

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่ว ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า

PRODUCTION OF BEAN PROTEIN HYDROLYSATE BY BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED SOYBEAN (THUA-NAO)

กิตติ เมืองต้อม*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ อำเภอเมือง จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

Kitti Mueangtoom*

Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, Uttaradit, Thailand 53000

*E-mail: kittoom@hotmail.com

Received: 12-06-2022

Revised: 21-10-2022

Accepted: 08-11-2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วชนิดต่าง ๆ โดยกระบวนการหมัก ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ถั่วเน่าแผ่นพื้นบ้านที่ผลิตที่จังหวัดแพร่ จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย จากถั่วเน่าแผ่นได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต จากนั้นนำมาศึกษาคุณลักษณะทางด้านสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น จำนวน 13 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปร่างกลม จำนวน 12 ไอโซเลต และเมื่อนำมาย่อยถั่วเหลืองพบว่า ไอโซเลต TN23 ค่าระดับการย่อยสลาย สูงสุดอยู่ที่ 20.70 ± 0.56 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่าเป็น เชื้อ *Lactobacillus lactis* และเมื่อนำเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 มาทำการหมักถั่วชนิดต่าง ๆ จำนวน 5 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วดำ และถั่วลิสง เพื่อหาปริมาณกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงหลังกระบวนการหมัก พบว่าถั่วดำ มีปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดเพิ่มสูงขึ้นหลังกระบวนการหมัก สรุปได้ว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต จากถั่วดำ ด้วยเชื้อ *L. lactis* TN23 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้ได้ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มี กรดอะมิโน จำเป็นสูงกว่าการรับประทานถั่วดำที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

คำสำคัญ: โปรตีนไฮโดรไลเสต ถั่ว ถั่วเน่า กรดอะมิโน

ABSTRACT

This research was to study the production of bean protein hydrolysate by bacteria isolated from fermented soybean (Thua-nao). There were 25 isolates of bacteria from Thua-nao which were studied morphological and physiological characteristics. The result showed gram-positive rod 13 isolates with short - chain arrangement and gram-positive cocci 12 isolates. The degree of hydrolysis

showed the highest degree of degradation at 20.70 ± 0.56 percent by isolate TN23. Then, isolate TN23 was strain analyzed by MALDI-TOF MS, which showed a strain of isolate TN23 is *Lactobacillus lactis*. After the fermentation of 5 different types of beans which were soybeans, red beans, mung beans, black beans, and peanuts by *L. lactis* TN23, the amino acid profile was analyzed. It was found that the hydrolysates black beans protein was increased for all amino acids. It could be concluded that in the production of protein hydrolysate from fermented black beans by *L. lactis* TN23 for 72 hours at room temperature, the amount of essential amino acids is higher than in non-fermented black beans.

Keywords: Protein hydrolysate, Bean, Thua-nao, Amino acid

บทนำ

ในปัจจุบัน การบริโภคอาหารของผู้สูงวัยมุ่งเน้นในเรื่องของสุขภาพ และสามารถรองรับสภาวะการทำงาน และความเป็นอยู่ที่เร่งรีบ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงการบริโภคของอาหารในกลุ่มโปรตีน เช่น มีการเน้นคุณค่าอาหาร ในด้านการดูดซึมที่รวดเร็วและการกระตุ้นการทำงานของสมอง เพราะเป็นแหล่งของสารอาหารประเภทกรดอะมิโน ที่สำคัญต่อคนทุกช่วงวัย เป็นต้น คณะวิจัยหลายกลุ่มได้รายงานไว้ว่า ร่างกายสามารถดูดซึมอาหารกลุ่มโปรตีนที่ถูกละลายจนได้ส่วนประกอบกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ได้รวดเร็วกว่าอาหารประเภทโปรตีนที่ยังไม่ถูกละลาย รวมถึงข้อดี ที่ได้จากการบริโภคอาหารกลุ่มโปรตีน ที่ผ่านการย่อยแล้ว (Thongsuk, 2019)

