด์ที่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดไม่ใช้น้ำตาล ได้แก่ HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4, เพปไทด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4, เพปไทด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส ได้แก่ RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4 นำมาวิเคราะห์ทางด้านกายภาพและทางเคมี ได้แก่ วิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสี (appearance and color values), องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียว(proximate analysis) ดังภาคผนวก ก ,การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar content) ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (amino acid compositions), ชนิดและปริมาณสารระเหยได้ (Volatile

compounds) , หมู่ฟังก์ชันทางเคมี, วิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติ (Sensory analysis)และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactivity)



ภาพที่ 3-1 แผนภาพของการเตรียมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

### 3.3.4. การวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสีของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว

ศึกษาลักษณะปรากฏของตัวอย่างด้วยการสังเกตด้วยตาและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล และศึกษาค่าสีของตัวอย่างตามระบบ CIE Lab ด้วยเครื่องวัดสี Hunter lab บันทึกค่าเป็น  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  รวมถึงคำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E$ )

### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield)

วิเคราะห์ปริมาณร้อยละผลผลิตของตัวอย่าง โดยชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างที่ได้หลังจากระเหยแห้ง แล้วเปรียบเทียบกับน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้น และคำนวณร้อยละผลผลิตได้ตามสมการ

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{weight of extraction}}{\text{weight of the sample taken}} \times 100$$

### 3.3.6 การวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation)

เพปไทด์หลังจากผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดในกลุ่มของเพปไทด์ที่ใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล ได้แก่ HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4, ตัวอย่างเพปไทด์ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4, ตัวอย่างเพปไทด์ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส ได้แก่ RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4 วิเคราะห์ปฏิกิริยาไกลเคชัน (Degree of glycation) ซึ่งเป็นวิธีหาร้อยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมิโนที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ โดยสามารถวิเคราะห์ได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Vigo's method [139] [140] เตรียม OPA reagents โดยชั่ง 80 g ของ OPA ละลายในสารละลาย ethanol ร้อยละ 95% จำนวน 2 mL จากนั้นผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ sodium tetraborate ความเข้มข้น 10 mmol/L ที่ pH เท่ากับ 9.7 จำนวน 50 mL ที่มีสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ร้อยละ 20% (w/w) จำนวน 5 mL และ  $\beta$ -mercaptoethanol 200 mL ผสมเข้าด้วยกัน จากนั้นเจือจาง OPA reagents ด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL ปิเปตตัวอย่าง 10  $\mu$ L ผสมกับ OPA reagents 200  $\mu$ L ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN รุ่น Infinite M200, สวิตเซอร์แลนด์) และคำนวณร้อยละการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน ดังสมการ

$$\text{DG (\%)} = (A1 - A2) / A1 \times 100\%$$

โดยที่ A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Crude

A2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (MRPs)

### 3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar content)

เพปไทด์หลังจากผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดในกลุ่มของเพปไทด์ที่ใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล ได้แก่ HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4, ตัวอย่างเพปไทด์ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4, ตัวอย่างเพปไทด์ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส ได้แก่ RC, RF1,

RF2, RF3 และ RF4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar content) โดยใช้สาร 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ [141] เตรียมสารละลาย DNS reagent โดยการชั่งสาร DNS จำนวน 1 g และสาร sodium potassium tartaric acid จำนวน 30 g ละลายในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 N ปริมาตร 80 mL ที่อุณหภูมิ 45°C ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายสีเหลือง ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตรเท่ากับ 100 mL ในส่วนขั้นตอนการวิเคราะห์ ปิเปตสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1 mg/mL) ปริมาตร 1 mL ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตสารละลาย DNS reagent 2 mL ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ใน water bath เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาในการทำปฏิกิริยา สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มแดง จากนั้นนำไปทำให้เย็น (cooling) เติมน้ำ DI ลงไป 7 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer (Thermo scientific, Evolution 60S, USA) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (GE/g sample)

### 3.3.8 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

วิเคราะห์กรดอะมิโนของตัวอย่างเปปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา (C, F1, F2, F3 และ F4) และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) ดัดแปลงตามวิธีการของ Li et al (2551) เตรียมตัวอย่างด้วยการ pre-treatment โดยการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 M ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากัน กรอง และเก็บสารละลายส่วนใส จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย reversed-phase, high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Agilent Technologies, Agilent 1100, USA) โดยมีสถานะการทดลองดังนี้ เริ่มต้นจาก pre-column derivatization ด้วย O-phthalaldehyde (OPA) (คอลัมน์ Zorbax 80 A C18 (4.6 id × 180 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) จากนั้นฉีดตัวอย่างปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยสารตัวพา (mobile phase) 2 ชนิด ได้แก่ Mobile phase A คือ 7.35 mM ของสารละลาย sodium acetate : triethylamine : tetrahydrofuran อัตราส่วน 500 : 0.12 : 2.5 (v/v/v) ปรับ pH เท่ากับ 7.2 ด้วย acetic acid และ Mobile phase B คือ 7.35 mM ของสารละลาย sodium acetate : methanol : acetonitrile ในอัตราส่วน 1 : 2 : 2 (v/v/v) ปรับ pH เท่ากับ 7.2 อุณหภูมิ

ของคอลัมน์เท่ากับ 40°C วิเคราะห์การดูดกลืนแสงที่ 338 และ 262 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ กรดอะมิโน 18 ชนิด ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (External standard) ได้แก่ Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val และ Trp

### 3.3.9 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ (Volatile compounds)

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ในตัวอย่างหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้แก่ ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) ด้วยเทคนิค Headspace solid phase micro extraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) เตรียมตัวอย่างปริมาณ 2 mL ลงในขวดแก้ว vial สำหรับวิเคราะห์ขนาด 20 mL ทำการให้ความร้อนและฉีดตัวอย่างด้วยระบบอัตโนมัติ โดยการให้ความร้อนกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดซับสารระเหยได้ด้วย SPME 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS coated (2 cm) fiber (Supelco, USA) 30 นาที และปลดปล่อยสารระเหยได้เข้าสู่คอลัมน์เป็นเวลา 15 นาที ปริมาณ headspace ของสารตัวอย่างที่เข้าคอลัมน์ 500  $\mu\text{L}$  ด้วยโหมด splitless แยกสารผ่านคอลัมน์ DB-WAX capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.; coated film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ) อุณหภูมิของ injection port เท่ากับ 240°C ควบคุมอุณหภูมิภายใน oven โดยเริ่มต้น 55°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 180°C ในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200°C ในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจจับโมเลกุลด้วยเครื่อง mass spectrometer (5975C inert XL EI/CI MSD with a triple-axis detector, Agilent Technology, USA) อุณหภูมิ interface เท่ากับ 250°C กำหนดช่วง mass scan range เท่ากับ 35-450 amu อัตรา 3.46 ครั้งต่อวินาที electron impact ionization เท่ากับ 70 eV ใช้ก๊าซ Helium เป็นก๊าซตัวพา ด้วยอัตราการไหล เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน  $3.32 \times 10^4$  psi พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอ้างอิงกับฐานข้อมูลจาก Wiley 275 และ the NIST library ที่ร้อยละความเหมือนมากกว่า 80 และค่า retention index (RI) ที่คำนวณได้จากสารมาตรฐาน alkane standards (C8-C20)

### 3.3.10 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปของเพปไทด์จากถั่วเขียวก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง ได้แก่ เพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (C, F1, F2, F3

และ F4) เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) นำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทางเคมี โดยนำตัวอย่างมาผสมกับ สาร potassium bromide (KBr) บดให้ละเอียดเข้ากันและนำไปอัดขึ้นรูปเป็นแผ่นใส จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (PerkinElmer, Spectrum 100, USA) โดยกำหนด spectra IR ช่วง  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

### 3.3.11 วิเคราะห์การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ เมลลาร์ดจากเพปไทด์จากถั่วเขียว

ทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของตัวอย่าง โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 15 คน ผู้ร่วมอภิปรายถึงการฝึกอบรมทุกคนได้รับการฝึกอบรมด้านการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา โดยมีประสบการณ์มากกว่า 20 ชั่วโมงในการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างอาหารต่าง ๆ เตรียมตัวอย่าง 1 กรัมละลายในน้ำ 10 mL ที่อุณหภูมิห้อง ใช้วิธีทดสอบแบบ Qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test ประเมินกลิ่นรสทางด้าน กลิ่นเนื้อ กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นหวาน กลิ่นน้ำซุ๊ป กลิ่นรมควัน กลิ่นเค็ม รสขม รสเค็ม รสหวาน รสเปรี้ยว รสฝาด รสอโรย (รสอูมามิ) และการยอมรับโดยรวม วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT ด้วยโปรแกรม SAS, (1997)

### 3.3.12 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.3.12.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล DPPH<sup>•</sup> โดยดัดแปลงวิธีจาก [142, 143] ตัวอย่าง ปริมาณ 50  $\mu$ L ผสมกับสารละลาย DPPH<sup>•</sup> 0.1 mM ปริมาณ 150  $\mu$ L บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (TECAN รุ่น Infinite M200) คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH<sup>•</sup> ดังสมการ กำหนด ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1 และ 2 mg/mL หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 50 หรือ inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรมจาก GraphPad Version 10.1.0

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - (A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

โดยที่  $A_{\text{blank}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (น้ำ DI + DPPH<sup>•</sup>)

$A_{\text{Sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + DPPH<sup>•</sup>)

#### 3.3.12.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> โดยผสมสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> 7.0 mM และ สารละลาย potassium persulphate 2.45 mM ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เก็บไว้ในที่มืด 12 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางด้วย 95% เอทานอล จนสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $0.7 \pm 0.02$  ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำตัวอย่างปริมาณ 10  $\mu$ L ผสมกับสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ปริมาณ 200  $\mu$ L บ่มในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> ดัง สมการ [73] กำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1 และ 2 mg/mL หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และคำนวณหา IC<sub>50</sub> โดยใช้โปรแกรมจาก GraphPad Version 10.1.0

$$\text{ABTS radical scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Blank}} - (A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Blank}}} \times 100$$

โดยที่  $A_{\text{Control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (น้ำ DI + ABTS<sup>•+</sup>)

$A_{\text{Sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่าง + ABTS<sup>•+</sup>)

### 3.3.12.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity

วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล โดยดัดแปลงวิธีจาก [142, 144] นำสารตัวอย่างละลายในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 จากนั้นปิเปตสารตัวอย่าง 50  $\mu\text{L}$  ผสมกับ 3 mM 1, 10-phenantroline ปริมาณ 50  $\mu\text{L}$  และเติมสารละลาย  $\text{FeSO}_4$  ความเข้มข้น 3 mM จำนวน 50  $\mu\text{L}$  ทำปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.01% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50  $\mu\text{L}$  วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 536 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ในเวลาที่ 0 และวัดทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37°C และเขย่าอย่างต่อเนื่อง กำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1 และ 2 mg/mL หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และคำนวณหา  $\text{IC}_{50}$  โดยใช้โปรแกรมจาก GraphPad Version 10.1.0

$$\text{Hydroxyl scavenging effect (\%)} = \frac{(\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank}) - \Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{sample}))}{\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank})} \times 100$$

โดยที่  $\Delta A$  คือ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง

### 3.3.12.4 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide สามารถอธิบายได้โดย [142] นำสารตัวอย่างละลายใน Tris-HCl buffer pH 8.3 จากนั้นปิเปตสารตัวอย่าง 80  $\mu\text{L}$  ลงใน 96-well plate เติม Tris-HCl buffer ปริมาณ 80  $\mu\text{L}$  ทำปฏิกิริยาโดยเติม pyrogallol 1.5 mM ที่อยู่ในสารละลาย HCl 10 mM ปริมาณ 40  $\mu\text{L}$  วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ในเวลาที่ 0 และวัดทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 4 นาที กำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0125, 0.025, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และคำนวณค่า  $\text{IC}_{50}$  โดยใช้โปรแกรมจาก GraphPad Version 10.1.0

$$\text{Superoxide scavenging effect (\%)} = \frac{(\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank}) - \Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{sample}))}{\Delta A_{\text{min}}^{-1}(\text{blank})} \times 100$$

โดยที่  $\Delta A$  คือ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง

### 3.3.12.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ทำการเตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม acetate buffer 0.3 M pH 3.6 สารละลาย TPTZ 10 mM ในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 40 mM และสารละลาย  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM ที่อัตราส่วน 5:1:1 (โดยปริมาตร) เตรียมสารละลายตัวอย่างตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยละลายในน้ำ DI และบ่มสารละลาย FRAP ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  ก่อนนำมาวิเคราะห์ ขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยผสมสารตัวอย่าง 40  $\mu\text{L}$  กับสารละลาย FRAP 200  $\mu\text{L}$  เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.03-0.9  $\mu\text{mol/mL}$ ) โดยแสดงค่าเป็นปริมาณ mM ของ  $\text{Fe}^{2+}$  ที่ถูกรีดิวซ์ ต่อกรัมสารตัวอย่าง [145]

### 3.3.13 วิเคราะห์ความเป็นพิษในเซลล์ปกติด้วยวิธี MTT

วิเคราะห์ความเป็นต่อเซลล์ปกติ โดยทดสอบกับเซลล์ Vero (Normal cell) ถูกเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อแบบ 96 well ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี  $\text{CO}_2$  5% จากนั้นเซลล์ถูกสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ (0.1 และ 1  $\text{mg/mL}$ ) ในแต่ละหลุม เป็นเวลาเพิ่มเติมอีก 24 ชั่วโมง การควบคุมเชิงลบและเชิงบวกได้แก่ DMSO 10% และอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ในเวลาที่กำหนด อาหารเลี้ยงเชื้อถูกนำออก จากนั้นเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น 0.5  $\text{mg/mL}$  และผสมกันก่อนนำไปบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม DMSO เพื่อทำให้ผลึก formazan ที่ไม่ละลาย สามารถละลายโดยทิ้งไว้ที่เวลา 15 นาที ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ถูกวัดโดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้นและการปล่อยที่ 570 และ 630 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้ microplate reader [146]

### 3.3.14 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

#### 3.3.14.1 วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO)

##### และความเป็นพิษต่อเซลล์ของแมคโครฟาจ RAW 264.7

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (macrophage) ของหนู: RAW 264.7 (จำนวน 100,000 cell/well) ถูกเพาะเลี้ยงในแผ่นเพาะเชื้อแบบ 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% ทำการเตรียมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยการเจือจางตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นเติมลงในแต่ละหลุมจานเพาะ (well plate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS (1 µg/mL) บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง กำหนดตัวแปรควบคุมเชิงบวก (positive control) ได้แก่ dichlofinac (75 µg/mL) และตัวแปรควบคุมเชิงลบ (negative control) ได้แก่ LPS (1 µg/mL) อย่างเดียวโดยไม่บ่มตัวอย่างใด ๆ ในตัวอย่างเซลล์ที่ทำการทดลองกับสารตัวอย่าง เมื่อบ่มตัวอย่างครบตามเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมทดสอบมาวิเคราะห์ปริมาณ NO โดยใช้สาร Greiss reagent (Promega) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ถูกวัดที่ความยาวคลื่น 570-630 นาโนเมตร โดยใช้ไนโตรต์เป็นสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยสีย้อม Presto Blue โดยการเจือจางสีดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:5 ก่อนเติมลงในแต่ละหลุมในปริมาตร 20 µL ซึ่งอัตราการรอดของเซลล์ต้องมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 80 ขึ้นไป [146]

#### 3.3.14.2 วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์

การทดสอบการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) เพื่อดูทิศทางการยับยั้งสารที่ถูกปลดปล่อยจากเซลล์หลังเกิดการอักเสบ โดยศึกษาผลของตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียวที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ต่อการหลั่ง IL-6 และ TNF-α วัดโดยวิธี ELISA เซลล์ RAW 264.7 เลี้ยงเซลล์จำนวน 3×10<sup>5</sup> เซลล์ ต่อ หลุม ลงใน 96 well plate เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 25 µg/mL ของสารละลายยา dichlofinac ถูกใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวกและสารละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดจะถูกใช้เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ หลังจากนั้นนำเซลล์ไปตรวจหา IL-6 และ TNF-α ด้วยชุดทดสอบ ELISA [147]

### 3.3.15 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer)

ทดสอบความสามารถของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์ถั่วเขียว ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด (human alveolar basal epithelial cell; A549) มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma; MCF-7) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma; HCT-116) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง A549 (จำนวน 5,000 cell/well), MCF7 (จำนวน 1,000 cell/well) และ HCT116 (จำนวน 7,000 cell/well) ในจานเพาะเชื้อแบบ 96 well ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% จากนั้นเติมสารตัวอย่างเพปไทด์ที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปวัดอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT [148]

### 3.3.4 วิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ข้อมูลจากการทดลองในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย the analysis of variance (ANOVA) และ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SAS, version 9.0 (2002)

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในกากถั่วเขียวผ่านการสกัดน้ำมัน (MBM) กากถั่วเขียวที่ผ่านการไฮโดรไลเซต (Crude) และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (RF4) จากผลการวิเคราะห์พบว่า กากถั่วเขียวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน และ กากถั่วเขียวที่ผ่านการไฮโดรไลเซตแล้ว มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงถึงร้อยละ 78.92 และ 87.35 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) ซึ่งแตกต่างจาก RF4 เป็นผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จาก F4 (<1 kDa) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 43.22 ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า RF4 มีปริมาณโปรตีนน้อยเมื่อเทียบกับ MBM และ Crude เนื่องจากโปรตีน กรดอะมิโนหรือเพปไทด์ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดเกิดขึ้น นอกจากนี้ RF4 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและความชื้นสูง อาจเป็นผลมาจากน้ำตาลที่ยังหลงเหลืออยู่หลังจากทำปฏิกิริยา ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภท monosaccharide และนอกจากนี้ น้ำตาลยังมีสมบัติในการดูดซับและกักเก็บความชื้นจากอากาศ ส่งผลทำให้ RF4 มีปริมาณความชื้นที่สูง วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ดัดนั้นควรมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนักแห้ง (% dry weight) ซึ่งการสกัดน้ำมันออกจากกากถั่วเขียวเพื่อป้องกันปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์ [149]

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเขียว (% w/w)

| องค์ประกอบ   | ปริมาณ (% dry weight) |       |       |
|--------------|-----------------------|-------|-------|
|              | MBM                   | C     | RF4   |
| โปรตีน       | 78.92                 | 87.35 | 43.22 |
| ไขมัน        | 0.98                  | 0.79  | 0.52  |
| เถ้า         | 0.78                  | 5.02  | 6.54  |
| เส้นใย       | 2.26                  | 1.32  | 0.76  |
| คาร์โบไฮเดรต | 10.71                 | 5.00  | 35.19 |
| ความชื้น     | 6.35                  | 0.52  | 13.77 |

#### 4.2 ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield) ของโปรตีนไฮโดรไลเซต จากกากถั่วเขียว (Crude)

ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield) ของโปรตีนไฮโดรไลเซต (Crude) ที่ผ่านการแยกขนาดตามขนาดมวลโมกุล ได้แก่ F1 มีขนาดมวลโมเลกุล (MW) > 10 kDa, F2 มี MW = 5-10 kDa, F3 มี MW = 1-5 kDa และ F4 มี MW < 1 kDa พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ภาวะที่เหมาะสม (ร้อยละ 15, 12 ชั่วโมง) หรือ Crude มีร้อยละการผลิตเท่ากับ 39.85 ต่อกากถั่วเขียวเริ่มต้น เมื่อนำ crude ไปแยกตามขนาดด้วยเมมเบรนตาม molecular weight cut-off ที่ต่างกัน พบว่าสัดส่วนของเพปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa (F4) มีปริมาณสูงสุด มีค่าเท่ากับ 27.97 รองลงมาคือขนาดของเพปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 1 kDa (F1), 1-5 kDa (F3) และ 5-10 kDa (F2) ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) เห็นได้ว่าร้อยละผลผลิตของเพปไทด์ในกากถั่วเขียวมีสัดส่วนไม่แตกต่างกันมาก แต่ส่วนใหญ่เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กน้อยกว่า 1 kDa ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากโบรมิเลนเป็นเอนไซม์ชนิด endoprotease ซึ่งมีการตัดอิสระระหว่างสายโปรตีน จึงทำให้ขนาดที่ได้มีขนาดต่าง ๆ กัน ขึ้นกับชนิดของกรดอะมิโนในบริเวณตัดจำเพาะ

ตารางที่ 4-2 ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield) ของเพปไทด์กากถั่วเขียว

| sample | %yield                  |
|--------|-------------------------|
| Crude  | 39.85±0.49              |
| F1     | 25.35±0.04 <sup>b</sup> |
| F2     | 22.34±0.64 <sup>c</sup> |
| F3     | 24.34±0.06 <sup>b</sup> |
| F4     | 27.97±0.54 <sup>a</sup> |

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เปรียบเทียบตัวอย่าง F1, F2, F3 และ F4

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและค่าสีของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว

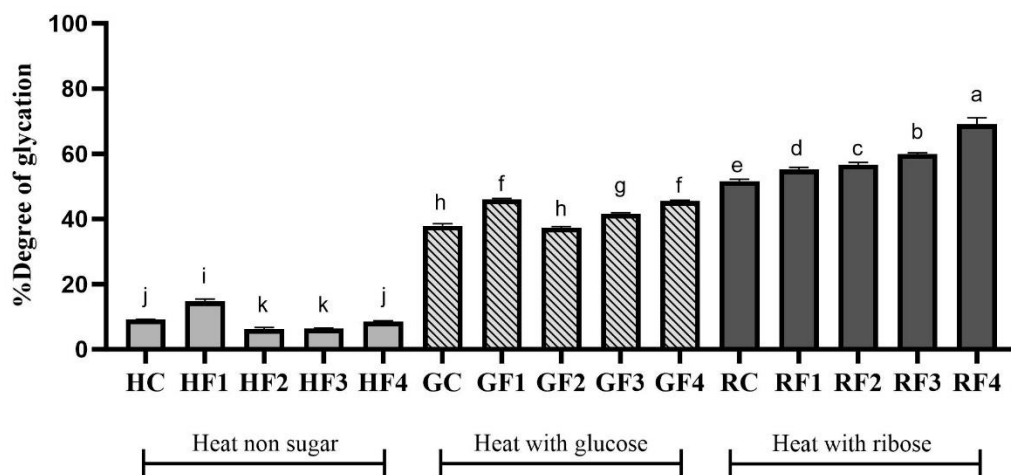
จากผลลักษณะปรากฏและค่าสีของเพปไทด์ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยที่ค่า  $L^*$  คือ ความสว่าง,  $a^*$  คือ ความเป็นสีเขียวหรือสีแดง และ  $b^*$  คือ ความเป็นสีน้ำเงินหรือสีเหลือง และนำค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  คำนวณค่า  $\Delta E$  เพื่อบอกความแตกต่างของสี ซึ่งได้จากสีของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดเปรียบเทียบกับสีของเพปไทด์เริ่มต้น จากตารางที่ 4.3 พบว่าเพปไทด์เริ่มต้นหรือเพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้แก่ Crude, F1, F2, F3 และ F4 มีสีตั้งต้นที่ค่อนข้างแตกต่างกัน เนื่องจากขนาดของโมเลกุลที่ต่างกัน สังเกตได้จากเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก มีสีเข้ม ส่วนเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะมีสีอ่อนตามลำดับ และเมื่อนำ Crude, F1, F2, F3 และ F4 ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล เมื่อพิจารณาตามแถวตาราง 4.3 พบว่า สีของผลิตภัณฑ์ (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) มีสีที่เข้มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเพปไทด์เริ่มต้น และเมื่อนำเพปไทด์ทำปฏิกิริยากับกลูโคส พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด สีของผลิตภัณฑ์มีสีที่เข้มขึ้นกว่าเดิม แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไรโบส พบว่าผลิตภัณฑ์ (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด มีสีน้ำตาลเข้มมากอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดในกลุ่มอื่น โดยเฉพาะ เพปไทด์ในกลุ่มของ F4 เมื่อพิจารณาตามแถว ตาราง 4.3 สังเกตความแตกต่างของสี ( $\Delta E$ ) ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้อย่างชัดเจน ซึ่งพบวก่อนทำปฏิกิริยา F4 มีสีเหลืองสว่าง เมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HF4) พบว่ามีสีเหลืองเข้มขึ้นจากเดิม และเมื่อทำปฏิกิริยากับกลูโคส (GF4) พบว่ามีสีที่เข้มขึ้นแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไรโบส ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (RF4) มีสีน้ำตาลเข้มมาก ซึ่งชนิดของน้ำตาลมีผลต่อสีของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากไรโบสเป็นน้ำตาลประเภทเพนโทสมีคาร์บอน 5 อะตอม น้อยกว่าน้ำตาลกลูโคสที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ทำให้ไรโบสเกิดการเปิดวง (Open-chain ring) ได้ง่ายกว่า ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอะมิโน เพปไทด์หรือโปรตีนได้ง่ายขึ้นและว่องไวกว่ากลูโคส [113] ทำให้เกิดเมลานอยด์ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลเข้มมากกว่ากลูโคส นอกจากนี้ มีรายงานพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาล เช่น เพอร์ฟูลมีส่วนสำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาล [150] ดังนั้น การวัดสีหลังจากเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) มีความสำคัญมาก สีที่เปลี่ยนแปลงเป็นตัวชี้วัดสำคัญของปฏิกิริยานี้ เนื่องจากสีสามารถจะคาดการณ์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ได้ เช่น ถ้าสีน้ำตาลเข้มแสดงว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดได้ดี ได้สารประกอบที่ให้กลิ่นและรสชาติที่เข้มข้น การวัดสีช่วยให้สามารถคาดการณ์อายุการเก็บรักษาได้ดีขึ้น รวมทั้ง สีของอาหารมีผลต่อความรู้สึกและความน่ารับประทานของผู้บริโภค

