

Physicochemical Analysis of Modified by Commercial Proteinases  
Coconut (*Cocos nucifera* L.) Protein

การวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพของโปรตีนมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) ดัดแปร  
โดยใช้เอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้า

สมฤดี ไทพานิชย์<sup>2</sup> และ ปราณี อานเปื้อง<sup>1\*</sup>  
Somruedee Thaiphanit<sup>2</sup> and Pranee Anprung<sup>1\*</sup>

บทคัดย่อ

หางกะทิและสารที่เป็นของแข็งซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น (Coconut Protein Concentrate, CPC) และโปรตีนมะพร้าวดัดแปร (Modified Coconut Protein, MCPs) โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ของ CPC และ MCPs ตามระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, DH) ตั้งแต่ร้อยละ 8 ถึง 14 ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสเปกตรัม ATR-FT-IR และลักษณะสัณฐานพื้นผิวของ MCPs นำไปสู่การปรับปรุงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ กิจกรรมพื้นผิวที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับอากาศ และระหว่างน้ำกับน้ำมัน และความสามารถในการละลาย MCPs จากการดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และค่ากิจกรรมพื้นผิวที่เหนือกว่า แต่มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนต่ำกว่า MCPs จากการดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ MCPs ที่ดัดแปรโดยเอนไซม์อัลคาเลสที่ DH ร้อยละ 8 แสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมพื้นผิวดีที่สุด ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า MCPs จากปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาเลสที่ DH ระดับต่ำ อาจสามารถใช้เป็นส่วนผสมเพื่อการส่งเสริมสุขภาพโดยเป็นสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และทำให้เกิดอิมัลชันในอาหาร

**คำสำคัญ:** โปรตีนมะพร้าว, การดัดแปรด้วยเอนไซม์, กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ, กิจกรรมพื้นผิว, สมบัติการละลาย

ABSTRACT

The by-products of coconut skim milk and solid substances from virgin coconut oil production were used to produce coconut protein concentrate (CPC) and modified coconut protein concentrates (MCPs) using Alcalase and Flavourzyme. In this study, the physicochemical properties and pH-dependent solubilities of CPC and MCPs according to the degree of hydrolysis (DH) at 8 to 14% were compared. Each enzymatic hydrolysis was found to change the intensity of ATR-FT-IR spectra and surface morphology of MCPs leading to improved antioxidant activity, surface activity at water-air and water oil interfaces and solubility. MCPs from Alcalase modification showed higher antioxidant activity and superior surface activity but a lower protein solubility than MCPs from Flavourzyme reaction. MCPs modified using Alcalase at DH 8% showed the best antioxidant activity and surface activity among all samples. These results suggest that MCPs from Alcalase reaction at limited DH could be used as a potential health promoting ingredient with antioxidant and emulsifying activity in foods.

**Keywords:** Coconut protein, enzymatic modification, antioxidant activity, surface activity, solubility

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

## บทนำ

โปรตีนจากพืช เช่น โปรตีนจากเมล็ดพืชตระกูลถั่ว และโปรตีนจากเมล็ดพืชน้ำมัน ถูกใช้เป็นโปรตีนทางเลือกเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีราคาถูก มีปริมาณโปรตีนสูง ส่งผลดีต่อสุขภาพ และมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี [1, 2, 3, 4, 5] โปรตีนจากมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) เป็นโปรตีนจากพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เพราะมะพร้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และของหลายๆ ประเทศในทวีปเอเชีย ได้แก่ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ มีผลผลิตโดยรวมประมาณ 50–60 ล้านตันต่อปี [6, 7] ในขณะเดียวกันการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สกัดเย็น (Virgin Coconut Oil, VCO) เป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งซึ่งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับมะพร้าว และกำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน [8]

กระบวนการผลิต VCO ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ การคั้นกะทิ (coconut milk) การแยกครีม (cream) ออกจากกะทิ และการแยกน้ำมัน (oil) ออกจากครีม [8, 9] กระบวนการผลิต VCO จะได้หางกะทิ (coconut skim milk) และสารที่เป็นของแข็ง (solid substances) ที่มีโปรตีนร้อยละ 29.9 และ 16.0 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเนื้อมะพร้าวเป็นผลพลอยได้ (by-products) ตามลำดับ [10, 11] กระบวนการผลิต VCO จะใช้เนื้อมะพร้าวสดเป็นวัตถุดิบ ไม่มีการใช้สารเคมี และความร้อน [8, 12, 13] ทำให้โปรตีนจากผลพลอยได้ ปราศจากสารเคมี มีความปลอดภัย และไม่เสียสภาพตามธรรมชาติ อีกทั้งยังมีรายงานว่า การผลิต VCO ในภูมิภาคเอเชีย และความต้องการ VCO ยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้มีผลพลอยได้เพิ่มขึ้นด้วย [7, 14] ดังนั้นถึงแม้ว่าเนื้อมะพร้าวสดจะมีโปรตีนเพียงร้อยละ 2.6–4.4 [15, 16] แต่เนื่องจากปริมาณมะพร้าวและผลพลอยได้ที่มีมาก ทำให้การแยกโปรตีนจากผลพลอยได้ และการใช้โปรตีนจากโปรตีนมะพร้าวมีความน่าสนใจและเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร

จุดเด่นของโปรตีนมะพร้าวมีรายงานไว้ดังนี้ คือ โปรตีนมะพร้าวประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่มีซัล

ปริมาณมาก และมีโปรตีนหลักคือ โกลบูลิน (globulin) ขนาด 11S และ 7S ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 326 และ 156 kDa ตามลำดับ คล้ายคลึงกับโปรตีนจากถั่วเหลือง และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีนจากถั่ว [2, 6, 17] โปรตีนมะพร้าวมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทั้ง 9 ชนิด ในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของผู้ใหญ่ที่แนะนำโดย FAO/WHO โดยมี leucine lysine และ valine เป็นหลัก และมี glutamic acid arginine และ aspartic acid สูง [18, 19] และในทางการแพทย์พบว่า arginine ในโปรตีนมะพร้าวมีฤทธิ์ควบคุมระดับน้ำตาล ระดับไขมันคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ และมีฤทธิ์ปกป้องหัวใจ [17, 20] ปัจจุบันจึงมีการนำโปรตีนมะพร้าวมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหาร อาหารเสริม และเป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากพบว่าสามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพ และป้องกันโรคได้