โปรตีนไฮโดรไลเสต เป็นโปรตีนผ่านกระบวนการย่อยจนได้สายของโพลีเปปไทด์ โอลิโกเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ (Lamsal et al., 2007) ซึ่งในปี ค.ศ. 1990 เริ่มมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตในทางการค้า โดยมีวัตถุดิบหลักที่ใช้ผลิต ได้แก่ ธัญพืชและถั่ว เคซีน แป้งปลา เจลาติน ยีสต์ หรือแหล่งโปรตีนอื่น ๆ เพื่อใช้เป็น สารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร (Julmanlik & Kongruang, 2019) โปรตีนไฮโดรไลเสตยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เช่น เป็นอาหารสัตว์ อาหารมนุษย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง สมบัติเชิงหน้าที่บางประการและคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนดั้งเดิม (Carthy et al., 2013) อีกทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตยังมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ การควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ซึ่งการออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับลำดับ ขนาด ความยาว และชนิดของกรดอะมิโน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพนั้น ต้องประกอบด้วยโอลิโกเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน อยู่ระหว่าง 2–20 พันธะ (Chalamaiah et al., 2018) โดยการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอาหารเชิงฟังก์ชันกันอย่างแพร่หลาย ทั้งชนิดของแหล่งโปรตีน วิธีการ สารเคมีหรือเอนไซม์ ในการย่อยสลาย และสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในด้านต่าง ๆ รวมทั้งการนำไปเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์สุขภาพ อีกด้วย การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี เป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดมากในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีการที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ ในขณะที่วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เอนไซม์จะมีความคงที่ของกรดอะมิโนมากกว่า และเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่จะให้ปริมาณ เปปไทด์สูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น อีกทั้งยังเป็นสภาวะที่ไม่รุนแรง และสามารถควบคุมการย่อยสลายได้ ซึ่งทำได้โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนที่มีพันธะเปปไทด์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม โปรติเอส ที่มีแหล่งของเอนไซม์อยู่ใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ในการผลิตของกลุ่มผู้ประกอบการรายย่อย รวมถึงการผลิตในระดับชุมชน การใช้เอนไซม์ยังคงเป็นเทคโนโลยีที่สูง ซึ่งที่ผ่านมาเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ จะพบได้ในกระบวนการ

หมักอาหารพื้นบ้าน เช่น ถั่วเน่า ซิอิ้ว น้ำปลา เป็นต้น ซึ่งถั่วเน่า เป็นอาหารหมักที่เกิดจากการหมักถั่วด้วยแบคทีเรีย นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารพื้นถิ่นทางภาคเหนือ เช่น น้ำเงี้ยว และใสในอาหารจานผัดเพื่อเพิ่มกลิ่นรส นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าถั่วเน่าเป็นอาหารหมักที่มีคุณค่าทางโภชนาการ และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่ทว่าขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อที่ใช้ผลิต และกระบวนการผลิตของแต่ละพื้นที่ (Chukeatirote et al., 2011)

งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ ถั่วเน่า ในการย่อยโปรตีนในถั่วชนิดต่างๆ เพื่อวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ได้จากกระบวนการหมักถั่ว ชนิดต่าง ๆ และประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นส่วประกอบของการผลิตอาหารสำหรับผู้สูงอายุต่อไป

วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย

1.1 เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจากร้านขายของฝาก แยกปากจ๊วระ อ.เด่นชัย จ.แพร่ ซึ่งเป็นแผ่นถั่วเน่า ที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำติ ลดอุณหภูมิให้เป็นอุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ถั่วเน่า 10 กรัม แล้วนำไปเขย่า ที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) แตะเชื้อที่เลี้ยงได้มาลากบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ด้วยเทคนิค Streak Plate แล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต่างกันมาลากซ้ำบนอาหาร NA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาเก็บไว้ในอาหาร NA Slant สำหรับการทดลองต่อไป

4) การให้รหัสเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บมาเป็นตัวเลข 2 หลักหลังตัวอักษร TN (Thua-Nao)

5) ศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบันทึกลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรมแบคทีเรีย และรูปร่าง การเรียงตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS, รุ่น CX22LED) กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

2.1 การศึกษาระดับการย่อยสลายโดยทำตามวิธีของ Nissen (1979)

