รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเขียว และถั่วเหลืองที่งอก

ดร. บังอร ประจันบาล

โครงการนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย
จากเงินรายได้ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว
ปีงบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สัญญาเลขที่ 001/2561 และขอขอบคุณศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อนุเคราะห์ถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 และถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 60

บทคัดย่อ

ถั่วเขียวและถั่วเหลืองเป็นพืชอาหารที่สำคัญของมนุษย์เพราะเป็นแหล่งของโปรตีนที่ให้คุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งการต้านอนุมูลอิสระ โดยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่อยู่ในรูปของ ไอโซฟลาโวน โปรแอนโทไซยานิดิน กรดฟีนอลิก และโพลีแซคคาร์ไรด์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนที่อยู่ในถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่งอกยังมีอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนที่ได้จากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก แล้วผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยภายหลังจากที่เมล็ดดูดซับน้ำแล้วทำการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองทั้งที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอกด้วยเฮกเซนและน้ำ แล้วนำไปตรวจสอบแบบแผนของสารสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเขียวที่ไม่ทำการเพาะงอกและทำการเพาะงอกที่ระยะเวลาต่างกันไม่มีความแตกต่างของจำนวนแถบแบนของโปรตีน และมีจำนวนแถบโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนจากถั่วเหลือง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่เพาะงอกจะลดลงตามระยะเวลาการเพาะ จากนั้นนำสารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน แล้วทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH assay พบว่าถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากที่สุด คือ 57.42 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบแถบแบนโปรตีนในช่วงของการแยกด้วย 15% SDS-PAGE ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 14 kDa ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ดังนั้นถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดและสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในอุตสาหกรรมอาหารได้

ABSTRACT

Mungbean (*Vigna radiate* (L.) Witzek) and soybean (*Glycine max* L.) are the most important and famous legumes for human because there are sources of proteins as well as provides biological properties, especially antioxidant properties. Major mungbean and soybean antioxidants include isoflavones, proanthocyanidins, phenolic acids and polysaccharides. Most studies have focused on the antioxidant properties of native mungbean and soybean, however the properties of germinated mungbean and soybean have a few repots. Therefore, the study aims to compare the protein patterns between dry mature seeds and germinating seeds of the mungbean and soybean extracts as well as to investigate their antioxidant properties, which were hydrolysed with papain. The germinating seeds were evaluated at 12, 24 and 48 h after water absorption. Protein extracts of both dry mature seeds and germinating seeds were achieved by the consecutive extraction in hexane and water. Protein pattern of each extract were determined by SDS-PAGE. The results from SDS-PAGE demonstrated that no differences in amounts of protein bands extracted from dry mature seeds and germinating seeds of mungbean and the amounts of protein bands is less than protein bands from soybean. However, amounts of protein extracted from germinating soybean seeds were decreased with time. And then, these proteins were digested with papain. The antioxidant activity of mungbean and soybean extracts and soybean hydrolysate were determined using DPPH assay. Soy protein isolate from 24 h of germination were hydrolyzed by treatment with papain at 37 $^{\circ}$C for 90 min that showed the highest scavenging activity against DPPH free radicals (57.42% at 2 mg/ml). Nevertheless, the protein bands of soy protein hydrolysates were not detected by 15% SDS-PAGE. These may be contained protein or peptides that have lower molecular weight than 14 kDa leading to against DPPH free radicals. As conclusion, soy protein hydrolysate with papain from 24 h of germination had the best antioxidant potency and could be used as natural antioxidant in food industry.

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
- ถั่วเขียว	4
- ถั่วเหลือง	6
- อนุมูลอิสระ	8
- การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเขียว	8
- การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลือง	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
- ศึกษาแบบแผนโปรตีนถั่วเขียวด้วยเทคนิค SDS-PAGE	13
- ศึกษาแบบแผนโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS-PAGE	14
- ผลการศึกษาแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปน	15
- ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay	17
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	20
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	22
บทที่ 7 ผลผลิต	23
เอกสารอ้างอิง	32
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

ชื่อตาราง		หน้า
ตารางที่ 1	ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างถั่วเขียวผิวมันกับถั่วเขียวผิวดำ	4
ตารางที่ 2	ลักษณะประจำพันธุ์ที่สำคัญของถั่วเขียวผิวมันพันธุ์รับรอง 6 พันธุ์	5
ตารางที่ 3	การวิเคราะห์องค์ประกอบของถั่วเขียว	6
ตารางที่ 4	องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง	7

สารบัญภาพ

ชื่อภาพ		หน้า
รูปที่ 1	ผลการศึกษาแบบแผนของถั่วเขียวด้วยเทคนิค SDS-PAGE	13
รูปที่ 2	ผลการศึกษาแบบแผนของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS-PAGE	14
รูปที่ 3	ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเขียวจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	15
รูปที่ 4	ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วเหลืองจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยแทคนิค SDS-PAGE	16
รูปที่ 5	ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเหลืองจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยแทคนิค SDS-PAGE	17
รูปที่ 6	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเขียวไม่ผ่านการเพาะงอกกับผ่านการเพาะงอกที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay	18
รูปที่ 7	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเหลืองไม่ผ่านการเพาะกับผ่านการเพาะงอกที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay	18
รูปที่ 8	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay	19

บทที่ 1
บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สารอนุมูลอิสระเป็นผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สารซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอมหรือโมเลกุล อนุมูลอิสระที่มากเกินไปก่อให้ความผิดปกติของร่างกายเช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือด มะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Chandrasekara and Shahidi, 2011a2; Chandrasekara and Shahidi, 2011b; Sarmadi and Ismail, 2010) ถ้าสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและสารอนุมูลอิสระได้ก็เป็นผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งสารที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระเรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยาดังกล่าว ซึ่งการหาสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติเป็นสิ่งสำคัญที่ถือว่ามีความปลอดภัยและมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นมา ดังนั้นการศึกษาโดยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติเช่น โทโคฟีรอล (tocopherols) สารคาเทชิน (catechin) สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และเปปไทด์ (peptides) (You et al., 2010)

อาหารที่เป็นแหล่งของโปรตีนสามารถแยกเป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ได้เพราะว่าเปปไทด์จะง่ายต่อการดูดซึม และมีความปลอดภัยต่อสุขภาพมากกว่ายาหรือสารอื่นๆที่ได้จากการสังเคราะห์ (Sarmadi and Ismail, 2010) โดยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3-20 ตัว โดยฤทธิ์ทางชีวภาพจะขึ้นอยู่กับลำดับและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ (Byun et al.,2009; Je et al., 2007; Pihlanto-Leppala, 2000) ซึ่งเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายเช่น วิทยาภูมิคุ้มกัน (Tsuruki et al., 2003) ลดความดันโลหิต (Lee et al., 2010) สารต้านอนุมูลอิสระ (Je et al., 2007) และยับยั้งจุลินทรีย์ (Li et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนบางชนิดที่ได้จากการไฮโดรไลซีสและแยกบริสุทธิ์จนได้เป็นเปปไทด์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi and Zhong, 2010; Tironi and Anon, 2010) โดยเปปไทด์ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 5-16 ตัว (Chen et al, 1996) ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เบส โครงสร้างเป็นวง และคุณสมบัติการไม่ชอบน้ำ อยู่ภายในโมเลกุลสามารถช่วยให้เปปไทด์มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ (Chen et al., 1998) โดยกรดอะมิโนดังกล่าวสามารถแย่งจับกับไอออน จับกับอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน (Sarmadi and Ismail, 2010) โดยเปปไทด์จากธรรมชาติที่สามารถต้านอนุมูลอิสระเป็นที่ยอมรับเป็นอย่างมากเนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพ สามารถแยกได้จากโปรตีนในพืชอาหารหลากหลายชนิดเช่น มันฝรั่ง (Kudo et al., 2009) ถั่วลิสง (Chen et al., 2007) เอนโดสเปิร์ม

ของข้าว (Zhang et al., 2010) ถั่วเหลือง (Moure et al., 2005) กลูเตนของข้าวโพด (Li et al., 2008) และดอกทานตะวัน (Vioque et al., 2008)

โปรตีนจากถั่วเหลืองและถั่วเขียวเป็นสารอาหารโปรตีนหลักที่พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ถูกไฮโดรไลซีสจะสามารถดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ถูกไฮโดรไลซีสเพราะมีองค์ประกอบของเปปไทด์ที่ช่วยเพิ่มการละลายได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในสารอาหารของมนุษย์ที่เป็นแหล่งของกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่จำเป็นต่อร่างกาย (Kong et al., 2008) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเหลืองและถั่วเขียวที่ทำให้งอก ด้วยการใช้เอนไซม์ปาเปน (papain) จากนั้นนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยคาดหวังว่าองค์ความรู้ที่ได้ทราบถึงหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่อยู่ในถั่วเขียวและถั่วเหลือง ที่ถือเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในกลุ่มโปรตีน การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และเวชสำอางค์ เป็นต้น

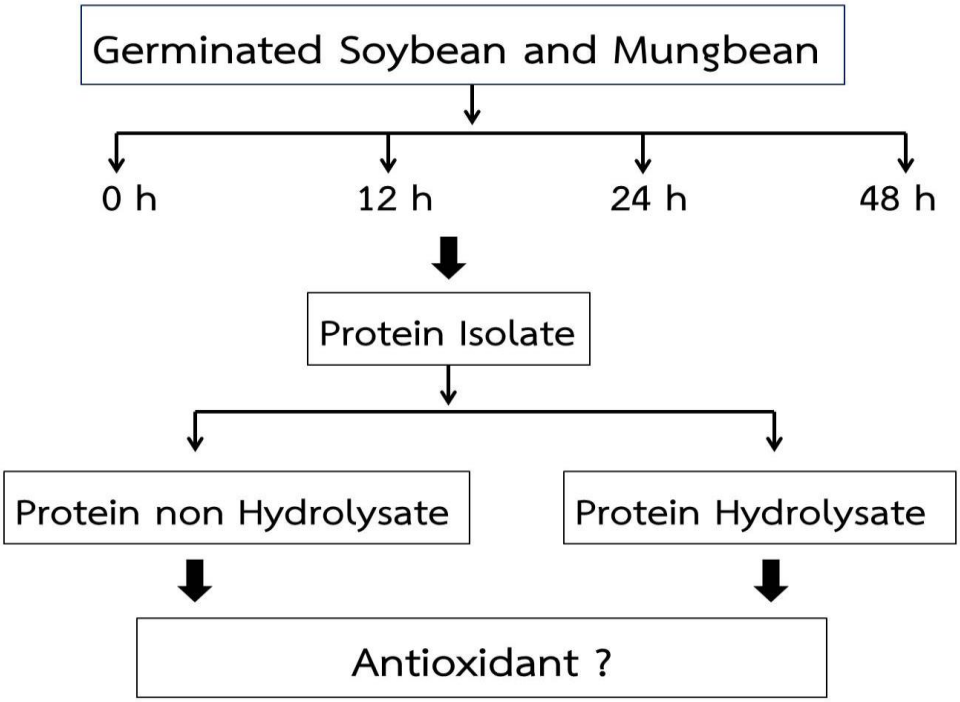
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการไฮโดรไลซีสโปรตีนในถั่วเขียวและถั่วเหลืองในสภาวะที่ไม่ทำการเพาะงอกกับทำการเพาะงอก