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการทำให้เกิดอิมัลชัน จะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของโปรตีน และปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณเกลือ เป็นต้น สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมีผลต่อกระบวนการแปรรูป และการใช้โปรตีนในอาหาร เช่น การใช้เป็นสารทำให้เกิดฟอง และการใช้เป็นสารทำให้เกิดอิมัลชัน [21, 22] อย่างไรก็ตามสมบัติการละลายของโปรตีนก็มีความสำคัญ เพราะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ ด้วย [21] จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนมะพร้าวตามธรรมชาติสามารถทำหน้าที่เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ได้ แต่อิมัลชันที่ได้มีความคงตัวต่ำกว่าการใช้โปรตีนจากหางนม และโปรตีนมะพร้าวจากผลพลอยได้จากการผลิต VCO มีค่าการละลายต่ำ [19, 23] นอกจากนี้ความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารมีผลทำให้สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนมะพร้าวลดลงด้วย [19] ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนเป็นอันดับแรก เมื่อมีการใช้โปรตีนชนิดใหม่ หรือมีการดัดแปรโปรตีน [24] ทั้งนี้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสามารถถูกดัดแปรได้ด้วยสารเคมี ความร้อน และเอนไซม์ [25]

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

การดัดแปรโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นที่ต้องการมากกว่าการดัดแปรโปรตีนด้วยสารเคมี เพราะมีความจำเพาะ สามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย เกิดผลพลอยได้ต่ำ และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่ภาวะไม่รุนแรง [26, 27] การดัดแปรโปรตีนโดยการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สามารถช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติทางโภชนาการของโปรตีนได้ โดยสามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่มหลักๆ ตามระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, DH) คือ DH ร้อยละ 1-10 ช่วยปรับปรุงความสามารถในการเกิดฟอง (foaming capacity) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsifying capacity) โดยที่ DH มากกว่าร้อยละ 10 ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทางโภชนาการ (nutritional supplements) ใช้เป็นอาหารพิเศษทางการแพทย์ (special medical diets) และอื่นๆ และการผลิตไฮโดรไลเซสที่มีค่า DH หลากๆ ค่า ก็เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส [28] ปัจจุบันยังไม่มีรายงานข้อมูลเกี่ยวกับผลของการดัดแปรโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ทางการค้าที่ระดับ DH ต่ำ หรือจำกัดต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ สเปกตรัม ATR-FT-IR ลักษณะสัณฐานพื้นผิว กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ กิจกรรมพื้นผิว และสมบัติการละลายที่ค่า pH ต่างๆ อย่างไรก็ตามมีรายงานผลวิจัยจำนวนมากอ้างถึงการใช้เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มโปรตีนไฮโดรเลสทางการค้า เช่น เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* ซึ่งมีคุณสมบัติการย่อยแบบ endoprotease กลุ่ม serine proteinase และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (flavourzyme) ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีคุณสมบัติการย่อยได้ 2 แบบ คือ endoprotease และ exoprotease ว่ามีประสิทธิภาพสูงในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากพืช โดยเฉพาะสมบัติการละลาย สมบัติทางอิมัลชัน และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ [27, 29, 30, 31, 32, 33, 34]

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์

ฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลาย หรือ DH จำกัด ในช่วงตั้งแต่ร้อยละ 8 จนถึง 14 โดยใช้หางกะทิ และสารที่เป็นของแข็งซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบ

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. วัตถุดิบ

หางกะทิ และตะกอนโปรตีนในรูปตะกอนเปียก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ สกัดเย็นได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่ม 100 พันมะพร้าวไทย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ บรรจุในถุง low density polyethylene และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดลองในขั้นต่อไป น้ำมันมะกอก (extra virgin olives oil) และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower oil) ทางการค้าซื้อจากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดกรุงเทพมหานคร สารเคมี (AR Grade) เอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (Sigma Aldrich, Denmark) ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส (Prod Code P4860) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Prod Code P6110) ในรูปสารละลาย มีกิจกรรม (activity) เท่ากับ 2.4 anson units/g (888 Sigma unit/g, เอนไซม์อัลคาเลส 1 Sigma unit จะย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1.0 mmol/min ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และ 500 Unit/g (เอนไซม์ฟลาโวไซม์ 1 Unit จะย่อย L-leucine-p-nitroanilide ได้ 1  $\mu$ mol/min ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ

### 2. การเตรียมโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำหางกะทิ และตะกอนโปรตีนมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อละลายน้ำแข็ง จากนั้นนำหางกะทิ (มีปริมาณของแข็งทั้งหมดประมาณ ร้อยละ 8) และตะกอนโปรตีน (มีปริมาณของแข็งทั้งหมด ประมาณ ร้อยละ 19) มาผสมให้เข้ากันก่อนการตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,440xg นาน 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน และตกตะกอนโปรตีนซ้ำตามวิธีข้างต้นโดยนำตกตะกอนโปรตีนไปละลายในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0 ใหม่อีกครั้ง จนได้ตะกอนโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำครีมโปรตีนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco FreeZone<sup>®</sup> Freeze Dryer, Floor-model, USA) แล้วนำมาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านเครื่อง Sieve Tester ผ่านชั้นตะแกรงขนาด 30 mesh [18, 19] นำโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น (Coconut Protein Concentrate, CPC) ที่ได้มาคำนวณร้อยละผลผลิตวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีตามวิธีมาตรฐาน [35] และเก็บรักษาในภาชนะปิดสนิท ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3. การเตรียมโปรตีนมะพร้าวเข้มข้นดัดแปรด้วยเอนไซม์ทางการค้า

ละลาย CPC ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ในน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นโปรตีน 77 mg/ml กวนผสมด้วยความเร็ว 100 rpm นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้โปรตีนมะพร้าวอมน้ำและละลายได้มากที่สุด จากนั้นนำไปกวนผสมด้วยเครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ (Ultra-Turrax T25) โดยใช้หัวโพรบ รุ่น S 25 KR-18 G (IKA Instruments, Germany) ที่ความเร็ว

2,000 rpm นาน 2 นาที นำสารละลายโปรตีนมะพร้าวที่ได้ไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 ก่อนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และยังสามารถนำสารละลายโปรตีนมะพร้าวไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ก่อนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเริ่มปฏิกิริยาทางเอนไซม์ที่ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, DH) ร้อยละ 8 10 12 และ 14 ด้วยอัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนตั้งต้น 1:80 (ปริมาตร/น้ำหนัก) โดยวิเคราะห์ค่า DH ตามวิธีของ Adler-Nissen (1986) [36] หยุดปฏิกิริยาทางเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายให้เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนดัดแปรที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco FreeZone<sup>®</sup> Freeze Dryer, Floor-model, USA) แล้วนำมาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านเครื่อง Sieve Tester ผ่านชั้นตะแกรงขนาด 30 mesh และเก็บรักษาโปรตีนมะพร้าวดัดแปร (Modified Coconut Protein, MCPs) ที่ได้ในภาชนะปิดสนิท ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รหัสที่ใช้แทนสภาวะการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ แสดงใน Table 1