1) การเตรียมตัวอย่างโดยนำถั่วเหลือง มาล้างทำความสะอาดคัดเลือกล้างเจือปนออกให้หมด จากนั้นแช่น้ำ 1 คืน แล้วต้มจนสุก ประมาณ 3 ชั่วโมง ทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และนำมาแยกบรรจุในขวด รูปชมพู่ ปริมาณ 200 กรัมต่อขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงในถั่ว โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^7 CFU/mL ซึ่งเตรียมมาจากการนำเชื้อแต่ละไอโซเลตที่แยกไว้ใน NA slant มาใส่ใน 0.85% Normal Saline Solution (NSS) แล้วปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ความขุ่นในหลอดเทียบเท่ากับ ความขุ่นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จะทำให้มีปริมาณเชื้อเป็น 1.5×10^8 CFU/mL แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^7 CFU/mL ปิดปากขวดให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผง นำใส่ถุงซิปล็อกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทดสอบระดับการย่อยสลาย

2) ศึกษาการย่อยสลายโดยนำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.215 M pH 8.2 และ trinitrobenzene sulfonic acid เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม hydrochloric acid เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ glycine เป็นสารมาตรฐาน

3) การกำหนดปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดทำได้โดยเติม hydrochloric acid เข้มข้น 6 N (ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วหมัก: กรด เท่ากับ 1:100) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับการย่อยสลายคำนวณดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis (\%DH)} = [(hs - ho)/ht] \times 100\%$$

โดย hs = ปริมาณของ α -amino acid ของตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์หลังการบ่ม 72 ชั่วโมง, ho = ปริมาณของ α -amino acid ของตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง, ht = ปริมาณของ α -amino acid ทั้งหมดหลังจากย่อยด้วยกรด

4) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุด มาทำการจำแนกสายพันธุ์โดยส่งวิเคราะห์สายพันธุ์ ณ ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย โดยเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในระบบแมสสเปกโตรเมตรีชนิด MALDI-TOF

2.2 การศึกษาปริมาณโปรตีน และวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

1) การเตรียมวัตถุดิบโดยนำถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วดำมาล้างทำความสะอาด คัดเลือกสิ่งเจือปนออกให้หมด จากนั้นนำถั่วแต่ละชนิดมาแช่ 1 คืน แล้วต้มจนสุก ประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นตักออก ทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และนำมาแยกบรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 200 กรัมต่อขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

2) การเตรียมหัวเชื้อโดยการนำเชื้อที่ให้ระดับการย่อยสลายถั่วเหลืองสูงสุด ที่แยกไว้ใน NA slant ปริมาณ 1 loop ใส่ลงในอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3) นำวัตถุดิบที่เตรียม และหัวเชื้อ มาผสมกันโดยการเทหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงในถั่วแต่ละชนิด คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่ว ปิดปากขวดให้สนิท ทำ 3 ซ้ำ

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง มาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผง แล้วนำใส่ถุงซิปล็อกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบระดับการย่อยสลาย นำตัวอย่างที่ได้ของแต่ละทริทเมนต์มาศึกษาปริมาณโปรตีน และวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

5) นำผงโปรตีนไฮโดรไลสได้จากถั่วหมักแต่ละชนิดที่บดละเอียดจำนวน 200 มิลลิกรัม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method (Latimer, 2012) และ การวิเคราะห์โปรไฟล์อะมิโนตามวิธี In-house method WI-TMC-06 โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อ และจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าพื้นบ้าน

ผลจากการคัดแยกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการคัดแยกได้จากถั่วหมักจากถั่วเหลือง ด้วยวิธีการ Dilution plate Spread plate และ Cross streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต (TN01 – TN25) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น จำนวน 13 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม จำนวน 12 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phoupasong et al. (2015) ทำการคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดี โดยคัดแยกจากถั่วเน่าหรือถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองทางภาคเหนือของไทย ที่พบว่า มี 28 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยมี 5 สายพันธุ์ที่ผลิตโปรติเอสได้มากที่สุด โดยมีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าพื้นบ้าน จังหวัดแพร่