ตารางที่ 4- 3 ค่าสีและลักษณะปรากฏของเพปไทด์จากกากถั่วเขียวก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด

| เพปไทด์<br>เริ่มต้น ไม่ได้<br>ทำปฏิกิริยา                                                    | ค่าสีตามระบบ CIE |        |       | เพปไทด์ใช้<br>ความร้อนแต่<br>ไม่ใช้น้ำตาล                                                    | ค่าสีตามระบบ CIE |       |       |            | เพปไทด์<br>ใช้ร้อนกับ<br>น้ำตาล                                                              | ค่าสีตามระบบ CIE |       |       |            | ค่าสีตามระบบ CIE |       |       |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|-------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|-------|------------|------------------|-------|-------|------------|
|                                                                                              | L*               | a*     | b*    |                                                                                              | L*               | a*    | b*    | $\Delta E$ |                                                                                              | L*               | a*    | b*    | $\Delta E$ | L*               | a*    | b*    | $\Delta E$ |
| <br>Crude | 58.49            | 21.83  | 21.79 | <br>HC    | 46.85            | 11.04 | 11.04 | 19.16      | <br>GC    | 39.25            | 5.69  | 33.07 | 27.53      | 19.53            | 31.37 | 56.32 | 52.92      |
| <br>F1    | 38.33            | 0.99   | 36.93 | <br>HF1   | 27.40            | 11.39 | 42.20 | 15.98      | <br>GF1   | 15.93            | 4.21  | 26.90 | 24.75      | 16.84            | 22.95 | 46.69 | 32.23      |
| <br>F2    | 37.25            | 2.96   | 33.81 | <br>HF2   | 34.23            | 1.59  | 36.79 | 4.45       | <br>GF2   | 33.34            | 4.25  | 40.05 | 36.20      | 17.73            | 31.22 | 54.86 | 40.28      |
| <br>F3   | 57.93            | -17.59 | 14.02 | <br>HF3  | 57.00            | 17.47 | 20.04 | 6.09       | <br>GF3  | 47.62            | 14.07 | 28.25 |            | 20.22            | 30.78 | 56.45 | 74.57      |
| <br>F4  | 61.60            | -10.90 | 7.18  | <br>HF4 | 56.19            | 15.15 | 9.72  | 7.33       | <br>GF4 | 52.54            | 17.93 | 25.26 | 35.21      | 15.39            | 30.63 | 52.31 | 76.79      |

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation)

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันด้วยการวัดค่า Degree of glycation เป็นวิธีที่บ่งบอกถึงระดับของการเกิดไกลเคชันของหมู่อะมิโนในโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกใช้ไปในกระบวนการระหว่างปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยใช้สาร OPA (o-Phathaldialdehyde) ในการตรวจจับหมู่อะมิโนในโปรตีนจากผลการทดสอบการเกิดไกลเคชันของเปปไทด์จากถั่วเขียว ได้แก่ เปปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) และเปปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนกับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-1) พบว่าเปปไทด์ที่ใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล มีร้อยละการเกิดไกลเคชันต่ำ ซึ่งแตกต่างกับในกลุ่มของเปปไทด์ที่ใช้ความร้อนกับน้ำตาลกลูโคสและไรโบส พบว่ามีเกิดไกลเคชันที่สูง โดยเฉพาะ RF4 เป็นผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จาก F4 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส ซึ่งพบว่ามีเกิดไกลเคชันสูงสุด เท่ากับ 69.17% รองลงมา RF3, RF2, RF1 และ RC ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดไกลเคชัน เท่ากับ 59.90%, 56.61%, 51.66% และ 55.25% ตามลำดับ โดยที่ RF4 เกิดไกลเคชันมากที่สุด เนื่องจากน้ำตาลไรโบสเป็นน้ำตาลประเภทเพนโทสมีความยาวของแกนคาร์บอนหลักซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม น้อยกว่าน้ำตาลกลูโคสที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ทำให้ไรโบสเกิดการเปิดวงหรือ reactivity ที่สูง ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายและว่องไวกว่ากลูโคส [113] โดยจากรายงานพบว่าการเปิดวงของน้ำตาลเพนโทส สูงกว่าน้ำตาลเฮกโซส และไดแซ็กคาไรด์ น้ำตาลที่แสดงการเปิดวงได้อย่างรวดเร็วทำให้เกิดไกลเคชันเร็วและสูงขึ้น [115] และเปปไทด์ขนาดเล็กอาจจะมีส่วนทำให้เกิดไกลเคชันได้ดี เมื่อน้ำตาลไรโบสทำปฏิกิริยาเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก โดยที่โมเลกุลขนาดเล็กสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลได้ง่ายกว่าเปปไทด์โมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้เกิดไกลเคชันสูงขึ้น [151] นอกจากนี้จากกราฟ จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ที่ใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาลมีค่าร้อยละการเกิดไกลเคชันต่ำ ถึงแม้ว่าจะมีเปปไทด์ขนาดเล็กที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด แต่เนื่องจากหมู่อะมิโนของเปปไทด์ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ส่งผลทำให้เกิดไกลเคชันต่ำ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่จะรายงานในหัวข้อถัดไป



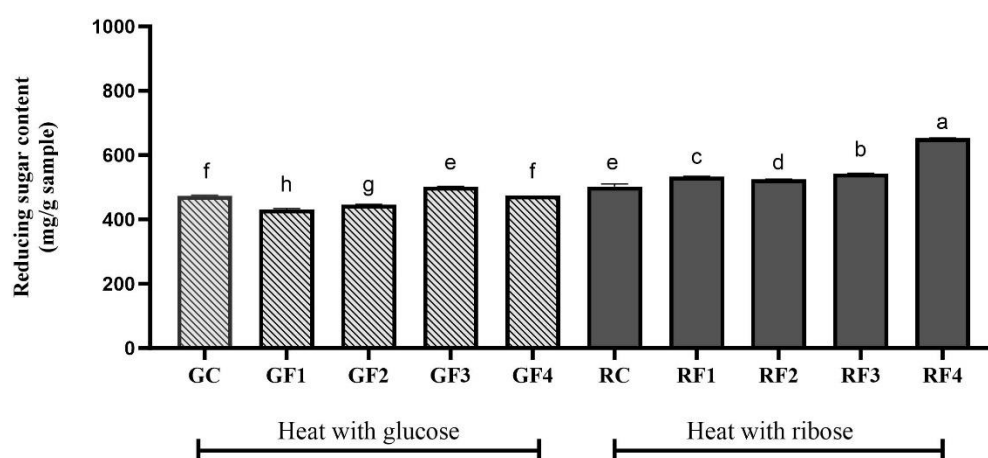
ภาพที่ 4-1 ร้อยละการเกิดไกลเคชัน (% Degree of glycation) ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์จากถั่วเขียวที่ขนาดมวโมเลกุลแตกต่างกัน

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยใช้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS reagents) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและไรโบส จากผลการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ของเพปไทด์จากถั่วเขียว ได้แก่ เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนกับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) เพื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เพื่อบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยาของเพปไทด์ โดยใช้น้ำตาลทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1) จากผลการทดลองพบว่า เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบสมีปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปมากกว่ากลูโคส เนื่องจาก น้ำตาลไรโบสมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา หรือ active ได้ดีกว่ากลูโคส [113] โดยเฉพาะใน RF4 ซึ่งได้จาก F4 ( $< 1$  kDa) ทำปฏิกิริยากับไรโบส ส่งผลทำให้ RF4 มีปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปมากที่สุด เท่ากับ 652.73 mg/g ต่อตัวอย่าง (ภาพที่ 4-2) เมื่อเทียบกับเพปไทด์ที่มีขนาดมวโมเลกุลใหญ่กว่า รองลงมา ได้แก่ RF3, RF1, RF2 และ RC เท่ากับ 543.11, 533.35, 524.99 และ 502.69 mg/g ต่อตัวอย่าง ตามลำดับ โดย RF4 มีปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปมากที่สุด ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากกรดอะมิโนในเพปไทด์ของ F4 มีขนาดมวโมเลกุล สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสได้ดีกว่าเมื่อเทียบเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ได้ทำวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในกลุ่มเพปไทด์ทำ

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) หรือ กลุ่ม control พบว่าเมื่อเติม DNS reagent สีของสารละลายไม่เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มแดง เนื่องจากไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ขนาดของเพปไทด์และ ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าสีและการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน ในการทดลองก่อนหน้านี้



ภาพที่ 4-2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาเมลลาร์ด (mg/g sample)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

กรดอะมิโนมีความสำคัญในการให้รสชาติ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภทได้แก่ กรดอะมิโนที่ให้รสขม (bitter amino acid) กรดอะมิโนให้รสหวาน (sweet amino acid) กรดอะมิโนให้รสเปรี้ยว (sour amino acid) กรดอะมิโนที่ให้รสเค็ม (salty amino acid) และ กรดอะมิโนให้รสอูมามิ (umami amino acid) จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมดในเพปไทด์ จากกากถั่วเขียวก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดด้วยน้ำตาลกลูโคสและไรโบส พบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเขียว Crude, F1 (>10 kDa), F2 (5-10 kDa), F3 (1-5 kDa) และ F4 (<1 kDa) พบว่ามีกรดอะมิโนทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ Asp, Glu, Lys, Arg, His, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Pro, Met, Cys, Tyr, Phe, Trp, Ser และ Thr ซึ่งกรดอะมิโน Asp และ Glu มีปริมาณสูงสุด รองลงมา คือ กรดอะมิโน Lys, Arg, Lue, Phe และ Ser ตามลำดับ โดย แบ่งเป็นกรดอะมิโนให้รสขม 8 ชนิด ได้แก่ Val, Leu, Ile, Met, Phe, Arg และ His กรดอะมิโนที่ให้รสหวาน ได้แก่ Gly, Thr, Ala, Ser และ Pro และกรดอะมิโนให้รสอูมามิหรือรสอร่อย มี 2 ชนิด คือ Glu และ Asp [12] จากผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างเพปไทด์ก่อนและหลังทำปฏิกิริยา พบว่า crude ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด พบกรดอะมิโน Asp, Glu, Lys, Arg, Lue, Phe และ Ser เท่ากับ 10.39, 15.08, 6.41, 5.49, 6.13, 4.70 และ 5.06 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเพปไทด์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4) แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนเหล่านี้กับเพปไทด์แฟรคชันอื่น รวมทั้งเพปไทด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล และทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสและไรโบส พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน อาจส่งผลให้มีความแตกต่างต่อลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเพปไทด์ในส่วนต่าง ๆ เช่น รสชาติ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งจะทำการทดสอบในหัวข้อถัดไป จากตารางที่ 4-4 เห็นได้ว่าปริมาณกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้น้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) พบว่ากรดอะมิโนทุกชนิดมีปริมาณลดลง เมื่อเทียบกับเพปไทด์เริ่มต้นที่ไม่ได้ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Crude, F1, F2, F3 และ F4) และ เพปไทด์ทำปฏิกิริยาใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) เช่น เพปไทด์ F4 มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1 kDa (F4) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีกรดอะมิโน Glu เท่ากับ 15.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเพปไทด์ หลังจาก F4 ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับกลูโคสและไรโบสมีปริมาณกรดอะมิโน Glu ที่พบในผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด GF4 และ เท่ากับ 7.67 และ 7.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเพปไทด์ ตามลำดับ หรือ เพปไทด์ (F4) ก่อนทำปฏิกิริยามีกรดอะมิโน Lys เท่ากับ 5.60 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเพปไทด์ หลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส (GF4) และไรโบส (RF4) มีปริมาณกรดอะมิโน Lys เท่ากับ 2.12 และ 0.94 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเพปไทด์ เป็นต้น

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในกลุ่มผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับไรโบส ส่วนใหญ่มีกรดอะมิโนลดลงเยอะ โดยการที่กรดอะมิโนมีปริมาณลดลง แสดงว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดได้ดี ซึ่งสัมพันธ์กับค่าสี glycation และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป เนื่องจากกรดอะมิโนลดลงหรือหายไป ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ ถ้ากรดอะมิโนลดลงเยอะ ส่งผลทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเยอะ ส่งผลทำให้เกิด glycation สูง ซึ่งเป็นผลมาจากการที่กรดอะมิโนจับกับน้ำตาลเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ดี ส่งผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มดังนั้นการที่กรดอะมิโนหายไปหรือมีจำนวนลดลงหลังจากทำปฏิกิริยาสามารถสรุปได้ว่ามีปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดขึ้นจริง เป็นผลมาจากการกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ [152] โดยเกิดการเชื่อมขวาง (crosslinking) กันระหว่างกรดอะมิโนในสายเพปไทด์กับน้ำตาลกลูโคสและไรโบส [153], [154] เพื่อสร้างสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compounds) [153] ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างของเพปไทด์ทุก fractions ที่ผ่านความร้อนโดยไม่ใช้น้ำตาล (H-C, H-F1, H-F2, H-F3 และ H-F4) มีปริมาณกรดอะมิโนลดลงจากเดิมเพียงเล็กน้อยไม่แตกต่างกับตัวอย่างเริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยา เป็นการยืนยันว่ากรดอะมิโนที่หายไปส่วนใหญ่เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ของกากถั่วเขียวโดยผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนทุกชนิดหลังทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสมีปริมาณลดลงมากกว่าทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลไรโบสเป็นน้ำตาลประเภทเพนโทสมีอันดับการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลประเภทเฮกโซส ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าน้ำตาลไรโบสมีความยาวของแกนคาร์บอนหลักซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม น้อยกว่าน้ำตาลกลูโคสที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ทำให้เกิดการเปิดวงหรือที่เรียกว่าน้ำตาลในรูปแบบ active ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า [113] โดยพบว่า การเปิดวงของน้ำตาลเพนโทส (pentose) สูงกว่า น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) น้ำตาลที่แสดงการเปิดวงได้อย่างรวดเร็วทำให้เกิดไกลเคชั่นเร็วขึ้นและสูงขึ้น [115]

**ตารางที่ 4-4** แสดงองค์ประกอบกรดอะมิโนทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา เพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเขียว F1 (>10 kDa) F2 (5-10 kDa) F3 (1-5 kDa) และ F4 (<1 kDa) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไรโบส

| Group                | Ami-<br>no<br>acid | Non-heating and No-sugar |      |      |      |     | Heated without sugar |       |       |       |       | Glucose |        |        |        |        | Ribose |      |      |      |      |
|----------------------|--------------------|--------------------------|------|------|------|-----|----------------------|-------|-------|-------|-------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|------|------|
|                      |                    | C                        | F1   | F2   | F3   | F4  | H-C                  | H-F1  | H-F2  | H-F3  | H-F4  | Glu-C   | Glu-F1 | Glu-F2 | Glu-F3 | Glu-F4 | R-C    | R-F1 | R-F2 | R-F3 | R-F4 |
| Acidic<br>(- charge) | Asp                | 10.3                     | 10.3 | 12.0 | 12.6 | 9.6 | 9.91                 | 9.76  | 11.30 | 12.20 | 8.97  | 5.30    | 4.99   | 5.82   | 6.12   | 4.48   | 5.08   | 5.10 | 5.44 | 6.06 | 4.32 |
|                      | Glu                | 15.0                     | 13.1 | 15.6 | 16.7 | 15. | 14.4                 | 13.21 | 15.16 | 16.15 | 15.05 | 7.49    | 6.61   | 7.71   | 8.23   | 7.67   | 7.32   | 6.37 | 7.38 | 8.12 | 7.28 |
|                      | Lys                | 6.41                     | 5.95 | 7.27 | 7.34 | 5.6 | 5.99                 | 5.71  | 6.93  | 7.48  | 5.63  | 2.78    | 2.63   | 3.20   | 3.48   | 2.48   | 0.98   | 0.82 | 1.07 | 1.31 | 0.94 |
| Basic<br>(+charge)   | Arg                | 5.49                     | 4.48 | 5.87 | 6.17 | 5.6 | 5.05                 | 4.08  | 5.86  | 5.71  | 5.45  | 2.15    | 1.73   | 2.34   | 2.49   | 2.12   | 1.57   | 1.32 | 1.79 | 1.97 | 1.62 |
|                      | His                | 2.56                     | 2.21 | 2.68 | 2.53 | 2.4 | 2.43                 | 2.24  | 2.63  | 2.42  | 2.47  | 1.38    | 1.21   | 1.45   | 1.21   | 1.19   | 1.01   | 0.91 | 1.08 | 1.12 | 1.05 |
| Hydro-<br>phobic     | Gly                | 3.12                     | 2.52 | 3.31 | 3.43 | 3.2 | 2.96                 | 2.56  | 3.24  | 3.32  | 3.44  | 1.50    | 1.25   | 1.60   | 1.66   | 1.59   | 1.36   | 1.15 | 1.42 | 1.53 | 1.39 |
|                      | Ala                | 3.56                     | 2.82 | 3.47 | 3.59 | 4.0 | 3.40                 | 2.83  | 3.42  | 3.47  | 4.09  | 1.76    | 1.39   | 1.77   | 1.78   | 2.03   | 1.67   | 1.34 | 1.66 | 1.73 | 1.86 |
|                      | Val                | 4.16                     | 3.50 | 4.53 | 4.88 | 4.1 | 3.96                 | 3.47  | 4.67  | 4.78  | 4.24  | 2.09    | 1.83   | 2.37   | 2.43   | 2.19   | 2.08   | 1.72 | 2.32 | 2.54 | 2.14 |
|                      | Ile                | 3.35                     | 3.11 | 4.05 | 4.30 | 2.9 | 3.19                 | 3.03  | 3.95  | 4.20  | 3.01  | 1.61    | 1.55   | 1.97   | 2.05   | 1.45   | 1.55   | 1.41 | 1.89 | 2.08 | 1.38 |
|                      | Leu                | 6.13                     | 4.51 | 5.79 | 6.15 | 7.0 | 5.77                 | 4.50  | 5.98  | 5.95  | 7.01  | 2.98    | 2.28   | 3.00   | 2.96   | 3.53   | 2.79   | 2.14 | 2.79 | 2.95 | 3.14 |
|                      | Pro                | 3.60                     | 3.45 | 4.89 | 5.67 | 2.9 | 3.45                 | 3.73  | 4.62  | 4.62  | 4.88  | 2.87    | 1.86   | 1.77   | 2.25   | 2.56   | 1.49   | 1.96 | 1.80 | 2.31 | 2.66 |
| Aromatic             | Met                | 1.08                     | 0.82 | 0.99 | 1.00 | 1.3 | 1.10                 | 0.78  | 0.81  | 0.84  | 1.32  | 0.42    | 0.26   | 0.37   | 0.43   | 0.48   | 0.39   | 0.24 | 0.53 | 0.37 | 0.40 |
|                      | Cys                | 0.68                     | 1.72 | 0.72 | 0.55 | 0.2 | 0.56                 | 0.95  | 0.42  | 0.42  | 0.18  | 0.26    | 0.54   | 0.20   | 0.18   | 0.10   | 0.41   | 0.74 | 0.34 | 0.24 | 0.16 |
|                      | Tyr                | 3.02                     | 2.63 | 2.94 | 3.15 | 3.1 | 2.80                 | 2.52  | 2.97  | 3.05  | 3.13  | 1.36    | 1.24   | 1.39   | 1.34   | 1.50   | 1.18   | 0.85 | 1.23 | 1.20 | 1.29 |
|                      | Phe                | 4.70                     | 3.52 | 4.44 | 4.75 | 5.3 | 4.43                 | 3.54  | 4.56  | 4.66  | 5.42  | 2.22    | 1.75   | 2.26   | 2.15   | 2.69   | 2.15   | 1.61 | 2.20 | 2.23 | 2.42 |
|                      | Trp                | 0.58                     | 0.52 | 0.65 | 0.72 | 0.6 | 0.58                 | 0.48  | 0.64  | 0.64  | 0.71  | 0.64    | 0.29   | 0.28   | 0.33   | 0.31   | 0.27   | 0.25 | 0.23 | 0.32 | 0.30 |
| Hydro-<br>philic     | Ser                | 5.06                     | 4.08 | 5.03 | 5.21 | 5.3 | 4.78                 | 3.84  | 4.94  | 4.86  | 5.16  | 2.43    | 1.89   | 2.48   | 2.43   | 2.61   | 2.41   | 1.91 | 2.36 | 2.41 | 2.43 |
|                      | Thr                | 2.88                     | 2.57 | 3.03 | 3.10 | 2.9 | 2.72                 | 2.43  | 2.96  | 2.91  | 2.80  | 1.40    | 1.22   | 1.48   | 1.44   | 1.42   | 1.41   | 1.24 | 1.45 | 1.50 | 1.37 |

#### 4.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ (Volatile compounds)

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยได้ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์ที่ใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาลและเพปไทด์ผ่านความร้อนทำปฏิกิริยาน้ำตาลกลูโคสและไรโบสด้วย Gas chromatography mass spectrometer (GC-MS) โดยใช้เทคนิค Solid phase microextraction (SPME) แบบ headspace โดยใช้โอรระเหยของตัวอย่าง พบว่าองค์ประกอบหลักของสารระเหยได้ทั้งหมด 48 ชนิด (Predominant volatile compounds) (ตารางที่ 4-5) ซึ่งให้กลิ่นรสที่แตกต่างกัน โดยผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากเพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล ได้ HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4 พบว่ามีสารประกอบระเหยได้ส่วนใหญ่เป็น alkane ได้แก่ nonanoic acid, octanoic acid, cyclotetradecane, benzaldehyde เป็นต้น ซึ่งให้กลิ่นเขียว กลิ่นชีส กลิ่นอัลมอนด์ และกลิ่นโกโก้ ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากน้ำกลูโคสและน้ำตาลไรโบส พบสารประกอบระเหยได้ที่ให้กลิ่นรส ได้แก่ 2,5-dimethyl pyrazine, benzaldehyde, benzeneacetaldehyde, methyl-phenyl-oxime และ 2,4-di-tert-butylphenol เป็นต้น ซึ่งให้กลิ่นเนื้อ กลิ่นอัลมอนด์ กลิ่นหวาน กลิ่นน้ำตาลไหม้ กลิ่นช็อกโกแลต กลิ่นซีฟูด เป็นต้น นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสและไรโบสพบผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากไรโบส มีปริมาณสารระเหยได้เกือบทุกชนิดมากกว่าในผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากกลูโคส โดยผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากกลูโคสและไรโบสมีสารประกอบระเหยได้ที่เหมือนกัน ได้แก่ 2,5-dimethyl pyrazine, benzaldehyde, benzeneacetaldehyde, 2,4-di-tert-butylphenol เป็นต้น ซึ่งให้กลิ่นคล้ายกับกลิ่นเนื้อ กลิ่นถั่ว กลิ่นหวาน กลิ่นเชอร์รี่ และกลิ่นกุหลาบ ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดในกลุ่มไรโบสพบในปริมาณที่สูงกว่ากลูโคส และมีสารประกอบระเหยปริมาณสูงกว่ากลูโคส อีกทั้งยังมีสารประกอบระเหยง่ายที่แตกต่างกัน โดยผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากกลูโคส พบสารประกอบระเหยง่าย ได้แก่ 2-ethyl-5-methyl-pyrazine ให้กลิ่นคล้ายมะพร้าว กลิ่นถั่ว, 2-methyl-4-vinylphenol ให้กลิ่นเผ็ดๆ ซึ่งต่างจากผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากไรโบส ให้กลิ่นที่ดี พบสารประกอบระเหยง่าย ได้แก่ furfural ให้กลิ่นหวานคล้ายกับคาราเมล, 4-ethyl-benzaldehyde ให้กลิ่นคล้ายกับอัลมอนด์, benzeneacetaldehyde กลิ่นกุหลาบ หรือ ช็อกโกแลต และ 3-phenyl furan ให้กลิ่นหวาน เป็นต้น นอกจากนี้สารประกอบระเหยได้ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการผลิตสารประกอบฟูแรน อนุพันธ์ของฟูแรน หรือสารประกอบให้กลิ่นรสอื่น ๆ [155] สาร 3-methyl-butanal ให้กลิ่นคล้ายแอปเปิลหรือข้าวมอลต์ (Malty) [156], [135] สาร furfural ให้ลักษณะกลิ่นเหมือนอัลมอนด์ [157] สาร benzaldehyde มีกลิ่นหอมหวานคล้ายอัลมอนด์ที่มีความขม [158] และสาร benzeneacetaldehyde ให้กลิ่นหวานคล้ายกุหลาบหรือช็อกโกแลต [159] ซึ่งเมื่อนำตารางที่ 4-5 มาทำเป็นแผนภาพ Heat map (ภาพที่ 4-3) ของสารประกอบระเหยง่ายที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยแกนทางด้านขวา แสดงถึงชนิด

สารประกอบระเหยง่าย ส่วนแกนด้านล่างเป็นตัวอย่างที่วิเคราะห์ โดยจาก Heat map จะแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ให้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล กลุ่มให้ความร้อนทำปฏิกิริยากับกลูโคสและไรโบส โดยแถบสีแดงถึงปริมาณของสาร โดยสีแดงเข้ม หมายถึง พบสารประกอบในปริมาณสูง ซึ่งไล่ระดับสีลงจนถึงสีขาว หมายถึง พบสารในปริมาณระดับปานกลาง ไล่ระดับสีลงมาจนถึงสีฟ้าอ่อนหรือฟ้าเข้ม หมายถึง พบสารในปริมาณต่ำมากหรือไม่พบสาร โดยจาก Heat map เห็นได้ว่าในกลุ่มของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่จากการใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล โดยเฉพาะ HC พบสาร 2-pentyl furan มีปริมาณที่สูง มีแถบสีแดงเข้ม โดยสาร 2-pentyl furan ให้กลิ่นถั่ว กลิ่นเขียว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากกลูโคสและไรโบส ไม่พบสาร 2-pentyl furan ซึ่งไม่พบกลิ่นเขียวเกิดขึ้น ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ส่งผลทำให้กลิ่นเขียวหายไป นอกจากนี้ โดยเฉพาะ RF4 พบว่ามีสารประกอบที่สำคัญในการให้กลิ่นรสคือ dimethyl trisulfide ให้กลิ่นรสเนื้อที่สูง เกิดจากกรดอะมิโน methionine กับ cysteine ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลเพนโทส [160] ทำให้ได้สารประกอบประเภทนี้เกิดขึ้น ซึ่งผลสอดคล้องกับผลของกลิ่นรสลักษณะประสมสัมผัสทางด้านกลิ่นรสพบว่า RF4 ให้กลิ่นรสเนื้อและการยอมรับโดยรวมที่สูงสุด (ภาพที่ 4-3) เห็นได้ชัดเจนว่า RF4 พบสารประกอบที่ให้กลิ่นรสหลายชนิด และยังพบสารประกอบที่ให้กลิ่นรสเนื้อที่เข้มข้นสูงมากกว่าผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์ทั้งหมด ซึ่งสังเกตได้จากแถบสีแดงเข้ม

ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นเริ่มต้น ขั้นกลาง และขั้นสุดท้าย ดังภาพที่ 2-14 ในระยะแรกของปฏิกิริยา กลุ่มอะมิโนทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลผ่านการเติมนิวคลีโอไฟล์และสร้างฐานซิมป์แบบผันกลับได้ ฐานซิมป์ที่ได้มาจากอัลโดสภายในโมเลกุลจะจัดเรียงใหม่เป็น 1-amino-2-deoxyketose ที่ถูกแทนที่ด้วย N ที่เสถียรซึ่งเรียกว่าผลิตภัณฑ์จัดเรียงตัวใหม่ของ Amadori (Amadori rearrangement products ,ARP) และฐานซิมป์ที่ได้รับจากคีโตสถูกแทนที่ด้วย N-deoxyaldose เรียกว่า Heyns rearrangement products (HRP) ผ่านวิถีทางที่คล้ายคลึงกัน ขั้นตอนที่สองของปฏิกิริยาเมลลาร์ด เกี่ยวข้องกับชุดของปฏิกิริยา เช่น การแตกแฟรกเมนต์ ไฮโดรไลซิส ปฏิกิริยา Strecker degradation และสารประกอบอื่น ซึ่งให้อัลดีไฮด์และคีโตนไดคาร์บอนิลและสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก ซึ่งขั้นตอนนี้จะเกิดสารประกอบระเหยง่ายที่มีความสามารถในการให้กลิ่นรสแก่อาหาร เช่น ฟูแรน ฟูราโนน ไพโรล ไพรีดีน เป็นต้น และขั้นสุดท้าย สารประกอบเหล่านี้จะเกิดการเชื่อมขวางเปลี่ยนเป็นเมลานอยด์ดินเป็นโพลีเมอร์ให้น้ำตาลเข้ม [108] และสารประกอบที่ไม่ระเหย นอกจากนี้สารประกอบที่ให้กลิ่นรสเหล่านี้มาจากกรดอะมิโนที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยอีกสาเหตุหนึ่ง เช่น น้ำตาลกลูโคสที่ทำปฏิกิริยากับลิซีนให้กลิ่นคล้ายช็อกโกแลต น้ำตาลกลูโคสกับอาร์จินีนให้กลิ่นหอมหวานคล้ายป๊อปคอร์น น้ำตาลไซโลสกับไลซีนให้กลิ่นคาราเมล หรือเนย (buttery) [161] อย่างไรก็ตามอาจเป็นเพราะ

การหายไปของกรดอะมิโนเกิดจากการย่อยสลายด้วยความร้อนของกรดอะมิโนเพื่อสร้างสารประกอบระเหยในปฏิกิริยาทางความร้อน หรือการเชื่อมขวางระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนอิสระหรือกรดอะมิโนที่เกาะติดกันจนเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ระเหยได้อีกทางหนึ่ง [162]

ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดส่งผลให้เกิดสารประกอบระเหยง่ายหลากหลายชนิด การสลายตัวทางความร้อนของน้ำตาลก่อให้เกิดรสชาติเหมือนเนื้อสัตว์อีกด้วย โดยน้ำตาลจะถูกคาราเมลไลเซชันจากน้ำตาลเพนโทสเป็นสารประกอบเฟอร์ฟูรัล หรือน้ำตาลเฮกโซสเป็นสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล รวมถึงสารประกอบไดคาร์บอนิลอื่น ๆ และสารประกอบไตรคาร์บอนิล สารประกอบระเหยง่ายเหล่านี้เป็นส่วนสำคัญในการให้กลิ่นรสในอาหาร ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการผลิตสารประกอบฟูแรนและอนุพันธ์ของฟูแรน นิวคลีโอไทด์ในเนื้อสัตว์สามารถก่อตัวเป็น ribose 5-phosphate ระหว่างการให้ความร้อน ตามด้วยการสลายตัวของน้ำตาลเพื่อสร้าง 5-methyl-4-hydroxy furanone (สารประกอบที่มีกลิ่นคล้ายเนื้อสัตว์) และปล่อยก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ปล่อยออกมาทำปฏิกิริยารุนแรงกับสารประกอบฟูราโนนเพื่อสร้างกลิ่นหอมที่เหมือนเนื้อสัตว์ [155] นอกจากนี้ซิสเตอีนเป็นสารเหตุหลักของการเกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นคล้ายเนื้อสัตว์ รวมถึงโมเลกุลเฮเทอโรไซคลิกที่มีกำมะถัน (S) ซึ่งมักเกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายซิสเตอีน เช่น  $H_2S$  หรือซิสเทอีน (cysteamine) [150] ดังนั้นจึงคาดว่านิวคลีโอไทด์เป็นสารตั้งต้นของรสชาติเนื้อสัตว์ด้วย ตัวอย่างการเกิดสารประกอบเฮเทอโรไซ-คลิก เช่น ไพราซีน (Pyrazine) เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นตัวแทนของสารประกอบระเหยง่ายของ MRP ไพราซีนเป็นสารแต่งกลิ่นรสสำหรับถั่วและเนื้อย่าง ทำหน้าที่เป็นสารประกอบระเหยง่ายทั่วไปที่พบในระบบปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ใช้เพปไทด์ กลไกการก่อตัวของไพราซีนเกี่ยวข้องกับ  $\alpha$ -aminoketones ที่เกิดจากการรวมตัวของสารประกอบไดคาร์บอนิลกับสารประกอบอะมิโนในปฏิกิริยาเมลลาร์ด การศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (<500 Da) ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดไพราซีน เนื่องจากมีอันดับปฏิกิริยาของเอไมด์สูง นอกจากนี้ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไดคาร์บอนิลซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำตาล และแอมโมเนียที่สามารถเกิดจากหมู่อะมิโนในกรดอะมิโน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสารไพราซีนได้ด้วย [155]

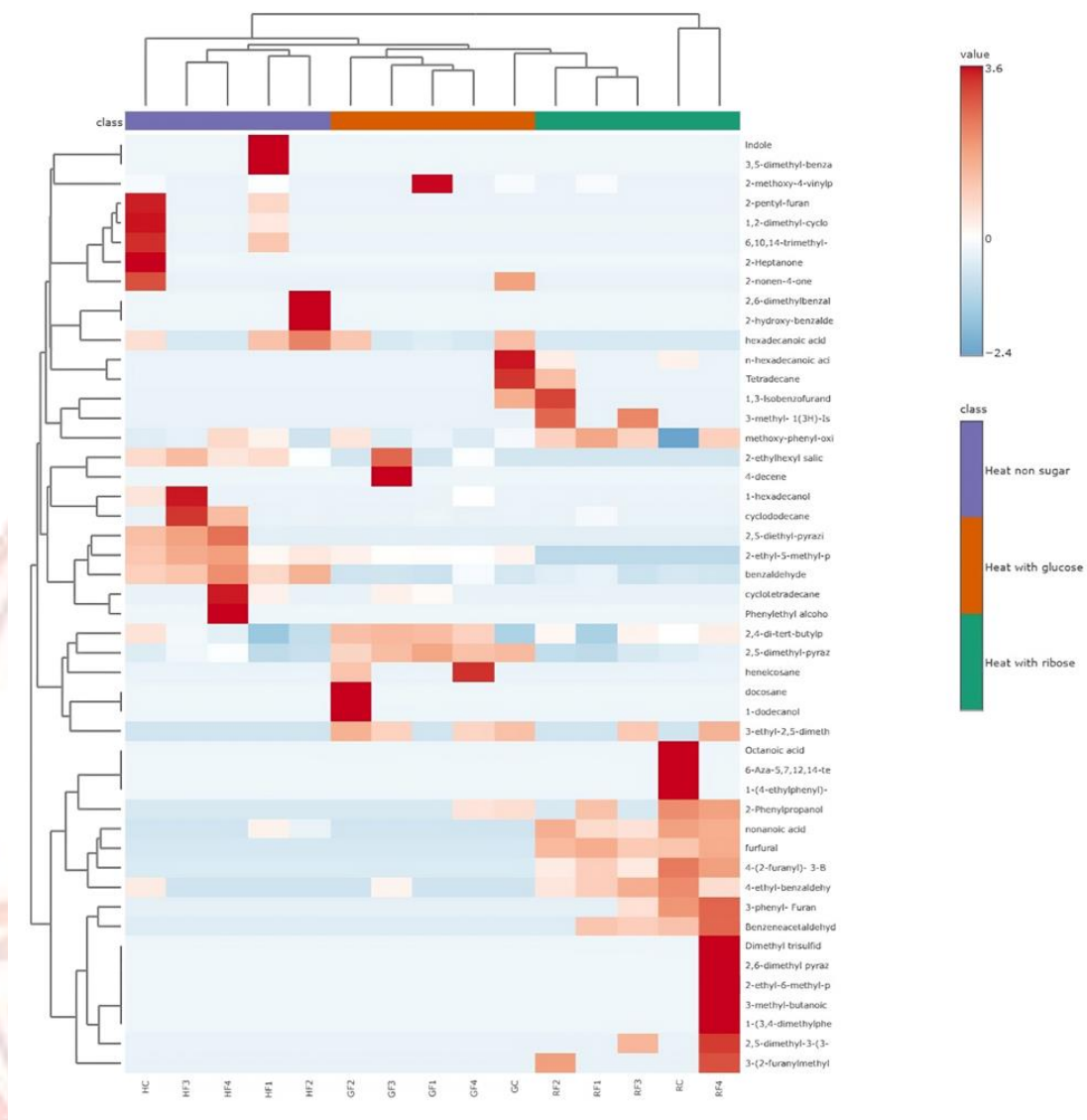
อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ใช้เพปไทด์อาจสร้างสารประกอบที่มีรสขม ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะรสชาติของการปรุงแต่งเนื้อ ปัจจุบันมีสองกระบวนการในการแก้ไขปัญหาเหล่านี้อย่างมีประสิทธิภาพ ประการแรกคือการเพิ่มซิสเตอีนระหว่างปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งสามารถยับยั้งสีและลดความขมได้ ประการที่สองคือ การปรับสภาพด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถเร่งการเชื่อมขวางของกรดอะมิโนและน้ำตาล ซึ่งช่วยลดความขมของ MRP [155] ประเภทของน้ำตาลรีดิวซ์ ลำดับเพปไทด์ องค์ประกอบของกรดอะมิโน และความยาวของสายเพปไทด์สามารถส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อ

ลักษณะของกลิ่นรสที่เกิดขึ้นได้เช่นกัน และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของน้ำตาล เช่น เฟอร์ฟูรัลหรือ ไดคาร์บอนิลมีส่วนสำคัญต่อระดับของการเกิดสีน้ำตาล [150] จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์จากกากถั่วเขียวมีความสามารถที่ดีในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารให้กลิ่นรสจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

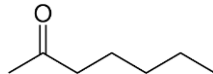
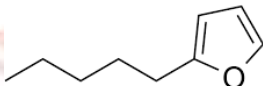
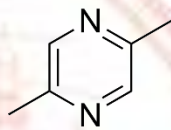
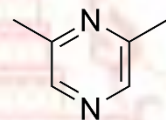
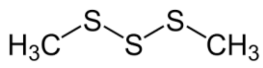
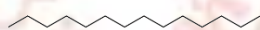
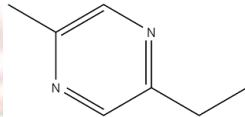
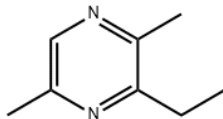


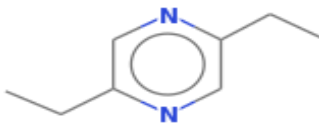
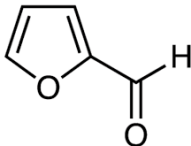
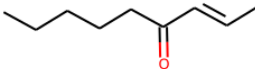
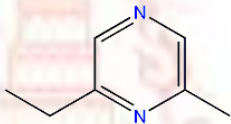
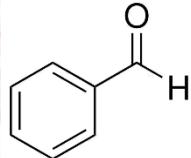
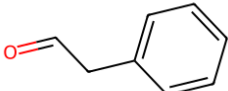
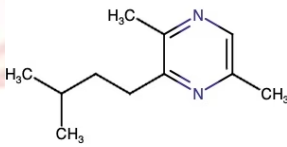
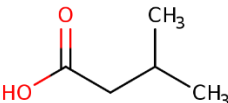
ตารางที่ 4-5 สารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ภูมิปัญญาเมลลาร์จากแพะเทศกาคัวเซีย

| No. | Compounds                               | Odor                                    | RI      | HC                   | HF1                  | HF2                  | HF3                  | HF4                  | GC                   | GF1                  | GF2                  | GF3                  | GF4                  | RC                   | RF1                  | RF2                  | RF3                  | RF4                  |
|-----|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1   | 2-Heptanone                             | sweet, banana-like, fruity              | 1201.45 | 3.57x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 2   | 2-pentyl-furan                          | green bean, butter, sweet, caramel-like | 1245.05 | 2.68x10 <sup>7</sup> | 8.85x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 3   | 2,5-dimethyl-pyrazine                   | nutty, cooked meat, cocoa               | 1344.80 | 5.48x10 <sup>7</sup> | 2.84x10 <sup>7</sup> | 3.65x10 <sup>7</sup> | 6.98x10 <sup>7</sup> | 7.99x10 <sup>7</sup> | 1.52x10 <sup>8</sup> | 1.73x10 <sup>8</sup> | 1.25x10 <sup>8</sup> | 1.50x10 <sup>8</sup> | 1.45x10 <sup>8</sup> | 5.55x10 <sup>8</sup> | 2.71x10 <sup>8</sup> | 3.10x10 <sup>8</sup> | 4.89x10 <sup>8</sup> | 6.19x10 <sup>8</sup> |
| 4   | 2,6-dimethyl pyrazine                   | nutty, cocoa, roasted, meat             | 1350.69 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 4.09x10 <sup>7</sup> |
| 5   | Dimethyl trisulfide                     | cabbage sulfur, meat                    | 1395.26 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.60x10 <sup>7</sup> |
| 6   | Tetradecane                             | alkane                                  | 1400.92 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 2.61x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.30x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    |
| 7   | 2-ethyl-5-methyl-pyrazine               | roasted cocoa, nuts                     | 1413.31 | 2.91x10 <sup>7</sup> | 1.77x10 <sup>7</sup> | 2.13x10 <sup>7</sup> | 3.54x10 <sup>7</sup> | 3.81x10 <sup>7</sup> | 1.89x10 <sup>7</sup> | 1.67x10 <sup>7</sup> | 1.92x10 <sup>7</sup> | 1.64x10 <sup>7</sup> | 1.58x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 8   | 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine           | roasted nutty, cocoa                    | 1466.73 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 9.92x10 <sup>6</sup> | -                    | 1.12x10 <sup>7</sup> | 8.55x10 <sup>6</sup> | 8.23x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | 9.23x10 <sup>6</sup> | 1.11x10 <sup>7</sup> |
| 9   | 2,5-dimethyl-pyrazine                   | nutty                                   | 1480.48 | 5.98x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | 7.57x10 <sup>6</sup> | 9.59x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 5.62x10 <sup>7</sup> | 6.78x10 <sup>7</sup> | 6.18x10 <sup>7</sup> | 5.35x10 <sup>7</sup> | 6.82x10 <sup>7</sup> |
| 10  | furfural                                | bread, almond, sweet                    | 1480.72 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 11  | 2-nonen-4-one                           | coconut-like, sweet                     | 1497.72 | 1.56x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.10x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 12  | 2-ethyl-6-methyl-pyrazine               | roasted potato, nutty                   | 1508.94 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 4.07x10 <sup>5</sup> |
| 13  | benzaldehyde                            | sweet, almond-like, cherry, burnt sugar | 1539.86 | 3.25x10 <sup>8</sup> | 2.99x10 <sup>8</sup> | 3.99x10 <sup>8</sup> | 3.56x10 <sup>8</sup> | 4.78x10 <sup>8</sup> | 1.14x10 <sup>8</sup> | 9.29x10 <sup>7</sup> | 9.96x10 <sup>7</sup> | 1.04x10 <sup>8</sup> | 1.87x10 <sup>8</sup> | 1.16x10 <sup>8</sup> | 1.52x10 <sup>8</sup> | 1.40x10 <sup>8</sup> | 9.28x10 <sup>8</sup> | 1.07x10 <sup>8</sup> |
| 14  | Benzeneacetaldehyde                     | rose, chocolate                         | 1661.66 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 3.88x10 <sup>7</sup> | 3.72x10 <sup>7</sup> | -                    | 3.43x10 <sup>7</sup> | 6.62x10 <sup>7</sup> |
| 15  | 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-Pyrazine | roasty, meaty                           | 1678.36 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 5.08x10 <sup>7</sup> | 9.21x10 <sup>7</sup> |
| 16  | 3-methyl-butanoic acid                  | cheesy                                  | 1687.46 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 3.32x10 <sup>7</sup> |
| 17  | 2-hydroxy-benzaldehyde                  | almond-like, roasted, sweet             | 1693.13 | -                    | -                    | 2.88x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 18  | 4-ethyl-benzaldehyde                    | almond, sweet, cherry, fruity           | 1724.93 | 5.28x10 <sup>6</sup> | -                    | 5.20x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 4.69x10 <sup>6</sup> | -                    | 1.19x10 <sup>7</sup> | 7.40x10 <sup>6</sup> | 5.65x10 <sup>6</sup> | 9.72x10 <sup>6</sup> | 6.25x10 <sup>6</sup> |
| 19  | 2,6-dimethyl-benzaldehyde               | sweet, almond-like                      | 1725.20 | -                    | 7.70x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 20  | 3,5-dimethyl-benzaldehyde               | sweet, almond-like                      | 1725.20 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 21  | methoxy-phenyl-oxime                    | Fresh seafood, fresh prawn, crab        | 1783.56 | 1.02x10 <sup>8</sup> | 1.34x10 <sup>8</sup> | 8.98x10 <sup>7</sup> | 1.06x10 <sup>8</sup> | 1.54x10 <sup>8</sup> | 1.17x10 <sup>8</sup> | 1.11x10 <sup>8</sup> | 1.44x10 <sup>8</sup> | 1.00x10 <sup>8</sup> | 9.94x10 <sup>7</sup> | -                    | 1.97x10 <sup>8</sup> | 1.61x10 <sup>8</sup> | 1.60x10 <sup>8</sup> | 1.62x10 <sup>8</sup> |
| 22  | 2-Phenylpropanol                        | hyacinth-like, balsamic                 | 1759.39 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 2.24x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | 2.09x10 <sup>6</sup> | 4.45x10 <sup>6</sup> | 3.09x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | 3.99x10 <sup>6</sup> |
| 23  | 3-phenyl- Furan                         | sweet                                   | 1868.00 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 24  | 4-(2-furyl)- 3-Buten-2-one              | sweety spicy, nutty                     | 1524.95 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 4.32x10 <sup>7</sup> | -                    | 2.06x10 <sup>7</sup> | 5.45x10 <sup>7</sup> |
| 25  | Phenylethyl alcohol                     | rose-like                               | 1533.17 | -                    | -                    | -                    | -                    | 9.78x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 2.53x10 <sup>6</sup> | 1.38x10 <sup>6</sup> | 9.50x10 <sup>5</sup> | 9.67x10 <sup>5</sup> | 2.09x10 <sup>6</sup> |
| 26  | 6-Aza-5,7,12,14-tetrahydropentacene     | fruit, promagranate                     | 1550.99 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 27  | 4-decene                                | alkane                                  | 1586.14 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.05x10 <sup>7</sup> | -                    | 1.00x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 28  | 1-dodecanol                             | coconut, oil, fatty                     | 1586.39 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 9.89x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 29  | 1,2-dimethyl-cyclooctane                | alkane                                  | 1586.44 | 1.28x10 <sup>8</sup> | 2.91x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 30  | cyclododecane                           | alkane                                  | 1586.44 | -                    | -                    | 3.85x10 <sup>6</sup> | 2.49x10 <sup>6</sup> | 1.14x10 <sup>6</sup> | 4.19x10 <sup>6</sup> | 5.23x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | 9.38x10 <sup>6</sup> | -                    | 1.55x10 <sup>6</sup> | -                    | 2.15x10 <sup>6</sup> |
| 31  | Octanoic acid                           | fatty, oily vegetable, cheesy           | 2015.77 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.72x10 <sup>7</sup> | -                    | 3.69x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 32  | heneicosane                             | alkane                                  | 2020.30 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 6.90x10 <sup>6</sup> | -                    | 9.63x10 <sup>6</sup> |
| 33  | 3-(2-furyl)methyl)-2,5-dimethylpyrazine | sweet, nutty                            | 2022.20 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 34  | 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone       | Creamy/com/floral fragrance             | 2028.69 | 3.23x10 <sup>7</sup> | 1.44x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 35  | nonanoic acid                           | green, fat                              | 2039.76 | -                    | 6.24x10 <sup>6</sup> | 3.09x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.53x10 <sup>7</sup> | 8.79x10 <sup>6</sup> | 1.38x10 <sup>7</sup> | 8.03x10 <sup>6</sup> | 1.39x10 <sup>7</sup> |
| 36  | cyclotetradecane                        | alkane                                  | 2041.49 | -                    | 7.86x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | 6.18x10 <sup>6</sup> | -                    | 7.81x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 37  | 1-hexadecanol                           | coconut, oil, fatty                     | 2041.49 | 2.37x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | 1.03x10 <sup>8</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.07x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 38  | docosane                                | alkane                                  | 2043.58 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 8.04x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 39  | 2-methoxy-4-vinylphenol                 | spicy, wine like clove                  | 2047.56 | 8.93x10 <sup>6</sup> | 1.22x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | 9.85x10 <sup>6</sup> | 1.43x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | 9.42x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    |
| 40  | hexadecanoic acid methyl ester          | oily, fatty                             | 2052.20 | 1.92x10 <sup>6</sup> | 2.80x10 <sup>6</sup> | 4.40x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | 2.89x10 <sup>6</sup> | 2.35x10 <sup>5</sup> | 2.65x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 41  | 1-(3,4-dimethylphenyl)- Ethanone        | floral                                  | 2058.45 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 2.23x10 <sup>7</sup> |
| 42  | 3-methyl- (3H)-Isobenzofuranone         | sweet, burnt, pungent                   | 2058.51 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 2.48x10 <sup>7</sup> | 2.19x10 <sup>7</sup> | -                    |
| 43  | 1-(4-ethylphenyl)- Ethanone             | sweet, honey, floral                    | 2058.58 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 3.08x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 44  | 2-ethylhexyl salicylate                 | floral                                  | 2077.56 | 4.14x10 <sup>6</sup> | 4.08x10 <sup>5</sup> | 2.14x10 <sup>6</sup> | 5.83x10 <sup>6</sup> | 3.59x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | 9.42x10 <sup>6</sup> | 2.19x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 45  | 1,3-Isobenzofurandione                  | mild acid                               | 2080.00 | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.95x10 <sup>6</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 46  | 2,4-di-ter-butylphenol                  | herbal                                  | 2082.74 | 3.95x10 <sup>7</sup> | 5.04x10 <sup>5</sup> | 1.54x10 <sup>7</sup> | 2.78x10 <sup>7</sup> | 2.39x10 <sup>7</sup> | 9.96x10 <sup>6</sup> | 5.14x10 <sup>7</sup> | 5.06x10 <sup>7</sup> | 5.27x10 <sup>7</sup> | 4.49x10 <sup>7</sup> | 3.09x10 <sup>7</sup> | 9.04x10 <sup>6</sup> | 3.34x10 <sup>7</sup> | 3.45x10 <sup>7</sup> | 3.59x10 <sup>7</sup> |
| 47  | Indole                                  | mothball, burnt                         | 412.77  | -                    | 1.10x10 <sup>5</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    |
| 48  | n-hexadecanoic acid                     | rancid, pungent                         | 476.24  | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | 5.74x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    | -                    | -                    | 1.02x10 <sup>7</sup> | -                    | 1.14x10 <sup>7</sup> | -                    | -                    |

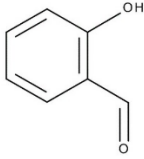
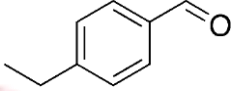
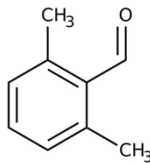
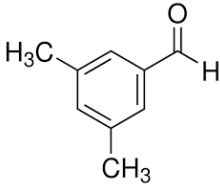
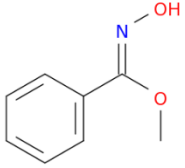
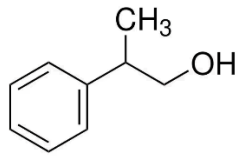
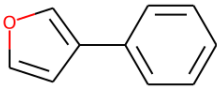
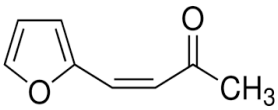


ภาพที่ 4-3 แผนภาพแสดงสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์จากถั่วเขียว (Heat map)

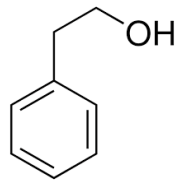
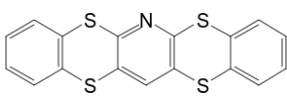
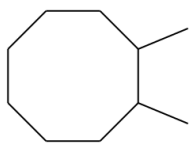
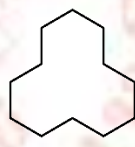
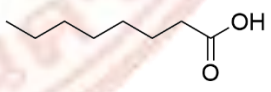
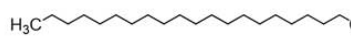
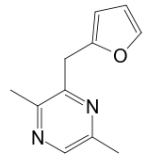
| No. | Volatile compounds            | Odor description                            | Structure                                                                             |
|-----|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 2-Heptanone                   | sweet/banana-like/fruity                    |    |
| 2   | 2-pentyl-furan                | green<br>bean/butter/sweet/<br>caramel-like |    |
| 3   | 2,5-dimethyl-pyrazine         | nutty/cooked<br>meat/cacao                  |    |
| 4   | 2,6-dimethyl pyrazine         | nutty/cacao/<br>roasted/ meaty              |   |
| 5   | Dimethyl trisulfide           | sulfur/meat                                 |  |
| 6   | Tetradecane                   | alkane                                      |  |
| 7   | 2-ethyl-5-methyl-pyrazine     | roasted cocoa/nuts                          |  |
| 8   | 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine | roasted<br>nutty/cocoa                      |  |

| No. | Volatile compounds                      | Odor description                             | Structure                                                                             |
|-----|-----------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 9   | 2,5-diethyl-pyrazine                    | nutty                                        |    |
| 10  | furfural                                | Bread/almond/<br>sweet                       |    |
| 11  | 2-nonen-4-one                           | coconut-like/sweet                           |    |
| 12  | 2-ethyl-6-methyl-pyrazine               | roasted<br>potato/nutty                      |   |
| 13  | benzaldehyde                            | sweet/almond-<br>like/cherry/ burnt<br>sugar |  |
| 14  | Benzeneacetaldehyde                     | honey/<br>sweet/floral                       |  |
| 15  | 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-Pyrazine | roasty/meaty                                 |  |
| 16  | 3-methyl-butanoic acid                  | cheesy                                       |  |