**Table 1** Coding of enzymatic conditions for modified coconut protein

| Enzyme          | DH (%) | Coded |
|-----------------|--------|-------|
| Alcalase (A)    | 8      | A-8   |
|                 | 10     | A-10  |
|                 | 12     | A-12  |
|                 | 14     | A-14  |
| Flavourzyme (F) | 8      | F-8   |
|                 | 10     | F-10  |
|                 | 12     | F-12  |
|                 | 14     | F-14  |

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

#### 4. การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

ตรวจวิเคราะห์ CPC และ MCPs โดยเทคนิค ATR-FTIR ตั้งค่าการวิเคราะห์ที่ช่วงเลขคลื่น (wave number)  $400\text{--}4,000\text{ cm}^{-1}$  มีค่า resolution  $4\text{ cm}^{-1}$  จำนวนครั้งของการ run ตัวอย่าง 64 scans ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (Perkin Elmer Spectrum One, USA)

#### 5. การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

ศึกษาลักษณะสัณฐานพื้นผิว (surface morphology) ของ CPC และ MCPs ด้วยเครื่อง JSM-6610LV scanning electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) โดยทำการฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองคำก่อนการตรวจวิเคราะห์

#### 6. การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Activity ตามวิธีของ Thaipong และคณะ (2006) [37] โดยเตรียมสารสกัดของตัวอย่างตามวิธีของ Maisuthisakul และคณะ (2007) [38] สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ Trolox<sup>®</sup> ความเข้มข้น  $100\text{--}500\text{ }\mu\text{M}$  แทนสารสกัดของตัวอย่าง ผลที่ได้แสดงในรูปของ mM Trolox<sup>®</sup> Equivalents (TE)/g dry mass

#### 7. การตรวจวิเคราะห์แรงตึงผิวของของเหลว และแรงตึงระหว่างผิว (Surface and Interfacial Tension)

ละลาย CPC และ MCPs ที่เตรียมได้จากข้อ 2 และ 3 ตามลำดับ ในสารละลาย Phosphate Buffer (PB) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.9 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ที่มี sodium azide ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใน

ระหว่างการทดลอง) ให้มีความเข้มข้นโปรตีน  $77\text{ mg/ml}$  กวนผสมด้วยความเร็ว 100 rpm นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปกวนผสม ด้วยเครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ (Ultra-Turrax T25) โดยใช้หัวโพรบ รุ่น S 25 KR-18 G (IKA Instruments, Germany) ที่ความเร็ว 2,000 rpm นาน 2 นาที นำสารละลายโปรตีนมะพร้าวที่ได้ไปวิเคราะห์แรงตึงผิวของของเหลว (surface tension) และแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) ของสารละลายตัวอย่างกับน้ำมันมะกอก (extra virgin olives oil) และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันโดยวิธี Wilhelmy Plate ด้วยเครื่อง Krüss Force Tensiometer (K20, Germany) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

#### 8. ความสามารถในการละลาย

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายของ CPC และ MCPs ที่เตรียมได้จากข้อ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยใช้การตกตะกอนโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2–10 ตามวิธีของ Adebawale และ Lawal (2003) [39] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย เตรียมสารแขวนลอยโปรตีน ที่มีโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนผสมด้วยความเร็ว 100 rpm นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว  $4,000\times g$  นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส กรองส่วนของเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายที่กรองได้ด้วยวิธีของ Bradford (1976) [40] สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) คำนวณค่าร้อยละการละลายของโปรตีน (Protein Solubility, PS) จาก  $PS = 100 \times (P/P_T)$  โดย P คือปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายที่กรองได้ และ  $P_T$  คือปริมาณโปรตีนทั้งหมด

#### 9. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ( $p < 0.05$ ) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS, Version 21 (IBM, USA)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น

จากการเตรียมผงโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น (Coconut Protein Concentrate, CPC) ด้วยการตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 จนได้ตะกอนโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนักแห้ง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่ามีค่าร้อยละผลผลิต เท่ากับ  $4.56 \pm 0.31$  มีปริมาณของโปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ  $80.3 \pm 1.55$   $18.9 \pm 0.56$   $0.64 \pm 0.01$   $0.09 \pm 0.00$  และ  $0.06 \pm 0.00$  ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังกล่าว พบว่า CPC ที่ได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก และมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้วิจัยกำหนด แต่เนื่องจากไขมันไม่ละลายในน้ำทำให้การสกัดโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก ไม่สามารถกำจัดไขมันออกไปได้อย่างสมบูรณ์ CPC ที่ได้จึงมีไขมันเป็นองค์ประกอบด้วย

### 2. ผลของการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนมะพร้าวตัดแปร

#### 2.1 ATR-FT-IR สเปกตรัม

โครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) ของ CPC และของโปรตีนมะพร้าวตัดแปร (Modified Coconut Protein, MCPs) ด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เอนไซม์อัลคาเลส (A) และ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (F) ที่ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, DH) ร้อยละ 8 10 12 และ 14 ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FT-IR) ผลที่ได้แสดงโดย Figure 1 ซึ่งพิก (Peak) สเปกตรัมเส้นดูดกลืน (absorption spectra) หลักของ CPC และ

MCPs คือ (1) หมู่ O-H และ N-H group stretching, (2)  $\text{CH}_2$  asymmetrical stretching, (3) protein C=O stretch (Amide I) และ (4) protein N-H bending และ C-N stretching (Amide II) ซึ่งมีการสั่นที่เลขคลื่น  $3,278$   $2,922$   $1,636$  และ  $1,521 \text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ โดยมีสเปกตรัมเส้นดูดกลืน ช่วงเลขคลื่น  $1,500$  ถึง  $850 \text{ cm}^{-1}$  เป็นช่วง fingerprint ของโปรตีนมะพร้าว

สเปกตรัมเส้นดูดกลืนของ MCPs มีรูปแบบเหมือนกับสเปกตรัมเส้นดูดกลืนของ CPC แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดที่ศึกษา ในช่วง DH ร้อยละ 8–14 ไม่ส่งผลต่อโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีนมะพร้าว [41] อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ส่งผลต่อลักษณะความเข้ม (intensity) ของสเปกตรัมเส้นดูดกลืนของ MCPs แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนมะพร้าวตัดแปรที่ได้ โดยการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ DH ร้อยละ 10 (F-10) ส่งผลต่อลักษณะความเข้มของสเปกตรัมเส้นดูดกลืนของหมู่ O-H และ N-H group stretching Amide I และ Amide II มากที่สุด และการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ DH ร้อยละ 8 (A-8) ส่งผลต่อลักษณะความเข้มของสเปกตรัมเส้นดูดกลืนของหมู่  $\text{CH}_2$  asymmetrical stretching มากที่สุด