ไอโซเลต	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี
TN01	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงตัวกลุ่มจากการแบ่งเซลล์	สีเหลือง ขอบนูน เงา
TN02	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN03	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงตัวกลุ่มจากการแบ่งเซลล์	สีเหลือง ขอบนูน เงา
TN04	มีรูปร่างกลม แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว	เทาใส ขอบเรียบ เงา
TN05	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงตัวกลุ่มจากการแบ่งเซลล์	สีเหลือง ขอบนูน เงา
TN06	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงตัวกลุ่มจากการแบ่งเซลล์	สีเหลือง ขอบนูน เงา
TN07	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงเซลล์เป็นกลุ่มจำนวนหลายเซลล์	ขาวเหลือง ขอบเรียบ มันวาว
TN08	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN09	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN10	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN11	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN12	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN13	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN14	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงเซลล์เป็นกลุ่มจำนวนหลายเซลล์	ขาวเหลือง ขอบเรียบ มันวาว
TN15	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงตัวกลุ่มจากการแบ่งเซลล์	สีเหลือง ขอบนูน เงา
TN16	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN17	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN18	มีรูปร่างกลม แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว	เทาใส ขอบเรียบ เงา
TN19	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงา
TN20	มีรูปร่างกลม แกรมบวก เรียงเซลล์เป็นกลุ่มจำนวนหลายเซลล์	ขาวเหลือง ขอบเรียบ มันวาว

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลต	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี
TN21	มีรูปร่างกลม แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว	เทาใส ขอบเรียบ เงาม
TN22	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN23	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบเรียบ เงาม
TN24	มีรูปร่างแท่ง แกรมบวก เซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น	ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ด้าน
TN25	มีรูปร่างกลม แกรมบวก การเรียงเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว	เทาใส ขอบเรียบ เงาม

2. ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis: DH)

ผลการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตต่อค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมัก 7 วัน (ตารางที่ 2) พบว่า ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดอยู่ที่ 20.70 ± 0.56 เปอร์เซ็นต์ โดยการย่อยด้วยเชื้อไอโซเลต TN23 และ รองลงมาคือ TN17 ที่มีค่าการย่อยสลายอยู่ที่ระดับ 19.13 ± 2.20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ เชื้อ TN04 ให้ค่าระดับการย่อยสลายต่ำสุดที่ 3.70 ± 1.49 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พบว่าเชื้อแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการสลายโปรตีนต่างกัน ($p \leq 0.05$) ถึงแม้จะใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตถั่วเน่าเหมือนกัน แต่ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของถั่วเหลืองให้เป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าจะเป็นการหมักแบบร่วม (Mixed culture) ที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดทำหน้าที่ในการย่อยสลายสเตรทต่างกัน และจากการศึกษาการย่อยสลายพบว่าระดับการย่อยสลายที่ 20 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ (Oladejo et al., 2020)

ตารางที่ 2 ผลของชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อค่าระดับการย่อยสลาย (%) ของโปรตีนถั่วเหลือง

Isolate	DH $\pm$ S.D. (%)*	Isolate	DH $\pm$ S.D. (%)*
TN01	12.33 ± 1.53^g	TN09	14.30 ± 2.14^{defg}
TN02	15.50 ± 1.32^{cdef}	TN10	14.50 ± 0.50^{cdefg}
TN03	13.73 ± 2.05^{efg}	TN11	14.90 ± 2.53^{cedfg}
TN04	3.70 ± 1.49^i	TN12	15.50 ± 1.61^{cdef}
TN05	14.60 ± 1.64^{cdefg}	TN13	4.77 ± 1.64^{hi}
TN06	16.27 ± 1.97^{bcde}	TN14	15.77 ± 1.57^{cdef}
TN07	13.80 ± 1.71^{efg}	TN15	12.07 ± 1.79^g
TN08	15.77 ± 1.57^{cdef}	TN16	16.87 ± 1.03^{bcde}

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolate	DH $\pm$ S.D. (%) [*]	Isolate	DH $\pm$ S.D. (%) [*]
TN17	19.13 $\pm$ 2.20 ^{ab}	TN22	17.53 $\pm$ 1.98 ^{bc}
TN18	14.70 $\pm$ 1.95 ^{cdefg}	TN23	20.70 $\pm$ 0.56 ^a
TN19	15.60 $\pm$ 0.36 ^{cdef}	TN24	17.43 $\pm$ 0.51 ^{bcd}
TN20	6.73 $\pm$ 1.65 ^h	TN25	12.87 $\pm$ 1.69 ^{fg}
TN21	16.93 $\pm$ 1.22 ^{bcde}		