**ตารางที่ 4-6** โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์จากถั่วเขียว (ต่อ)

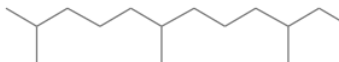
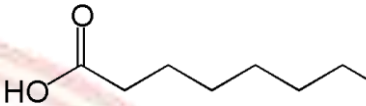
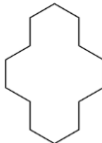
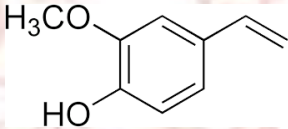
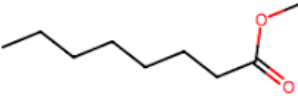
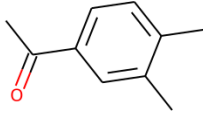
| No. | Volatile compounds           | Odor description                | Structure                                                                             |
|-----|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 17  | 2-hydroxy-benzaldehyde       | almond-like/roasted/ sweet      |    |
| 18  | 4-ethyl-benzaldehyde         | almond/sweet/cher ry, fruity    |    |
| 19  | 2,6-dimethylbenzaldehyde     | sweet, almond-like              |    |
| 20  | 3,5-dimethylbenzaldehyde     | sweet, almond-like              |   |
| 21  | methoxy-phenyl-oxime         | Fresh seafood/ fresh prawn/crab |  |
| 22  | 2-Phenylpropanol             | hyacinth-like/balsamic          |  |
| 23  | 3-phenyl-Furan               | sweet, caramel-like             |  |
| 24  | 4-(2-furanyl)- 3-Buten-2-one | sweeey spicy/nutty              |  |

ตารางที่ 4-6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์กากถั่วเขียว (ต่อ)

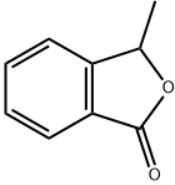
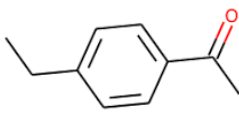
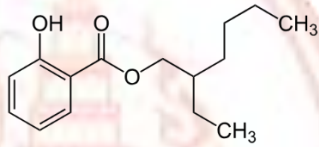
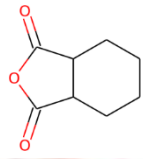
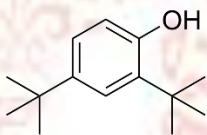
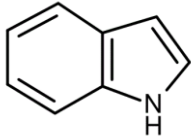
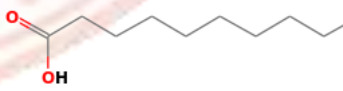
| No. | Volatile compounds                       | Odor description                 | Structure                                                                             |
|-----|------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 25  | Phenylethyl alcohol                      | rose-like                        |    |
| 26  | 6-Aza-5,7,12,14-tetrathiapentacene       | fruit/promagranate               |    |
| 27  | 4-decene                                 | alkane                           |    |
| 28  | 1-dodecanol                              | coconut/oil/fatty                |     |
| 29  | 1,2-dimethyl-cyclooctane                 | alkane                           |  |
| 30  | cyclododecane                            | alkane                           |  |
| 31  | Octanoic acid                            | fatty/oily/vegetable<br>/ cheesy |  |
| 32  | heneicosane                              | alkane                           |  |
| 33  | 3-(2-furanylmethyl)-2,5-dimethylpyrazine | sweet/nutty                      |  |

ตารางที่ 4-6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ด  
ของเพปไทด์จากถั่วเขียว (ต่อ)

96

| No. | Volatile compounds                  | Odor description             | Structure                                                                             |
|-----|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 34  | 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone   | creamy/corn/floral fragrance |    |
| 35  | nonanoic acid                       | green/ fat                   |     |
| 36  | cyclotetradecane                    | alkane                       |    |
| 37  | 1-hexadecanol                       | spicy/wine like<br>clove     |   |
| 38  | docosane                            | oily/ fatty                  |  |
| 39  | 2-methoxy-4-vinylphenol             | floral                       |  |
| 40  | hexadecanoic acid methyl ester      | sweet/burnt/<br>pungent      |  |
| 41  | 1-(3,4-dimethylphenyl)-<br>Ethanone | sweet/honey/floral           |  |

**ตารางที่ 4-6** โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบระเหยง่ายของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์จากถั่วเขียว (ต่อ)

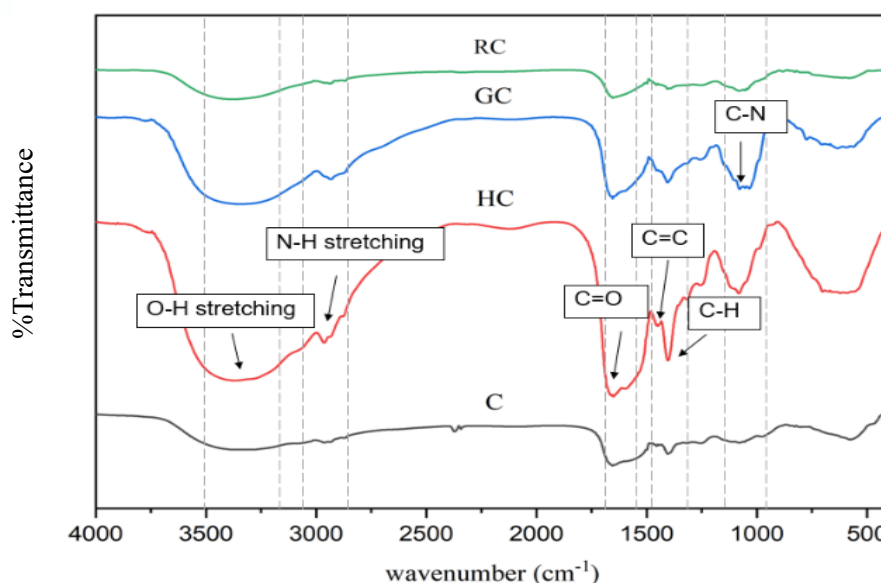
| No. | Volatile compounds                   | Odor description | Structure                                                                             |
|-----|--------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 42  | 3-methyl- 1(3H)-<br>Isobenzofuranone | floral           |    |
| 43  | 1-(4-ethylphenyl)-<br>Ethanone       | mild acid        |    |
| 44  | 2-ethylhexyl salicylate              | herbal           |    |
| 45  | 1,3-Isobenzofurandione               | mothball/ burnt  |  |
| 46  | 2,4-di-tert-butylphenol              | herbal           |  |
| 47  | Indole                               | mothball/ burnt  |  |
| 48  | n-hexadecanoic acid                  | rancid/pungent   |  |

#### 4.8 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy

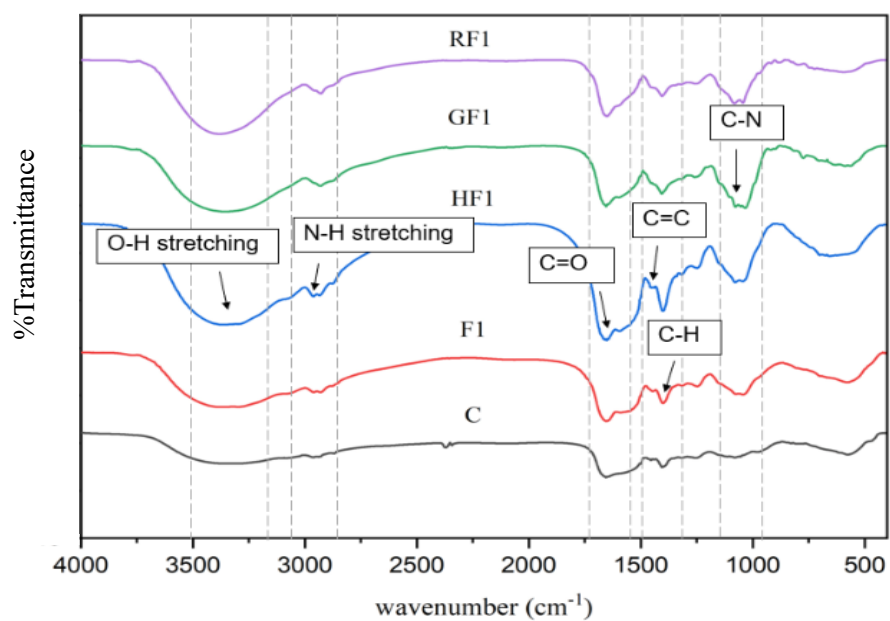
ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วย FTIR ของตัวอย่างเพปไทด์จากถั่วเขียวก่อน และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้แก่ เพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (C, F1, F2, F3 และ F4) เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) และ

เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนกับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) พบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในกากถั่วเขียว ได้แก่ โปรตีน ประกอบด้วยเพปไทด์ กลุ่มคาร์บอนิล กลุ่มอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต

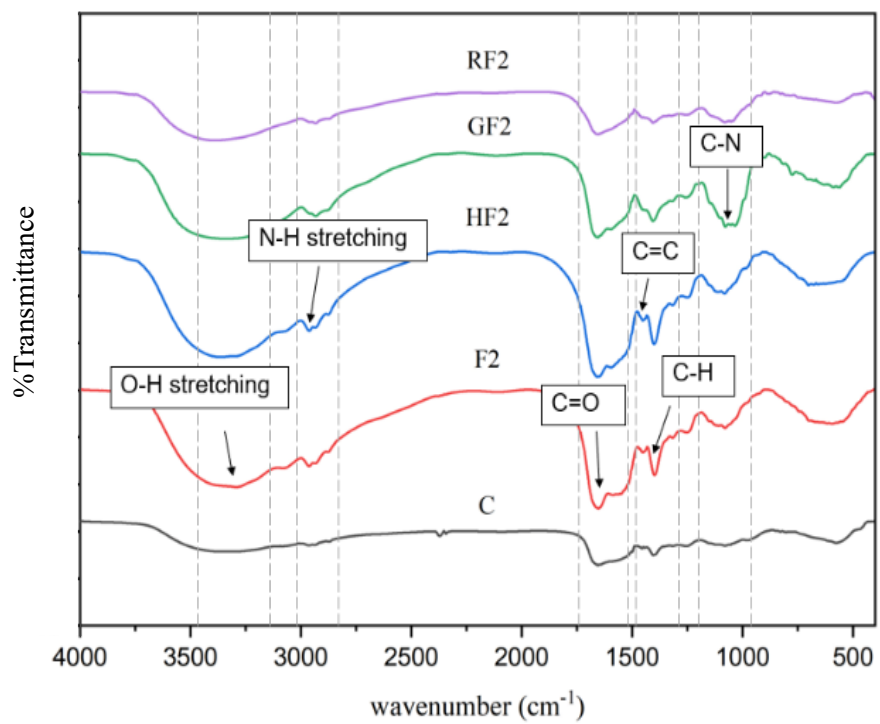
จากผลการวิเคราะห์ด้วย FTIR พบว่าลักษณะพิกของเพปไทด์เริ่มต้นที่ยังไม่ผ่านการแยกตามขนาดหรือทำปฏิกิริยา (C) มีลักษณะแตกต่างเมื่อเทียบกับเพปไทด์ตัวอย่างอื่น ๆ (ภาพที่ 4-4a) โดยพบพิกที่  $3200-2800\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง N-H stretching ซึ่งเป็นหมู่อะมิโนของโปรตีน พบพิกที่  $1710-1600\text{ cm}^{-1}$  ของหมู่  $\text{C=O}$  และพิกที่  $1400-1300\text{ cm}^{-1}$  ของ C-H ซึ่งบ่งชี้ถึงลักษณะของโปรตีน แต่ไม่พบพิกปรากฏในช่วง  $1250-1020\text{ cm}^{-1}$  ที่แสดงถึงสารที่มีวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) เป็นองค์ประกอบ ต่างจากผลิตภัณฑ์เมลลาร์ด (ภาพที่ 4-4b, 4-4c, 4-4d และ 4-4e) โดยผลิตภัณฑ์ของเมลลาร์ดส่วนใหญ่พบพิกช่วง  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ ,  $3200-2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1710-1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1590-1470\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400-1300\text{ cm}^{-1}$  และ  $1250-1020\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพิกของ N-H stretching, amide ( $\text{C=O}$ ),  $\text{C=C}$  (aromatic ring), C-H bending และ C-N ตามลำดับ จากสเปกตรัมของ FTIR ของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดสามารถอธิบายได้ว่ากลุ่มอะมิโนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสและไรโบสในปฏิกิริยาเมลลาร์ด และเกิด หมู่ฟังก์ชันใหม่, amadori compounds ( $\text{C=O}$ ) เช่นเดียวกับสารประกอบที่มี N เป็นองค์ประกอบ (C-N) [163], [164] ซึ่งอาจเกิดจากการเชื่อมขวางกันระหว่างหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอนิล แต่อย่างไรก็ตาม FTIR อาจจะไม่สามารถระบุได้ว่าผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดมีองค์ประกอบของสารประกอบใดบ้าง ต้องใช้เทคนิค GC-MS ในการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรสที่ระเหยได้



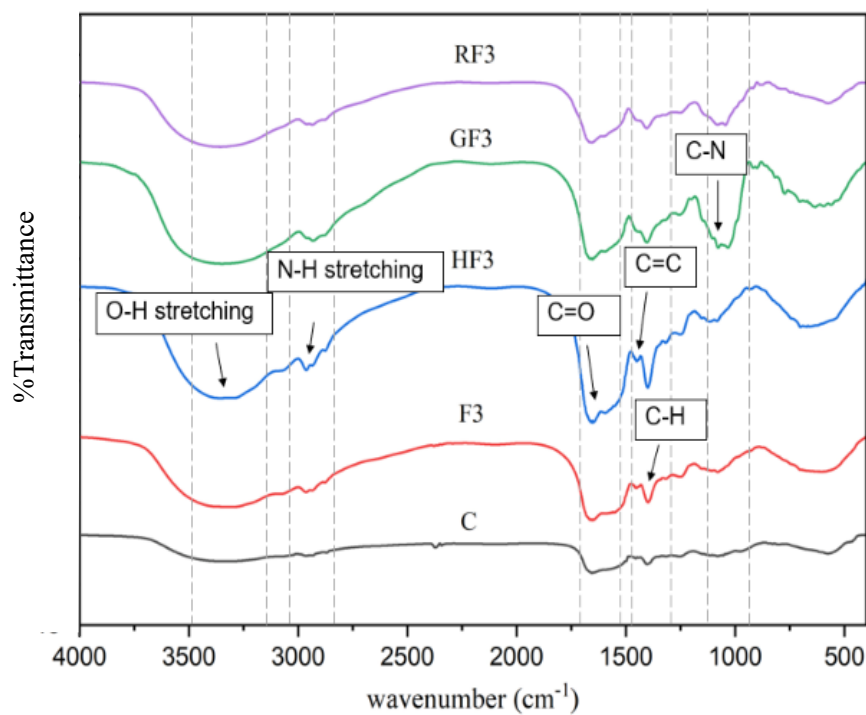
ภาพที่ 4-4a สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก C



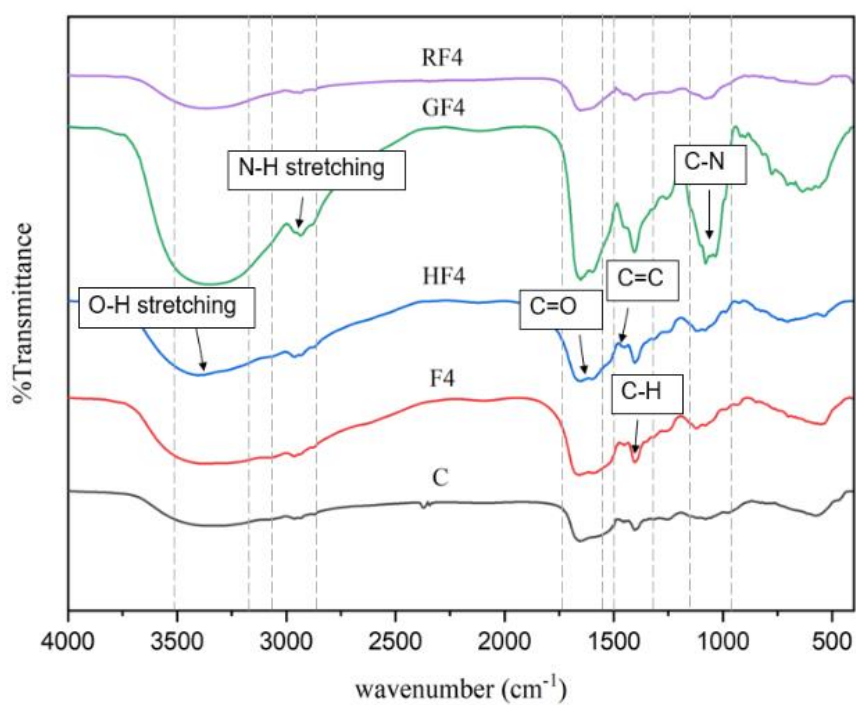
ภาพที่ 4-4b สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก F1



ภาพที่ 4-4c สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก F2



ภาพที่ 4-4d สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก F3

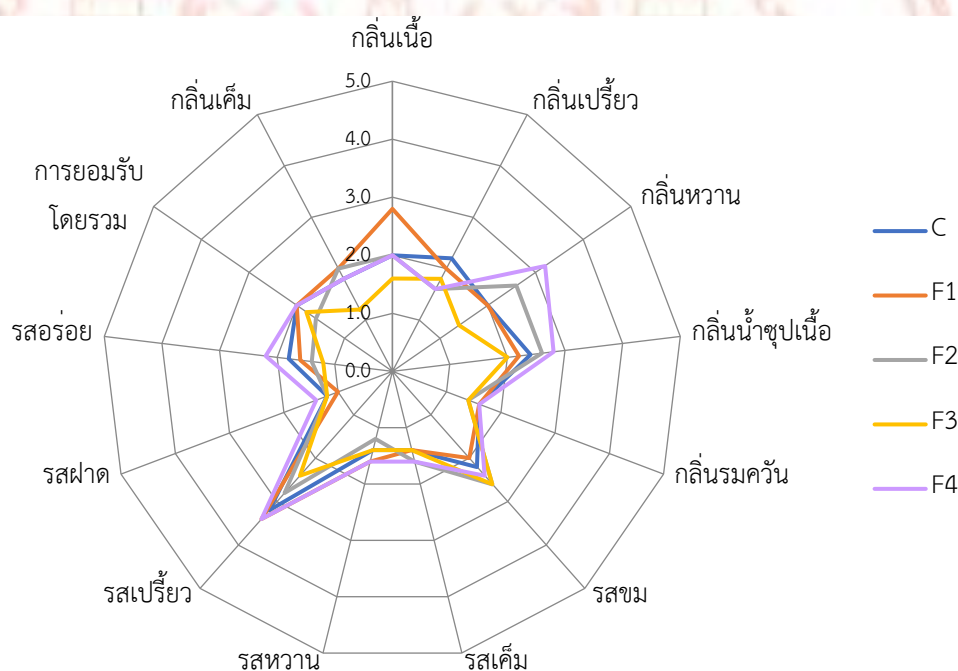


ภาพที่ 4-4e สเปกตรัม IR ของเพปไทด์และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจาก F4

#### 4.9 ผลการวิเคราะห์การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว

ผลการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของเพปไทด์กากถั่วเขียวก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากกากถั่วเขียว โดยประเมินกลิ่นรสทางด้านกลิ่นเนื้อ กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นหวาน กลิ่นน้ำซุ๊ป กลิ่นรมควัน กลิ่นเค็ม รสขม รสเค็ม รสหวาน รสเปรี้ยว รสฝาด รสอโรย (รสอูมามิ) และการยอมรับโดยรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ Qualitative different test ให้คะแนนแบบ 5-point scoring test จากผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 15 คน ที่ผ่านการฝึกอบรมด้านการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา ผลการศึกษาพบว่าเพปไทด์ทุก fraction ที่ยังไม่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดซึ่งได้แก่ Crude-MMPH (หรือ C), F1, F2, F3 และ F4 มีลักษณะกลิ่นเนื้อ กลิ่นหวาน และกลิ่นน้ำต้มเนื้อปานกลาง รสอโรยเล็กน้อย พบรสเปรี้ยวและรสขมปานกลาง (ภาพที่ 4-5) โดยที่เพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านการแยกขนาดน้ำหนักโมเลกุล (C) มีลักษณะกลิ่นเค็ม กลิ่นเนื้อ กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นหวาน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ รสขม กลิ่นรมควัน รสหวาน รสเปรี้ยว รสฝาด รสอโรย และการยอมรับโดย เท่ากับ 1.8, 2.0, 2.2, 2.0, 2.4, 1.6, 2.2, 1.4, 1.4, 3.2, 1.2, 1.8 และ 2.0 คะแนน ในส่วนของเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa (F1) มีกลิ่นเค็ม กลิ่นเนื้อที่สูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเพปไทด์ C (หรือ Crude-MMPH) มีคะแนนกลิ่นเค็ม 2.0 คะแนน กลิ่นเนื้อ 2.8 คะแนน กลิ่นเปรี้ยว 2.0 คะแนน กลิ่นหวาน 2.0 คะแนน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ 2.2 คะแนน กลิ่นรมควัน 1.6 คะแนน รสขม 2.0 คะแนน รสเค็ม 1.4 คะแนน รสหวาน 1.6 คะแนน รสเปรี้ยว 3.4 คะแนน รสฝาด 1.0 คะแนน รสอโรย 1.6 คะแนน การยอมรับโดยรวม 2.0 คะแนน กรณีของเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลช่วง 5-10 kDa (F2) พบคะแนนด้านกลิ่นเค็ม 2.0 คะแนน กลิ่นเนื้อ 2.0 คะแนน กลิ่นเปรี้ยว 1.6 คะแนน กลิ่นหวาน 2.6 คะแนน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ 2.6 คะแนน กลิ่นรมควัน 1.4 คะแนน รสขม 2.6 คะแนน รสเค็ม 1.6 คะแนน รสหวาน 1.2 คะแนน รสเปรี้ยว 2.8 คะแนน รสฝาด 1.2 คะแนน รสอโรย 1.4 คะแนน การยอมรับโดยรวม 1.6 คะแนน เพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลช่วง 1-5 kDa (F3) มีคะแนนด้านกลิ่นเค็ม 1.2 คะแนน กลิ่นเนื้อ 1.6 คะแนน กลิ่นเปรี้ยว 1.8 คะแนน กลิ่นหวาน 1.4 คะแนน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ 2.0 คะแนน กลิ่นรมควัน 1.4 คะแนน รสขม 2.6 คะแนน รสเค็ม 1.4 คะแนน รสหวาน 1.4 คะแนน รสเปรี้ยว 2.4 คะแนน รสฝาด 1.2 คะแนน รสอโรย 1.2 คะแนน การยอมรับโดยรวม 1.8 คะแนน และเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1 kDa (F4) มีผลการทดสอบดังนี้ กลิ่นเค็ม 1.8 คะแนน กลิ่นเนื้อ 2.0 คะแนน กลิ่นเปรี้ยว 1.6 คะแนน กลิ่นหวาน 3.2 คะแนน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ 2.8 คะแนน กลิ่นรมควัน 1.6 คะแนน รสขม 2.4 คะแนน รสเค็ม 1.6 คะแนน รสหวาน 1.6 คะแนน รสเปรี้ยว 3.4 คะแนน รสฝาด 1.4 คะแนน รสอโรย 2.2 คะแนน และการยอมรับโดยรวม 2.0 คะแนน ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวอย่างเพปไทด์แต่ละส่วนมีรสชาติที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่ง

พบกรดอะมิโน Asp และ Glu ปริมาณสูงสุด รองลงมา คือ กรดอะมิโน Lys, Arg, Lue, Phe และ Ser เป็นต้น โดยกรดอะมิโน Asp และ Glu ให้รสชาติอูมามิ กรดอะมิโน Arg และ Ser มีรสหวาน Lue และ Phe มีรสขม [93] Lys มีกลิ่นเขียวสดเล็กน้อย [97] เป็นต้น ในการที่เพปไทด์ส่วนต่าง ๆ มีชนิดและปริมาณกรดอะมิโนต่าง ๆ ไม่เท่ากัน ส่งผลให้รสชาติของเพปไทด์แต่ละส่วนมีรสชาติแตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ [97] ที่กล่าวว่าชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในสายเพปไทด์ ส่งผลต่อกลิ่นรสที่แตกต่างกันของเพปไทด์ เช่น รสหวาน รสขม รสเปรี้ยว และอูมามิ เป็นต้น นอกจากกรดอะมิโนเหล่านี้ให้รสชาติด้วยตัวเองแล้ว กรดอะมิโน เช่น Asp, Glu, Arg และ Lys เป็นสารตั้งต้นกลิ่นรสที่สำคัญในปฏิกิริยาเมลลาร์ด [102]



ภาพที่ 4-5 แสดงผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทด้านรสชาติเพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลและให้ความร้อน

คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์ไม่ได้ผ่านการแยกขนาด หรือ C ไม่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (C) ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่มีการเติมน้ำตาล (HC) ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส (GC) และผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลโรโบส (RC) พบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและโรโบส (GC และ RC) ให้คะแนนการยอมรับ

โดยรวมสูงกว่าเพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (โดยให้ความร้อน) และเพปไทด์ที่ให้ความร้อน แต่ไม่ใช้น้ำตาล (รูปที่ 4-10) ซึ่งทั้งผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาจากน้ำตาลไรโบสให้คะแนนการยอมรับโดยรวมสูงสุด เท่ากับ 2.8 คะแนน นอกจากนี้พบว่ามีความค่อนด้านรสชาติอร่อยหรือ รสอุมมี สูงกว่า C, HC และ GC โดยคะแนนด้านรสชาติอร่อยของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากไรโบสเท่ากับ 2.6 คะแนน ในขณะที่ C ซึ่งเป็นเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา และ HC เป็นเพปไทด์ที่ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่มีการเติมน้ำตาล และเพปไทด์ที่ผ่านความร้อนใช้น้ำกลูโคส (GC) มีความค่อนด้านรสอร่อยเท่ากับ 1.8 คะแนน, 2.0 คะแนน และ 2.4 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีความค่อนทางด้านรสเปรี้ยวลดลง ซึ่ง RC และ GC มีความค่อนด้านรสเปรี้ยวลดลงเหลือในระดับกลางถึงต่ำเท่ากับ 1.4 และ 2.4 คะแนน ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 10 kDa ที่ไม่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (F1) ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่มีการเติมน้ำตาล (HF1) ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคส (GF1) และผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส (RF1) พบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและไรโบส (GF1 และ RF1) ให้คะแนนการยอมรับโดยรวมสูงกว่าเพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (โดยให้ความร้อน) และเพปไทด์ที่ให้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (ภาพที่ 4-6) ซึ่งทั้งผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไรโบสให้คะแนนการยอมรับโดยรวมใกล้เคียงกัน เท่ากับ 3.2 และ 3.0 คะแนน ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ามีความค่อนด้านรสชาติอร่อยหรืออูมามีสูงกว่า F1 และ HF1 โดยคะแนนด้านรสชาติอร่อยของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากน้ำตาลกลูโคสและไรโบสเท่ากับ 2.6 คะแนน ในขณะที่ F1 ซึ่งเป็นเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา และ HF1 เป็นเพปไทด์ที่ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่มีการเติมน้ำตาล มีความค่อนด้านรสอร่อยเท่ากับ 1.6 คะแนน และ 2.0 คะแนน ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีความค่อนทางด้านรสเปรี้ยวลดลง ซึ่ง RF1 และ GF1 มีความค่อนด้านรสเปรี้ยวลดลงเหลือในระดับกลางถึงต่ำเท่ากับ 1.6 และ 2.2 คะแนน ตามลำดับ จากระดับความเปรี้ยวเดิมของ F1 เท่ากับ 3.4 คะแนน ซึ่งอยู่ในระดับสูง อาจเนื่องมาจากกรดอะมิโนที่ให้รสเปรี้ยวในเพปไทด์ถั่วเขียวทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ในขณะเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่แสดงไว้ข้างต้น พบว่ากรดอะมิโนทรีโอนีน (Thr) เซอรีน (Ser) มีปริมาณลดลง