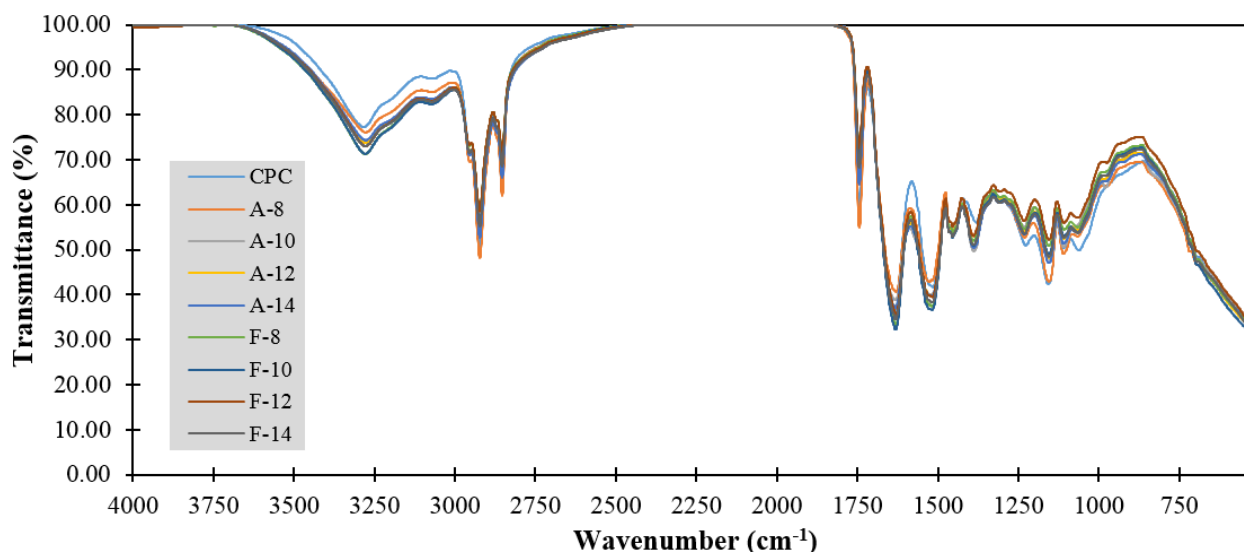
#### 2.2 ลักษณะพื้นฐานพื้นผิว

ลักษณะพื้นฐานพื้นผิวของ CPC และ MCPs ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (A) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (F) ที่ DH ร้อยละ 8 10 12 และ 14 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า แสดงดัง Figure 2

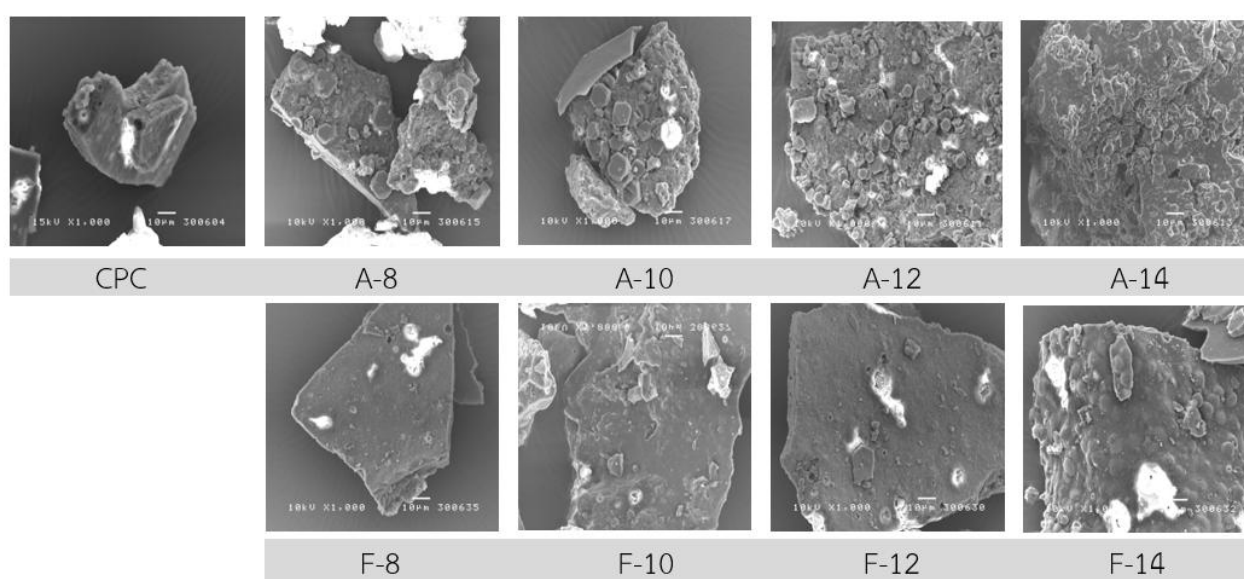
\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร



**Figure 1** ATR-FT-IR spectra of freeze dried native (CPC) and modified coconut protein concentrate (MPCs) with different the enzyme reaction and the degree of hydrolysis.



**Figure 2** Scanning electron micrographs of freeze dried native coconut protein (CPC) and modified coconut protein concentrate (MPCs) with different enzyme reaction and degree of hydrolysis.

Figure 2 แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลาย CPC ด้วย เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดที่ศึกษา ในช่วง DH ร้อยละ 8–14 ส่งผลต่อลักษณะสัณฐานพื้นผิวของ MPCs โดยผง โปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (A) จะมี รูปทรงไม่แน่นอน มีลักษณะพื้นผิวขรุขระ และ

ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กๆ จำนวนมากมาเกาะอยู่ที่ ผิวของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ และเมื่อค่า DH เพิ่มขึ้น ผง โปรตีนมะพร้าวดัดแปรที่ได้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย และเกิด การหลอมรวมกันของอนุภาคขนาดเล็กๆ ที่พื้นผิว จนทำให้ พื้นผิวของโปรตีนมะพร้าวดัดแปรที่ DH สูงๆ มีลักษณะการ