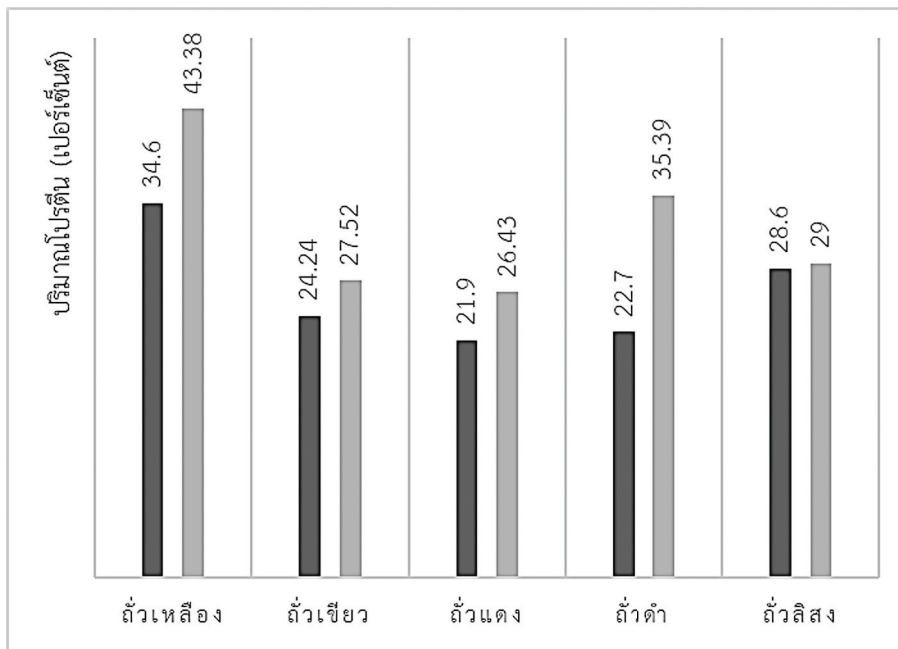
^{*}หมายเหตุ : ตัวอักษร a – i ในแนวคอลัมน์ แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan, s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เมื่อทำการจำแนกชนิดแบคทีเรีย ไอโซเลต TN23 ที่ให้ค่าการย่อยสลายสูงสุด ด้วยเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในระบบแมสสเปกโทรเมตรีชนิด MALDI-TOF ณ ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย พบว่า เชื้อแบคทีเรีย TN23 เป็นเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งสอดคล้องกับการบ่งชี้เบื้องต้นจากลักษณะโคโลนี และการย้อมสีแกรม

ในการคัดแยกเชื้อจากถั่วเน่าพื้นบ้าน ทำให้พบว่านอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่ทำหน้าที่หลักในกระบวนการหมักแล้ว ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นที่เจริญเติบโตร่วมด้วย ซึ่งเป็นแบคทีเรียในธรรมชาติ (Chukeatirote et al., 2011) และเมื่อพิจารณาจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์โปรตีนในถั่วเหลืองได้ดีที่สุด พบว่า *Lactobacillus lactis* TN23 มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์โปรตีนได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Lactobacillus* ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเหลือง ส่งผลให้เกิดกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก และมีผลต่อการเกิดกลิ่นรสของโปรตีนด้วย (Aguirre et al., 2008)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด หลังจากการหมักถั่วแต่ละชนิดด้วยเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น โดยถั่วดำจะมีการเพิ่มปริมาณโปรตีนสูงสุด โดยมีปริมาณโปรตีนหลังการหมัก 35.39 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นโปรตีนเพิ่มขึ้น 12.69 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ถั่วเหลือง ถั่วแดง และถั่วเขียว ในขณะที่ถั่วลิสงมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด โดยเพิ่มขึ้นเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) เนื่องจากโครงสร้างโปรตีนในถั่วลิสงจะสามารถย่อยสลายได้ดีด้วยเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (Zhang et al., 2022)