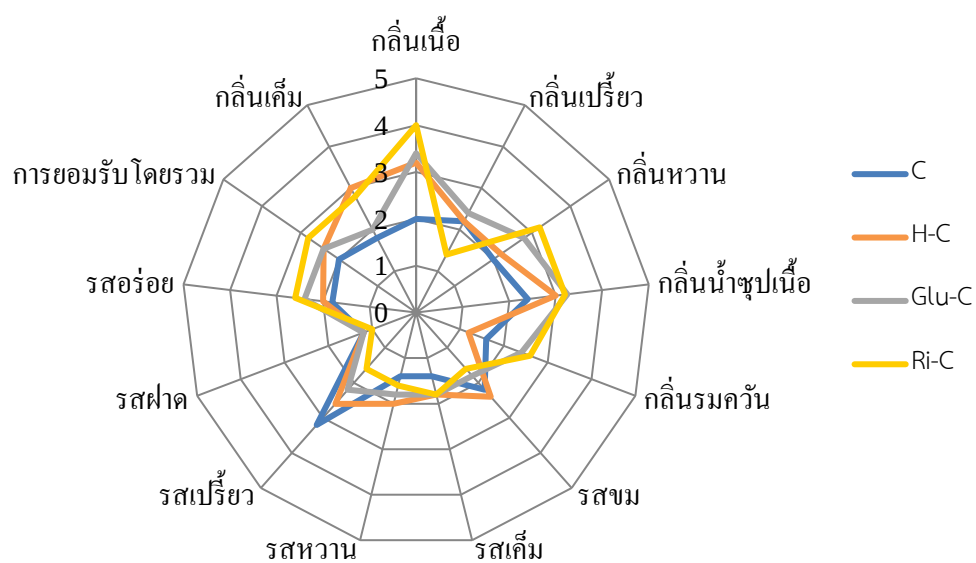
เช่นเดียวกับเพปไทด์ขนาด 5-10 (F2), 1-5 (F3) และ น้อยกว่า 1 kDa (F4) ผลการทดสอบคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์ถั่วเขียวในแต่ละส่วนที่มีขนาดต่างกัมน้ำตาลกลูโคสและไรโบส มีความค่อนด้านกลิ่นเนื้อ กลิ่นหวาน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ กลิ่นรมควัน รสหวาน รสชาติอร่อยหรืออูมามี และการยอมรับโดยรวมสูงขึ้น

ระดับคะแนนด้านรสเปรี้ยวและรสขมลดลง เมื่อเทียบกับคะแนนจากตัวอย่างเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา และที่ผ่านความร้อนโดยไม่เติมน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำตาลไรโบสจะมีกลิ่นรสต่าง ๆ ดังกล่าวที่สูงกว่าน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 4-7, 4-8 และ 4-9) โดยเฉพาอย่างยิ่งเพปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดด้วยน้ำตาลไรโบส (RF4) ให้คะแนนด้านรสอร่อย และการยอมรับโดยรวมสูงสุด เท่ากับ 3.2 และ 3.6 คะแนน ตามลำดับ อีกทั้งมีคะแนนด้านกลิ่นเค็ม 2.8 คะแนน กลิ่นเนื้อ 3.4 คะแนน กลิ่นหวาน 4.2 คะแนน กลิ่นน้ำต้มเนื้อ 2.4 คะแนน กลิ่นนมควั่น 2.8 คะแนน รสเค็ม 2.0 คะแนน รสหวาน 2.6 คะแนน มีคะแนนด้านกลิ่นเปรี้ยว รสเปรี้ยว และรสขมลดลง ซึ่งมีคะแนนเท่ากับ 1.4, 1.6 และ 1.2 คะแนน ตามลำดับ (ภาพที่ 4-10)

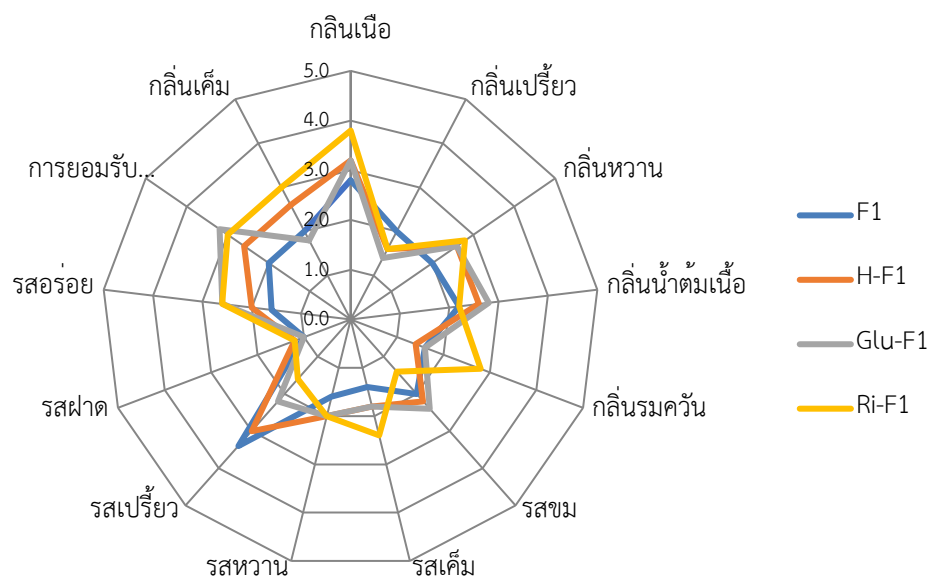
ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสและน้ำตาลกลูโคสให้คะแนนทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสเนื้อ รสหวาน รสอูมามิและการยอมรับโดยรวมที่สูงกว่าเพปไทด์ก่อนทำปฏิกิริยา เนื่องจากเกิดสารประกอบระเหยง่ายที่ทำให้เกิดกลิ่นรส โดยพบว่าเพปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส (RF4) ให้คะแนนทางด้านรสอูมามิ 3.2 คะแนน รสหวาน 2.6 คะแนน กลิ่นเนื้อ 3.4 คะแนน และการยอมรับโดยรวม 3.6 คะแนน ซึ่งดีกว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากน้ำตาลไรโบสที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ขนาดใหญ่ ได้แก่ F1, F2, F3 และ Crude สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการขัดขวางของ steric รวมถึงโครงสร้างของน้ำตาล [115] [165] ดังนั้นเพปไทด์ขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ความสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับน้ำตาลได้ง่าย ส่งผลทำให้ได้สารกลิ่นรสที่สูงกว่าเพปไทด์ขนาดใหญ่ อีกทั้งการสลายตัวของน้ำตาลที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดสารให้กลิ่นรสที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาการเมลเลชัน (Caramelization) รวมถึงความร้อนจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำให้เกิดสารพวกอะโรมาติกฟูแรน สารประกอบคาร์บอนิล แอลกอฮอล์ อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนซึ่งทำให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (MRPs) เป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถเกิดขึ้นได้จากผลิตภัณฑ์ที่มีการเชื่อมขวาง (crosslinking) อีกด้วย รสชาติของ MRPs เกิดจากการทำงานร่วมกันของสารประกอบอะโกนิสต์ (agonist compounds) กับตัวรับรสภายในต่อมรับรส ซึ่งจะสร้างสัญญาณไฟฟ้าที่ส่งต่อไปยังสมอง จากนั้นจึงตีความสัญญาณว่าหมายถึงรสชาติที่เฉพาะเจาะจง รสเปรี้ยว หวาน ขม เค็ม และอูมามิ เป็นรสชาติพื้นฐาน 5 ประการที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย [155]

ด้วยเหตุนี้กรดอะมิโนจึงมีส่วนสำคัญในการให้รสชาติด้วย เช่น กรดอะมิโนโพรลีน (Pro) และไกลซีน (Gly) ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลกลูโคสทำให้เกิดสารระเหยง่ายของ pyrrolizine และ pyridine ซึ่งมีหน้าที่ในรสชาติในอาหาร กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซิสเทอีน (Cys) เมทไธโอนีน (Met) มีส่วนให้เกิดรสคล้ายเนื้อในอาหาร Cys ยังมีอิทธิพลต่อการเกิดสีน้ำตาล

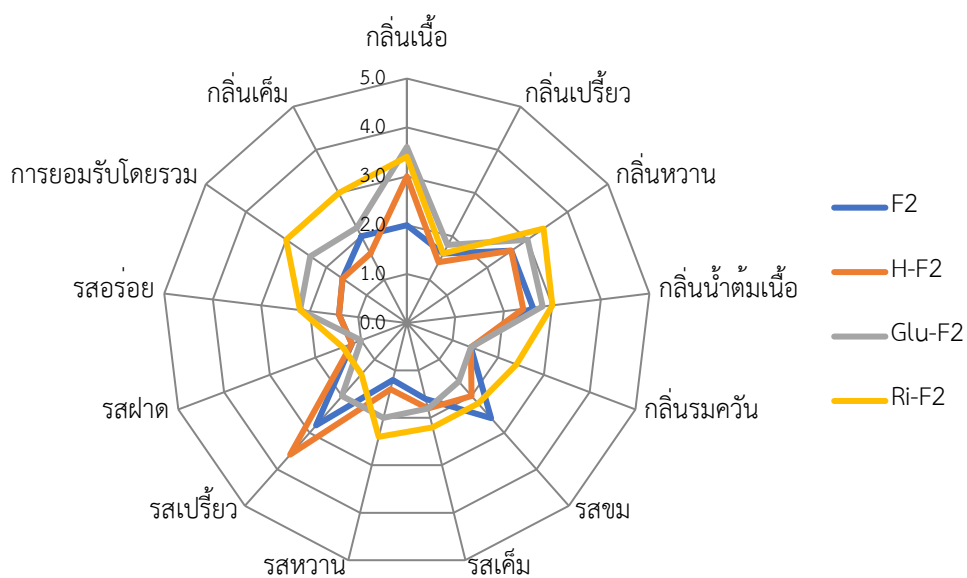
จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยยับยั้งการก่อตัวของโครโมฟอร์ [150] กรดอะมิโนที่ทำให้เกิดรสหวาน ได้แก่ ทรีโอนีน (Thr) เซอรีน (Ser) อาร์จินีน (Arg) และอะลานีน (Ala) กรดอะมิโนที่ให้รสชาติอูมามิหรือรสอูมามิเกิดจากกรดอะมิโนแอสพาร์ติก (Asp) และกรดกลูตามิก (Glu) [102] เนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานร่วมกันคือ  $-O-(Cn)-O-(n=3-9)$  เมื่อ  $n=4-6$  รสอูมามิจะเข้มข้นที่สุด ซึ่งลักษณะโครงสร้างกรดอะมิโน Asp และ Glu คล้ายคลึงกับโครงสร้างของผงชูรส (monosodium glutamate) บ่งชี้ถึงลักษณะที่เหมือนกันของการเข้าจับกับ receptor บริเวณลิ้น เพื่อได้รับรสอูมามิ อีกทั้งรวมถึง pH มีอิทธิพลอย่างมากต่อรสชาติของกรดอะมิโนอูมามิเนื่องจากการมีอยู่ของ  $NH_3^+$  และ  $COO^-$  ซึ่งจากงานวิจัยตรวจสอบผลของ pH ต่อการรับรสอูมามิหรือรสอูมามิของโมเลกุลโมโนโซเดียมกลูตาเมตพบว่าที่ pH เท่ากับ 4 สามารถรับรสอูมามิน้อย แต่ในช่วง pH 5.5–8.0 สามารถรับรสอูมามิได้สูง [166]



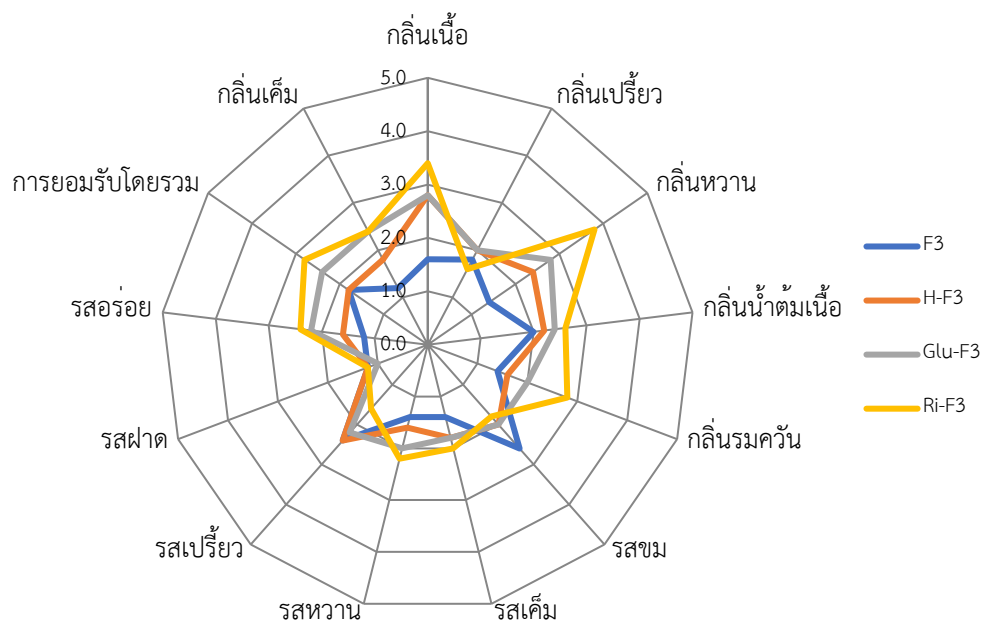
ภาพที่ 4-6 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์จากถั่วเขียว Crude หรือ C ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด



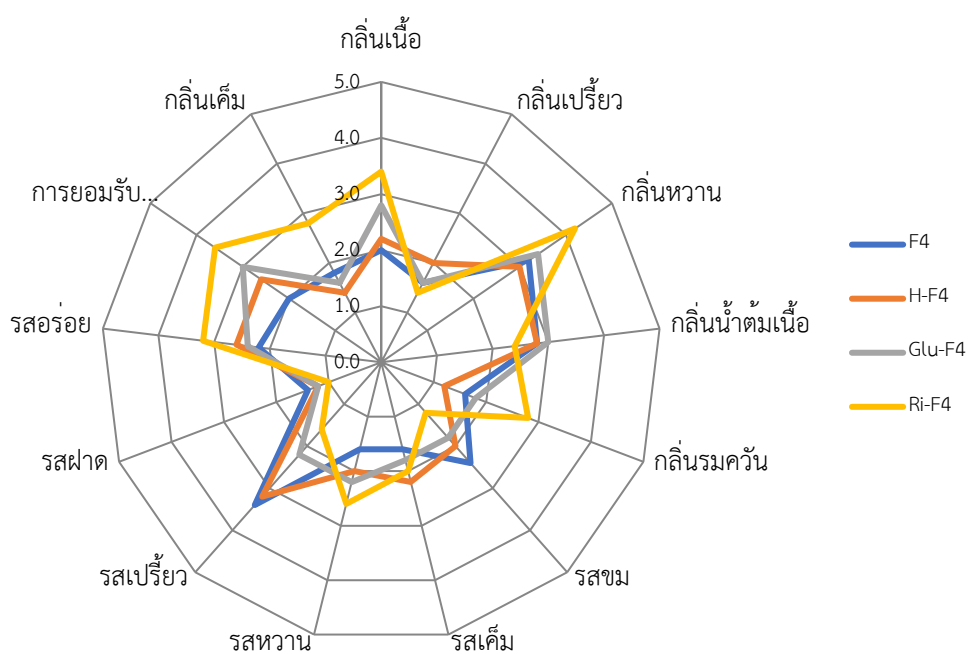
ภาพที่ 4-7 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดมากกว่า 10 kDa (F1) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด



ภาพที่ 4-8 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดมากกว่า 5-10 kDa (F2) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด



ภาพที่ 4-9 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาด 1-5 kDa (F3) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด



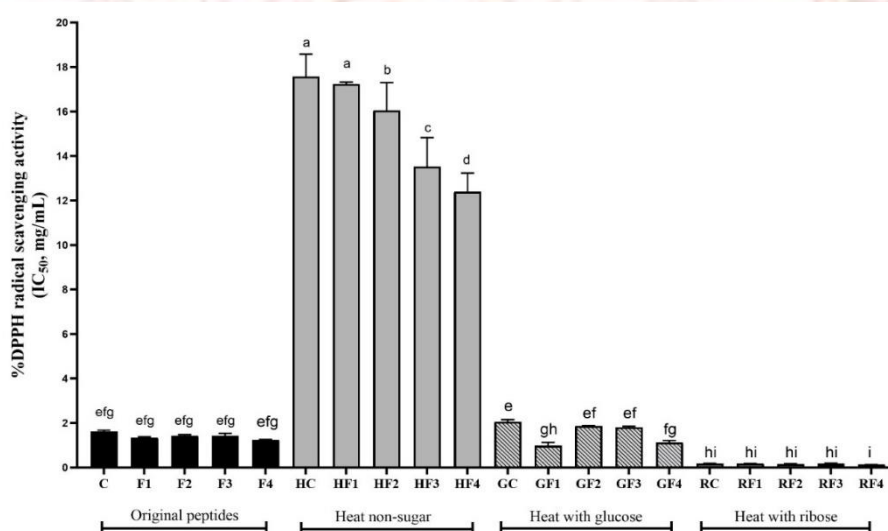
ภาพที่ 4-10 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของเพปไทด์กากถั่วเขียวขนาดเล็กกว่า 1 kDa (F4) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด

#### 4.10 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

##### 4.10.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ผลจากการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเพปไทด์กากถั่วเขียวได้แก่ เพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (C, F1, F2, F3 และ F4) เพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) และเพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนกับน้ำตาลกลูโคส (GC, GF1, GF2, GF3 และ GF4) และน้ำตาลไรโบส (RC, RF1, RF2, RF3 และ RF4) จากผลการทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของเพปไทด์กากถั่วเขียวกับน้ำตาลไรโบสพบว่า มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  ที่ต่ำ แสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสและเพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา (ภาพที่ 4-11) โดยพบว่า RF4 ซึ่งมาจาก F4 ที่มีขนาดน้อยกว่า 1 kDa ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส ให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.1302 mg/mL ซึ่งแตกต่างกับ RC, RF1, RF2 และ RF3 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.1816, 0.1737, 0.1611 และ 0.1834 mg/mL ตามลำดับ โดยที่ RF4 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด ซึ่งสาเหตุหลักเนื่องมาจากสารประกอบระเหยได้ที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น 2,5-dimethyl pyrazine, 2-nonen-4-one, nonanoic acid หรือ dimethyl trisulfide เป็นต้น มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> เนื่องจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH<sup>•</sup> มีกลไกแบบ Hydrogen atom transfer [167] อย่างเช่น dimethyl trisulfide มีหมู่ sulfur เป็นองค์ประกอบทำให้ความสามารถในการให้โปรตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมให้กับอนุมูลอิสระทำให้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังเป็นมาผลจากการดอเมิโนอิสระในสายเพปไทด์ที่ยังเหลืออยู่หลังจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด รวมทั้งเพปไทด์ขนาดเล็กส่งผลทำให้ RF4 ช่วยเสริมทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี [168] มีรายงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชหลายชนิด เช่น เกล็ดจีน พบว่าขนาดของเพปไทด์น้อยกว่า 1 kDa สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูง [123] เช่นเดียวกับงานวิจัยของ [169] พบว่า เพปไทด์จากข้าว rice berry ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นกัน นอกจากนี้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลแล้ว สารประกอบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดกับน้ำตาลไรโบส เช่น สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compound) ได้แก่ เช่น อัลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) ฟูแรน (furan) ไทโอฟิน (thiophene) ไพราซีน (pyrazine) เป็นต้น หรือสารประกอบอื่นๆ

ที่เกิดขึ้นระหว่างทำปฏิกิริยาทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [170] [171] โดยมีงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษา ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากใบกระหล่ำปลี จากผลการศึกษาพบว่า มีสารประกอบที่เป็นวงอะโรมาติก (aromatic ring) และหมู่ไทออล (thiol) ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ร้อยละ 76 [172] นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากควินัว พบว่า มีสารประกอบ furan, furanones และ cyclopentanones มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นเดียวกัน [173] ดังนั้น จากผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยดังกล่าว นอกจากนี้จากกราฟพบว่า เพปไทด์ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยใช้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล (HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเพปไทด์เริ่มต้น ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นผลมาจากการสลายตัวของกรดอะมิโนในเพปไทด์ ส่งผลให้กรดอะมิโนมีการเสื่อมสภาพ หรือเกิดเป็นสารประกอบประเภทอื่นซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่ดี ดังนั้นจากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่า RF4 สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ได้สูงสุด สูงกว่าผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส และเพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา

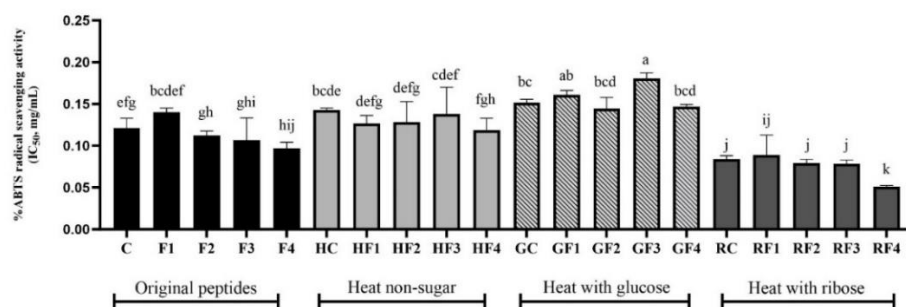


ภาพที่ 4-11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>, mg/mL)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.10.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียวที่ใช้น้ำตาลโรบอสพบว่า มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ  $ABTS^{\bullet+}$  ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเพปไทด์กลุ่มอื่น โดยจากกราฟ (ภาพที่ 4-12) จะเห็นได้ว่า F4 (<1 kDa) ก่อนทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0968 mg/mL แต่เมื่อ F4 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโรบอส พบว่า RF4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้สูงสุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0508 mg/mL ซึ่งมีค่าแตกต่างกันกับ RC, RF1, RF2 และ RF3 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.0843, 0.0890, 0.0793 และ 0.0782 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ และมีสารประกอบประเภทเฮเทอโรไซคลิกที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น 2,5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde, 3-phenyl-furan เป็นต้น โดยสารประกอบประเภทเฮเทอโรไซคลิกมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถให้อิเล็กตรอนจากโครงสร้างวงแหวนของสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกได้ ทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนไปยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ [174] นอกจากนี้สารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่ประกอบด้วย N และ S หรือ คีโตน เป็นองค์ประกอบ มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ [9] จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $ABTS^{\bullet+}$  ได้ดีกว่า DPPH $^{\bullet}$  เนื่องมาจากวิธี ABTS สามารถให้ได้ทั้งไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนไปยับยั้งอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระหยุดลง [175] ดังนั้น เพปไทด์ส่วนใหญ่มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี จะมีค่า  $IC_{50}$  ที่ต่ำ แสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูงเมื่อเทียบกับการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH $^{\bullet}$ , hydroxyl, superoxide และ FRAP



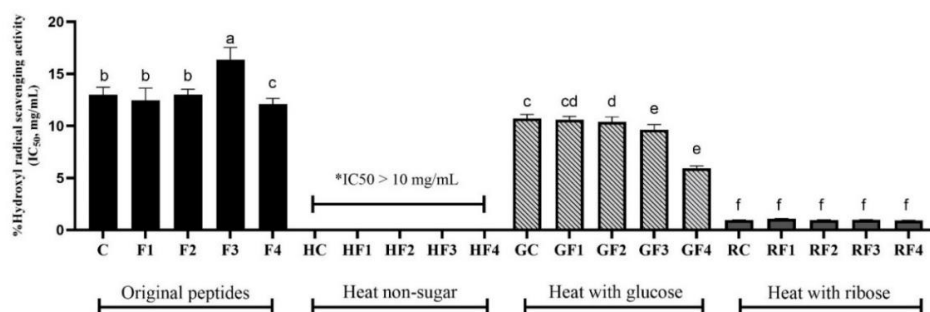
ภาพที่ 4-12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>, mg/mL)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.10.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity

อนุมูลอิสระ hydroxyl (OH<sup>•</sup>) มีฤทธิ์แรงมาก ซึ่งเป็นอนุมูลที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ซึ่งอนุมูลอิสระ hydroxyl จะทำปฏิกิริยากับไบโอโมเลกุลเกือบทั้งหมดในเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์เกิดการตายหรือเสื่อมสภาพ ส่งผลทำให้เกิดการแก่ก่อนวัยและโรคเรื้อรัง เช่น การอักเสบ โรคเมเร็ง เป็นต้น โดยจากผลการทดสอบ Hydroxyl radical scavenging activity พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียวที่ใช้น้ำตาลโรโบส มีค่า IC<sub>50</sub> ที่น้อย แสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าเพปไทด์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส เพปไทด์ที่ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล และเพปไทด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยเพปไทด์ F4 มีขนาดน้อยกว่า 1 kDa ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโรโบส หรือ RF4 มีค่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl สูงสุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.9045 mg/mL ซึ่งไม่แตกต่างกับ RC, RF1, RF2 และ RF3 เท่ากับ 0.9488, 1.0624, 0.9324 และ 0.9712 mg/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 4-13) โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเกิดจากสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่เกิดขึ้นจากหลังทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น 2,5-dimethyl pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde และ 3-phenyl-furan เป็นต้น โดย Hydroxyl radical scavenging activity มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระเป็นแบบ single electron transfer [176] สารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็น aromatic ring มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระส่งผลทำให้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ [177] นอกจากนี้ จากกราฟจะเห็นว่าในกลุ่มของเพปไทด์ที่ผ่านการให้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาล มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ เนื่องจากเมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl

พบว่าที่ความเข้มข้น 10 mg/mL พบว่า HC, HF1, HF2, HF3 และ HF4 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl 16.87, 28.19, 2.64, 3.45 และ 0.44 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ถึงร้อยละ 50 ทำให้ไม่สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นผลมาจากสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น 2-nonen-4-one, 2-heptanone และ nonanoic acid เป็นต้น ซึ่งสารส่วนใหญ่เป็นจำพวกไฮโดรคาร์บอน จึงทำให้ต้านอนุมูลอิสระได้ไม่ค่อยดีเมื่อเทียบกับสารเป็นพวก aromatic ring ดังนั้น เพปไทด์ที่ให้ความร้อนแต่ไม่ใช้น้ำตาลจะต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 mg/mL ขึ้นไป จึงสามารถที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ได้ร้อยละ 50



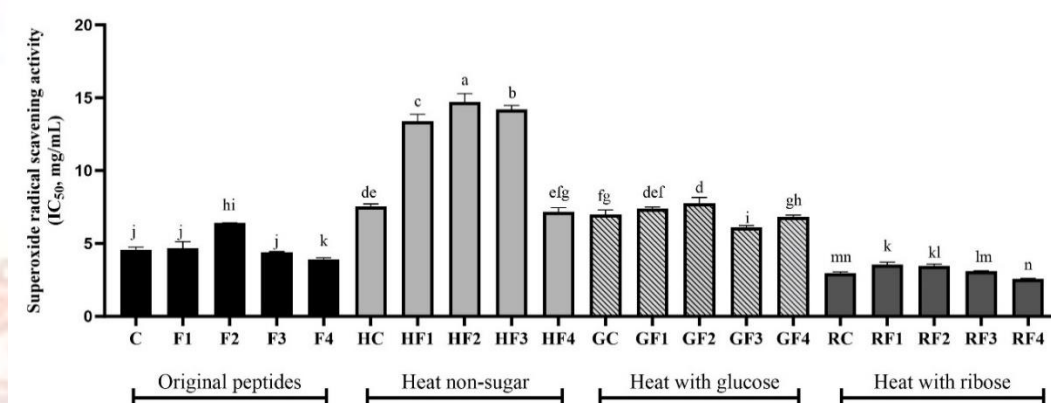
ภาพที่ 4-13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Hydroxyl radical scavenging activity ( $IC_{50}$ , mg/mL)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.10.4 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging activity

อนุมูลอิสระ superoxide ซึ่งเป็นอนุมูลที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายเช่นเดียวกับอนุมูลอิสระ hydroxyl โดยอนุมูลอิสระ superoxide ( $O_2^-$ ) เกิดจากการเพิ่มอิเล็กตรอนหนึ่งตัวให้กับโมเลกุลของออกซิเจน ( $O_2$ ) ทำให้เกิดเป็น  $O_2^-$  ซึ่งมีอิเล็กตรอนเกินมาและทำให้มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเคมี ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide radical scavenging activity พบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโรโบส มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide สูงสุด เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากโรโบสมี 5 อะตอม ส่งผลทำให้เกิดการเปิด-ปิดวงได้ง่าย มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ดี ส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอะโรมาติกมีปริมาณสูงกว่า จึงทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ได้ดีกว่ากลูโคส (ภาพที่ 4-14) โดยเฉพาะเพปไทด์ RF4 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide สูงสุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.5473 mg/mL แตกต่างจาก RC, RF1, RF2 และ RF3 ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.9400, 3.5532, 3.4670 และ 3.0894 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจาก มีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เกิดจาก สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปในประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระในวิธีอื่นๆ โดย Superoxide radical scavenging activity มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ single electron transfer โดยที่สารประกอบเฮเทอโรไซคลิกเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระส่งผลทำให้ต้านอนุมูลอิสระได้ [137], [138] นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน Glutamic acid, Aspartic acid และ Arginine [178] มีฤทธิ์ในการเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยกรดอะมิโนเหล่านี้สามารถให้อิเล็กตรอนเพื่อไปยับยั้งอนุมูลอิสระ superoxide



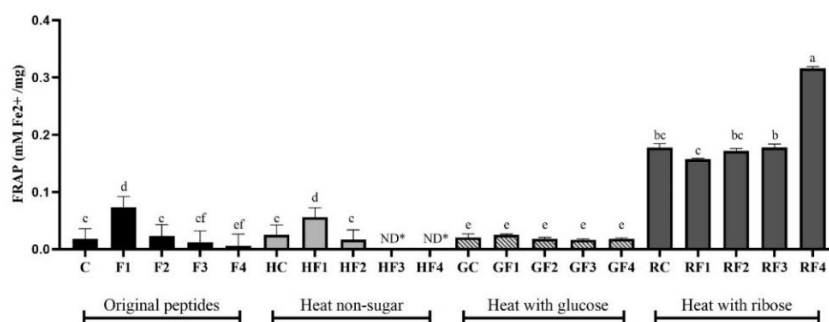
ภาพที่ 4-14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Superoxide radical scavenging activity ( $IC_{50}$ , mg/mL)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.10.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดจากความสามารถในการรีดิวซ์ ferric ions ( $Fe^{3+}$ ) ให้เป็น ferrous ions ( $Fe^{2+}$ ) ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์จากถั่วเขียวที่ใช้น้ำตาลไรโบส พบว่า มีความสามารถในการรีดิวซ์  $Fe^{3+}$  ให้กลายเป็น  $Fe^{2+}$  ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเพปไทด์กลุ่มอื่น RF4 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.3163 mM  $Fe^{2+}$ /mg ซึ่งแตกต่างจาก RC, RF1, RF2 และ RF3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.1771,

0.1572, 0.1715 และ 0.1776 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15) อาจเป็นผลมาจากสารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่นสารประกอบสีน้ำตาล (melanoidin) และ reducing ketone ที่เกิดขึ้นในระบบ ซึ่งสามารถรีดิวซ์  $\text{Fe}^{3+}$  เป็น  $\text{Fe}^{2+}$  [179]



ภาพที่ 4-15 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mM  $\text{Fe}^{2+}$ /mg)

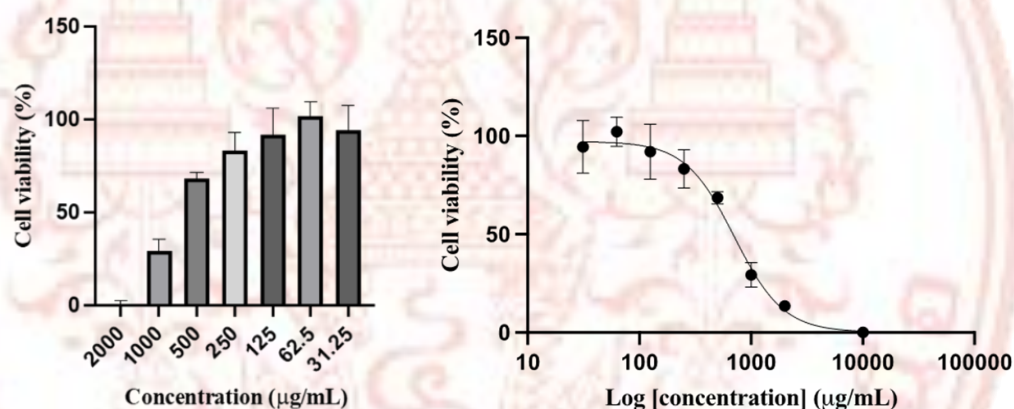
a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ RF4 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก F4 (< 1 kDa) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีในทุกการทดสอบสาเหตุหลักเป็นเพราะสารประกอบระเหยง่ายที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMW) ถือเป็นส่วนสำคัญสำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [180] และชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการเกิดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ไม่เพียงขึ้นอยู่กับสารประกอบระเหยง่ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดเท่านั้น แต่อาจจะเกิดจากกรดอะมิโนที่อยู่ในสายเพปไทด์ ที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด อาจจะส่งเสริมทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ กรดอะมิโนที่มีขั้ว/มีประจุ เช่น ฮิสติดีน (His) หรืออาร์จินีน (Arg) ทรีปโตเฟน (Trp) และไทโรซีน (Tyr) สามารถลดอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนและอิเล็กตรอนได้ดี [73]

#### 4.11 ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell)

ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ของ RF4 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จาก F4 (< 1kDa) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส โดยทดสอบอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (เซลล์ Vero) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และคำนวณหาค่า

ความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ ) ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ RF4 ลดลง ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อคำนวณค่าการรอดชีวิตต่อ log ความเข้มข้นต่อสารทดสอบ พบค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $707 \pm 7.90 \mu\text{g/mL}$  และค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เท่ากับ  $250 \mu\text{g/mL}$  (ภาพที่ 4-16) ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดมักเกี่ยวข้องกับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด รวมถึงกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี [171] ซึ่งช่วยการป้องกันหรืออาจช่วยลดความเสียหายของเซลล์ และ ผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์การย่อยสลายเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งโดยทั่วไปไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ



ภาพที่ 4-16 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ของ RF4

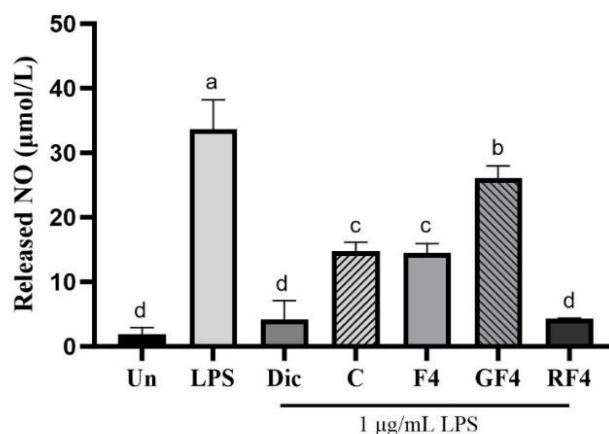
#### 4.12 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

ในการศึกษาผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบ โดยได้เลือกตัวอย่างมาทดสอบ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Crude, F4, GF4 และ RF4 เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะ RF4 ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ดังนั้นจึงได้เลือกกลุ่มของเปปไทด์ขนาดเล็ก คือ กลุ่มของ F4 ( $< 1\text{kDa}$ ) มาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยเปรียบเทียบกับเปปไทด์เริ่มต้นที่ไม่ได้ทำการแยกขนาด (Crude)

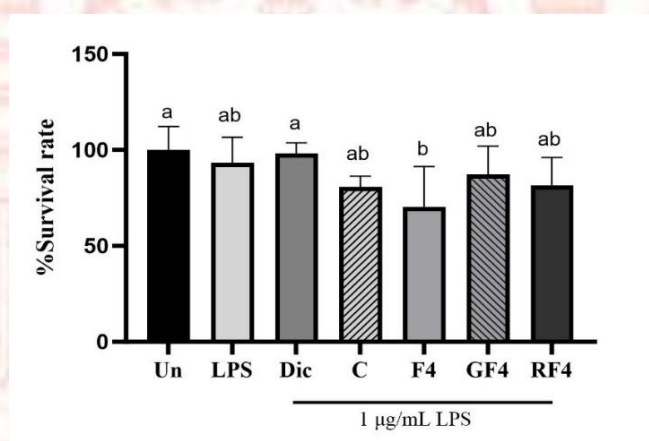
##### 4.12.1 ความสามารถในการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) จากเปปไทด์กากถั่วเขียว

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของเปปไทด์จากกากถั่วเขียวถูกประเมินจากความสามารถในการยับยั้งการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในไตร

กออกไซด์เป็นสารที่ร่างกายมนุษย์ผลิตขึ้นตามธรรมชาติและมีความสำคัญต่อสุขภาพของหลอดเลือด [181] อย่างไรก็ตาม การผลิต NO ในปริมาณมากเกินไปอาจนำไปสู่ผลเสีย เช่น ความเสียหายของเนื้อเยื่อและการอักเสบเรื้อรัง ในการศึกษาที่ทดสอบเพปไทด์จากกากถั่วเขียว และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ C, F4, GF4 และ RF4 เพื่อวิเคราะห์การยับยั้งการปลดปล่อย NO และเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น control (Untreated) กลุ่มที่ได้รับยาแก้อักเสบ (Diclofenac) และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-17) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในสถานะที่เซลล์ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่ามีการผลิต NO ในปริมาณสูงเท่ากับ  $33.70 \mu\text{mol/L}$  เมื่อให้เพปไทด์จากถั่วเขียวสามารถลดการผลิต NO ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเข้มข้น  $1000 \mu\text{g/mL}$  ของเพปไทด์จากถั่วเขียว พบว่า RF4 สามารถยับยั้งการปลดปล่อย NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สามารถยับยั้งการปลดปล่อย NO ลดลงเหลือเท่ากับ  $4.29 \mu\text{mol/L}$  เมื่อเทียบกับ C, F4 และ GF4 ซึ่งมีปริมาณ NO ปลดปล่อยเท่ากับ  $14.74$ ,  $14.48$  และ  $26.09 \mu\text{mol/L}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษาายังแสดงให้เห็นว่า RF4 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่แข็งแกร่งเทียบเท่ากับ Diclofenac ( $4.18 \mu\text{mol/L}$ ) ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ดังนั้น RF4 จึงมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการปลดปล่อย NO สาเหตุหลักมาจากสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกสามารถช่วยลดการอักเสบได้เนื่องจากมีรายงานพบว่าได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเฮเทอโรไซคลิกของฟูแรนเพื่อใช้เป็นยาต้านการอักเสบ นอกจากนี้กรดอะมิโนในสายเพปไทด์ที่ยังหลงเหลืออยู่หลังจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดช่วยเสริมทำให้มีความยับยั้งการปลดปล่อย NO เนื่องจากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนใน RF4 พบว่ากรดอะมิโนที่เป็นแบบแบบโซ่กิ่ง (branched-chain) ได้แก่ Leucine, Valine และ Isoleucine เหลืออยู่หลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้มีรายงานพบว่า Leucine สามารถยับยั้งการผลิต NO ได้ร้อยละ 81.15 ในขณะที่ Valine และ Isoleucine ก็ลดการผลิต NO ได้ร้อยละ 29.65 และ 42.95 ตามลำดับ [182] ในส่วนของความเป็นพิษของ C, F4, GF4 และ RF4 ต่อเซลล์ RAW 264.7 (ภาพที่ 4-18) จากผลการทดลองพบว่า C, F4, GF4 และ RF4 มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เกินร้อยละ 80 ซึ่งแสดงว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ macrophage (RAW 264.7)



ภาพที่ 4-17 การปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO released) ของเพปไทด์จากถั่วเขียว



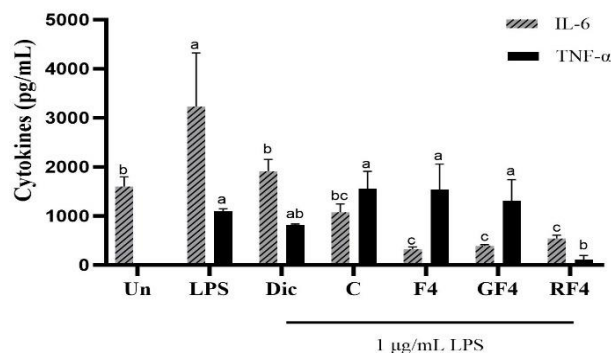
ภาพที่ 4-18 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของเพปไทด์จากถั่วเขียวต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7)

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.12.2 ความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ ชนิด IL-6 และ TNF- $\alpha$

สาร IL-6 (Interleukins) และ TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ซึ่ง cytokine ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นหนึ่งในตัวกระตุ้นเกิดการอักเสบ โดยในการทดสอบ ได้เลือกใช้เพปไทด์จากถั่วเขียว 4 ตัวอย่าง ได้แก่ C, F4, GF4 และ RF4 เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง IL-6 และ TNF- $\alpha$  เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น Untreated (Control) กลุ่มที่ได้รับยาแก้ปวด (Diclofenac) และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-19) จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เกิด

การอักเสบ มีการหลั่ง IL-6 เท่ากับ 3227.40 pg/mL แต่เมื่อบ่มเซลล์ด้วยเพปไทด์ถั่วเขียว พบว่าสามารถลดการหลั่งของ IL-6 และ TNF- $\alpha$  ได้ โดย F4, GF4 และ RF4 สามารถยับยั้ง IL-6 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่า IL-6 อยู่ที่ 324, 391.66 และ 542.81 pg/mL ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) เปรียบเทียบกับ C และ ยา Diclofenac โดยมีค่า IL-6 อยู่ที่ 1076.24 และ 1910.34 pg/mL ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง TNF- $\alpha$  พบว่า RF4 มีความสามารถในการยับยั้ง TNF- $\alpha$  โดยลดการหลั่งของ TNF- $\alpha$  ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยมีค่า TNF- $\alpha$  อยู่ที่ 113.55 pg/mL แต่ตัวอย่าง C, F4, GF4, ยา Diclofenac และ LPS เพียงอย่างเดียว พบการหลั่ง TNF- $\alpha$  อยู่ที่ 1159.03, 1538.39, 1309.64, 1097.78 และ 810.69 pg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับตัวอย่างที่บ่มด้วย LPS อย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า RF4 มีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถลดการปลดปล่อยของ IL-6 กับ TNF- $\alpha$  เนื่องจาก RF4 มาจาก F4 ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 kDa ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส เพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก หน้าที่ทางชีวภาพนี้ โดยที่ขนาดน้ำโมเลกุลน้อย สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) และส่งไปยังเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ดี [56] นอกจากนี้สารประกอบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น furan เนื่องจากได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ ของ furan เพื่อทดสอบคุณสมบัติของยาต้านการอักเสบ [183] รวมถึงยังมีรายงานพบว่าสารประกอบ dimethyl trisulfide มีความสามารถในการต้านอักเสบในตับอ่อนได้ [184] ดังนั้น จากเหตุผลดังที่ได้กล่าวมานี้ ทำให้ RF4 มีประสิทธิภาพในการต้านอักเสบที่ดี รวมทั้งสารประกอบ heterocyclic มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ [185] ซึ่งช่วยลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ อาจจะช่วยลดการกระตุ้นเส้นทางส่งสัญญาณที่นำไปสู่การผลิต cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น NF- $\kappa$ B ตามรายงานได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการอักเสบจากเพปไทด์ถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์ alcalase พบว่าเพปไทด์ถั่วเขียวสามารถยับยั้ง NF- $\kappa$ B ได้ ดังนั้น กลไกการต้านการอักเสบคาดว่าจะเกิดจาก RF4 สามารถควบคุม NF- $\kappa$ B pathway โดยการยับยั้ง I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation และ p65 ไม่ให้เคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ทำให้ไม่เกิดการหลั่ง cytokine แต่ถ้า I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation และ p65 เคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B pathway ทำให้เกิดการปลดปล่อย cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเกิดขึ้น [56] ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า RF4 มีความสามารถในการยับยั้งการปลดปล่อย IL-6 และ TNF- $\alpha$  ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 4-19 ความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง cytokine ของเปปไทด์กากถั่วเขียว

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

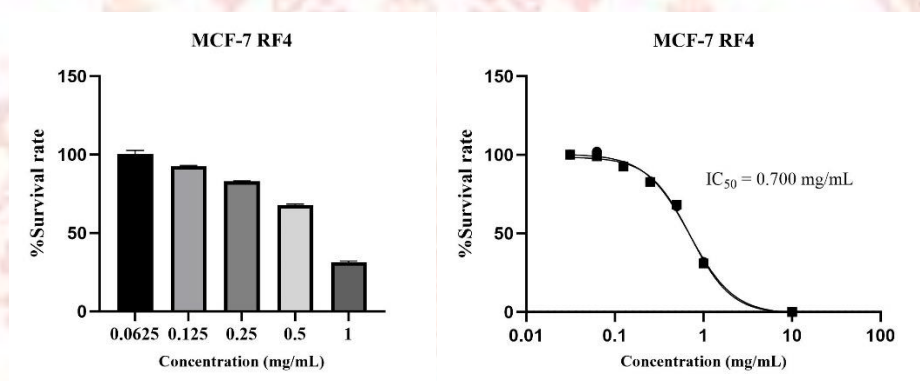
#### 4.13 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็ง (Anti-cancer)

##### 4.13.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งเต้านม (MCF7)

ศึกษาการประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม breast adenocarcinoma cell (MCF-7) ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยเลือกตัวอย่าง RF4 คือ เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 1 kDa ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl และ superoxide ซึ่งเป็นกลุ่มของอนุมูลออกซิเจน (Oxygen species) ที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ส่งผลทำให้เซลล์เกิดการตายหรือเสื่อมสภาพ ทำให้เกิดการแก่ก่อนวัยและโรคเรื้อรัง เช่น การอักเสบ และโรคมะเร็ง [186] ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบตัวอย่างเปปไทด์ในด้านไปทดสอบความสามารถในการต้านมะเร็งเต้านมเบื้องต้น (Preliminary Experiment) ผลจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่า RF4 มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมได้ สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เริ่มต้นที่ไม่มีการแยกขนาด และไม่ผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (C หรือ Crude) ดังนั้นจึงเลือก RF4 มาศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นต่อฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม และทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ RF4 มีแปรผันผกผันกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมลดลง โดย RF4 มีค่าความเข้มข้น  $IC_{50}$  เท่ากับ 700  $\mu\text{g/mL}$  (ภาพที่ 4-20) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า RF4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ โดยมีผลต่อเซลล์มะเร็งในลักษณะขึ้นอยู่กับปริมาณ (dose-dependent effect)

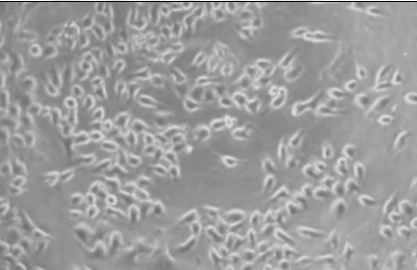
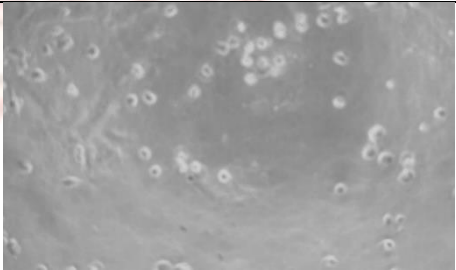
เมื่อศึกษาภาพลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม ก่อนและหลังทดสอบด้วย RF4 (ตาราง 4-7) พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ก่อน treat ด้วย RF4 มีความหนาแน่นของ

เซลล์มะเร็งอยู่เป็นจำนวนมาก เซลล์มีรูปร่างเรียวยาว แต่หลังจาก treat ด้วย RF4 พบว่าเซลล์มะเร็งมีจำนวนลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับก่อนทดสอบ นอกจากนี้เซลล์มีลักษณะรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์มะเร็งมีลักษณะกลม มีรูตรงกลางเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากการที่เพปไทด์ RF4 เข้าไปทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดยที่ เซลล์มีกหุดตัวและกลมขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของไซโตสเกเลตอน (cytoskeleton) และการสูญเสียการยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียง หรือสาเหตุของเซลล์มะเร็งถูกทำลาย อาจเกิดจากการที่สารเข้าไปกระตุ้น DNA ให้เกิดความเสียหาย ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และตายในที่สุด [5]



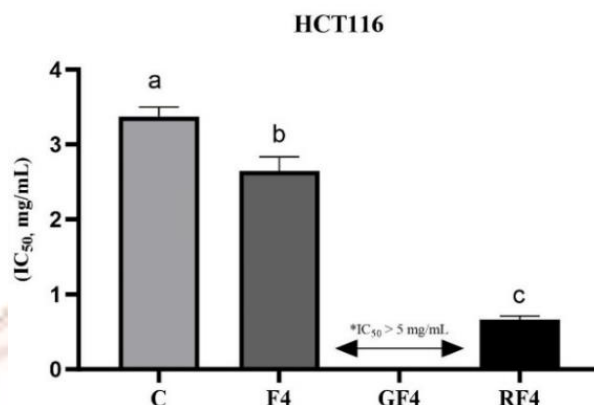
ภาพที่ 4-20 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) หลังบ่มด้วย RF4

ตารางที่ 4-7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม ก่อนและหลังทดสอบด้วยเพปไทด์ RF4

| เซลล์มะเร็งเต้านม<br>(MCF-7) ก่อน treat RF4                                         | เซลล์มะเร็งเต้านม<br>(MCF-7) หลัง treat RF4                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |

#### 4.13.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งลำไส้ (HCT116)

จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (human colorectal carcinoma cell line, HCT116) ของเพปไทด์ และผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากกากถั่วเขียว ในการศึกษานี้ได้เลือกเพปไทด์จากกากถั่วเขียว ได้แก่ C, F4, GF4 และ RF4 เนื่องจากได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะ RF4 ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ดังนั้นจึงเลือกกลุ่มของเพปไทด์ขนาดเล็ก ( $< 1$  kDa) คือกลุ่มของ F4 มาทำการทดสอบมะเร็งลำไส้และเปรียบเทียบกับเพปไทด์เริ่มต้นที่ไม่ได้ทำการแยกตามขนาด (Crude หรือ C) จากผลการทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์ขนาดเล็กกว่า  $< 1$  kDa ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโรโบส (RF4) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.6645$  mg/mL สูงกว่าเพปไทด์ขนาดเดียวกันก่อนทำปฏิกิริยา (F4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $2.6435$  mg/mL และสูงกว่ากับเพปไทด์เริ่มต้นที่ไม่ได้ทำการแยกตามขนาด (Crude) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากเพปไทด์กับน้ำตาลกลูโคส (GF4) โดย C มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.3740$  mg/mL ส่วน GF4 ไม่สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ แม้กระทั่งที่ความเข้มข้นสูงถึง  $5$  mg/mL อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ยังอยู่ที่ร้อยละ  $73.6560$  (ภาพที่ 4-21) ซึ่ง GF4 อาจจะต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า  $5$  mg/mL ขึ้นไป จึงจะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ  $50$  เนื่องจากสารประกอบใน GF4 อาจจะไม่มีความสามารถหรือมีประสิทธิภาพน้อยกว่า RF4 จึงทำให้มีความสามารถในการต้านมะเร็งได้ไม่ดี ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า RF4 มีความสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีขึ้นประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับเพปไทด์จากกากถั่วเขียวขนาดเล็กกว่า  $1$  kDa เริ่มต้น เนื่องจากมีสารประกอบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งมีรายงานพบว่า heterocyclic compound และอนุพันธ์ มีความสามารถในการต้านมะเร็ง เช่น ยา Methotrexate sodium เป็นยาต้านมะเร็ง จากโครงสร้างของยาพบว่ามีอนุพันธ์ของ pyrazine เป็นองค์ประกอบ [187] ซึ่งพบสารประกอบ pyrazine ใน RF4 รวมทั้งมีรายงานพบ dimethyl trisulfide มีหมู่ sulfur เป็นองค์ประกอบมีความสามารถในการยับยั้งมะเร็งได้ [188] ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ RF4 มีความสามารถในการต้านมะเร็งได้