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

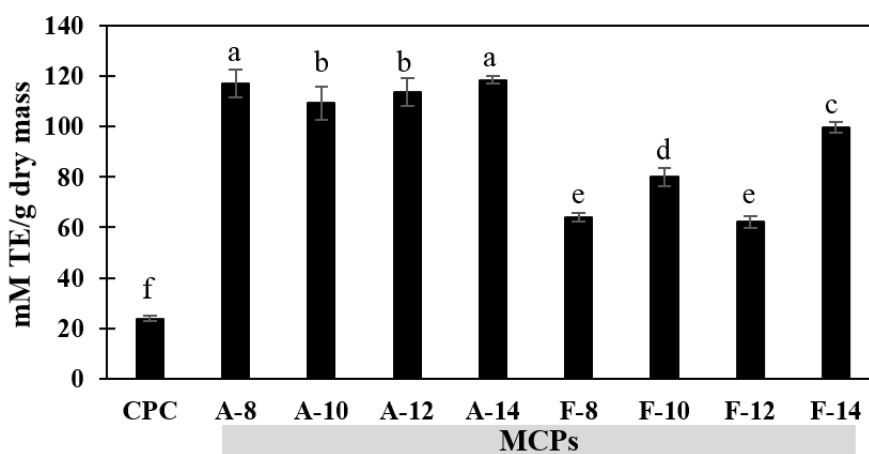
<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

อัตราส่วนของอนุภาคน้ำตาล ดังจะเห็นได้อย่างชัดเจนใน Figure 2 (A-14) ในขณะที่ลักษณะพื้นฐานของผงโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (F) จะมีรูปทรงเป็นแผ่นบางๆ มีลักษณะพื้นผิวค่อนข้างเรียบ และประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กๆ จำนวนเล็กน้อยมาเกาะอยู่ที่ผิวของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น และเมื่อค่า DH เพิ่มขึ้น ผงโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรที่ได้จะมีลักษณะพื้นผิวขรุขระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่ส่งผลต่อขนาดและความแน่นของผงโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรที่ได้เพียงเล็กน้อย

### 2.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของ CPC และ MCPs ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (A) และ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (F) ที่

DH ร้อยละ 8 10 12 และ 14 แสดงใน Figure 3 โดยแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดที่ศึกษา ในช่วงร้อยละ DH 8-14 ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนมะพร้าว โดยช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนมะพร้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้โปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนมะพร้าวสูงกว่าโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และโปรตีนมะพร้าวที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 8 และ 14 ให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



**Figure 3** Antioxidant activity in coconut protein concentrate (CPC) and modified coconut protein concentrate (MCPs) with different enzyme reaction and degree of hydrolysis. Data are shown as the mean $\pm$ SD, derived from three independent replicates. Means with a different superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ; DMRT).

องค์ประกอบสำคัญที่ส่งผลให้ CPC และ MCPs มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ ชนิดกรดอะมิโน ชนิดเพปไทด์ และโปรตีนที่ปรากฏใน CPC และ MCPs โดยกรดอะมิโนที่มีการรายงานว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ได้แก่ histidine cysteine methionine และ tyrosine และชนิดเพปไทด์ที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่

glutathione carnosine และ anserine [42] อีกทั้งการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดชนิดของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) ชนิดและขนาดของเพปไทด์ที่แตกต่างกันไปตามความจำเพาะของเอนไซม์ที่ใช้ และระดับการย่อยสลาย ส่งผลให้ MCPs ที่ได้มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน [43] และเนื่องจาก MCPs ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มาแล้ว จึง

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร



อาจมีกรดอะมิโนอิสระ หรือชนิดเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ทำให้ MCPs มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า CPC

## 2.4 แรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว

แรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวของสารละลายตัวอย่างที่มี CPC และ MCPs ละลายอยู่ในสารละลายยิมบพบาทสำคัญต่อการประยุกต์ใช้โปรตีนมะพร้าว และโปรตีนมะพร้าวตัดแปรเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์

(emulsifier) ในระบบอิมัลชัน [44] ผลการวิเคราะห์แรงตึงผิวของของเหลว (surface tension) ของสารละลาย Phosphate Buffer (PB) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.9 ที่มี CPC และ MCPs ในสารละลาย และแรงตึงระหว่างผิว (Interfacial Tension) ระหว่างสารละลายดังกล่าวกับน้ำมันมะกอก และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันโดยวิธี Wilhelmy Plate ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แสดงดัง Table 2

**Table 2** Surface and interfacial tensions of coconut protein concentrate (CPC) and modified coconut protein concentrate (MPCs) with different enzyme reaction and degree of hydrolysis.

| Solution        | Surface tensions<br>(mN/m) |                         | Interfacial tension<br>(mN/m)                 |                                            |
|-----------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                 |                            | Air-water <sup>s</sup>  | Virgin olive oil-water interface <sup>s</sup> | Sunflower oil-water interface <sup>s</sup> |
| Distilled water |                            | 72.6 <sup>a</sup> ± 0.2 | 18.7 <sup>a</sup> ± 0.5                       | 23.9 <sup>a</sup> ± 0.3                    |
| PB <sup>¥</sup> |                            | 53.4 <sup>b</sup> ± 0.4 | 16.2 <sup>b</sup> ± 0.4                       | 21.6 <sup>b</sup> ± 0.5                    |
| CPC in PB       |                            | 35.8 <sup>f</sup> ± 0.6 | 10.7 <sup>c</sup> ± 0.6                       | 13.3 <sup>de</sup> ± 0.7                   |
| MPCs in PB      | A-8                        | 37.8 <sup>e</sup> ± 0.8 | 7.2 <sup>e</sup> ± 0.3                        | 10.4 <sup>g</sup> ± 0.4                    |
|                 | A-10                       | 37.7 <sup>e</sup> ± 0.4 | 6.8 <sup>e</sup> ± 0.7                        | 10.7 <sup>g</sup> ± 0.7                    |
|                 | A-12                       | 37.4 <sup>e</sup> ± 0.1 | 6.1 <sup>e</sup> ± 0.4                        | 12.0 <sup>f</sup> ± 0.6                    |
|                 | A-14                       | 36.1 <sup>f</sup> ± 0.2 | 7.1 <sup>e</sup> ± 0.7                        | 12.4 <sup>ef</sup> ± 0.2                   |
|                 | F-8                        | 38.7 <sup>d</sup> ± 0.2 | 8.6 <sup>d</sup> ± 0.9                        | 14.8 <sup>c</sup> ± 0.4                    |
|                 | F-10                       | 39.8 <sup>c</sup> ± 0.3 | 10.2 <sup>c</sup> ± 0.6                       | 14.8 <sup>c</sup> ± 0.5                    |
|                 | F-12                       | 39.7 <sup>c</sup> ± 0.4 | 10.7 <sup>c</sup> ± 1.0                       | 14.9 <sup>c</sup> ± 0.8                    |
|                 | F-14                       | 38.9 <sup>d</sup> ± 0.1 | 10.4 <sup>c</sup> ± 0.9                       | 14.0 <sup>cd</sup> ± 0.7                   |

<sup>s</sup>Data are shown as the mean ± 1SD and are derived from three independent replicates. Means within a column with different subscripts are significantly different (p < 0.05; DMRT).

<sup>¥</sup>PB = 0.1 M Phosphate buffer pH 6.9.