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

แยกสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ทำให้งอกที่เวลา 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ระยะเวลาต่างกันด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน แล้วนำสารสกัดโปรตีนหรือโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสของถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ไม่ทำการเพาะงอกและทำการเพาะงอกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH assay

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเขียว

ถั่วเขียวเป็นพืชตระกูลถั่วที่คนไทยนิยมบริโภคเป็นอาหารคาว อาหารหวาน แหล่งปลูกถั่วเขียวในประเทศไทย ส่วนใหญ่อยู่ทางภาคเหนือตอนล่าง ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ถั่วเขียวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของเปลือกเมล็ด คือ ถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ ซึ่งความแตกต่างในด้านสัณฐานวิทยาระหว่างถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำดังแสดงในตารางที่ 1 (นพพร และคณะ, 2547)

ตารางที่ 1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างถั่วเขียวผิวมันกับถั่วเขียวผิวดำ

ลักษณะ	ถั่วเขียวผิวมัน	ถั่วเขียวผิวดำ
หูใบ	กว้าง	แคบ
จำนวนดอกต่อ raceme	10-20	5-6
รูปร่างฝัก	ยาว โค้งที่ปลายฝัก	สั้น ตรง
จำนวนเมล็ดต่อฝัก	8-20	8 หรือต่ำกว่า
เมล็ด	ค่อนข้างกลม	รูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกระบอก
ตาเมล็ด (hilum)	เรียบ	มีขอบนูน
สีใบเลี้ยง (cotyledon)	เหลือง	ขาว
สีกลีบคีล (keel)	เทา	เหลือง
ปริมาณขนบนลำต้น ใบ และฝัก	สั้นและบาง	ยาวและหนาแน่น

1) ถั่วเขียวผิวมัน (Mungbean) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Vigna radiate* (L.) Witzek ผลหรือฝักมีรูปทรงยาวรีและโค้งเล็กน้อย มีประมาณ 10-15 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดมีขนาดเล็กและกลม ตัวอย่างของถั่วเขียวผิวมัน เช่น พันธุ์อู่ทอง 1 เป็นพันธุ์แนะนำพันธุ์แรก พันธุ์ชัยนาท 72 60 และ 36 พันธุ์หลังมีเมล็ดขนาดใหญ่ หนักประมาณ 7.2 กรัมต่อ 100 เมล็ด พันธุ์มอ.1 ที่เหมาะสำหรับปลูกแซมในสวนยางพารา พันธุ์กำแพงแสน 1 และ 2 ที่ให้ผลผลิตสูงประมาณ 208 และ 193 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ (ชยาพร และ กิตติ, 2557) โดยลักษณะที่สำคัญบางประการของถั่วเขียวผิวมัน 7 พันธุ์แสดงดังตารางที่ 2 (นพพร และคณะ, 2547)

ตารางที่2 ลักษณะประจำพันธุ์ที่สำคัญของถั่วเขียวผิวมันพันธุ์รับรอง 6 พันธุ์

ลักษณะ	อู่ทอง1	กำแพงแสน 1 [a]	กำแพงแสน 2 [b]	ชัยนาท 60	มอ.1[c]	ชัยนาท 36	ชัยนาท 72
1.พันธุ์ประวัติ	M74	VC1973A	VC2778A	VC1178A	VC2768A	VC1628A	กพส 2 อาบรังสี
2.ปีที่รับรอง	2519	2529	2529	2530	2531	2534	2543
3.สีโคนต้นกล้า	ม่วง	เขียว	เขียว	เขียว	เขียว	เขียว	เขียว
4.อายุดอกแรกบาน (วัน)	34-38	33-37	32-36	30-34	32-36	32-36	32-36
5.อายุเก็บเกี่ยวฝักชุดแรก (วัน)	60-65	58-62	56-60	52-56	56-60	56-6-0	56-63
6. นน. 1,000 เมล็ด (กรัม)	63-67	65-69	63-67	60-63	65-69	70-73	63-67
7.ผลผลิตจากแปลงทดสอบ (กก./ไร่)	150-170	180-220	175-210	160-200	175-210	180-220	180-220

a = ไม่ทนทานต่อดินด่าง ให้ผลผลิตสูงในฤดูแล้ง

b = ไม่ทนทานต่อดินด่าง ให้ผลผลิตสูงในฤดูฝน

c = ไม่ทนทานต่อดินด่าง ทนสภาพน้ำขังได้ดีกว่าพันธุ์อื่นๆ

2) ถั่วเขียวผิวดำ (black gram) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *V. mungo* (L.) Hepper อาจพบว่าบางพันธุ์มีลำต้นเลื้อย มีขนมากตามกิ่ง ใบ และฝัก มีอายุเก็บเกี่ยวนาน ผลหรือฝักมักสั้น ผิวฝักมีสีเขียวเมื่อยังอ่อน แล้วเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มเมื่อแก่ ฝักมีเมล็ดน้อยกว่า คือประมาณ 5-8 เมล็ดต่อฝัก เปลือกเมล็ดมีสีดำ ตัวอย่างถั่วเขียวผิวดำ เช่น พันธุ์พิษณุโลก 2 ที่ให้ผลผลิตสูงถึง 190 กิโลกรัมต่อไร่ และพันธุ์อู่ทอง 2 ที่เป็นพันธุ์เก่าแก่ ถึงแม้พันธุ์หลังจะมีอายุเก็บเกี่ยวนานกว่าพันธุ์แรก แต่พันธุ์นี้ก็มีเมล็ดสีน้ำตาลหรือแดงน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีเป็นที่ต้องการของตลาด (ชยาพรและกิตติ, 2557)

โครงสร้างของเมล็ดถั่วเขียวมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) 12.1 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อน (embryo) 2.3 เปอร์เซ็นต์ และใบเลี้ยง (cotyledon) 85.6 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเมล็ด ซึ่งเมื่อทำการสกัดองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียวที่บดละเอียดที่อยู่ในรูปของแป้งนั้นพบว่ามีโปรตีนประมาณ 23.87 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 56.43 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)โดยถั่วเขียวประกอบไปด้วยโปรตีน 17-26 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนหลักคือกลอบูลินชนิด vicilin (8S) ชนิด basic 7S และ legumin พบได้ 89 เปอร์เซ็นต์ 3.4 เปอร์เซ็นต์ และ 7.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกลอบูลินดั้งเดิมแต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันโดย vicilin มีน้ำหนักโมเลกุล 200 kDa basic 7S มีน้ำหนักโมเลกุล 135 kDa และ legumin มีน้ำหนักโมเลกุล 360 kDa แต่เมื่อถูกแยกน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โปรตีนกลอบูลินชนิด legumin มี 2 แบนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 40 kDa และ 24 kDa โปรตีนกลอบูลินชนิด vicilin ประกอบไปด้วยแบนที่มีขนาด 60 kDa 48 kDa 32 kda และ 26 kDa ส่วนโปรตีนกลอบูลินชนิด basic 7S ประกอบด้วยแบนที่มีขนาด 28 kDa และ 16 kDa (Mendoza et al., 2001)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของถั่วเขียว (ดัดแปลงข้อมูลจาก Brishti et al., 2017)

องค์ประกอบ	**ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)**
โปรตีน	23.84
ไขมัน	1.53
กากใย	4.95
เถ้า	3.02
ความชื้น	10.21
แป้ง	56.43

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชอยู่ในตระกูล Leguminosae มีชื่อวิทยาศาสตร์หลายชื่อ เช่น *Glycine soja, Soja hispida, Phaseolus max* เป็นต้น แต่ชื่อที่ยอมรับกันในปัจจุบันคือ *Glycine max* (L.) Merrill โดยพันธุ์ถั่วเหลืองที่เกษตรกรใช้ปลูกมีอยู่หลายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์รับรองของทางราชการ ได้แก่พันธุ์ สจ. 4 สจ. 5 สุโขทัย 1 นครสวรรค์ 1 เชียงใหม่ 60 สุโขทัย 2 เชียงใหม่ 2 สุโขทัย 3 (ถั่วเหลืองผิวดำ) เชียงใหม่ 3 และเชียงใหม่ 4 นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ ที่เป็นที่นิยมในท้องถิ่นอีก 3 พันธุ์คือ พันธุ์ทวี 9 พันธุ์ รม.1 และ พันธุ์ มข. 35 (KKU 35) ซึ่งถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 นั้นปรับปรุงโดยคณาจารย์ของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ซึ่งได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์จากคู่ผสม Williams x สจ. 2 เริ่มแนะนำให้แก่เกษตรกรตั้งแต่ พ.ศ. 2537 เป็นที่นิยมในท้องที่ของจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี และเลย (นพพร และคณะ, 2547)

ถั่วเหลืองเป็นเมล็ดพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการเป็นแหล่งของไขมันและโปรตีนที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ได้แก่ สารสกัดไนโตรเจนอิสระ ความชื้น เส้นใยและเถ้า (ตารางที่ 4) โดยถั่วเหลืองให้โปรตีนหรือกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ โดยมีโปรตีนสะสมอยู่ในเมล็ดประมาณ 35-42 เปอร์เซ็น โดยโปรตีนที่พบเป็นกลุ่มของกลอบูลิน 2S 7S 11S และ 15S ซึ่งโปรตีนสะสมหลักเป็นโปรตีนกลอบูลิน 11S และ 7S พบประมาณ 40 และ 30 เปอร์เซ็นตามลำดับของโปรตีนทั้งหมดที่สะสมในเมล็ด โดยไกลซินิน (glycinin) เป็นโปรตีนในกลุ่มของกลอบูลิน 11S ในขณะที่บีต้าคอนไกลซินิน (β-conglycinin) เป็นโปรตีนในกลุ่มของกลอบูลิน 7S โดยทั่วไปไกลซินินอยู่ในรูปของเฮกซะเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 360 kDa ในขณะที่บีต้าคอนไกลซินินเป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 kDa ที่จะอยู่ในรูปของไตรเมอร์ของหน่วยย่อยแอลฟา (α) แอลฟา' (α') และเบต้า (β) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 76 66 และ 47.5 kDa ตามลำดับ (Qi et al., 1992; Ma et al., 2016) ในกระบวนการงอกของเมล็ดนั้นโปรตีนที่เก็บสะสมจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนตัวใหม่และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยเอนไซม์ในกลุ่ม endopeptidase มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนส่วนใหญ่ที่เก็บสะสมไว้ในเมล็ด คือโปรตีนในหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินินให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงเพื่อนำไปใช้ในระหว่างการงอกของเมล็ด (Qi et al., 1992; Zakharov et al., 2004)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง (ดัดแปลงจาก Rehman et al., 2007)

องค์ประกอบ	**ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)**
ความชื้น	7.50
ไขมัน	19.73
โปรตีน	34.81
เถ้า	4.57
เส้นใย	5.29
สารสกัดไนโตรเจนอิสระ	35.6