ภาพที่ 1 ปริมาณโปรตีนของถั่วแต่ละชนิด ก่อนและหลังกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (■ ก่อนกระบวนการหมัก ■ หลังกระบวนการหมัก)

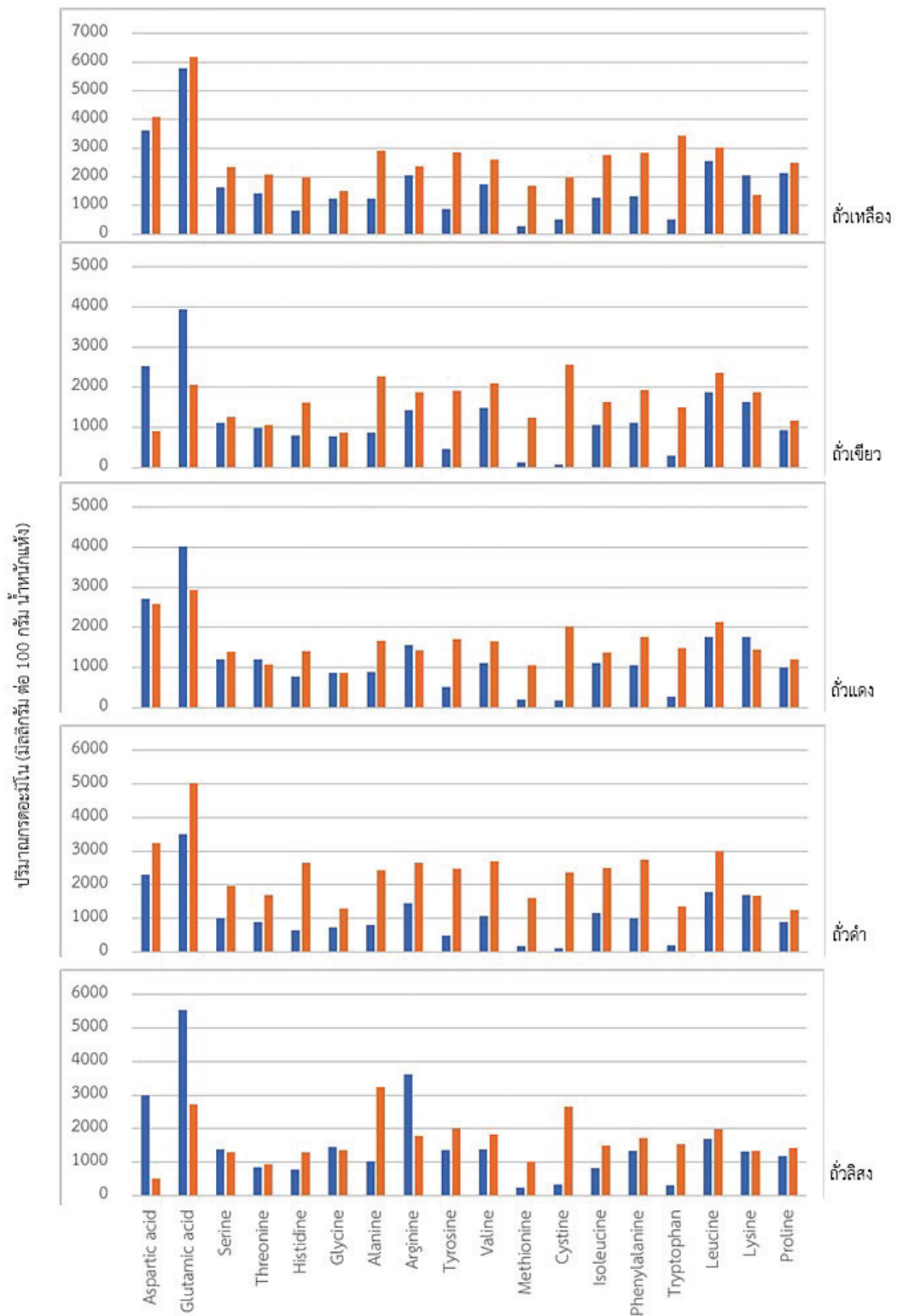
ดังนั้นกระบวนการหมักถั่วด้วยกระบวนการทางจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในถั่วชนิดต่าง ๆ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีหนึ่งในการผลิตไฮโดรไลเสตโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส หรือเรียกว่าวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันเพื่อปรับปรุงสมบัติของโปรตีน ทั้งนี้กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะต่อชนิดของโปรตีนสูง สภาวะการผลิตที่ไม่รุนแรง และสามารถควบคุมระดับการย่อยได้ ส่งผลให้วิธีนี้มีอัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี ที่ใช้กรดและด่าง (López-Barrios et al., 2014)