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวของสารละลายตัวอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของตัวถูกละลาย โดยน้ำบริสุทธิ์จะมีแรงตึงผิวสูงกว่าสารละลาย PB และสารละลาย PB จะมีแรงตึงผิวสูงกว่าสารละลาย PB ที่มี CPC และ MCPs ละลายอยู่ด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมะพร้าว และโปรตีน

มะพร้าวตัดแปรมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวได้ โดย MCPs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลายได้ดีกว่า MCPs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และ MCPs จากการใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 14 (A-14) สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลายได้มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

0.05) อย่างไรก็ตามค่าแรงดึงดูดของสารละลายที่ลดลงนั้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ CPC ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียสภาพบางส่วน (partial denaturation) ของโปรตีนมะพร้าวที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาทางเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เนื่องจาก Tangsuphoom และ Coupland (2008) ได้รายงานไว้ว่าโปรตีนมะพร้าวจะเริ่มเกิดการเสียสภาพ และเกิดการจับกันเป็นก้อน (coagulation) เมื่อมีการให้ความร้อนสูงถึง 80 องศาเซลเซียส [45] การเสียสภาพบางส่วนของโปรตีน ทำให้โครงสร้างโปรตีนสภาวะปกติ (native state) เกิดการคลายตัว (unfolding) แล้วทำให้หมู่ R (side chains) ในโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนมีผลกระทบต่อพฤติกรรมของโปรตีนที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและอากาศ [19]

เมื่อพิจารณาแรงดึงดูดระหว่างผิวของสารละลายตัวอย่างกับผิวของน้ำมันพบว่า CPC และ MCPs ในสารละลาย สามารถช่วยลดแรงดึงดูดระหว่างผิวของสารละลายตัวอย่างกับผิวของน้ำมันมะกอก และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันได้ โดย MCPs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสสามารถลดแรงดึงดูดระหว่างผิวของสารละลายตัวอย่างกับผิวของน้ำมันได้ดีกว่า MCPs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และ MCPs จากการใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 8-14 สามารถลดแรงดึงดูดระหว่างผิวของของน้ำและน้ำมันมะกอกได้มากที่สุด ในขณะที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 8 และ 10 สามารถลดแรงดึงดูดระหว่างผิวของน้ำและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ CPC และ MCPs ในสารละลายสามารถช่วยลดแรงดึงดูดที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันมะกอกได้ดีกว่าน้ำและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน

โปรตีนสามารถลดแรงดึงดูด และแรงดึงดูดระหว่างผิวของน้ำกับน้ำมันได้เนื่องจากในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในสาย

พอลิเพปไทด์ โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมัน [46, 47] โปรตีนมะพร้าวที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนซึ่งละลายน้ำได้ดี เช่น โปรตีน oleosin และโปรตีน albumin เป็นหลัก [48] การย่อยสลาย CPC อย่างจำกัด (limited hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ ช่วยเพิ่มกิจกรรมพื้นผิว (surface activity) ของโปรตีนมะพร้าวได้เนื่องจากทำให้เกิดเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง สามารถเคลื่อนที่ไปยังรอยต่อระหว่างผิวของน้ำกับน้ำมันได้เร็วขึ้น และการย่อยสลาย CPC อย่างจำกัดจะช่วยให้โปรตีนมะพร้าวละลายได้ดีขึ้น [49, 50] อย่างไรก็ตาม MCPs จากปฏิกิริยาทางเอนไซม์ และระดับการย่อยสลายที่แตกต่างกันจะมีกิจกรรมพื้นผิวที่แตกต่างกันเนื่องมาจากความแตกต่างของ ความเป็นไฮโดรโฟบิกที่พื้นผิว (surface hydrophobicity) โครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) โครงสร้างระดับจตุรภูมิ (quaternary structure) และความยืดหยุ่น (flexibilities) ของโปรตีน [51]

### 3. ผลของการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ต่อสมบัติการละลายของโปรตีนมะพร้าวตัดแปรรูป

สมบัติการละลายของ CPC และ MCPs ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2-10 จากการวิเคราะห์ค่าร้อยละการละลายของโปรตีน (Protein Solubility, PS) แสดงไว้ใน Figure 4 รูปแบบการละลายเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-solubility profile) ของ CPC และ MCPs มีลักษณะเป็นเส้นโค้งรูปตัวยู มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนมะพร้าวเข้มข้น ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก และมีค่าใกล้เคียงกับค่า pI ของโปรตีนมะพร้าวที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [23, 52, 53, 54, 55] แสดงว่าการย่อยสลาย CPC อย่างจำกัดที่ระดับการย่อยต่ำ ณ ภาวะที่ศึกษา ไม่ทำให้ค่า pI ของโปรตีนมะพร้าวเกิดการเปลี่ยนแปลง และช่วยเพิ่มค่าร้อยละการละลายของโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกได้เพียงเล็กน้อย โดย MCPs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีค่า

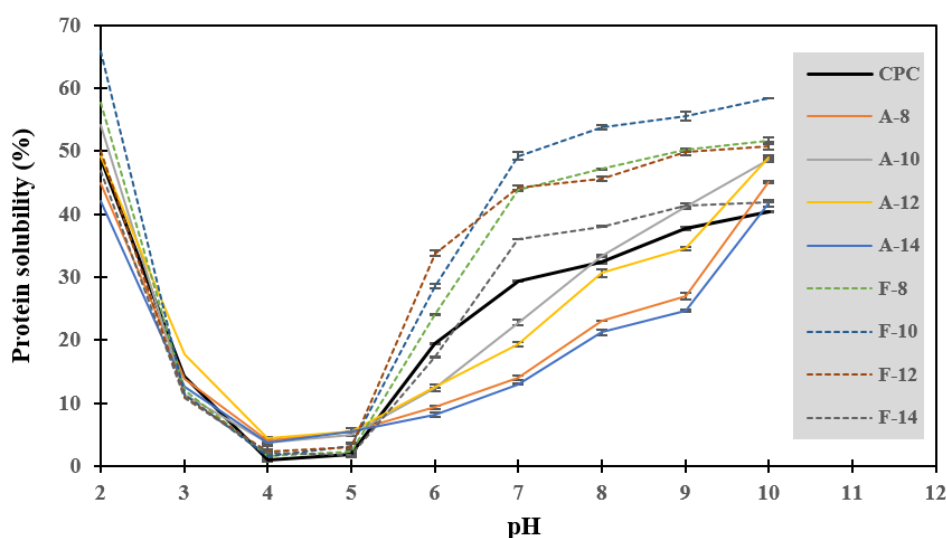
\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

ร้อยละการละลายของโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก สูงกว่า MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ อย่างไรก็ตามที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆ MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนสูงกว่า MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง < 3 หรือ > 7 โดยที่ MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ

10 (F-10) มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนสูงที่สุด ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3-5 MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 12 (A-12) มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนสูงที่สุด และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 12 (F-12) มีค่าร้อยละการละลายของโปรตีนสูงที่สุด



**Figure 4** pH-solubility profile of coconut protein concentrate (CPC) and modified coconut protein concentrate (MPCs) with different enzyme reaction and degree of hydrolysis. Data are shown as the mean $\pm$ 1 SD, derived from three independent replicates.