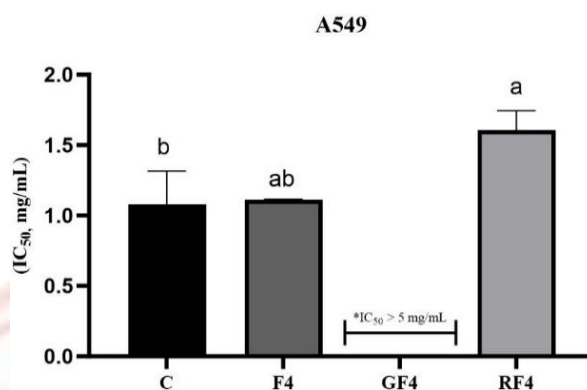


ภาพที่ 4-21 ความสามารถในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) จากเพปไทด์จากถั่ว

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.13.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านมะเร็งปอด (A549)

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด (Adenocarcinoma) ของเพปไทด์จากถั่วเขียว ในการศึกษานี้ได้เลือกเพปไทด์จากถั่วเขียว ได้แก่ C, F4, GF4 และ RF4 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งมะเร็งปอด พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทหรือเพปไทด์ที่ยังไม่ผ่านการแยกขนาดและไม่ได้ทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Crude) มีความสามารถในการยับยั้งมะเร็งปอดได้สูงสุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลดลงครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ 50 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.0791 mg/mL (ภาพที่ 4-22) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ F4, GF4 และ RF4 โดย F4 และ RF4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.1105 และ 1.6060 mg/mL ตามลำดับ แต่ GF4 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด แม้ทดสอบที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 5 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ที่ร้อยละ 67.4919 จึงไม่สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ GF4 อาจจะต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 5 mg/mL ขึ้นไป จึงจะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ 50 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า Crude มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดได้ดีกว่า RF4 ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะมะเร็งแต่ละชนิดมีลักษณะทางชีววิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างกัน เช่น การตอบสนองต่อสารบางชนิดหรือการรับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงขนาดโมเลกุล ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ส่งผลต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ [189] จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกต่อไป



ภาพที่ 4-22 ความสามารถในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปอด (A549) จากเพปไทด์กากถั่วเขียว

a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาลักษณะของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรสและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไรโบส พบว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารให้กลิ่นรสและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งความสามารถในการอักเสบและการต้านมะเร็งได้ดี โดยที่เพปไทด์ที่ได้จากกากถั่วเขียวขนาดน้อยกว่า 1 kDa ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส (RF4) ให้กลิ่นรสดี มีปริมาณกรดอะมิโน Glu และ Asp สูงกว่ากรดอะมิโนที่พบ ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองชนิดเป็นสารตั้งต้นในการเกิดรสอูมามิหรือรสอร่อย มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติที่ดี โดยมีกลิ่นเนื้อเท่ากับ 3.4 คะแนน กลิ่นหวาน 4.2 คะแนน รสอร่อย 3.2 คะแนน และการยอมรับโดยรวม 3.6 คะแนน นอกจากนี้ พบองค์ประกอบหลักของสารระเหยได้ซึ่งมีเป็นส่วนสำคัญในการให้กลิ่นรสแก่อาหาร ได้แก่ furfural ให้กลิ่นคล้ายกับคาราเมล, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-Pyrazine กลิ่นคล้ายกับเนื้อคั่ว และ dimethyl trisulfide ให้กลิ่นคล้ายกับเนื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ RF4 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, Hydroxyl, Superoxide และ FRAP รวมถึงความสามารถในการต้านการอักเสบโดยลดการปลดปล่อย NO ยับยั้งการหลั่ง cytokine IL-6 และการหลั่ง TRF- $\alpha$  ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดมะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma; MCF-7) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma; HCT-116) และมะเร็งปอด (human alveolar basal epithelial cell; A549) ได้ โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารกลุ่มเฮเทอโรไซคลิกที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดและ/หรือ กรดอะมิโนในสายเพปไทด์ที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยาเมลลาร์ด หรือรวมถึงสารประกอบอื่น ซึ่งควรมีการศึกษาในเชิงลึกในการทดลองต่อไป แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองจากงานวิจัยก็สามารถชี้ให้เห็นเด่นชัดว่าผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากกากถั่วเขียวมีศักยภาพที่ดีในการเป็นสารเสริมรสในอาหารที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย เหมาะที่จะศึกษาและพัฒนาไปเป็นสารเสริมรสเชิงสุขภาพและประยุกต์ใช้ในอาหาร และพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง จึงควรมีการทดลองเพิ่มเติมโดยจำลองสภาวะระบบการย่อยอาหารในร่างกาย (digestion) เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระทั้งก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ ว่าหลังจากผ่านกระบวนการย่อยแล้ว ประสิทธิภาพดังกล่าวยังเหลืออยู่หรือไม่ และศึกษาการแยกบริสุทธิ์สาร ศึกษาและติดตามเมตาบอไลต์โปรไฟล์ (metabolite profile) ของสารสำคัญที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา เพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของสารประกอบแต่ละตัวที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด



### บรรณานุกรม

- [1] van Staveren, W.C., et al., *Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1795**(2): p. 92-103.
- [2] Wattanasiritham, L., et al., *Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein.* Food Chem, 2016. **192**: p. 156-62.
- [3] Sonklin, C., et al., *Functional Characterization of Mung Bean Meal Protein-Derived Antioxidant Peptides.* Molecules, 2021. **26**: p. 1515.
- [4] Diao, J., X. Miao, and H. Chen, *Anti-inflammatory effects of mung bean protein hydrolysate on the lipopolysaccharide- induced RAW264.7 macrophages.* Food Sci Biotechnol, 2022. **31**(7): p. 849-856.
- [5] Li, M., et al., *Finding and isolation of novel peptides with anti-proliferation ability of hepatocellular carcinoma cells from mung bean protein hydrolysates.* Journal of Functional Foods, 2019. **62**: p. 103557.
- [6] Yu, M., et al., *Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate.* Food Chem, 2018. **243**: p. 249-257.
- [7] Chen, X., et al., *Effect of Temperature on Flavor Compounds and Sensory Characteristics of Maillard Reaction Products Derived from Mushroom Hydrolysate.* 2018. **23**(2): p. 247.
- [8] Sun, L., et al., *Structure and flavor characteristics of Maillard reaction products derived from soybean meal hydrolysates-reducing sugars.* LWT, 2023. **185**: p. 115097.
- [9] Ni, Z.-J., et al., *Effects of sugars on the flavor and antioxidant properties of the Maillard reaction products of camellia seed meals.* Food Chemistry: X, 2021. **11**: p. 100127.
- [10] Lotfy, S.N., et al., *Effects of pH on headspace volatiles and properties of Maillard reaction products derived from enzymatically hydrolyzed quinoa protein-xylose model system.* LWT, 2021. **145**: p. 111328.

- [11] Zhang, W., et al., *Effect of different sulfur-containing compounds on the structure, sensory properties and antioxidant activities of Maillard reaction products obtained from Pleurotus citrinopileatus hydrolysates*. LWT, 2022. **171**: p. 114144.
- [12] Song, N., et al., *Transglutaminase cross-linking effect on sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soybean protein hydrolysates*. Food Chemistry, 2013. **136**(1): p. 144-151.
- [13] Teng, C., et al., *Effects of Maillard reaction on the properties and anti-inflammatory, anti-proliferative activity in vitro of quinoa protein isolates*. Industrial Crops and Products, 2021. **174**: p. 114165.
- [14] Rachie, K.O. and L.M. Roberts, *Grain Legumes of the Lowland Tropics*, in *Advances in Agronomy*, N.C. Brady, Editor. 1974, Academic Press. p. 1-132.
- [15] Hou, D., et al., *Mung Bean (Vigna radiata L.): Bioactive Polyphenols, Polysaccharides, Peptides, and Health Benefits*. Nutrients, 2019. **11**(6): p. 1238.
- [16] Pataczek, L., et al., *Beans with Benefits-The Role of Mungbean (Vigna radiata) in a Changing Environment*. 2018.
- [17] Pratap, A., et al., *Breeding Progress and Future Challenges: Biotic Stresses*, in *The Mungbean Genome*, R.M. Nair, R. Schafleitner, and S.-H. Lee, Editors. 2020, Springer International Publishing: Cham. p. 55-80.
- [18] Singh, D., B. Singh, and A. Pratap, *Genetic improvement of mungbean and urdbean and their role in enhancing pulse production in India*. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The), 2016. **76**: p. 550.
- [19] Pratap, A., et al., *Cross-genera amplification of informative microsatellite markers from common bean and scarlet runner bean for assessment of genetic diversity in mungbean ( Vigna radiata )*. Plant Breeding, 2016. **135**.
- [20] Kusumah, J., L.M. Real Hernandez, and E. Gonzalez de Mejia, *Antioxidant Potential of Mung Bean (Vigna radiata) Albumin Peptides Produced by Enzymatic Hydrolysis Analyzed by Biochemical and In Silico Methods*. 2020. **9**(9): p. 1241.
- [21] Hou, D., et al., *Mung Bean (Vigna radiata L.): Bioactive Polyphenols, Polysaccharides, Peptides, and Health Benefits*. 2019. **11**(6): p. 1238.

- [22] Li, G.-H., et al., *Antihypertensive effect of Alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats*. European Food Research and Technology, 2006. **222**: p. 733-736.
- [23] Sonklin, C., et al., *Identification of antihypertensive peptides from mung bean protein hydrolysate and their effects in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Functional Foods, 2020. **64**: p. 103635.
- [24] Xie, J., et al., *Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiata*)*. Food Chemistry, 2019. **270**: p. 243-250.
- [25] Oomah, B.D., A. Corbé, and P. Balasubramanian, *Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**: p. 8225-30.
- [26] Soucek, J., et al., *Mung bean sprout (*Phaseolus aureus*) nuclease and its biological and antitumor effects*. Neoplasma, 2006. **53**(5): p. 402-9.
- [27] Zhou, L., et al., *Structural and functional properties of Maillard reaction products of protein isolate (mung bean, *Vigna radiata* (L.)) with dextran*. International Journal of Food Properties, 2017. **20**(sup2): p. 1246-1258.
- [28] Mubarak, A.E., *Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes*. Food Chemistry, 2005. **89**(4): p. 489-495.
- [29] Yi-Shen, Z., S. Shuai, and R. FitzGerald, *Mung bean proteins and peptides: nutritional, functional and bioactive properties*. Food & nutrition research, 2018. **62**: p. 10.29219/fnr.v62.1290.
- [30] Ganesan, K. and B. Xu, *A critical review on phytochemical profile and health promoting effects of mung bean (*Vigna radiata*)*. Food Science and Human Wellness, 2018. **7**(1): p. 11-33.
- [31] Nair, R.M., et al., *Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health*. 2013. **93**(8): p. 1805-1813.
- [32] Dahiya, P.K., et al., *Nutrient composition of selected newly bred and established mung bean varieties*. LWT - Food Science and Technology, 2013. **54**(1): p. 249-256.

- [33] Zhu, Y.-S., S. Shuai, and R. FitzGerald, *Mung bean proteins and peptides: nutritional, functional and bioactive properties*. Food & Nutrition Research, 2018. **62**(0).
- [34] Kudre, T.G., S. Benjakul, and H. Kishimura, *Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut*. 2013. **93**(10): p. 2429-2436.
- [35] Hadidi, M., S. Jafarzadeh, and A. Ibarz, *Modified mung bean protein: Optimization of microwave-assisted phosphorylation and its functional and structural characterizations*. LWT, 2021. **151**: p. 112119.
- [36] El-Adawy, T.A., *Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate*. Food Chemistry, 2000. **70**(1): p. 83-91.
- [37] Herneke, A., et al., *Protein nanofibrils from mung bean: The effect of pH on morphology and the ability to form and stabilise foams*. Food Hydrocolloids, 2023. **136**: p. 108315.
- [38] Jo, Y.-J., W. Huang, and L. Chen, *Fabrication and characterization of lentil protein gels from fibrillar aggregates and the gelling mechanism study*. Food & Function, 2020. **11**(11): p. 10114-10125.
- [39] Wang, R.-X., et al., *The improvement and mechanism of gelation properties of mung bean protein treated by ultrasound*. LWT, 2023. **182**: p. 114811.
- [40] Liu, F.-F., et al., *Impact of pH on the physicochemical and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata* L.) protein*. Process Biochemistry, 2021. **111**: p. 274-284.
- [41] Lee, M.-Y. and Y.-J. Jo, *Microstructural and rheological properties of heat-induced gels from mung bean protein aggregates*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023. **17**(4): p. 3464-3472.
- [42] Zheng, Z., et al., *Preparation and characterization of lipophilic antioxidative peptides derived from mung bean protein*. Food Chemistry, 2022. **395**: p. 133535.
- [43] Xia, J.a., et al., *Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of mungbean protein*. 2020. **85**(6): p. 1735-1741.

- [44] Li, L., et al., *Regulatory Effect of Mung Bean Peptide on Prediabetic Mice Induced by High-Fat Diet*. 2022. **9**.
- [45] Karami, Z., et al., *Comparative study on structural, biological and functional activities of hydrolysates from Adzuki bean (*Vigna angularis*) and mung bean (*Vigna radiata*) protein concentrates using Alcalase and Flavourzyme*. Food Research International, 2022. **161**: p. 111797.
- [46] Diao, J., X. Miao, and H. Chen, *Anti-inflammatory effects of mung bean protein hydrolysate on the lipopolysaccharide- induced RAW264.7 macrophages*. Food Science and Biotechnology, 2022. **31**(7): p. 849-856.
- [47] Sonklin, C., et al., *Volatile flavour compounds, sensory characteristics and antioxidant activities of mungbean meal protein hydrolysed by bromelain*. J Food Sci Technol, 2018. **55**(1): p. 265-277.
- [48] Sonklin, C., N. Laohakunjit, and O. Kerdchoechuen, *Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates*. PeerJ, 2018. **6**: p. e5337.
- [49] Sonklin, C., et al., *Functional Characterization of Mung Bean Meal Protein-Derived Antioxidant Peptides*. 2021. **26**(6): p. 1515.
- [50] Liu, F.-F., et al., *Influence of ultrasound treatment on the physicochemical and antioxidant properties of mung bean protein hydrolysate*. Ultrasonics Sonochemistry, 2022. **84**: p. 105964.
- [51] Xia, J., et al., *Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of mungbean protein*. J Food Sci, 2020. **85**(6): p. 1735-1741.
- [52] Zheng, Z., et al., *Comparative assessment of physicochemical and antioxidative properties of mung bean protein hydrolysates*. RSC Advances, 2020. **10**(5): p. 2634-2645.
- [53] Je, J.Y. and S.K. Kim, *Chitosan as potential marine nutraceutical*. Adv Food Nutr Res, 2012. **65**: p. 121-35.
- [54] Udenigwe, C.C., et al., *Almond protein hydrolysate fraction modulates the expression of proinflammatory cytokines and enzymes in activated macrophages*. Food Funct, 2013. **4**(5): p. 777-83.

- [55] Mercier, A., S.F. Gauthier, and I.L. Fliss, *Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests*. International Dairy Journal, 2004. **14**(3): p. 175-183.
- [56] Diao, J., et al., *Mung Bean Protein Hydrolysate Modulates the Immune Response Through NF- $\kappa$ B Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages*. J Food Sci, 2019. **84**(9): p. 2652-2657.
- [57] Chalamaiah, M., W. Yu, and J. Wu, *Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review*. Food Chemistry, 2018. **245**: p. 205-222.
- [58] Liu, Y., et al., *Progress of Cell Penetrating Peptides Application as Delivery Agent*. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014. **41**: p. 731-738.
- [59] Kong, X., et al., *Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins*. Bioresource Technology, 2008. **99**(18): p. 8873-8879.
- [60] Wang, Z. and X. Zhang, *Isolation and identification of anti-proliferative peptides from Spirulina platensis using three-step hydrolysis*. J Sci Food Agric, 2017. **97**(3): p. 918-922.
- [61] Kannan, A., et al., *Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran*. Peptides, 2010. **31**(9): p. 1629-34.
- [62] Ortiz-Martinez, M., et al., *Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 cells*. Journal of Functional Foods, 2017. **34**: p. 36-48.
- [63] González-Montoya, M., et al., *Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation*. Food Chemistry, 2018. **242**: p. 75-82.
- [64] Chi, C.-F., et al., *Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (Tegillarca granosa) muscle*. Journal of Functional Foods, 2015. **15**: p. 301-313.
- [65] Kim, E.-K., et al., *Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from Ruditapes philippinarum*. Process Biochemistry, 2013. **48**(7): p. 1086-1090.

- [66] Pan, X., et al., *Anticancer Activity of a Hexapeptide from Skate (Raja porosa) Cartilage Protein Hydrolysate in HeLa Cells*. Mar Drugs, 2016. **14**(8).
- [67] Adler-Nissen, J., *Enzymic Hydrolysis of Food Protein*. Vol. 8. 1986.
- [68] Orengo, C.A., A.E. Todd, and J.M. Thornton, *From protein structure to function*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(3): p. 374-82.
- [69] Ren, J., et al., *Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate*. 2010. **48**: p. 519-523.
- [70] Habinshuti, I., T.-H. Mu, and M. Zhang, *Structural, antioxidant, aroma, and sensory characteristics of Maillard reaction products from sweet potato protein hydrolysates as influenced by different ultrasound-assisted enzymatic treatments*. Food Chemistry, 2021. **361**: p. 130090.
- [71] Zhou, K., S. Sun, and C. Canning, *Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration*. Food Chemistry, 2012. **135**(3): p. 1192-1197.
- [72] Sonklin, C., N. Laohakunjit, and O. Kerdchoechuen, *Physicochemical and Flavor Characteristics of Flavoring Agent from Mungbean Protein Hydrolyzed by Bromelain*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(15): p. 8475-8483.
- [73] Sonklin, C., et al., *Volatile flavour compounds, sensory characteristics and antioxidant activities of mungbean meal protein hydrolysed by bromelain*. Journal of Food Science and Technology, 2018. **55**(1): p. 265-277.
- [74] Sun-Waterhouse, D., M. Zhao, and G.I.N. Waterhouse, *Protein Modification During Ingredient Preparation and Food Processing: Approaches to Improve Food Processability and Nutrition*. Food and Bioprocess Technology, 2014. **7**(7): p. 1853-1893.
- [75] Scocca, J. and Y.C. Lee, *The Composition and Structure of the Carbohydrate of Pineapple Stem Bromelain*. Journal of Biological Chemistry, 1969. **244**(18): p. 4852-4863.
- [76] Murachi, T., *Amino Acid Composition of Stem Bromelain\**. Biochemistry, 1964. **3**(7): p. 932-934.

- [77] Hale, L.P., et al., *Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(4): p. 783-93.
- [78] James, M.N.G., *Handbook of proteolytic enzymes*, edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner. 1998. London: Academic Press. 1666 pp. \$250.00. \$90.00 for the CD-ROM. Protein Science, 1999. **8**(3): p. 693-694.
- [79] Heinicke, R.M. and W.A. Gortner, *Stem bromelain—A new protease preparation from pineapple plants*. Economic Botany, 1957. **11**(3): p. 225-234.
- [80] Walsh, D.J., et al., *Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking*. Food Research International, 2003. **36**(7): p. 677-683.
- [81] Koh, J., et al., *Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers*. Fibers and Polymers, 2006. **7**(2): p. 180-185.
- [82] Singh, L., Y. Ranjana, and S. Devi, *Enzymological characterization of pineapple extract for potential application in oak tasar (Antheraea proylei J.) silk cocoon cooking and reeling*. Electronic Journal of Biotechnology (ISSN: 0717-3458) Vol 6 Num 3, 2003. **6**.
- [83] Ketnawa, S., P. Chaiwut, and S. Rawdkuen, *Extraction of bromelain from pineapple peels*. Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional, 2011. **17**: p. 395-402.
- [84] *Industrial Enzymes*, in *Enzymes in Industry*. 2007. p. 99-262.
- [85] Hwang, K. and A.C. Ivy, *A REVIEW OF THE LITERATURE ON THE POTENTIAL THERAPEUTIC SIGNIFICANCE OF PAPAIN*. 1951. **54**(2): p. 161-207.
- [86] Pavan, R., et al., *Properties and therapeutic application of bromelain: a review*. Biotechnology research international, 2012. **2012**: p. 976203-976203.
- [87] Chobotova, K., A.B. Vernallis, and F.A. Majid, *Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives*. Cancer Lett, 2010. **290**(2): p. 148-56.
- [88] Orsini, R., *Bromelain*. Plastic and reconstructive surgery, 2007. **118**: p. 1640-4.
- [89] Maurer, H.R., *Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(9): p. 1234-45.

- [90] Castell, J.V., et al., *Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. G139-46.
- [91] Molina Ortiz, S.E. and J.R. Wagner, *Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties*. Food Research International, 2002. **35**(6): p. 511-518.
- [92] Manley, C.H. and S. Ahmed, *The development of process flavors*. Trends in Food Science & Technology, 1995. **6**(2): p. 46-51.
- [93] Laohakunjit, N., O. Selamassakul, and O. Kerdchoechuen, *Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.)*. Food Chemistry, 2014. **158**: p. 162–170.
- [94] Wu, Y.-F., et al., *Development of a Meat-Like Process Flavoring from Soybean-Based Enzyme-Hydrolyzed Vegetable Protein (E-HVP)*. 2000. **65**(7): p. 1220-1227.
- [95] Kosowska, M., M. Majcher, and T. Fortuna, *Volatile compounds in meat and meat products*. Food Science and Technology (Campinas), 2017. **37**: p. 1-7.
- [96] Lane, M.J. and H.E. Nursten, *The Variety of Odors Produced in Maillard Model Systems and How They Are Influenced by Reaction Conditions*, in *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. 1983, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. p. 141-158.
- [97] Dzanic, H., I. Mujic, and V. Sudarski-Hack, *Protein hydrolyzates from soy grits and dehydrated alfalfa flour*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985. **33**(4): p. 683-685.
- [98] Zhang, Y., et al., *Effect of limited enzymatic hydrolysis on physico-chemical properties of soybean protein isolate-maltodextrin conjugates*. 2015. **50**(1): p. 226-232.
- [99] Hofmann, T. and P. Schieberle, *Evaluation of the Key Odorants in a Thermally Treated Solution of Ribose and Cysteine by Aroma Extract Dilution Techniques*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(8): p. 2187-2194.

- [100] Hofmann, T., *Characterization of the Chemical Structure of Novel Colored Maillard Reaction Products from Furan-2-carboxaldehyde and Amino Acids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(3): p. 932-940.
- [101] Wu, Y.F. and K.R. Cadwallader, *Characterization of the aroma of a meatlike process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(10): p. 2900-7.
- [102] Laohakunjit, N., O. Selamassakul, and O. Kerdchoechuen, *Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (Gracilaria sp.)*. Food Chemistry, 2014. **158**: p. 162-170.
- [103] Eric, K., et al., *Sensory Characteristics of Maillard Reaction Products Obtained from Sunflower Protein Hydrolysates and Different Sugar Types*. International Journal of Food Engineering, 2017. **13**.
- [104] Manninen, H., et al., *Free amino acids and 5'-nucleotides in Finnish forest mushrooms*. Food Chemistry, 2018. **247**: p. 23-28.
- [105] Nagodawithana, T.W., *Savory Flavors*. 1995: Esteekay Associates.
- [106] Zhang, Y. and C.T. Ho, *Formation of meatlike aroma compounds from thermal reaction of inosine 5'-monophosphate with cysteine and glutathione*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(6): p. 1145-1148.
- [107] Farmer, L.J., D.S. Mottram, and F.B. Whitfield, *Volatile compounds produced in maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid*. 1989. **49**(3): p. 347-368.
- [108] Cui, H., et al., *Formation and fate of Amadori rearrangement products in Maillard reaction*. Trends in Food Science & Technology, 2021. **115**: p. 391-408.
- [109] Lund, M.N. and C.A. Ray, *Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(23): p. 4537-4552.
- [110] Horvat, Š. and M. Roščić, *Glycosylation of lysine-containing pentapeptides by glucuronic acid: new insights into the Maillard reaction*. Carbohydrate Research, 2010. **345**(3): p. 377-384.

- [111] Naik, R.R., Y. Wang, and C. Selomulya, *Improvements of plant protein functionalities by Maillard conjugation and Maillard reaction products*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022. **62**(25): p. 7036-7061.
- [112] Xiao, Q., et al., *The role of heating time on the characteristics, functional properties and antioxidant activity of enzyme-hydrolyzed rice proteins-glucose Maillard reaction products*. Food Bioscience, 2021. **43**: p. 101225.
- [113] Jiang, Z., et al., *Biological activities and physicochemical properties of Maillard reaction products in sugar-bovine casein peptide model systems*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 3837-3845.
- [114] Kerler, J., et al.
- [115] Amaya-Farfan, J. and D.B. Rodriguez-Amaya, *Chapter 6 - The Maillard reactions*, in *Chemical Changes During Processing and Storage of Foods*, D.B. Rodriguez-Amaya and J. Amaya-Farfan, Editors. 2021, Academic Press. p. 215-263.
- [116] Shang, Y.F., et al., *Effect of sugar types on structural and flavor properties of peony seed derived Maillard reaction products*. Journal of Food Processing and Preservation, 2020. **44**(3).
- [117] Limsuwanmanee, J., et al., *Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from stingray (*Himantura signifier*) non-protein nitrogenous fraction and sugar model systems*. LWT - Food Science and Technology, 2014. **57**(2): p. 718-724.
- [118] Zhou, Q., et al., *Application of Maillard reaction product of xylose-pea protein enzymatic hydrolysate in 3D printing*. 2020. **100**(7): p. 2982-2990.
- [119] Shen, Y., G. Chen, and Y. Li, *Bread characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products of white pan bread containing various sugars*. LWT, 2018. **95**: p. 308-315.
- [120] Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease*. The American Journal of Medicine, 1991. **91**(3): p. S14-S22.
- [121] Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, [2] *Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version*

- for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, in *Methods in Enzymology*. 1999, Academic Press. p. 15-27.
- [122] Gülçin, İ., M. Elmastaş, and H.Y. Aboul-Enein, *Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012. **5**(4): p. 489-499.
- [123] Feng, Y.-X., et al., *Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates*. *LWT*, 2018. **92**: p. 40-46.
- [124] Liang, N. and D.D. Kitts, *Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action*. *Molecules*, 2014. **19**(11): p. 19180-208.
- [125] Hou, W.-C., et al., *Antioxidant Activities of Dioscorin, the Storage Protein of Yam (*Dioscorea batatas* Decne) Tuber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(10): p. 4956-4960.
- [126] Ratnavathi, C.V. and V.V. Komala, *Chapter 1 - Sorghum Grain Quality*, in *Sorghum Biochemistry*, C.V. Ratnavathi, J.V. Patil, and U.D. Chavan, Editors. 2016, Academic Press: San Diego. p. 1-61.
- [127] Spencer, J.P.E., et al., *Intense oxidative DNA damage promoted by l-DOPA and its metabolites implications for neurodegenerative disease*. 1994. **353**(3): p. 246-250.
- [128] Mathew, S. and T.E. Abraham, *Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models*. *Food Chemistry*, 2006. **94**(4): p. 520-528.
- [129] Nishikimi, M., N. Appaji Rao, and K. Yagi, *The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1972. **46**(2): p. 849-854.
- [130] Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 771-6.
- [131] Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(2): p. 227-35.

- [132] Nathan, C. and A. Ding, *Nonresolving inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 871-82.
- [133] Zhou, Y., Y. Hong, and H. Huang, *Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway*. Kidney Blood Press Res, 2016. **41**(6): p. 901-910.
- [134] Jabbour, H.N., et al., *Inflammatory pathways in female reproductive health and disease*. Reproduction, 2009. **138**(6): p. 903-19.
- [135] Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S140-6.
- [136] Chen, H.-M., et al., *Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(1): p. 49-53.
- [137] Chen, X., et al., *Effects of ultrasound pretreatment on the extent of Maillard reaction and the structure, taste and volatile compounds of chicken liver protein*. Food Chemistry, 2020. **331**: p. 127369.
- [138] Habinshuti, I., et al., *Antimicrobial, antioxidant and sensory properties of Maillard reaction products (MRPs) derived from sunflower, soybean and corn meal hydrolysates*. LWT, 2019. **101**: p. 694-702.
- [139] Vigo, M.S., et al., *Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products*. Food Chemistry, 1992. **44**(5): p. 363-365.
- [140] Zhang, Q., et al., *Effect of d-galactose on physicochemical and functional properties of soy protein isolate during Maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 2022. **133**: p. 107914.
- [141] Krivorotova, T. and J. Sereikaite, *Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants*. Electronic Journal of Biotechnology, 2014. **17**(6): p. 329-333.
- [142] Sonklin, C., et al., *Functional Characterization of Mung Bean Meal Protein-Derived Antioxidant Peptides*. Molecules, 2021. **26**(6): p. 1515.

- [143] Girgih, A.T., C.C. Udenigwe, and R.E. Aluko, *In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (Cannabis sativa L.) Protein Hydrolysate Fractions*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011. **88**(3): p. 381-389.
- [144] Ajibola, C.F., et al., *Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (Sphenostylis stenocarpa) protein hydrolysate fractions*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(10): p. 6685-702.
- [145] Karamać, M., A. Kosińska-Cagnazzo, and A. Kulczyk, *Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
- [146] Theeraraksakul, K., et al., *Exploring the Biological Functions and Anti-Melanogenesis of Phallus indusiatus for Mushroom-Based Cosmetic Applications*. Cosmetics, 2023. **10**(5): p. 121.
- [147] Zhu, J., et al., *Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells*. Exp Ther Med, 2013. **5**(5): p. 1345-1350.
- [148] Tabtimmai, L., et al., *Cell-penetrable nanobodies (transbodies) that inhibit the tyrosine kinase activity of EGFR leading to the impediment of human lung adenocarcinoma cell motility and survival*. J Cell Biochem, 2019. **120**(10): p. 18077-18087.
- [149] Lahir, Y.K., *LIPID OXIDATION IN BIOLOGICAL SYSTEMS: BIOCHEMICAL, BIOLOGICAL & BIOPHYSICAL ASPECTS*. 2015. **4**: p. 224-233.
- [150] Hemmler, D., et al., *Insights into the Chemistry of Non-Enzymatic Browning Reactions in Different Ribose-Amino Acid Model Systems*. Scientific Reports, 2018. **8**.
- [151] Li, Z., et al., *Structural characteristics and emulsifying properties of myofibrillar protein-dextran conjugates induced by ultrasound Maillard reaction*. Ultrasonics Sonochemistry, 2021. **72**: p. 105458.
- [152] Qinzhu, Z., et al., *Process optimization and anti-oxidative activity of peanut meal Maillard reaction products*. LWT, 2018. **97**: p. 573-580.

- [153] Lan, X., et al., *Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose- soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking*. Food Chemistry, 2010. **120**(4): p. 967-972.
- [154] Hidalgo, F.J., E. Alcón, and R. Zamora, *Cysteine- and serine-thermal degradation products promote the formation of Strecker aldehydes in amino acid reaction mixtures*. Food Research International, 2013. **54**(2): p. 1394-1399.
- [155] Sun, A., et al., *Maillard reaction of food-derived peptides as a potential route to generate meat flavor compounds: A review*. Food Research International, 2022. **151**: p. 110823.
- [156] Wagner, R. and W. Grosch, *Key odorants of French fries*. Journal of Oil & Fat Industries, 1998. **75**: p. 1385-1392.
- [157] Mathew, A., et al., *Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources?* 2018. p. 267-297.
- [158] Fox, P.F., *Preface to the First Edition*, in *Cheese (Fourth Edition)*, P.L.H. McSweeney, et al., Editors. 2017, Academic Press: San Diego. p. xvii.
- [159] Selamassakul, O., et al., *Bioactive peptides from brown rice protein hydrolyzed by bromelain: Relationship between biofunctional activities and flavor characteristics*. 2020. **85**(3): p. 707-717.
- [160] Zhang, Z., B. Wang, and Y. Cao, *Factors influencing on the formation of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide in model systems*. Food Research International, 2023. **172**: p. 113200.
- [161] Kerler, J., et al., *Basic Chemistry and Process Conditions for Reaction Flavours with Particular Focus on Maillard-Type Reactions*, in *Food Flavour Technology*. 2010. p. 51-88.
- [162] Zha, F., et al., *The Maillard reaction of a shrimp by-product protein hydrolysate: Chemical changes and inhibiting effects of reactive oxygen species in human HepG2 cells*. Food & function, 2015. **6**.
- [163] Madadlou, A., *Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides*. Food Chemistry, 2016. **192**: p. 831-836.

- [164] Chen, W., et al., *Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction*. Food Hydrocolloids, 2019. **95**: p. 298-307.
- [165] He, S., et al., *Antioxidative activity of oyster protein hydrolysates Maillard reaction products*. 2020. **8**(7): p. 3274-3286.
- [166] Zhao, Y., et al., *Progresses on processing methods of umami substances: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2019. **93**: p. 125-135.
- [167] Norma Francenia, S.-S., et al., *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*, in *Antioxidants*, S. Emad, Editor. 2019, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.
- [168] Udenigwe, C.C. and R.E. Aluko, *Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(5): p. 3148-61.
- [169] Selamassakul, O., et al., *Effects of cluster dextrin encapsulation on the properties and antioxidant stability of fractionated Riceberry protein hydrolysate powder prepared by bromelain*. Food Chemistry, 2024. **439**: p. 138161.
- [170] Jiang, Z., et al., *Effects of ultrafiltration and hydrolysis on antioxidant activities of Maillard reaction products derived from whey protein isolate and galactose*. LWT, 2019. **113**: p. 108313.
- [171] Tu, Y., et al., *Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products from  $\alpha$ -lactalbumin and 2'-fucosyllactose*. Food Chem, 2020. **316**: p. 126341.
- [172] Fadel, H.H.M., et al., *Effect of amino compounds on the volatile compounds and antioxidant activity of Maillard reaction products of enzymatic hydrolyzed cabbage leaves*. Applied Food Research, 2023. **3**(2): p. 100327.
- [173] Lotfy, S., et al., *Effects of pH on headspace volatiles and properties of Maillard reaction products derived from enzymatically hydrolyzed quinoa protein-xylose model system*. LWT, 2021. **145**: p. 111328.
- [174] Yanagimoto, K., et al., *Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(19): p. 5480-4.

- [175] Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(9-10): p. 1231-7.
- [176] Mohammed Ali, A.-M. and M. Ziad, *Antioxidant Activity: The Presence and Impact of Hydroxyl Groups in Small Molecules of Natural and Synthetic Origin*, in *Antioxidants*, W. Viduranga, Editor. 2021, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 13.
- [177] Fu, Y., et al., *Maillard reaction products derived from food protein-derived peptides: insights into flavor and bioactivity*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020. **60**(20): p. 3429-3442.
- [178] Tao, J., et al. *Bioactive Peptides from Cartilage Protein Hydrolysate of Spotless Smoothhound and Their Antioxidant Activity In Vitro*. Marine Drugs, 2018. **16**, DOI: 10.3390/md16040100.
- [179] Huang, X., et al., *Preparation of meaty flavor additive from soybean meal through the Maillard reaction*. Food Chemistry: X, 2023. **19**: p. 100780.
- [180] Liu, P., et al., *Sensory Characteristics and Antioxidant Activities of Maillard Reaction Products from Soy Protein Hydrolysates with Different Molecular Weight Distribution*. Food and Bioprocess Technology, 2012. **5**(5): p. 1775-1789.
- [181] Lundberg, J.O. and E. Weitzberg, *Nitric oxide signaling in health and disease*. Cell, 2022. **185**(16): p. 2853-2878.
- [182] Lee, J.H., et al., *Anti-inflammatory and anti-genotoxic activity of branched chain amino acids (BCAA) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 macrophages*. Food Sci Biotechnol, 2017. **26**(5): p. 1371-1377.
- [183] Kabir, E. and M. Uzzaman, *A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds*. Results in Chemistry, 2022. **4**: p. 100606.
- [184] Orján, E.M., et al., *The anti-inflammatory effect of dimethyl trisulfide in experimental acute pancreatitis*. Scientific Reports, 2023. **13**(1): p. 16813.
- [185] Shakoor, A., et al., *Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties*. Food Chemistry, 2022. **393**: p. 133416.
- [186] Iwasaki, K., et al., *Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(44): p. 9765-9774.

- [187] Kaur, A., et al., *Heterocyclic Compounds and their Derivatives with Potential Anticancer Activity*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2024. **58**: p. s26-s39.
- [188] Cerella, C., et al., *Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds*. Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(3): p. 267-71.
- [189] Nwachukwu, I.D. and R.E. Aluko, *Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides*. J Food Biochem, 2019. **43**(1): p. e12761.



ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี



## การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของกากถั่วเขียว

### ก 1. ปริมาณความชื้น โดยใช้ moisture analyzer (% moisture)

ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนมาประมาณ 2.XXX กรัมให้เป็นน้ำหนักสด อบใน hot-air oven ที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งตัวอย่างให้เย็นใน desicator แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบต่อใน Hot-air oven 30 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ได้เป็นน้ำหนักแห้ง จากนั้น คำนวณหาความชื้นตามสูตรคำนวณ

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

### ก 2. ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000)

วิเคราะห์จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่าง (Total nitrogen) แล้วนำมาคูณกับค่า Empirical factor ของอาหารชนิดต่าง ๆ โดยในการทดลองนี้ใช้ค่า 6.25

#### การเตรียมสารเคมี

1. เตรียม modified methyl red indicator เตรียมโดยการชั่งสาร bromocresol green 1.250 กรัม และ methylene blue 0.825 กรัม ละลายด้วยเอธานอลร้อยละ 90 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
2. สารละลาย 4 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด
3. สารละลาย 0.1 นอร์มัล กรดซัลฟูริก เตรียมโดยละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล ปริมาณ 2.719 มิลลิลิตร ลงในขวดเชิงปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเข้าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

#### การวิเคราะห์

นำตัวอย่างจำนวน 2 กรัม ใส่ลงในหลอดตัวอย่าง (digestion tube) เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นลง ในแต่ละหลอดปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ Kjeltab 1 เม็ด เตรียม blank 1 หลอด โดยเติมเฉพาะ กรดซัลฟูริกและ Kjeltab เท่านั้น นำหลอดไปวางลงในเครื่องย่อยสลาย แล้วปรับปุ่มให้ความร้อนไป หมายเลข 10 (จะให้อุณหภูมิภายในหลอดทดลองประมาณ 330 องศาเซลเซียส) ย่อยสลายตัวอย่าง จนกระทั่งสารละลายใส แล้วย่อยสลายต่อไปอีก 20–30 นาที เพื่อให้การย่อยสลายเป็นไปอย่างสมบูรณ์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำตัวอย่างไปกลั่นไนโตรเจนโดยดวงสารละลายอิมตัว

กรดบอริก 50 – 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม modified methyl red indicator ลงไป 2 – 3 หยด แล้วนำไปวางใต้ เครื่องกลั่น Buchi 320 โดยให้สายยางที่นำแอมโมเนียจุ่มอยู่ใต้สารละลายกรดบอริก จากนั้นนำ สารละลายในหลอด Kjeldahl ที่ย่อยสลายจนใสและ เย็น แล้วมาวางในเครื่องกลั่น เติมน้ำให้ได้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80–100 มิลลิลิตร รองรับแอมโมเนียที่ เกิดขึ้นในสารละลายกรดบอริกที่เตรียมไว้ แล้วล้างปลายสายยางภายนอกด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยลงในขวดรูปชมพู่ที่รองรับ นำขวดรูปชมพู่ที่รองรับแอมโมเนีย จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย มาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทาแกมม่วง แล้วนำมา คำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\% N = \frac{0.014 A (B - C)}{D} \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล

B = มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

C = มิลลิลิตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรต blank

D = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Nitrogen} \times \text{Emperical factor}$$

### ก 3. ปริมาณไขมัน โดยใช้ soxhlet (AOAC, 2000))

สารเคมี

- petroleum ether

การวิเคราะห์

นำ round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร และ glass bead 3 เม็ด ไปอบที่อุณหภูมิที่ 100 องศา เซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น 30–60 นาที ใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W1) แล้ว นำไปติดตั้งกับชุด soxhlet ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 10 กรัม (W) ใส่ลงใน porous cup ที่ ทำจากกระดาษ แล้วปิดทับด้วยก้อนสำลี แล้วนำไปติดตั้งไว้กับชุด soxhlet เติม petroleum ether 200 มิลลิลิตร ลงไปใน round bottom flask แล้วให้ความร้อน โดยให้ petroleum ether เดือดและควบแน่น ลงใน porous cup ประมาณ 3–4 หยดต่อวินาที ทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการระเหย petroleum ether ที่อยู่ใน round bottom flask ออกไปจนหมด

(petroleum ether ที่มี crude fat ที่ถูกสกัดออกมาจาก ตัวอย่างละลายอยู่) แล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W2) จากนั้นนำมาหาปริมาณไขมันโดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{W2 - W1}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักตัวอย่าง

W1 = น้ำหนักของ round bottom flask และ glass bead

W2 = น้ำหนักของ round bottom flask, glass bead และ fat

#### ก 4. ปริมาณเยื่อใย โดย Acid detergent digestion (AOAC, 2000)

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟูริกร้อยละ 1.25 เตรียมโดยเติมสารละลายกรดซัลฟูริก 12.50 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.25 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12.50 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

- แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เตรียมโดยละลายแอลกอฮอล์ 960 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ กลั่นเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม และ glass bead 3 เม็ด ในถุงสำหรับบรรจุตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนัก แล้วใส่ในบีกเกอร์สำหรับย่อย แล้วเติมร้อยละ 1.25 กรดซัลฟูริกที่ต้มเดือดประมาณ 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อน จนเดือดนาน 30 นาทีล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนกรดหมด แล้วจึงเติม 1.25 เปอร์เซ็นต์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ต้มเดือดประมาณ 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาทีล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนต่างหมดแล้วเอา glass bead ออกมาแล้วล้างกาก ด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร นำถุงบรรจุจากตัวอย่าง ใส่ลงในครูชีเบล และ ใช้แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ชะล้างจากผ้ากรองลงในครูชีเบล แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก

(W1) นำครุชิลและกากหลังจากอบแห้งแล้วไปเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 60 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วจึงชั่งน้ำหนัก (W2) จากนั้นคำนวณหา ค่าปริมาณเยื่อในตามสูตร คำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเยื่อ (ร้อยละ)} = \frac{(W1 - W2)}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักของตัวอย่าง

W1 = น้ำหนักของครุชิลและกากหลังจากอบแห้งแล้ว

W2 = น้ำหนักของครุชิลและเถ้าหลังจากเผาแล้ว

#### ก 5. ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

นำครุชิลพร้อมฝาปิดเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 นาที แล้วนำ ออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาชั่งน้ำหนัก โดย ชั่งตัวอย่างใส่ในครุชิลประมาณ 2-4 กรัม หรือให้ปริมาณของตัวอย่างสูงประมาณครึ่งหนึ่งของ ความสูงครุชิล บันทึกน้ำหนักของครุชิลและ ตัวอย่าง (W1) นำไปอบใน hot-air oven ที่อุณหภูมิ ประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีหรือจนตัวอย่างเริ่ม เป็นสีดำ จึงนำไปเผาใน furnace ที่ อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาครุชิลไว้อีก 2 ชั่วโมง หรือจนตัวอย่างเป็นเถ้าสีขาวหรือสี เทา นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักของครุชิล พร้อมฝาปิดและเถ้า (W2) จากนั้นคำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{W - (W1 - W2)}{W} \times 100$$

โดยที่ W = น้ำหนักของตัวอย่าง

W1 = น้ำหนักของครุชิลและตัวอย่างก่อนเผา

W2 = น้ำหนักของครุชิลและเถ้าหลังเผา

ก 6. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

$$\text{คาร์โบไฮเดรต (\%)} = 100 - (\text{ร้อยละของ (ความชื้น + โปรตีน + ไขมัน + เถ้า + เยื่อใย)})$$





ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดลอง

**ตารางที่ 1** อัตราการเกิดไกลเคชันของผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากเพปไทด์กากถั่วเขียว

| Sample | %Degree of glycation       |
|--------|----------------------------|
| HC     | 9.0919 <sup>j</sup> ±0.18  |
| HF1    | 14.7322 <sup>i</sup> ±0.66 |
| HF2    | 6.2757 <sup>k</sup> ±0.48  |
| HF3    | 6.3261 <sup>k</sup> ±0.21  |
| HF4    | 8.5249 <sup>j</sup> ±0.25  |
| GC     | 37.9086 <sup>h</sup> ±0.62 |
| GF1    | 46.0144 <sup>f</sup> ±0.29 |
| GF2    | 37.3505 <sup>h</sup> ±0.33 |
| GF3    | 41.6236 <sup>g</sup> ±0.26 |
| GF4    | 45.5202 <sup>f</sup> ±0.24 |
| RC     | 51.6659 <sup>e</sup> ±0.51 |
| RF1    | 55.2497 <sup>d</sup> ±0.55 |
| RF2    | 56.6102 <sup>c</sup> ±0.77 |
| RF3    | 59.9027 <sup>b</sup> ±0.39 |
| RF4    | 69.1740 <sup>a</sup> ±1.89 |

\*ข้อมูลแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ 2** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไประหว่างทำปฏิกิริยาเมลลาร์ดของเพปไทด์กากถั่วเขียว

| Sample | Reducing sugar (mg/g sample) |
|--------|------------------------------|
| GC     | 473.4299 <sup>f</sup> ±2.13  |
| GF1    | 431.1594 <sup>h</sup> ±2.90  |
| GF2    | 446.0237 <sup>g</sup> ±1.39  |
| GF3    | 501.7651 <sup>e</sup> ±0.69  |
| GF4    | 475.2879 <sup>f</sup> ±0.76  |
| RC     | 502.6941 <sup>e</sup> ±0.80  |
| RF1    | 533.3519 <sup>c</sup> ±0.80  |
| RF2    | 524.9907 <sup>d</sup> ±0.80  |
| RF3    | 543.1066 <sup>b</sup> ±0.80  |
| RF4    | 652.7313 <sup>a</sup> ±0.80  |

\*ข้อมูลแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ 3** ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตและผลิตภัณฑ์เมลลาร์ดจากกากถั่วเขียว

| Sample        | IC <sub>50</sub> (mg/mL) *  |                               |                             |                             |                            |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|               | DPPH                        | ABTS                          | Hydroxyl                    | Superoxide                  | FRAP                       |
| C             | 1.6027 <sup>efg</sup> ±0.07 | 0.1210 <sup>efg</sup> ±0.01   | 12.9971 <sup>b</sup> ±0.71  | 4.5501 <sup>i</sup> ±0.20   | 0.0177 <sup>c</sup> ±0.02  |
| F1 (> 10 kDa) | 1.3327 <sup>efg</sup> ±0.05 | 0.1403 <sup>bcdef</sup> ±0.00 | 12.4580 <sup>b</sup> ±1.17  | 4.6805 <sup>j</sup> ±0.45   | 0.0738 <sup>d</sup> ±0.02  |
| F2 (5-10 kDa) | 1.4357 <sup>efg</sup> ±0.04 | 0.1123 <sup>gh</sup> ±0.01    | 13.0076 <sup>b</sup> ±0.51  | 6.4041 <sup>hi</sup> ±0.02  | 0.0229 <sup>c</sup> ±0.02  |
| F3 (1-5 kDa)  | 1.4170 <sup>efg</sup> ±0.12 | 0.1069 <sup>ghi</sup> ±0.03   | 16.3563 <sup>a</sup> ±1.16  | 4.3807 <sup>j</sup> ±0.07   | 0.0119 <sup>c</sup> ±0.02  |
| F4 (< 1 kDa)  | 1.2430 <sup>efg</sup> ±0.01 | 0.0968 <sup>hij</sup> ±0.01   | 12.0754 <sup>c</sup> ±0.56  | 3.8965 <sup>k</sup> ±0.12   | 0.0057 <sup>c</sup> ±0.02  |
| HC            | 17.5767 <sup>a</sup> ±1.00  | 0.1430 <sup>bcde</sup> ±0.00  | >10                         | 7.5409 <sup>de</sup> ±0.16  | 0.0251 <sup>c</sup> ±0.02  |
| HF1           | 17.2400 <sup>a</sup> ±0.09  | 0.1268 <sup>defg</sup> ±0.01  | >10                         | 13.4007 <sup>c</sup> ±0.47  | 0.0554 <sup>d</sup> ±0.02  |
| HF2           | 16.0567 <sup>b</sup> ±1.24  | 0.1283 <sup>defg</sup> ±0.02  | >10                         | 14.7126 <sup>a</sup> ±0.57  | 0.0166 <sup>c</sup> ±0.02  |
| HF3           | 13.5267 <sup>c</sup> ±1.30  | 0.1380 <sup>cdef</sup> ±0.03  | >10                         | 14.1975 <sup>b</sup> ±0.28  | ND*                        |
| HF4           | 12.3933 <sup>d</sup> ±0.84  | 0.1191 <sup>fgh</sup> ±0.01   | >10                         | 7.1763 <sup>efg</sup> ±0.29 | ND*                        |
| GC            | 2.0540 <sup>e</sup> ±0.09   | 0.1514 <sup>bc</sup> ±0.00    | 10.7047 <sup>c</sup> ±0.39  | 6.9754 <sup>f</sup> ±0.33   | 0.0205 <sup>e</sup> ±0.01  |
| GF1           | 0.9794 <sup>gh</sup> ±0.15  | 0.1609 <sup>ab</sup> ±0.01    | 10.6048 <sup>cd</sup> ±0.30 | 7.3937 <sup>def</sup> ±0.11 | 0.0247 <sup>e</sup> ±0.00  |
| GF2           | 1.8643 <sup>ef</sup> ±0.02  | 0.1444 <sup>bcd</sup> ±0.01   | 10.3718 <sup>d</sup> ±0.50  | 7.7393 <sup>d</sup> ±0.42   | 0.1799 <sup>e</sup> ±0.00  |
| GF3           | 1.8067 <sup>ef</sup> ±0.05  | 0.1808 <sup>a</sup> ±0.01     | 9.6369 <sup>e</sup> ±0.49   | 6.1154 <sup>i</sup> ±0.11   | 0.0160 <sup>e</sup> ±0.00  |
| GF4           | 1.1210 <sup>fg</sup> ±0.09  | 0.1467 <sup>bcd</sup> ±0.00   | 5.9324 <sup>e</sup> ±0.22   | 6.8340 <sup>gh</sup> ±0.10  | 0.0179 <sup>e</sup> ±0.00  |
| RC            | 0.1816 <sup>hi</sup> ±0.01  | 0.0843 <sup>j</sup> ±0.00     | 0.9488 <sup>f</sup> ±0.02   | 2.9400 <sup>mn</sup> ±0.12  | 0.1771 <sup>bc</sup> ±0.01 |
| RF1           | 0.1737 <sup>hi</sup> ±0.00  | 0.0890 <sup>ij</sup> ±0.02    | 1.0624 <sup>f</sup> ±0.02   | 3.5532 <sup>k</sup> ±0.17   | 0.1572 <sup>c</sup> ±0.00  |
| RF2           | 0.1611 <sup>hi</sup> ±0.01  | 0.0793 <sup>j</sup> ±0.00     | 0.9324 <sup>f</sup> ±0.05   | 3.4670 <sup>kl</sup> ±0.12  | 0.1715 <sup>bc</sup> ±0.00 |
| RF3           | 0.1834 <sup>hi</sup> ±0.01  | 0.0782 <sup>j</sup> ±0.00     | 0.9712 <sup>f</sup> ±0.03   | 3.0894 <sup>lm</sup> ±0.04  | 0.1776 <sup>b</sup> ±0.01  |
| RF4           | 0.1302 <sup>i</sup> ±0.00   | 0.0508 <sup>k</sup> ±0.00     | 0.9045 <sup>f</sup> ±0.03   | 2.5473 <sup>n</sup> ±0.06   | 0.3163 <sup>a</sup> ±0.00  |

\*IC<sub>50</sub> คือความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

\*ข้อมูลแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

\*ND คือ ไม่พบ

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวโรชา ทรัพย์เจริญ

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อลักษณะทางกายภาพและเคมี กลิ่นรส และฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จากกากถั่วเขียว

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม

ประวัติ วัน เดือน ปีเกิด : 15 ตุลาคม 2542

ที่อยู่ : 1/4 หมู่ 2 ต.ดอนเกาะกา อ.บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา 24170

ระดับการศึกษา

มัธยมศึกษาตอนต้น : โรงเรียนบางน้ำเปรี้ยววิทยา

มัธยมศึกษาตอนปลาย : โรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎิ์

ปริญญาตรี : สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