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือสารที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ในวงล้อมของอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนวงรอบนอกทำให้อะตอมหรือโมเลกุลของสารนั้นไม่เสถียร มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดึงอิเล็กตรอนจากเนื้อเยื่อหรือสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ อะตอมหรือโมเลกุล เพื่อให้เกิดความเสถียรเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จึงเป็นสาเหตุทำให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้น เกิดความเสียหาย โดยอนุมูลอิสระมีแหล่งที่มาจาก 2 แหล่งหลัก ๆได้แก่ จากภายในร่างกาย เป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ที่เกิดขึ้นตลอดเวลาภายในเซลล์ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ หรือการเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรม และจากภายนอกร่างกาย เป็นผลจากการได้รับการติดเชื้อก่อโรค รังสียูวี รังสีแกมมา ควันบุหรี่ ควันหรือเขม่าจากท่อไอเสียรถยนต์ การรับประทานอาหารปิ้งย่างหรืออาหารที่ใช้น้ำมันทอดซ้ำ (บุหรัน, 2556) โดยสารที่มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยปกติร่างกายจะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) คาตาเลส (catalase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เพื่อควบคุมและป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระมีมากเกินไปจนทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังได้จากอาหารที่รับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบตาแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ สารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวจะได้จากพืชผักและผลไม้ (บุหรัน, 2556) ซึ่งการหาสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติเป็นสิ่งสำคัญที่ถือว่ามีความปลอดภัยและมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นมา (Imaida et al., 1983) ดังนั้นการศึกษาโดยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติเช่น โทโคฟีรอล (tocopherols) สารคาเทชิน (catechin) สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และเปปไทด์ (peptides) (You et al., 2010)

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเขียว

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเขียว มีการสกัดเอาเปลือกถั่วเขียวด้วยเมทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถแย่งจับกับอนุมูลอิสสระและเป็นตัวยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น ต่อมาก็มีการสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำจากเปลือกถั่วเขียว (*Vigna radiate* L.) ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค และแยกบริสุทธิ์โพลีแซคคาไรด์ได้ไอโซเลต MP1 และ MP2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 83 kDa และ 45 kDa โดย MP1 มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้มากกว่า MP2 แต่ในขณะที่ MP2 มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์และ DPPH มากกว่า MP1 (Lai et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ ไวเทกซิน (vitexin) และ ไอโซไวเทกซิน (isovitexin) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในถั่วเขียว (มากกว่า 96% อยู่ในเปลือกหุ้มเมล็ด) (Cao et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามก็มีนักวิจัยบางท่านสนใจศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วเขียว ถั่วเหลืองและถั่วดำเมื่อเกิดการงอก พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของวิตามินซี

วิตามินอี โปรตีนที่ละลายน้ำ ฟีโนลิกทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของถั่วเขียว ถั่วเหลืองและถั่วดำจะมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 44.87–90.31 เปอร์เซ็นต์ จะสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการงอกของถั่วที่เหมาะสมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ระยะเวลาการงอกที่ 3-5 วัน (Xue et al., 2016)

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นเมล็ดพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประกอบไปด้วยโปรตีน 34.81 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 35.6 เปอร์เซ็นต์และไขมัน 19.73 เปอร์เซ็นต์ (Rehman et al., 2007) โดยสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเมล็ดถั่วเหลืองแบ่งออกเป็นสารประกอบที่ไม่ใช้โปรตีน เช่นไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซาโปนิน (saponins) และสารประกอบโปรตีน ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่วเหลืองของสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช้โปรตีนได้แก่ การศึกษาองค์ประกอบและกลุ่มของฟีโนลิกที่พบในเมล็ดของถั่วเหลือง 20 สายพันธุ์ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ Serbian cultivar 1511 และ Chinese cultivar LN92-7369 มีสารประกอบฟีโนลิกมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ในขณะที่ถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่เป็นจีโนไทป์มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกน้อยและมีฤทธิ์ในการแย่งจับกับ DPPH ได้น้อยเช่นเดียวกัน (Malencic et al., 2007) ซึ่งมีการรายงานว่าเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองสีดำจะมีปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมล็ดถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและเมล็ดถั่วเหลืองสีดำที่แยกเปลือกหุ้มเมล็ดออก (Xu and Chang, 2008)

แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าเมล็ดถั่วเหลืองสีดำ (*Glycine max* L.) ที่ทำการเพาะงอกเป็นระยะเวลา 3 วัน (24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง) แล้วนำโปรตีนมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนครีเอตินเพื่อทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าโปรตีนถั่วเหลือกที่งอกที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml สามารถจับกับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) ได้ดีที่สุดคือ 76.56 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml จับกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 66.62 และ 60.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sefatie et al., 2013)

โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซีสมีลักษณะทางกายภายที่ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย เนื่องจากโปรตีนที่ถูกย่อยเป็นเพปไทด์สามารถถูกดูดซึมที่ลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพดังนั้นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์จึงเป็นทางเลือกของสารอาหารแก่มนุษย์ โดยโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไฮโดรไลซีสแสดงคุณสมบัติทางกายภาพที่หลากหลายที่ประกอบไปด้วยการช่วยลดไขมันในกระแสเลือดและลดคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ลดความดันเลือด ช่วยปรับความยืดหยุ่นของหลอดเลือดและเนื้อเยื่อบุโพรงของหลอดเลือดเป็นต้น (Kong et al., 2008) โดยโปรตีนหรือเปปไทด์จากถั่วได้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในด้านโภชนาการของมนุษย์ เช่น เป็นโปรตีนเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารของผู้สูงอายุและนักกีฬา เครื่องดื่มเสริม

พลังงาน ไปจนถึงการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็งและโรคเบาหวาน เป็นต้น (Singh et al., 2014) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาเป็นส่วนผสมที่เป็นแหล่งของโปรตีนในอาหารเลี้ยงสัตว์ได้อีกด้วย (Zdunczyk et al., 2010)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลืองและถั่วเขียว

นำเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียวมาทำการเพาะงอก จากนั้นเก็บเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียวที่เพาะงอกที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาสกัดน้ำมันออกด้วยการใช้ n-hexane อัตราส่วน 1:5 v/v เป็นเวลา 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไขมันอิสระก็จะถูกระเหยออกไปในอากาศ จากนั้นก็เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

2. การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองและถั่วเขียว

เมื่อทำการสกัดแยกไขมันออกจากถั่วเหลืองและถั่วเขียวแล้วนำมาเติมน้ำที่ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 2N NaOH ในอัตราส่วนน้ำต่อถั่ว 10:1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วย 1 N HCl จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมา centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำส่วนของตะกอนโปรตีนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH แล้วนำโปรตีนไปทำให้แห้งด้วย freeze-dried ก่อนที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

3. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Bradford

ปิเปตสารละลาย Bradford dry จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube และใช้เป็น blank ด้วย จากนั้นปิเปตโปรตีนจากถั่วแต่ละชนิด อย่างละ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

4. การทำ SDS-PAGE

เตรียม 15% separating gel, 4% stacking polyacrylamide gel หลังจากนั้นผสมตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 15 ไมโครกรัม กับ 2x solubilizing solution แล้วนำไปต้มประมาณ 2 นาที จากนั้นโหลดตัวอย่างลงในแผ่นเจล แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้ Tris-glycine เป็น electrod buffer จากนั้นย้อมด้วย coomassie brilliant blue R-250 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการ destain ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือให้เจลที่ไม่มีแถบโปรตีนใส

5. การไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่ว

เตรียมตัวอย่างผงโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะงอกและที่ผ่านการเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงมาละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ในอัตราส่วน 2 เปอร์เซ็นต์โปรตีน จากนั้นเติมเอนไซม์ papain ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต 1:100 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที 60 นาที และ 90 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา

10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำให้อุณหภูมิลดลง แล้วนำมา centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส เพื่อวิเคราะห์การทดลองต่อไป

6. การทดสอบ Antioxidant ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

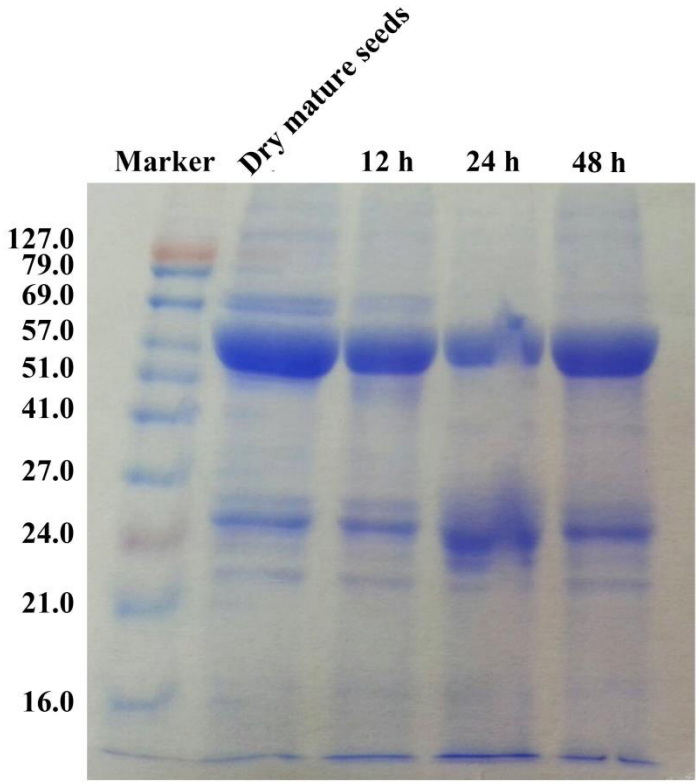
การทดสอบฤทธิ์ของการถั่วเหลือง ถั่วเขียวและไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเหลืองในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะใช้วิธีการตรวจวัดด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยใช้เปปไทด์ความเข้มข้น 1-2 mg/ml ในปริมาตร 10 µl เติมลงใน 0.1 M DPPH ปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well plate ผสมให้เข้ากันจากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A550 nm จากนั้นนำแต่ละค่ามาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระตามสูตรข้างล่าง

% DPPH radical scavenging ability = [(Control A550nm – Sample A550nm)/Control A550nm] × 100

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ศึกษาแบบแผนโปรตีนถั่วเขียวด้วยเทคนิค SDS-PAGE