นอกจากนั้นเมื่อนำเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 มาทำการหมักร่วมกับถั่วชนิดต่าง ๆ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีกลิ่นถั่วเน่าที่เกิดจากการหมักด้วย *Bacillus* ที่ผลิตแอมโมเนียเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมัก (Chukeatirote et al., 2011) แต่ผลิตภัณฑ์จะมีกลิ่นของกรดแลคติกอ่อน ๆ แทน ซึ่งเมื่อนำมาอบแห้งและบดเป็นผงแล้วกลิ่นแลคติกก็หายไป ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นคล้ายถั่วแต่ละชนิดมากกว่าการหมักด้วย *Bacillus*

4. ผลการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน พบว่า ถั่วดำ มีปริมาณกรดอะมิโนทุกชนิดเพิ่มสูงขึ้น หลังกระบวนการหมัก และถั่วทุกชนิดที่ผ่านกระบวนการหมัก พบว่ามีกรดอะมิโนจำเป็นเพิ่มขึ้นทุกชนิด ยกเว้น Lysine โดยถั่วเหลืองหมักพบ Lysine มีปริมาณลดลง 32 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือถั่วแดงหมัก และถั่วดำหมัก ที่มีปริมาณ Lysine ลดลง 17.50 เปอร์เซ็นต์ และ 2.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นในกลุ่ม Aspartic acid และ Glutamic acid ลดลงเมื่อผ่านกระบวนการหมักในถั่วแดงที่ 4.75 เปอร์เซ็นต์ และ 26.70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เช่นเดียวกับถั่วเขียวหมัก และถั่วลิสงหมัก ในขณะที่ในถั่วลิสงหมักยังมีปริมาณของ Arginine ลดลงด้วย (ภาพที่ 2)

ในส่วนของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ พบว่า มีกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในถั่วดำ เมื่อทำการไฮโดรไลเสตด้วยกระบวนการหมักพบว่า มีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นทุกชนิด และมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นถึง 12.69 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณรวมของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหลังกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* TN23 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีผลต่อการเพิ่มและลดของกรดอะมิโนแต่ละชนิด ดังนั้นถั่วที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตคือ ถั่วดำ ถั่วเหลือง และถั่วแดงตามลำดับ โดยมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าการรับประทานแบบไม่ผ่านกระบวนการหมัก ในขณะที่ปริมาณ Lysine ที่ลดลง 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อรสขมที่ลดลงด้วย (Chukeatirote et al., 2011) และปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นสำหรับผู้สูงอายุ ได้แก่ Tryptophan ในถั่วดำที่ผ่านกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้น 6.70 เท่าเมื่อเทียบกับถั่วดำที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ส่งผลช่วยให้หลับได้ง่าย ในขณะที่ปริมาณ Threonine ในถั่วดำหมักเพิ่มขึ้น 2 เท่า ทำให้เกิดการเผาผลาญไขมันได้ดีขึ้น นอกจากนั้นยังปริมาณ Leucine และ Valine ในถั่วดำหมักเพิ่มขึ้น 1.70 เท่า และ 2.55 เท่า ตามลำดับ โดยทั้ง Leucine และ Valine มีคุณสมบัติช่วยเรื่องของระบบประสาทเพิ่มสูงขึ้น (Julmanlik & Kongruang, 2019) นอกจากนั้นถั่วดำหมักยังมีปริมาณ Methionine เพิ่มขึ้น 9 เท่า ที่เป็นสารตั้งต้นกรดอะมิโนหลายชนิดที่ร่างกายต้องใช้ในการสังเคราะห์ (Canfield et al., 2019) โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนแตกต่างกันในถั่วแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในถั่วแต่ละชนิด โดยถั่วที่มีองค์ประกอบของโปรตีนเป็น กรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันไม่มีขั้ว และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ได้แก่ Glycine Alanine Valine Leucine Isoleucine และ Proline เป็นจำนวนมาก ก็จะทำให้ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ยาก ส่งผลให้ถั่วลิสงที่มีไขมันสูงมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนต่ำที่สุด ในขณะที่เดียวกันบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ก็มีผลเฉพาะเจาะจงกับซับสเตรท ทำให้เกิดการแยกตัวของกรดอะมิโนอิสระต่างกันในแต่ละชนิด (Zhang et al., 2022) ซึ่งกรดอะมิโนที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ามีปริมาณที่สูงขึ้นหลังจากผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยวิธีการหมักด้วยแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* TN23 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 โปรไฟล์กรดอะมิโนของข้าวแต่ละชนิด ก่อนและหลังกระบวนการหมัก