สมบัติการละลายของโปรตีนเป็นผลมาจากชนิดกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจำแนกเป็นกรดอะมิโนชนิดกรด (acidic amino acids) และกรดอะมิโนชนิดเบส (basic amino acids) ที่จะเป็นตัวกำหนดค่า pI ของโปรตีน และค่าประจุสุทธิ (net charge) ของโปรตีนที่ pH ต่างๆ นอกจากนี้ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophillic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์จะเป็นตัวกำหนดสมบัติการละลายของโปรตีน [56] อย่างไรก็ตามสมบัติการละลายของโปรตีนยังขึ้นอยู่กับค่าประจุผิว (surface charge) ของโปรตีนในสารละลายอีกด้วย [57]

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จะทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลง เกิดเพปไทด์ที่มีสายสั้น

นำไปสู่การปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีน และการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ยังส่งผลต่อค่าไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) หมู่ที่มีขั้ว และหมู่ที่สามารถเป็นไอออนได้ของโปรตีน [58] ดังนั้นการย่อยสลาย CPC อย่างจำกัด ณ ภาวะที่ศึกษา จึงช่วยเพิ่มค่าร้อยละการละลายของโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริกได้ อย่างไรก็ตามการย่อยสลาย CPC อย่างจำกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสส่งผลให้ค่าร้อยละการละลายของ MPCs ที่ค่า pH อื่นๆ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ CPC มีสาเหตุมาจากความไม่เหมาะสมของสัดส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophillic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในสายพอลิเพปไทด์ [59] ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ สมบัติ

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

การละลายดีกว่า MPCs ที่ได้จากการย่อยสลาย CPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งเป็นอาจมีสาเหตุจากเอนไซม์ ฟลาโวไซม์มีคุณสมบัติการย่อยได้ 2 แบบ คือ endoprotease และ exoprotease เมื่อเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน จะสามารถเข้าตัดพันธะเพปไทด์ได้หลากหลายกว่าเอนไซม์อัลคาเลสที่เป็นเอนไซม์ endoprotease ชนิด serine จึงทำให้เกิดเพปไทด์ที่มีขนาดปานกลางและขนาดเล็กที่มีการกระจายของขนาดโมเลกุลในช่วงกว้าง [60, 61]

### สรุปผล

ผลการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ของโปรตีนมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลายอย่างจำกัดตั้งแต่ร้อยละ 8 ถึง 14 โดยใช้หางกะทิ และสารที่เป็นของแข็งซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบสรุปได้ว่าการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์อย่างจำกัด มีผลทำให้สเปกตรัม ATR-FT-IR ลักษณะสัณฐานพื้นผิวของ MCPs กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ กิจกรรมพื้นผิว และความสามารถในการละลายของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส จะได้โปรตีนมะพร้าวตัดแปรที่มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และค่ากิจกรรมพื้นผิวที่เหนือกว่าการย่อยสลายโปรตีนมะพร้าวด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ และโปรตีนมะพร้าวที่ตัดแปรโดยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 8 แสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมพื้นผิวดีที่สุด อย่างไรก็ตามโปรตีนมะพร้าวที่ตัดแปรจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟลาโวไซม์จะมีสมบัติการละลายดีกว่าโปรตีนมะพร้าวที่ตัดแปรจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาเลส

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(RES560530047-FW) และ ทุน 90 ป จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### เอกสารอ้างอิง

- [1] Molina, E., Papadopoulou, A. and Ledward, D.A., (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*. 15: 263–269.
- [2] Palazolo, G.G, Mitidieri, F.E. and Wangner, J.R. (2003). Relationship between interfacial behaviour of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of oil in water emulsions-effect of salt and protein concentration. *Food Science and Technology International*. 9: 409–411.
- [3] Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N. and Khan, M.S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*. 97(2): 331–335.
- [4] Wang, B., Wang, L., Li, D., Adhikari, B. and Shi, J. (2011). Effect of gum Arabic on stability of oil-in-water emulsion stabilized by flaxseed and soybean protein. *Carbohydrate Polymers*. 86(1): 343–351.
- [5] Shao, Y. and Tang, C.H. (2014). Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocolloids*. 37: 149–158.
- [6] Chambal, B., Bergenstahl, B. and Dejmeek, P. (2012). Edible proteins from coconut milk press cake; one step alkaline

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

- extraction and characterization by electrophoresis and mass spectrometry. Food Research International. 47: 146–151.
- [7] FAO and APCC. (2013). Report of the FAO High Level Expert Consultation on Coconut Sector Development in Asia and the Pacific Region. In the FAO-APCC High Level Expert Consultation on “Coconut Sector Development in Asia–Pacific Region, 30 October - 1 November 2013, Bangkok, Thailand.
- [8] Marina, A.M., Che Man, Y.B. and Amin, I. (2009). Virgin coconut oil: emerging functional food oil. Trends in Food Science and Technology. 20: 481–487.
- [9] Rosenthal, A., Pyle, D.L. and Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme and Microbial Technology. 19(6): 402–420.
- [10] Mepba, H.D. and Achnewhu, S.C. (2003). Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. Plant Foods for Human Nutrition. 58: 15–25.
- [11] Smith, N., My Ha, N., Cuong, V.K. Thu Dong, H.T., Son, N.T., Baulch, B. and Le Thuy, N.T. (2009). Coconuts in the mekong delta: an assessment of competitiveness and industry potential. Prosperity Initiative develops. Leeds Beckett University Leeds. UK. 98 p.
- [12] Hamid, M.A., Sarmidi, M.R., Mokhtar, T.H., Sulaiman, W.R.W. and Aziz, R.A. (2011). Innovative integrated wet process for virgin coconut oil production. Journal of Applied Sciences. 11(13): 2467–2469.
- [13] Xu, B., Li, P., Ma, F., Wang, X., Matthäus, B., Chen, R., Yang, Q., Zhang, W. and Zhang, Q. (2015). Detection of virgin coconut oil adulteration with animal fats using quantitative cholesterol by GC x GC–TOF/MS analysis. Food Chemistry. 178: 128–135.
- [14] Sangamithra, A., Swamy G.J., Sorna, P.R., Chandrasekar, V., Sasikala, S. and Hasker, E. (2013). Coconut: an extensive review on value added products. Indian Food Industry Magazine. 32(6): 29–38.
- [15] Kwon, K.S., Bae, D., Park, K.H. and Rhee, K.C. (1996). Aqueous extraction and membrane techniques improve coconut protein concentrate functionality. Journal of Food Science. 61: 753–756.
- [16] Tangsuphoom, N., and Coupland, J.N. (2005). Effect of heating and homogenization on the stability of coconut milk emulsions. Journal of Food Science. 70(8): 466–470.
- [17] DebMandal, M., and Mandal, S. (2011). Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 4(3): 241–247.
- [18] Thaiphanit, S. and Anprung, P. (2014). Increasing the utilization of coconut (*Cocos nucifera* L.) wet processing waste: Physicochemical and functional properties of coconut protein powder. In The Proceedings of the 1<sup>st</sup> Joint ACS AGFD-ACS ICST Symposium on