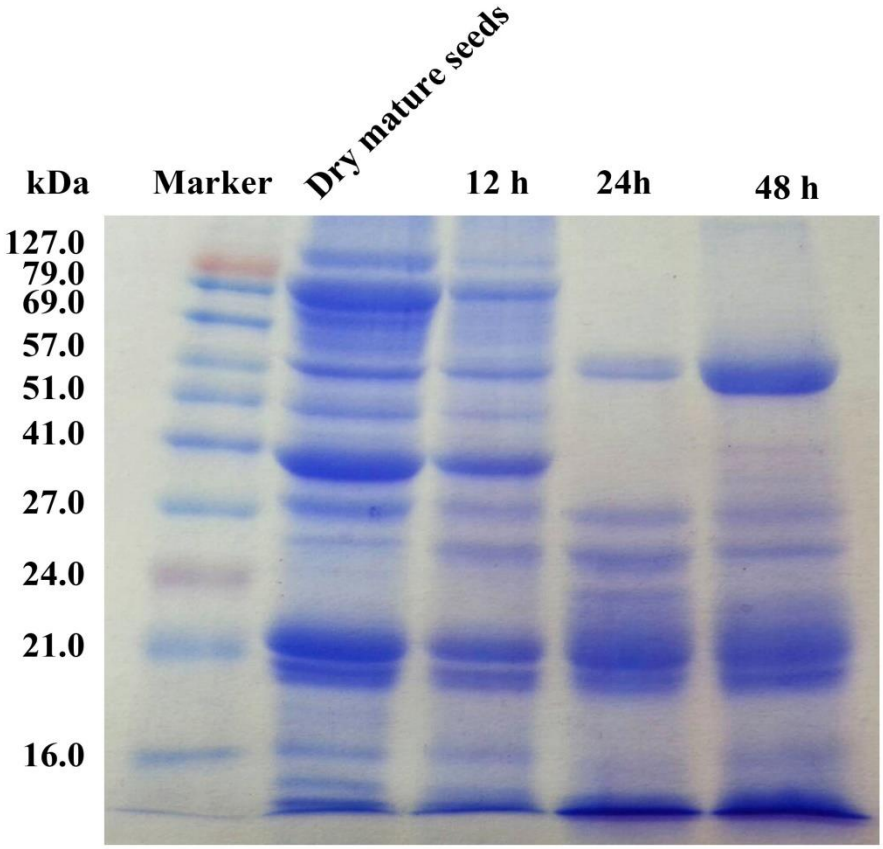
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนจากถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 60 ที่ไม่ทำการเพาะ กับเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าสารสกัดโปรตีนในถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการเพาะกับผ่านการเพาะงอกมีจำนวนแถบของโปรตีนไม่แตกต่างกันมากนัก โดยโปรตีนหลักที่พบมีขนาดประมาณ 57 kDa และโปรตีนที่พบรองลงมาคือ มีขนาด ประมาณ 25 kDa ซึ่งพบได้ทั้งในถั่วเขียวที่ไม่ทำการเพาะและทำการเพาะงอกที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลการศึกษาแบบแผนของถั่วเขียวด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดย Lane 1: โปรตีน marker, Lane 2: โปรตีนจากถั่วเขียวที่ไม่ทำการเพาะงอก Lane 3: โปรตีนจากถั่วเขียวที่ทำการเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมง, Lane 4: โปรตีนจากถั่วเขียวที่ทำการเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง และ Lane 5: โปรตีนจากถั่วเขียวที่ทำการเพาะงอกที่ 48 ชั่วโมง

2. ศึกษาแบบแผนโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS-PAGE

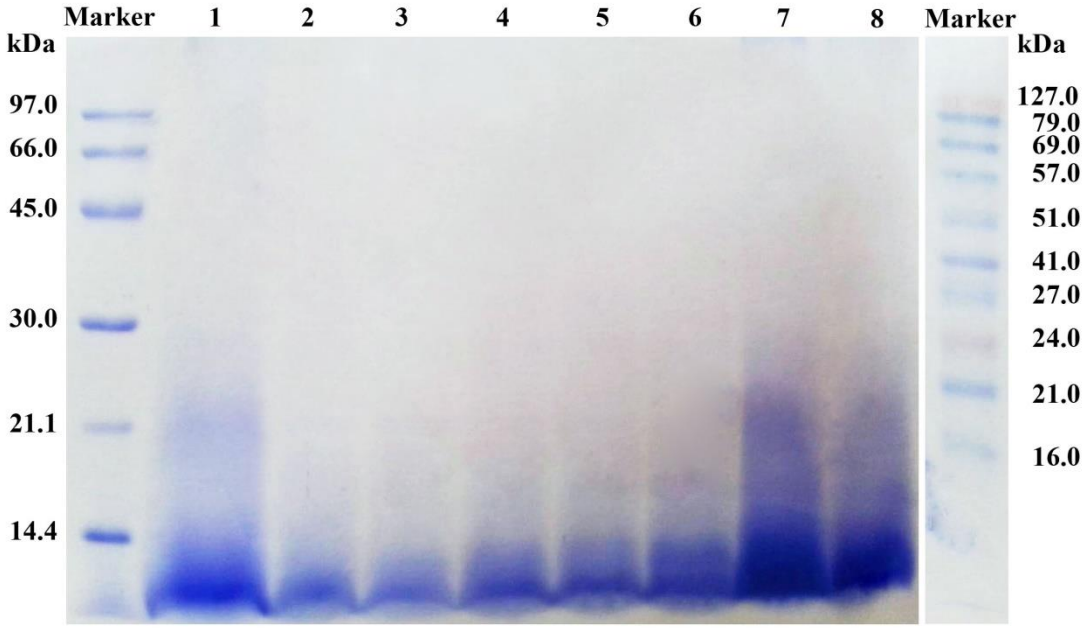
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 ที่ไม่ทำการเพาะกับเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าสารสกัดโปรตีนในถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะกับผ่านการเพาะงอกมีจำนวนแถบแบนของโปรตีนแตกต่างกัน โดยถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะพบแถบโปรตีน 12 แถบ ถั่วเหลืองที่ทำการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนจำนวน 10 7 และ 6 แถบตามลำดับ โดยการเพาะเมล็ดที่ 48 ชั่วโมงพบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลการศึกษาแบบแผนของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดย Lane 1: โปรตีน marker, Lane 2: โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่ทำการเพาะงอก Lane 3:โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมง, Lane 4: โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง และ Lane 5:โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 48 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปน

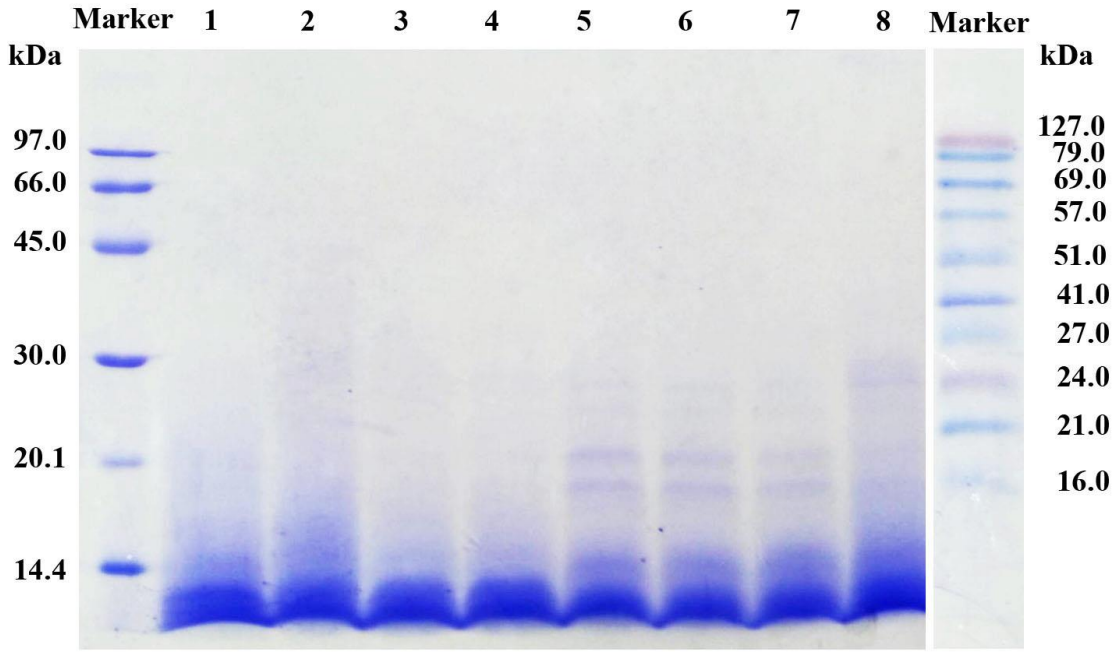
จากผลการทดลองพบว่าจากการไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเขียวที่ไม่ผ่านการเพาะงอกและการเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ไม่พบแถบแบนของโปรตีน (รูปที่ 3 และ รูปที่ 4)



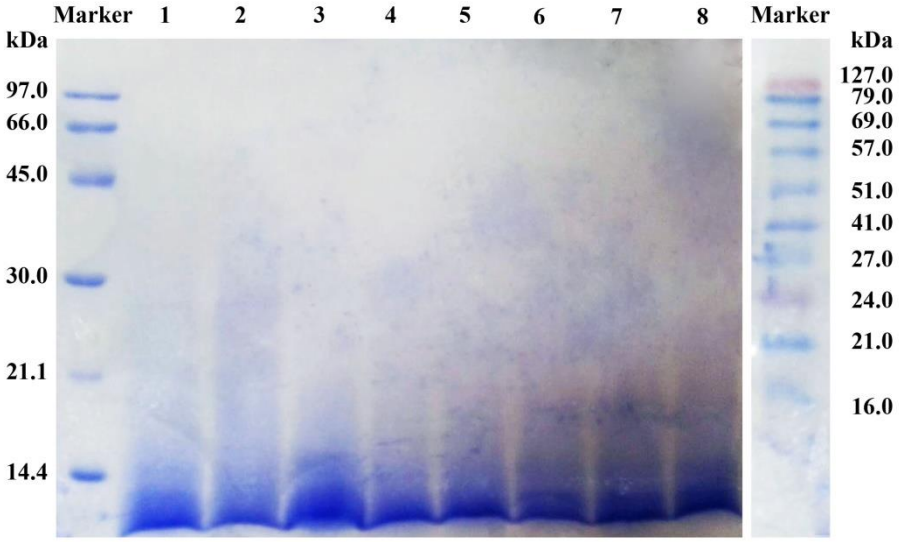
รูปที่3 ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเขียวจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยแทคนิค SDS-PAGE หมายเลข 1-3 แสดงถั่วเขียวที่ไม่ทำการเพาะงอกไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาทีตามลำดับ หมายเลข 4-6 แสดงถั่วเขียวที่เพาะงอกที่ 12 ชั่วโมงไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาทีตามลำดับ หมายเลข 7-8 แสดงถั่วเขียวที่เพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 และ 60 นาทีตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะงอกและการเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที พบว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะงอกเมื่อไฮโดรไลซีสที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที พบแถบโปรตีนหลักที่มีขนาดประมาณ 20.1 และ 16.0 kDa เหมือนกัน (รูปที่ 4) ส่วนการเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมงและไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาทีเท่านั้นที่พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 24 kDa (รูปที่ 4) ส่วนสภาวะอื่นๆ ของถั่วเหลืองที่ผ่านการไฮโดรไลซีสจะไม่พบแถบของโปรตีน (รูปที่ 5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ปาเปนที่นำมาย่อยในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ไม่เหมาะสมกับการย่อยโปรตีนจาก

ถั่วเขียว เนื่องจากพบว่าโปรตีนจากถั่วเขียวในทุกสภาวะเกิดการตกตะกอนเมื่อเติมเอนไซม์ปาเปนลงไปทำปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถทำการย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ เนื่องจากพบแบนของโปรตีนบางส่วนที่มีโมเลกุลที่เล็กลงเมื่อทำการย่อยและพบการตกตะกอนของโปรตีนได้น้อยเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ปาเปน ดังนั้นจึงนำเฉพาะส่วนใสที่ได้จากการไฮโดรไลซีสโปรตีนจากถั่วเหลืองเท่านั้นไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่อไป



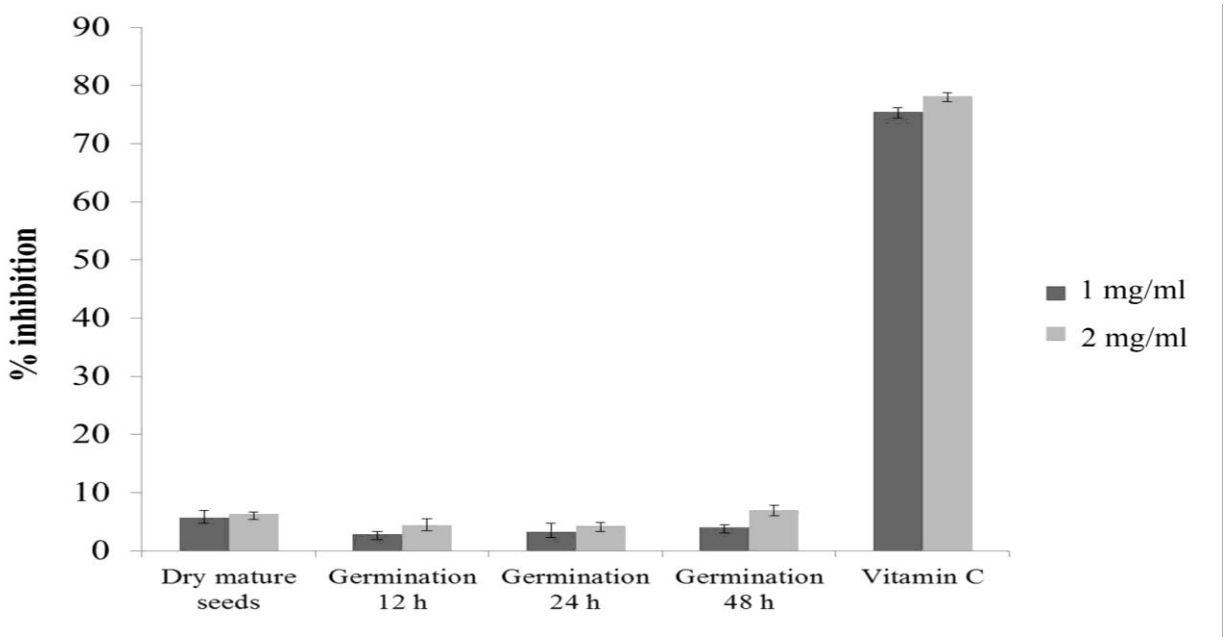
รูปที่ 4 ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วเหลืองจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 ˚C ด้วยแทคนิค SDS-PAGE หมายเลข 1 แสดงถั่วเขียวที่เพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 90 นาที หมายเลข 2-4 แสดงถั่วเขียวที่เพาะงอกที่ 48 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ตามลำดับ หมายเลข 5-7 แสดงถั่วเหลืองที่ไม่ทำการเพาะงอกแล้วไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ตามลำดับ หมายเลข 8 แสดงถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีสเป็นเวลา 30 นาที



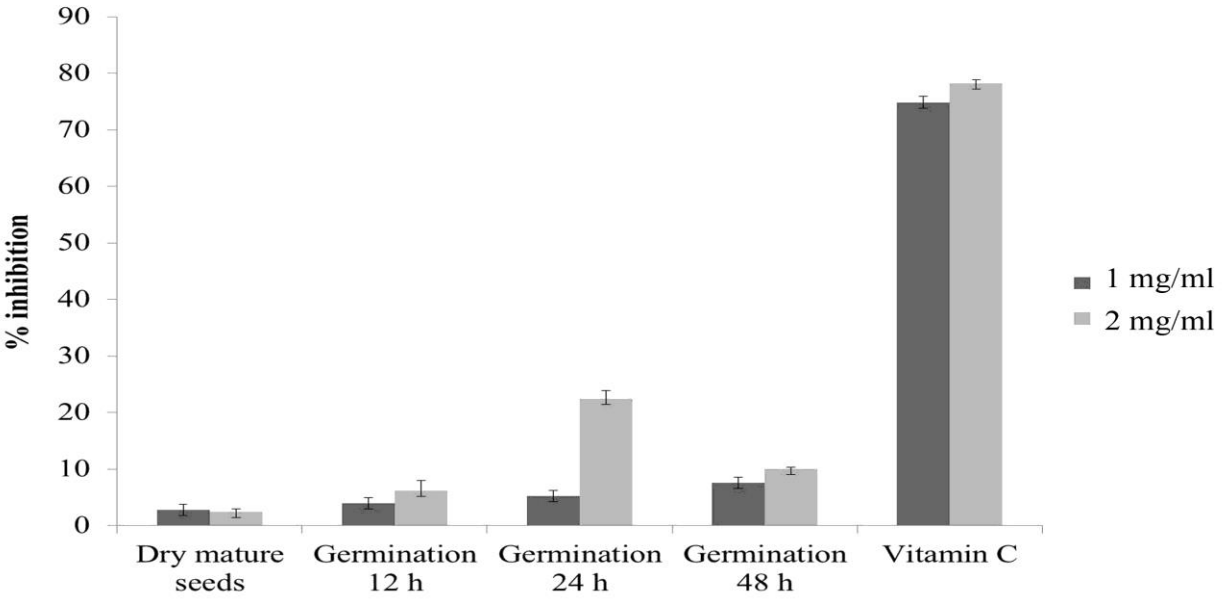
รูปที่ 5 ผลการศึกษาแบบแผนโปรตีนของถั่วเหลืองจากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 ˚C ด้วยแทคนิค SDS-PAGE หมายเลข 1-2 แสดงถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ 12 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีส 60 และ 90 นาที ตามลำดับ หมายเลข 3-5 แสดงถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีส 30 60 และ 90 นาที ตามลำดับ หมายเลข 6-8 แสดงถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ 48 ชั่วโมงแล้วไฮโดรไลซีส 30 60 และ 90 นาทีตามลำดับ

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging พบว่าสารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวที่ไม่ได้ทำการเพาะงอกและที่ทำการเพาะงอกที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 2 mg/ml ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 6) ส่วนสารสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ทำการเพาะงอกและทำการเพาะงอกที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นและที่ความเข้มข้น 2 mg/ml พบว่าสารสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองไม่ได้ทำการเพาะงอกและที่ทำการเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมง ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็น แต่อย่างไรก็ตามการเพาะงอกที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 10 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 7)

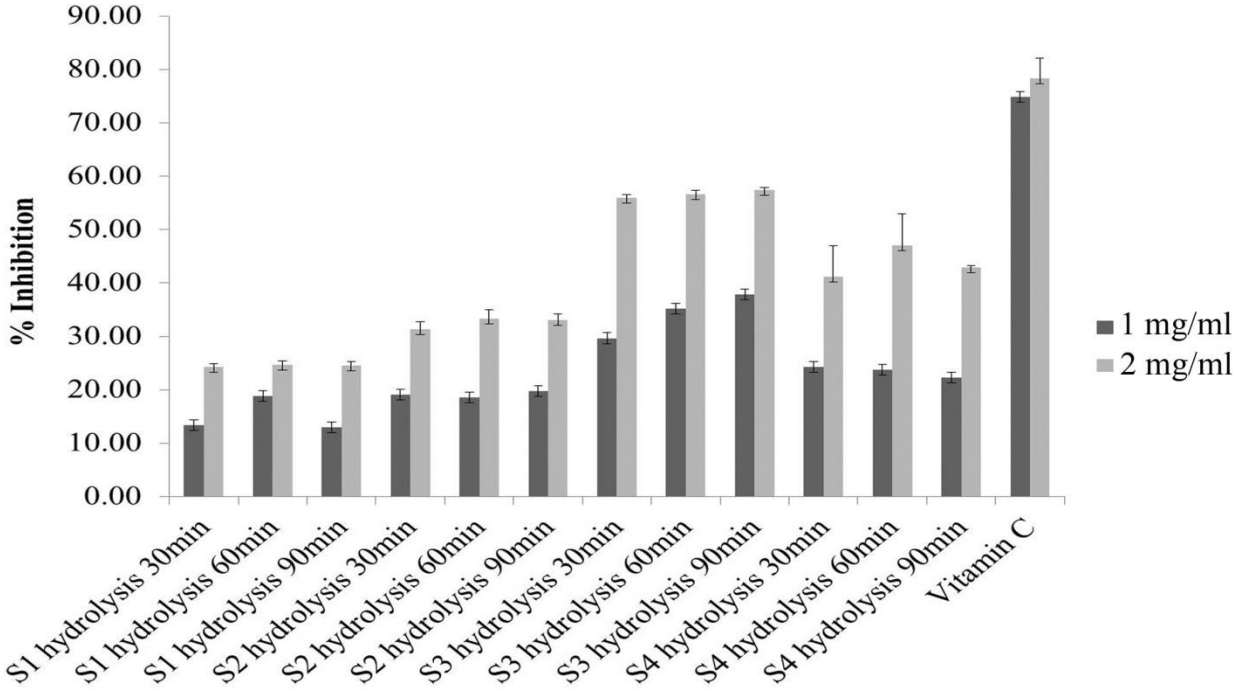


รูปที่ 6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเขียวไม่ผ่านการเพาะงอกกับผ่านการเพาะงอกที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay



รูปที่ 7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเหลืองไม่ผ่านการเพาะกับผ่านการเพาะงอกที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกมีฤทธ์ต้านอนุมูลอิสระได้เล็กน้อย จึงนำไปย่อยต่อให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลงด้วยการใช้เอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ระยะเวลาการย่อย 30 60 และ 90 นาที ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 2 mg/ml พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนที่ทำการย่อยและระยะเวลาการย่อยที่มากกว่า 30 ก็ไม่มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระมากนัก โดยตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 mg/ml สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 mg/ml การย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองไม่ได้ทำการเพาะงอกและทำการเพาะงอกที่ 12 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 24-25 เปอร์เซ็นต์ 31-33 เปอร์เซ็นต์ 55-57 เปอร์เซ็นต์ และ 41-47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ซึ่งถูกวัดด้วยวิธี DPPH assay: S1= ไม่ผ่านการเพาะงอก S2= การเพาะงอกที่ 12 ชั่วโมง S3= การเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง S4= การเพาะงอกที่ 48 ชั่วโมง

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

ถั่วเหลืองเป็นพืชอาหารสำคัญที่มีโปรตีนสะสมอยู่ในเมล็ดประมาณ 35-42 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนสะสมหลักเป็นกลอบูลิน 11S และ 7S พบประมาณ 40 และ 30 เปอร์เซ็นของโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ โดยไกลซินิน (glycinin) เป็นโปรตีนในกลุ่มของ 11S อยู่ในรูปของเฮกซะเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 360 kDa ส่วนบีต้าคอนไกลซินิน (β-conglycinin) เป็นกลุ่มของกลอบูลิน 7S มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 kDa อยู่ในรูปของไตรเมอร์ที่มีองค์ประกอบเป็นหน่วยย่อยแอลฟา (α) แอลฟา' (α') และเบต้า (β) มีน้ำหนักโมเลกุล 76 66 และ 47.5 kDa ตามลำดับ (Ma et al., 2016) จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 ที่ยังไม่การเพาะงอก พบว่ามีจำนวนแถบแบนของโปรตีนมากที่สุด แต่ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเมล็ดถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมงกับ 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 57 kDa อาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดแห้งมีเอนไซม์ endopeptidase และ carboxypeptidase ที่ไม่สามารถทำงานได้แต่จะทำงานได้เมื่อเมล็ดอยู่ในระหว่างการงอก โดยการย่อยโปรตีนขนาดใหญ่ที่เก็บสะสมไว้ให้มีขนาดที่เล็กลง (Muntz et al., 2001) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากใบเลี้ยงของถั่วเหลืองที่เพาะเป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะงอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินิน โดยโปรตีนสองหน่วยย่อยคือ α และ α' ลดลงอย่างรวดเร็วโดยไม่พบหลังจากการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 6 วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีหนึ่งหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 51.2 kDa เกิดขึ้นในทุกระยะเวลาของการเพาะงอกจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเมล็ด (Wilson et al., 1986) นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มของ Protease C1 ที่ทำหน้าที่ในการเริ่มต้นการย่อยหน่อยย่อย α และ α' ของบีต้าคอนไกลซินินที่เก็บสะสมในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merrill) พบโปรตีนตัวกลางที่มีขนาด 70 63 61 58 55 และ 53.5 kDa (Qi et al., 1992) ในทางตรงกันข้ามกับแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเขียวที่พบว่าจำนวนแถบแบนของโปรตีนจะไม่มีความแตกต่างกันระหว่างถั่วเขียวที่ไม่ทำการเพาะงอกกับทำการเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการสลายตัวอย่างรวดเร็วของโปรตีนที่เก็บสะสมในถั่วเขียวจะเกิดขึ้นหลักจากกระบวนการงอกได้ 2-3 วัน (Chrispeels and Boulter, 1975)

สารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกเมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 30 นาที 60 นาทีและ 90 นาที แล้วตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนที่ย่อยได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ปาเปนในสภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะทำการย่อยโปรตีนจากถั่วเขียว เนื่องจากสารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวเกิดการตกตะกอน แต่ในขณะที่เอนไซม์ปาเปนสามารถทำการย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ เนื่องจากพบแบนของโปรตีนบางส่วนที่มีโมเลกุลที่เล็กลงเมื่อทำการย่อย และพบการตกตะกอนของโปรตีนได้น้อยเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ปาเปน ซึ่งเมื่อนำส่วนใสของโปรตีนหรือเปปไทด์จากถั่วเหลืองที่ได้จากการ

ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสภาวะของการย่อยถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 24 ชั่วโมงด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุด 57.42 เปอร์เซ็นต์ สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าการย่อยถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกที่ 48 ชั่วโมงด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ที่ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เพียง 47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ตัวอื่นในการย่อยถั่วเหลือง ซึ่งมีการรายงานว่าโปรตีนจากไฮโดรไลซีส (hydrolysate) เมล็ดถั่วเหลืองสีดำ (*Glycine max* L.) ที่ทำให้งอกเป็นระยะเวลา 3 วัน (24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง) แล้วนำโปรตีนมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนครีเอติน พบว่าโปรตีนถั่วเหลือกที่งอกที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml สามารถจับกับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) ได้ดีที่สุดคือ 76.56 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่เวลา 24 ชั่วโมง และ72 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml จับกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 66.62 และ 60.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sefatie et al., 2013) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติของเอนไซม์ที่นำมาย่อยถั่วเหลืองเมล็ดมีสีเหลือง กับถั่วเหลืองที่มีสีดำ เมื่อใช้เอนไซม์ที่ต่างชนิดกันอาจย่อยให้ได้โปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีโครงสร้างที่อาจจะแตกต่างกัน เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้แตกต่างกันโดยเอนไซม์ปาเปนย่อยอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง N-acyl-alpha- amino acid (Lowe and Williams, 1965) เอนไซม์เปปซินย่อยโปรตีนที่ตำแหน่งพันธะเปปไทด์ (Hornbuckle et al., 2008) และแพนครีเอตินเป็นไซม์ที่หลั่งจากตับอ่อนสามารถย่อยโปรตีนได้ (Silvestre et al., 2011) ทำให้ได้โปรตีนหรือเปปไทด์ที่ต้านอนุมูล DPPH ได้เปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันในแต่ละสภาวะของถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอก เมื่อนำสารสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกแล้วผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนเพื่อตรวจสอบตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ไฮโดรไลซีสด้วยเทคนิค SDS-PAGE ไม่พบแถบแบนของโปรตีนในช่วงการแยกด้วย 15% SDS-PAGE อาจเป็นไปได้ว่ามีโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 14 kDa ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ก่อนหน้านี้มีการรายงานว่าตัวอย่างถั่วทุกชนิดที่มีการเพาะงอกพบเปอร์เซ็นต์ของเปปไทด์ที่อยู่ในช่วงระหว่าง 370-1500 Da มากกว่าถั่วที่ไม่ได้ทำการเพาะงอก และยังมีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าถั่วที่ไม่ได้ทำการเพาะงอกอีกด้วย การศึกษานี้สอดคล้องกับสมมุติฐานที่ว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือเปปไทด์ (Amadou et al., 2010; Sefatie et al., 2013) จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเทคนิคที่ใช้ในการแยกเปปไทด์หรือโปรตีนที่ได้ต่อไป

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่ทำการเพาะงอกด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า จำนวนแถบโปรตีนของถั่วเขียวจะน้อยกว่าโปรตีนจากถั่วเหลือง โดยในถั่วเขียวเมื่อทำการเพาะงอกที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง แบบแผนโปรตีนที่ได้จะไม่แตกต่างจากถั่วเขียวที่ไม่ได้ทำการเพาะ ส่วนแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่เพาะงอกจะลดลงตามระยะเวลาการเพาะ เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากถั่วเขียวและถั่วเหลืองที่เพาะงอกมาย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ 24 ชั่วโมง ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากที่สุด คือ 57.42 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบแถบแบนโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลซีสในช่วงของการแยกด้วย 15% SDS-PAGE ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 14 kDa ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้

บทที่ 7
ผลผลิต

1. บังอร ประจันบาล. 2561. การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนจากสารสกัดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก. การประชุมวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 16 วันที่ 12-13 กรกฎาคม พ.ศ. 2561 ณ โรงแรมแซนด์ ดูนส์ เจ้าหลาว บีช รีสอร์ท จังหวัดจันทบุรี (ได้รับการตอบรับการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ฉบับพิเศษ ปี 2561 ISSN 0125-0507)

ABSTRACT
16th National Postharvest Technology Conference 2018
การประชุมวิชาการ
วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ
ครั้งที่ 16
12-13 กรกฎาคม 2561
ณ โรงแรมแซนด์ ดูนส์ เจ้าหลาว รีสอร์ท
จังหวัดจันทบุรี
ศนทก
จัดทำโดย ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ ศธ 0513.11503/ ว.168

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

15 มิถุนายน 2561

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาผลงานภาคบรรยาย/ภาคโปสเตอร์

เรียน คุณบังอร ประจันบาล

ตามที่ท่านได้ส่งบทคัดย่อเรื่อง การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนจากสารสกัดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก เพื่อเข้าร่วมใน งานประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 16 ซึ่งจะจัดขึ้นในระหว่างวันที่ 12-13 กรกฎาคม 2561 ณ โรงแรมแชนต์ ดูนส์ เจ้าหลาว บีช รีสอร์ท จังหวัดจันทบุรี นั้น ทางคณะกรรมการฝ่ายวิชาการขอแจ้งให้ท่านทราบว่าผลงานของท่าน ผ่านการพิจารณา และได้รับการจัดให้อยู่ในการเสนอผลงาน ภาคโปสเตอร์ ซึ่งท่านสามารถติดตามรายละเอียดเรื่องวันและเวลาในการเสนอผลงานได้ทาง http://npht.phtnet.org/

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล)
ประธานกรรมการฝ่ายวิชาการ
งานประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 16

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทร 034-355311
โทรสาร 034-355311
E-mail: phticku@gmail.com

การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนจากสารสกัดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก

Comparison of Protein Patterns from the Extracts of Dry Mature Seeds and Germinating Seeds of Soybean (*Glycine max* L.)

บังอร ประจันบาล[1]
Bung-on Prajanban[1]

บทคัดย่อ

การงอกเป็นกระบวนการเจริญเติบโตของพืชจากเมล็ดหรือโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน กระบวนการนี้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเมล็ดเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ในระหว่างที่เมล็ดงอก โดยแบบแผนโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ที่ทำการเพาะงอกสัมพันธ์กับระยะเวลาการงอกยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนที่สกัดจากถั่วเหลืองพันธุ์ KKU35 ที่ไม่ผ่านการเพาะและที่ผ่านการเพาะงอก โดยภายหลังจากที่เมล็ดดูดซับน้ำแล้วทำการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองทั้งที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอกด้วยเฮกเซนและน้ำ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และแบบแผนของสารสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค FT-IR และ SDS-PAGE ตามลำดับ แล้วระบุชนิดของโปรตีนจากการเพาะงอกที่มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าที่ไม่ผ่านการเพาะด้วยเทคนิค LC-MS/MS ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 4 สภาวะแสดงเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงมากในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1,633 cm^{-1} 1,518 cm^{-1} และ 1,392 cm^{-1} ที่บ่งบอกหมู่ amine I, amine II และ amine III ของโปรตีน จากผล SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่เพาะงอกจะลดลงตามระยะเวลา โดยแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่งอก 48 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 57 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะ และเมื่อบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลพบว่าเป็นโปรตีน alpha subunit of beta conglycinin, partial [*Glycine max*]

คำสำคัญ: ถั่วเหลือง, การงอก, เบต้า คอนไกลซินิน

Abstract

Germination is the process by which an organism grows from a seed or similar structure. The process changes compositions of proteins and amino acids for synthesis of new cells during germination. The patterns of proteins extracted from germinating soybean (*Glycine max* L.) seeds that are correlated with time during germination process have not been clearly studied. The objective of this study was to compare the protein patterns which were extracted from dry mature seeds and germinating seeds of the soybean variety, KKU35. The germinating seeds were evaluated at 12, 24 and 48 h after water absorption. Protein extracts of both dry mature seeds and germinating seeds were achieved by the consecutive extraction in hexane and water. Protein purity and pattern of each extract were determined by FT-IR spectrometry and SDS-PAGE, respectively. Then, protein band with higher intensity than that of dry mature seeds was identified by LC-MS/MS. Germinating seeds at four evaluation times displayed strong absorption peaks of approximately 1,633 cm^{-1}, 1,518 cm^{-1} and 1,392 cm^{-1}, which were correlated with the amine I, amine II and amine III structures of a protein, respectively. The results from SDS-PAGE demonstrated that amounts of protein extracted from germinating soybean seeds decreased with time. The protein pattern of germinating seeds at 48 h with molecular weight of about 57 kDa showed higher intensity than did the protein pattern of dry mature seeds, and this protein was identified as alpha-subunits of beta-conglycinin, partial [*Glycine max*] by comparing the protein sequences with those in database.

Keywords: soybean, germination, beta-conglycinin

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160
[1] Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160

การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนจากสารสกัดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก

Comparison of Protein Patterns from the Extracts of Dry Mature Seeds and Germinating Seeds of Soybean (*Glycine max* L.)

บังอร ประจันบาล[1]
Bung-on Prajanban[1]

Abstract

Germination is the process by which an organism grows from a seed or similar structure. The process changes compositions of proteins and amino acids for synthesis of new cells during germination. The patterns of proteins extracted from germinating soybean (*Glycine max* L.) seeds that are correlated with time during germination process have not been clearly studied. The objective of this study was to compare the protein patterns which were extracted from dry mature seeds and germinating seeds of the soybean variety, KKU 35. The germinating seeds were evaluated at 12, 24 and 48 h after water absorption. Protein extracts of both dry mature seeds and germinating seeds were achieved by the consecutive extraction in hexane and water. Protein purity and pattern of each extract were determined by FT-IR spectrometry and SDS-PAGE, respectively. Then, protein band with higher intensity than that of dry mature seeds was identified by LC-MS/MS. Germinating seeds at four evaluation times displayed strong absorption peaks of approximately 1633 cm^{-1}, 1518 cm^{-1} and 1392 cm^{-1}, which were correlated with the amine I, amine II and amine III structures of a protein, respectively. The results from SDS-PAGE demonstrated that amounts of protein extracted from germinating soybean seeds decreased with time. The protein pattern of germinating seeds at 48 h with molecular weight of about 57 kDa showed higher intensity than did the protein pattern of dry mature seeds, and this protein was identified as alpha-subunits of beta-conglycinin, partial [*Glycine max*] by comparing the protein sequences with those in database.

Keywords: Soybean, Germination, beta-conglycinin

บทคัดย่อ

การงอกเป็นกระบวนการเจริญเติบโตของพืชจากเมล็ดหรือโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน กระบวนการนี้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเมล็ดเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ในระหว่างที่เมล็ดงอก โดยแบบแผนโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ที่ทำการเพาะงอกสัมพันธ์กับระยะเวลาการงอกยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนที่สกัดจากถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 ที่ไม่ผ่านการเพาะและที่ผ่านการเพาะงอก โดยภายหลังจากที่เมล็ดดูดซับน้ำแล้วทำการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองทั้งที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอกด้วยเฮกเซนและน้ำ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และแบบแผนของสารสกัดโปรตีนด้วยเทคนิค FT-IR และ SDS-PAGE ตามลำดับ แล้วระบุชนิดของโปรตีนจากการเพาะงอกที่มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าที่ไม่ผ่านการเพาะด้วยเทคนิค LC-MS/MS ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่สกัดได้ทั้ง 4 สภาวะแสดงเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงมากในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1633 cm^{-1} 1518 cm^{-1} และ 1392 cm^{-1} ที่บ่งบอกหมู่ amine I, amine II และ amine III ของโปรตีน จากผล SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่เพาะงอกจะลดลงตามระยะเวลา โดยแบบแผนของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่งอก 48 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 57 kDa มี

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160
Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160

ความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะ และเมื่อบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลพบว่าเป็นโปรตีน alpha subunit of beta conglycinin, partial [*Glycine max*]
คำสำคัญ: ถั่วเหลือง, การงอก, เบต้า คอนไกลซินิน

คำนำ

พืชมีการเก็บสะสมโปรตีน ไตรเอซิลกลีเซอรอล และคาร์โบไฮเดรตไว้ในส่วนของ เมล็ด หัว และราก โดยพืชใบเลี้ยงคู่เก็บสะสมโปรตีนปริมาณมากในรูปของเมล็ดเพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ที่ใช้สำหรับการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของพืช (Yamada *et al*., 2014) โดยถั่วเหลืองเป็นพืชอาหารสำคัญที่มีโปรตีนสะสมอยู่ในเมล็ดประมาณ 35-42 เปอร์เซ็น โดยโปรตีนสะสมหลักเป็นโกลบูลิน 11S และ 7S พบประมาณ 40 และ 30 เปอร์เซ็นตามลำดับของโปรตีนทั้งหมด โดยไกลซินิน (glycinin) เป็นโปรตีนในกลุ่มของ 11S อยู่ในรูปของเฮกซะเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 360 kDa ส่วนบีต้าคอนไกลซินิน (β-conglycinin) เป็นกลุ่มของโกลบูลิน 7S มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 kDa อยู่ในรูปของไตรเมอร์ที่มีองค์ประกอบเป็นหน่วยย่อยแอลฟา (α) แอลฟา' (α') และเบต้า (β) มีน้ำหนักโมเลกุล 76 66 และ 47.5 kDa ตามลำดับ (Ma *et al*., 2016) โดยเอนไซมกลุ่ม endopeptidase มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนที่เก็บสะสมในเมล็ดที่เป็นโปรตีนในหน่วยย่อยของเบต้าคอนไกลซินินให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงหรือถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระ โดยใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนตัวใหม่และสารประกอบไนโตรเจนตัวอื่น ๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนในระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ด (Zakharov *et al*., 2004) จากข้อมูลดังกล่าวจึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สัมพันธ์กับระยะเวลาการงอกของถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 ที่ไม่ผ่านการเพาะและที่ผ่านการเพาะงอก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 นำมาแช่น้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วเพาะลงบนกระบะที่มีทิชชูชุบน้ำให้ชุ่มในภาชนะปิด วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นอบให้แห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด เติมเฮกเซนลงไปในอัตรา 5 ต่อ 1 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกวางให้ระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง

2. การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลือง

การสกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองโดยการดัดแปลงวิธีการเพียงเล็กน้อยของ Solominoarisoa Sefatie *et al*., (2013) โดยนำตัวอย่างแห้งเติมน้ำลงไปในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วปรับพีเอชให้เป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสมาปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงอีกรอบ แล้วนำตะกอนที่ได้มาปรับพีเอช 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำโปรตีนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ผงโปรตีนถูกนำมาตรวจวัดหมู่ฟังก์ชั่นของสารประกอบด้วยเทคนิค FTIR-Spectroscopy ด้วยเครื่อง Bruker tensor 27 FT-IR spectrometer และใช้ Platinum Diamond ATR เป็นอุปกรณ์เสริม วัดที่ 64 scans ด้วย Spectral resolution 4 cm^{-1} ทำการวัดตัวอย่าง 5 ซ้ำ บันทึกผลการวัดและวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยโปรแกรม Optical User Software (OPUS) 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany)

4. การทำ SDS-PAGE

เตรียมเจล 12 % separating gel และ 4 % stacking polyacrylamide gel จากนั้นผสมตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 15 ไมโครกรัม กับ 2x solubilizing แล้วนำไปต้มประมาณ 2 นาที จากนั้นโหลดตัวอย่างโปรตีนลงบนแผ่นเจล แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้ Tris-glycine เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ จากนั้นย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue R-250 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากนั้นนำแช่ในสารละลาย destain ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือให้เจลที่ไม่มีแถบโปรตีนใส

5. LC-MS/MS

ทำการตัดแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 kDa จากการเพาะงอกที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-ESI MS/MS (Bruker, Bremen, Germany) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนโดยใช้โปรแกรม MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com)

ผล

1. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเทคนิค FT-IR

การวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่ไม่ทำการเพาะและการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าทั้ง 4 สภาวะ มีการดูดกลืนแสงมากในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1633 cm^{-1} 1518 cm^{-1} และ 1392 cm^{-1} โดยการดูดกลืนแสงต่ำในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1064 cm^{-1}1160 cm^{-1} 1233 cm^{-1} 1449 cm^{-1} 1745 cm^{-1} 2854 cm^{-1} และ 2924 cm^{-1} แต่การเพาะเมล็ดที่ 48 ชั่วโมงที่ไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1160 cm^{-1} และ 1745 cm^{-1} (Figure1)

2. แบบแผนโปรตีนจากสารสกัดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะและการเพาะงอก

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนของสารสกัดโปรตีนในถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะกับผ่านการเพาะงอกพบว่าจำนวนแถบของโปรตีนแตกต่างกัน โดยถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะพบแถบโปรตีน 12 แถบ ถั่วเหลืองที่ทำการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนจำนวน 10 7 และ 6 แถบตามลำดับ โดยการเพาะเมล็ดที่ 48 ชั่วโมงพบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะ (Figure 2)

3. การบ่งชี้ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 kDa ของถั่วเหลืองที่เพาะงอกที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลพบว่าเป็นโปรตีน alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max] (Table 1)

วิจารณ์ผลการทดลอง

โปรตีนจากเมล็ดถั่วเหลืองที่สกัดด้วยเฮกเซนและน้ำ พบการดูดกลืนแสงสูงในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1633 cm^{-1} 1518 cm^{-1} และ 1392 cm^{-1} ที่สอดคล้องกับหมู่ amine I (~1650 cm^{-1}), amine II (~1550 cm^{-1}), amine III (1400-1200 cm^{-1}) ที่เป็นโครงสร้างองค์ประกอบของโปรตีน (Barth, 2007) โดยพบว่ามีการปะปนของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพียงเล็กน้อยจากการดูดกลืนแสงต่ำในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1064 cm^{-1} 1160 cm^{-1} 1233 cm^{-1} 1449 cm^{-1} 1745 cm^{-1} 2854 cm^{-1} และ 2924 cm^{-1} (Wiercigroch *et al*., 2017; Forfang *et al*., 2017) แต่ที่ระยะเวลาการเพาะเมล็ดที่ 48 ชั่วโมงพบตำแหน่งของการดูดกลืนแสงในช่วงของไขมันและคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ทำการเพาะ อาจเป็นไปได้ว่ามีการใช้ไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในระหว่างที่เกิดกระบวนการงอกด้วย นอกจากนี้การเพาะเมล็ดที่ 24 กับ 48 ชั่วโมง ไม่พบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 57 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ทำการเพาะ อาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดแห้งมีเอนไซม์ endopeptidase และ carboxypeptidase ที่ไม่สามารถทำงานได้แต่จะทำงานได้เมื่อเมล็ดอยู่ในระหว่างการงอกโดยการย่อยโปรตีนขนาดใหญ่ที่เก็บสะสมไว้ให้มีขนาดที่เล็กลง (Muntz *et al*., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากใบเลี้ยงของถั่วเหลืองที่เพาะเป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะงอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินิน โดยโปรตีนสองหน่วยย่อยคือ α และ α' ลดลงอย่างรวดเร็วโดยไม่พบหลังจากการเพาะเมล็ดที่ระยะเวลา 6 วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีหนึ่งหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 51.2 kDa เกิดขึ้นในทุกระยะเวลาของการเพาะงอกจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเมล็ด (Wilson *et al*., 1986) นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มของ Protease C1 ที่ทำหน้าที่ในการเริ่มต้นการย่อยหน่อยย่อย α และ α' ของบีต้าคอนไกลซินินที่เก็บสะสมในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merrill) พบโปรตีนตัวกลางที่มีขนาด 70 63 61 58 55 และ 53.5 kDa (Xiaoqun *et al*., 1992) ซึ่งอาจเป็นไปได้ในกระบวนการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 มีการย่อยโปรตีนในหน่วยย่อยของบีต้าคอนไกลซินินเป็น

โปรตีนตัวกลางที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเมล็ดงอกได้ 48 ชั่วโมงคือโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟาของบีต้าคอนไกลซินิน ที่อาจเก็บสะสมในใบเลี้ยงมากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอในระหว่างการงอกของเมล็ด

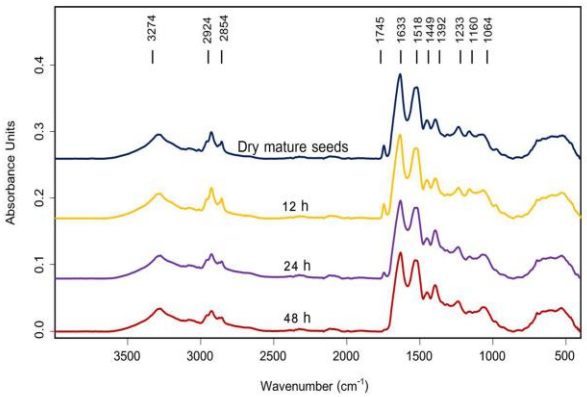


Figure 1 FT-IR spectra of protein extracted from dry mature seeds and germinating seeds of soybeans at 12, 24 and 48 h.

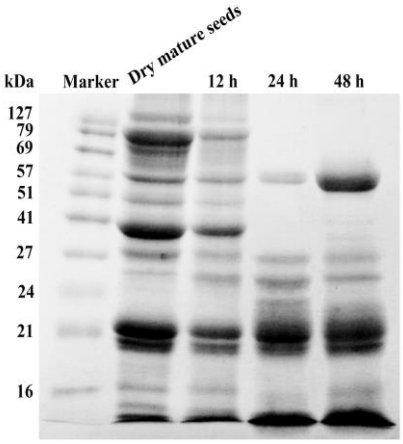


Figure 2 SDS-PAGE of of protein extracted from dry mature and germinating seeds of soybean at 12, 24 and 48 h

Table 1 Protein identification by LC-MS/MS after SDS-PAGE.

Protein band	Match to	Protein name	Mass Theory (Da)	Score	Sequence coverage (%)	Peptide sequences
Mw ~57 kDa germination at 48 h	BAA23360.2	alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]	63184	978	33	RSPQLQNLRD, RSPQLQNLRD KFFEITPEKN, RNILEASYDTKF RESYFVDAQPKK,RLQESVIVEISKE RLITLAIPVNKPGRF,KTISSEDKPFNLRS KEQQQEQQQEEQPLEVRK KAIVILVINEGDANIELVGLKE RVPSGTTYYVVNPDNNENLRL RFESFFLSSTEAQQSYLQGFSRN RDLDIFLSIVDMNEGALLLPHFNSK

สรุปผลการทดลอง

จำนวนแถบโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองที่เพาะงอกจะลดลงตามระยะเวลา โดยถั่วเหลืองที่งอก 48 ชั่วโมง พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 57 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการเพาะ และเมื่อบ่งชี้ชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลพบว่าเป็นโปรตีน alpha subunit of beta conglycinin, partial [*Glycine max*]

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สัญญาเลขที่ 001/2561 และขอขอบคุณศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อนุเคราะห์ถั่วเหลืองพันธุ์ KKU 35 และศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรติโอมิกส์เพื่อการพานิชย์และอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

Barth A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1767(9): 1073-101.

Forfang K, B. Zimmermann, G. Kosa, A Kohler and V. Shapaval. 2017. FTIR Spectroscopy for Evaluation and Monitoring of Lipid Extraction Efficiency for Oleaginous Fungi. PLoS One 12(1):1-17.

Ma Y., G. Kan, X. Zhang, Y. Wang, W. Zhang, H. Du and D. Yu. 2016. Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping for Glycinin and beta-Conglycinin Contents in Soybean (*Glycine max* L. Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 64(17): 3473-3483.

Muntz K., M.A. Belozersky, Y.E. Dunaevsky, A. Schlereth and J. Tiedemann. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. Journal of Experimental Botany 52(362): 1741-1752.

Solominoarisoa Sefatie R., T. Fatoumata, K. Eric, Y. Hui Shi and G. Le. 2013. In Vitro Antioxidant Activities of Protein Hydrolysate from Germinated Black Soybean (*Glycine max* L.) Journal of Food Science and Technology 5(4): 453-459.

Wiercigroch E., E. Szafraniec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, et al. 2017. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 185: 317-335.

Wilson K.A., B.R. Rightmire, J.C. Chen and A.L. Tan-Wilson. 1986. Differential Proteolysis of Glycinin and beta-Conglycinin Polypeptides during Soybean Germination and Seedling Growth. Plant Physiology 82(1): 71-76.

Yamada T., Y. Mori, K. Yasue, N. Maruyama, K. Kitamura and J. Abe. 2014. Knockdown of the 7S globulin subunits shifts distribution of nitrogen sources to the residual protein fraction in transgenic soybean seeds. Plant Cell Reports 33(12): 1963-1976.

Zakharov A., M. Carchilan, T. Stepurina, V. Rotari, K. Wilson and I. Vaintraub. 2004. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. Journal of Experimental Botany (406): 2241-2249.

เอกสารอ้างอิง

ชยาพร วัฒนศิริ และ กิตติ วงส์พิเชษฐ. (2557). พืชไร่. ในเอกสารการสอนชุดวิชา พืชเศรษฐกิจ (หน่วยที่ 8-15). นนทบุรี: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. หน้า 147-230.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ และสนธิชัย จันทร์เปรม, บรรณาธิการ. (2547). พืชเศรษฐกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21(3), 27-86.

Amadou I., Le G.W., Shi Y.H. and Sun J. (2010). Reducing, radical scavenging and chelation properties of fermented soy protein mealhydrolysate by Lactobacillus plantarum Lp6. Int.J. Food Prop., 14, 654-665.

Brishti F., Zarei M., Muhammad SKS., Ismail-Fitry M.R., Shukri R., Saari N. (2017). Evaluation of the functional properties of mung bean protein isolate for development of textured vegetable protein. International Food Research Journal, 24 (4), 1595-1605.

Byun H.-G., Lee J. K., Park H. G., Jeon J.-K., and Kim S.-K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, Brachionus rotundiformis. Process Biochemistry, 44, 842–846.

Cao D., Li H., Yi J., Zhang J., Che H., Cao J., et al. (2011).Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. PLoS One, 6(6), e21071.

Chandrasekara A. and Shahidi F. (2011a). Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 428–436.

Chandrasekara N. and Shahidi, F. (2011b). Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 5006–5014.

Chen G.-t., Zhao L., Zhao L.-y., Cong T., Bao S.-f. (2007). In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, 357–362.

Chen H.-M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 2619–2623.

Chrispeels M.J., Boulter D. (1975). Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of Endopeptidase. Plant Physiology, 55(6), 1031-1037.

Hornbuckle W.E., Simpson K.W., Tennant B.C. (2008). Chapter 14 - Gastrointestinal Function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition). San Diego: Academic Press:413-457.

Je J.-Y., Qian Z.-J., Byun H.-G., Kim S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42, 840–846.

Kong X., Guo M., Hua Y., Cao D., Zhang C. (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. Bioresource Technology, 99, 8873-8879.

Kudo K., Onodera S., Takeda Y., Benkeblia N., Shiomi N. (2009). Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract. Journal of Functional Foods, 1, 170–176.

Lai F., Wen Q., Li L., Wu H., Li X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. Carbohydrate Polymers, 81(2), 323-329.

Lee S.-H., Qian Z.-J. and Kim S.-K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry, 118, 96–102.

Li J., Chen X., Xiao W., Ma W., Li T., Huang J., Liu X., Liang X., Tang S., Luo Y. (2011). Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells. Biochemical and Biophysical ResearchCommunications, 404, 349–356.

Li X.-x., Han L.-j., and Chen L.-j. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 1660–1666.

Lowe G., Williams A. (1965). Papain-catalysed hydrolysis of some hippuric esters. A new mechanism for papain-catalysed hydrolysis. Biochem J, 96, 199-204.

Ma Y., G. Kan, X. Zhang, Y. Wang, W. Zhang, H. Du and D. Yu. (2016). Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping for Glycinin and beta-Conglycinin Contents in Soybean (*Glycine max* L. Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(17), 3473-3483.

Malencic D., Popovic M., Miladinovic J. (2007). Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. Molecules, 12(3), 576-581.

Mendoza E.M., Adachi M., Bernardo A.E., Utsumi S. (2001). Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] globulins: purification and characterization. J Agric Food Chem, 49(3), 1552-1558.

Moure A., Dominguez H. and Parajo J. C. (2005). Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7600–7608.

Muntz K., M.A. Belozersky, Y.E. Dunaevsky, A. Schlereth and J. Tiedemann. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. Journal of Experimental Botany, 52(362), 1741-1752.

Pihlanto-Leppala, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science & Technology, 11, 347–356.

Qi X., Wilson K. A. and Tan-Wilson A. L. (1992). Characterization of the Major Protease Involved in the Soybean β-Conglycinin Storage Protein Mobilization . Plant Physiology, 99(2), 725–733.

Rehman S-u, Haq N., Ahmad M.M., Sarfraz H., Murtaza M., Hafeez Shahid S. (2007). Physico-chemical and Sensory Evaluation of Ready to Drink Soy-cow Milk Blend. Pakistan Journal of Nutrition, 6 (3), 283-285.

Sarmadi B. H. and Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides, 31, 1949–1956.

Sefatie R.S., Fatoumata T., Eric K., Shi Y.H. and Guo-wei L. (2013). In vitro antioxidant activities of protein hydrolysate from germinated black soybean (Glycine max L.). Advance Journal of Food Science and Technology, 5(4), 453-459.

Shahidi F. and Zhong Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. European Journal of Lipid Science and Technology, 112, 930–940.

Silvestre M, de Oliveira Afonso W, de Oliveira Lopes Junior C, Silva V, Morais H, Souza M, et al. (2011). Use of subtilisin and pancretin for hydrolyzing whey protein concentrate. American Journal of Food Technology, 6 (8), 647-660.

Singh B.P., Vij S., Hati S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. Peptides, 54, 171-179.

Tironi V. A. and An˜ o´n M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis. Food Research International, 43, 315–322.

Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T., and Yoshikawa, M. (2003). Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean [beta]-conglycinin, is an fMLP agonist. FEBS Letters, 540, 206–210.

Vioque J., Megias C., Pedroche J., Yust M. M., Giron-Calle J., Alaiz M., and Millan, F. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. Lwt-Food Science and Technology, 41, 1973–1977.

Wilson K.A., B.R. Rightmire, J.C. Chen and A.L. Tan-Wilson. (1986). Differential Proteolysis of Glycinin and beta-Conglycinin Polypeptides during Soybean Germination and Seedling Growth. Plant Physiology, 82(1), 71-76.

Xu B., Chang S.K.C. (2008). Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. J Agric Food Chem, 56(18), 8365-8373.

Xue Z., Wang C., Zhai L., Yu W., Chang H., Kou X., et al. (2016). Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (Glycine max L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process, 34(1), 68-78.

You, S. J., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E., and Wu, J. P. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. Food Research International, 43, 848–855.

Zakharov A., M. Carchilan, T. Stepurina, V. Rotari, K. Wilson and I. Vaintraub. (2004). A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. Journal of Experimental Botany (406): 2241-2249.

Zdunczyk Z., Jankowski J., Juskiewicz J., Lecewicz A., Slominski B. (2010). Application of soybean meal, soy protein concentrate and isolate differing in alpha-galactosides content to low- and high-fibre diets in growing turkeys. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 94(5), 561-570.

Zhang J., Zhang H., Wang L., Guo X., Wang X., and Yao H. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. Food Chemistry, 119, 226–234.