ด้วยเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (■ ก่อนกระบวนการหมัก ■ หลังกระบวนการหมัก)

สรุป

ดังนั้นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วชนิดต่าง ๆ ด้วยกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 ที่แยกได้จากถั่วเน่าแผ่นพื้นบ้าน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้ได้ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นสูงขึ้นในถั่วทุกชนิด รวมถึงปริมาณโปรตีนที่สูงขึ้นด้วย และด้วยปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นทำให้ความเป็นไปได้สูงในการนำผงโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วด้วยกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus lactis* TN23 สามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ให้ผู้สูงวัยได้

กิตติกรรมประกาศ

ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม สำหรับทุนวิจัยประจำปี 2565 และขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ และนายคงศิริ มั่นคง นักวิจัยโครงการในการประสานงานส่งตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- Aguirre, L., Garro, M.S., & de Giori, G.S. (2008). Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, **111**, 976–982
- Canfield, C.A., Patrick, C., & Bradshaw, B. (2019). Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. **Translational Medicine of Aging**, **3**(1), 70-89.
- Carthy, M.A.L., Callaghan, O.Y.C., Piggott, C.O., Gerald, F.R.J., & Brien, O.N.M. (2013). Brewers spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. **Proceedings of the Nutrition Society**, **72**(1), 117-125.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, **245**(1), 205-222.
- Chukeatirote, E., In-khian, S., Dajanta, K., & Apichartsrangkoon, A. (2011). Thua Nao – An indigenous fermented soybean of Thailand. **Srinakharinwirot Science Journal**, **27**(1), 197-213.
- Julmanlik, T. & Kongruang, S. (2019). Functional properties and applications of egg white protein hydrolysates. **Journal of Food Technology, Siam University**, **14**(1), 69-87. (In-Thai).
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J.A., & Serna-Saldívar, S.O. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. **Journal of Food Science**, **79**(3), 273-283.
- Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis, **LWT - Food Science and Technology**, **40**(7), 1215-1223.

- Latimer, G.W. (2012). **Official methods of analysis of AOAC International**. (19th edition). Gaithersburg, Maryland. AOAC International.
- Nissen, A.J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **27**(6), 1256–1262.
- Oladejo, T.C., Olaniya, O.O., Ayodejib, A.O., & Akinyele, B.J. (2020). Protease produced by *Lactobacillus brevis* enhanced nutritional values of African yam beans and demonstrated improvement in the growth and blood indices of albino rats. **Heliyon**, **6**(1), 1-10.
- Phoupasong, O., Ketbot, P., Phoemsuk, K., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Ratanakhanokchai, K. & Waeonukul, R. (2015). Screening and isolation of bacteria from Thua-nao for improving nutritive values of fermented soybean meal in animal feed. **Agricultural Science Journal**, **46**(3), 273-276.
- Thongsuk, T. (2019). Dietary behavior of the elderly on era 4.0. **Journal of Humanities and Social Sciences, Rajapruk University**, **5**(3), 232-244. (In-Thai).
- Zhang, L., Sun, X., Lu, X., Wei, S., Sun, O., Jin, L., Song, G., You, J., & Li, F. (2022). Characterization of peanut protein hydrolysate and structural identification of umami-enhancing peptides. **Molecules**, **27**, 2853. <https://doi.org/10.3390/molecules27092853>.