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

- Agricultural and Food Chemistry; 2014 March 4-5, Bangkok, Thailand, 207–215.
- [19] Thaiphanit, S. and Anprung, P. (2015). Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment. *Food Hydrocolloids*. doi: 10.1016/j.foodhyd. 2015.08.017.
- [20] Salil, G., Nevina, K.G. and Rajamohan, T. (2011). Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in alloxan treated rats. *Chemico-Biological Interactions*. 189: 107–111.
- [21] Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8: 219–280.
- [22] Soares de Castro, R.J., Bagagli, M.P. and Sato, H.H. (2015). Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*. 1: 64–69.
- [23] Onsaard, E., Vittayanont, M., Sringam, S. and McClements, D.J. (2006). Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Research International*. 39: 78–86.
- [24] Zayas, J.F. (1997). *Functionality of Proteins in Food*. Springer Berlin Heidelberg. Germany.
- [25] Palazolo, G.G., Sobral, P.A. and Wagner, J.R. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates. *Food Hydrocolloids*. 25(3): 398–409.
- [26] ปราณี อำนเปื่อง. (2547). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4 ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 442 หน้า.
- [27] Yust, M.M., Pedroche, J., Millán-Linares, M.C., Alcaide-Hidalgo, J.M. and Millán, M. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*. 122: 1212–1217.
- [28] Conde, J.M., Escobar Mdel, M., Pedroche Jiménez, J.J., Rodríguez, F.M. and Rodríguez Patino, J.M. (2005). Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8038–8045.
- [29] Kim, J.M., Whang, J.H., Kim, K.M., Koh, J.H. and Suh, H.J. (2004). Preparation of corn gluten hydrolysate with angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and its solubility and moisture sorption. *Process Biochemistry*. 39: 989–994.
- [30] Celus, I., Brijs, K. and Delcour, J.A. (2007). Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(21): 8703–8710.
- [31] Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y.L., Álvarez, D., Payne, F.A. and Garrido, M.D. (2009). Antioxidant and emulsifying properties

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

- of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Science*. 83(1): 24–30.
- [32] Ventureira, J., Martínez, E.N. and Añón, M.C. (2010). Stability of oil: Water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH. *Food Hydrocolloids*. 24: 551–559.
- [33] Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*. 135: 3039–3048.
- [34] Connolly, A., Piggott, C.O. and FitzGerald, R.J. (2014). Technofunctional properties of a brewers' spent grain protein-enriched isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*. 59(2): 1061–1067.
- [35] AOAC. (1990). Association of official analytical chemists. *Methods of analysis*. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: AOAC (Methods 962, 09–992.06).
- [36] Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishing. London.
- [37] Thaipong, K., Boonprakkob, U., Ckrosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 669–675.
- [38] Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*. 100: 1409–1418.
- [39] Adebawale, K.O. and Lawal, O.S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*. 83: 237–246.
- [40] Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- [41] Lefevre, T. and Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: model studies on  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*. 15: 365–376.
- [42] Xiong, Y.L. (2010). *Antioxidant peptides. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*. IFT Press. Iowa.
- [43] Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 36: 949–957.
- [44] Barnes, G. T. and Gentle, I.R. (2005). *Interfacial Science*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford University Press. Oxford.
- [45] Tangsuphoom, N., and Coupland, J.N. (2008). Effect of surface-active

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok

- stabilizers on the microstructure and stability of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*. 22: 1233–1242.
- [46] Ye, A. and Singh, H. (2006). Heat stability of oil-in-water emulsions formed with intact or hydrolyzed whey proteins: influence of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 20: 269–276.
- [47] Foegeding, E.A. and Davis, J.P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*. 25: 1853–1864.
- [48] ธนธรณ์ เกิดสวัสดิ์ และปาริฉัตร หงสประภาส. (2556). ผลของโปรตีนและสารลดแรงตึงผิวต่อความคงตัวของกะทิสเตอริไลซ์. ในเรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 65-72.
- [49] Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. In G. M. Hall (ed.). *Methods of testing protein functionality*. London: Blackie Academic & Professional, 110–152.
- [50] Turgeon, S. L., Gauthier, S. F. and Paquin, P. (1991). Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a 2-step ultrafiltration process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39: 673–676.
- [51] Tornberg, E., Olsson, A., and Persson, K. (1997). The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions. In S.E. Friberg and K. Lersson (eds.), *Food emulsions*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [52] Balasubraimian, K. and Sihotang, K. (1979). Studies of coconut protein and its enzyme activities. *Journal of Food Science*. 44(1): 62–65.
- [53] Samson, S.J., Cater, C.M. and Mattil, K.F. (1971). Preparation and characterization of coconut protein isoates. *Cereal Chemistry*. 48: 182–190.
- [54] Onsaard, E., Vittayanont, M., Sringam, S. and McClements, D.J. (2005). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by coconut skim milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 5747–5753.
- [55] Horsfall, M., Achinewhu, S.C. and Ademiluyi, T. (2008). Solubility, emulsion and foraming properties of coconut (*Cocos Nucifera*) proteins concentrate. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 8(2): 170–191.
- [56] Damodaran, S. (1996). Functional properties. In: S. Nakai, H. W. Modler (eds.) *Food proteins: properties and characterization*. VCH Publishers. New York. pp. 167–234.
- [57] Karaca, A.C., Low, N.H. and Nickerson, M.T. (2015). Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends in Food Science and Technology*. 42: 5–12.
- [58] Mutilangi, W.A.M., Panyam, D. and Kilara, A. (1995). Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. *Journal of Food Science*. 60(5): 1104–1109.
- [59] Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. (2004). Influence of

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>ศ.ดร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร<sup>2</sup>อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร



hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*. 69: 615–622.

- [60] Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C. and Scheper, T. (2007). An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 508–514.
- [61] Bamdad, F., Wu, J. and Chen, L. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*. 54: 20–28.

\*pranee.a@chula.ac.th

<sup>1</sup>Professor Dr., Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok