

การเชื่อมประสานของแอคโตไมโอซินธรรมชาติ โดยการเติมสารสกัดจากใบพืช

Cross-linking of Natural Actomyosin by the Addition of Plants Leaf Extract

ปารมี สงชัย และวรางคณา สมพงษ์*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Paramee Songkhai and Warangkana Sompongse*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University, Rangsit Center, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแทนนินของสารสกัดจากใบพืช 10 ชนิด ได้แก่ กุยช่าย (*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng) บรอกโคลี (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) บัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urban] ตำลึง [*Coccinia grandis* (L.) Voigt] ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) ยอ (*Morinda citrifolia* L.) โหระพา (*Ocimum basilicum* L.) กะเพราแดง (*Ocimum tenuiflorum* L.) ผักแพว [*Persicaria odorata* (Lour.) Soják] และย่านาง [*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels] และนำสารสกัดจากใบพืชที่มีปริมาณแทนนินมากที่สุดไปศึกษาการเชื่อมประสานของแอคโตไมโอซินธรรมชาติ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแทนนิน 26.29-197.86 และ 10.03-171.77 มิลลิกรัม gallic acid/กรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ โดยผักแพวมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและแทนนินสูงที่สุดเท่ากับ 197.86 และ 171.77 มิลลิกรัม gallic acid/กรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากพืชที่ผ่านการออกซิไดซ์มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณแทนนินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชที่ไม่ผ่านการออกซิไดซ์ เมื่อเติมสารสกัดจากใบพืช 4 ชนิด ที่ผ่านการออกซิไดซ์แล้ว มีปริมาณแทนนินสูงที่สุดได้แก่ ผักแพว กะเพราแดง บัวบก และชะมวง ร้อยละ 0-10 ของปริมาณโปรตีน ลงในแอคโตไมโอซินธรรมชาติ (natural actomyosin, NAM) ที่สกัดจากชูริมิปลาเกียซี (*Mulloidichthys martinicus*) พบว่าการเติมสารสกัดในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ทำให้ NAM มีปริมาณของหมู่ sulphhydryl ทั้งหมด และค่า surface hydrophobicity ที่ลดลง ($p < 0.05$) การศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนโดย SDS-PAGE พบว่าแถบไมโอซินสายหนักมีความเข้มลดลง และพบแถบของโปรตีนที่เกิดการรวมตัวกันมากขึ้น การเติมสารสกัดจากผักแพวที่ถูกออกซิไดซ์ลงใน NAM จากชูริมิปลาเกียซีมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าการเติมสารสกัดจากกะเพราแดง

คำสำคัญ : สารประกอบฟีนอลิก; แทนนิน; การเชื่อมประสาน; แอกโตไมโอซินธรรมชาติ; ปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมด; ค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิว

Abstract

The objectives of this study was to analyzed total phenolic and tannin content of 10 plants leaf extract, that were Chinese chives (*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng), Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), Asiatic pennywort [*Centella asiatica* (L.) Urban], Ivy gourd (*Coccinia grandis* (L.) Voigt), Cowa (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.), Noni (*Morinda citrifolia* L.), Thai basil (*Ocimum basilicum* L.), Holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.), Vietnamese coriander [*Persicaria odorata* (Lour.) Soják] and Yanang [*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels]. Then, cross-linking of natural actomyosin by addition of plants leaf extract with the highest tannin content was investigated. The result was expressed that the total phenolic and tannin content ranged from 26.29-197.86 mg gallic acid/g dry sample and 10.03-171.77 mg gallic acid/g dry sample, respectively. The highest total phenolic and tannin content were found in Vietnamese coriander, those were 197.86 and 171.77 mg gallic acid/g dry sample, respectively. In addition, the decrease in total phenolic and tannin content were observed in the oxidized plants extract when compared with the sample without oxidation ($p \leq 0.05$). Four plants leaf extract with the highest tannin content; Vietnamese coriander, Holy basil, Asiatic pennywort and Cowa were added at 0-10 % by protein content; into natural actomyosin (NAM) from goatfish (*Mulloidichthys martinicus*) surimi. It was found that the decrease in total sulphydryl group content and surface hydrophobicity ($p \leq 0.05$) were occurred with the higher concentration of the extract. Investigation of protein subunit by SDS-PAGE revealed that the intensity of myosin heavy chain (MHC) band was decreased accompanying with the polymerized protein band. Moreover, the addition of oxidized Vietnamese coriander leaf extract into NAM from goatfish surimi could increase a cross-linking of myofibrillar protein effectively with the lower concentration than that of the extract from Holy basil.

Keywords: phenolic compound; tannin; cross-linking; natural actomyosin; total sulphydryl groups; surface hydrophobicity

1. บทนำ

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารชีวภาพที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในพืชผัก (phytonutrients) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของผัก โดยสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผัก คือ สารประเภท

hydroxycinnamic acid ได้แก่ caffeic acid และ chlorogenic acid ที่เกิดจากการรวมกันของ caffeic acid และ quinic acid นอกจากนี้ยังประกอบด้วย flavonols ได้แก่ quercetin และ rutin [1] สารประกอบฟีนอลิกโดยส่วนใหญ่มีหมู่ hydroxyl อยู่

ตำแหน่ง *ortho* ของวงแหวนอะโรมาติก เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่าง *ortho*-quinone กับโปรตีน จึงทำให้โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนมีความแข็งแรง โมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกมีความไวต่อการถูกออกซิไดซ์ กลายเป็น *ortho*-quinone โดยการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืช หรือโดยโมเลกุลของออกซิเจน นอกจากนี้ quinone ที่เกิดขึ้นในสายเดียวกันยังสามารถเกิดพันธะต่อกัน และทำให้เกิดการเชื่อมประสานขึ้น (cross-linking) [2]

ซูริมิ (Surimi) เป็นภาษาญี่ปุ่นที่ใช้เรียกเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้างด้วยน้ำ แล้วเติมสารที่ช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น คามา-โบโกะ ไส้กรอก เต้าหู้ปลา ลูกชิ้น และปูเทียม [3] ความสามารถในการเกิดเจลเป็นหนึ่งในคุณลักษณะที่สำคัญของซูริมิ โดยได้รับผลมาจากปัจจัยภายใน และภายนอก เช่น ชนิดของปลา ความสด เอนไซม์ภายใน สารเติมแต่งตลอดจนกระบวนการผลิต โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลัก และเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเกิดเจล ได้แก่ โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ โดยในระหว่างการเซตตัวของเพสซูริมิที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 °C โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการจับกันเป็นโครงข่าย เนื่องจากเกิดการเชื่อมประสานกันด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสภายใน (endogenous transglutaminase, TGase) นอกจากนี้โปรตีนยังเกิดการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulphide พันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก [4] แต่เนื่องจากโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของซูริมียังคงถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสภายในกล้ามเนื้อปลา จึงทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนส่งผลต่อคุณภาพของเจลซูริมิ [5] มีการนำสารเติมแต่งประเภทโปรตีนมาใช้เพื่อช่วยลดการอ่อนตัวของเจลที่เกิดจากเอนไซม์ โปรติเอสภายใน อย่างไรก็ตาม การเติมสารเติมแต่งบาง

ชนิดนั้นส่งผลเสียต่อเจลของซูริมิ เช่น การเกิดกลิ่นหรือสีที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นจึงมีความต้องการในการหาสารเติมแต่งที่สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพให้กับเจลของเนื้อปลา โดยไม่มีผลเสียต่อเจลซูริมิ ทั้งนี้มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้สารประกอบฟีนอลิกอย่างกว้างขวาง โดยอันตรกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตอาหารบางชนิด มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidised phenolic compound) ลงในซูริมิจากปลาแมคเคอเรลและปลาตาหวาน [6-8] พบว่าสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการเชื่อมประสานและเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เจลซูริมิ ได้ โดย oxidised tannic acid (OTA) ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติของเจลซูริมิได้ดีที่สุด ซึ่งในงานวิจัยได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในรูปของสารสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยหลายงานที่ได้ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบพืชชนิดต่าง ๆ เช่น บรอกโคลี กุยช่าย ย่านาง ใบบัวบก และใบกะเพราแดง [9,10] ซึ่งเป็นพืชผักของไทยที่มีราคาถูกและพบได้ทั่วไปตามท้องตลาด นอกจากนี้ยังมีพืชผักหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่มียอดข้อมูลด้านการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ชะมวง ผักแพว ใบยอ เป็นต้น อีกทั้งยังไม่มีมีการนำสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากพืชเหล่านี้ไปใช้ปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ซูริมิ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณแทนนินที่สกัดจากใบพืช และศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากใบพืชต่อการเชื่อมประสานของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อจากซูริมิปลาเกะ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

gallic acid (analytical grade), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 8-anilino-1-naphthalene-sulphonic acid (ANS) จาก Sigma (St. Louis, สหรัฐอเมริกา) Folin-Ciocalteu's phenol reagent จาก Merck (Darmstadt, เยอรมนี) sodium dodecyl sulphate (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethyl ethylene diamine (TEMED) และสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ electrophoresis จาก Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, สหรัฐอเมริกา)

พืชผักทั้ง 10 ชนิด ตามที่ระบุในตารางที่ 1 จากลานพืชผลการเกษตร ตลาดไท อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2558

ซูริมิแช่เยือกแข็งเกรด A จากปลาฉลาม (Mulloidichthys martinicus) จาก บริษัท อันตามันซู

ริมิ อินด์สทรี จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร และเก็บที่อุณหภูมิ -18 °C ก่อนนำมาใช้

2.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแทนนินที่สกัดจากใบพืช

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างใบพืช

นำตัวอย่างพืชมาล้างด้วยน้ำกรอง ผึ่งให้แห้ง และเด็ดส่วนที่นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง โดยมีปริมาณน้ำอิสระ (aw) ของผักหลังอบอยู่ในช่วง 0.5-0.6 จากนั้นนำพืชที่ผ่านการอบแห้งไปบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด ให้มีขนาด 40 mesh บรรจุลงตัวอย่างพืชในถุงลามิเนตอลูมิเนียมฟอยล์ที่มีไนลอนเป็นส่วนประกอบ นำไปปิดผนึกที่สภาวะสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับแสงสว่าง ก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 รายชื่อพืชและส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ (ไทย/อังกฤษ)	ส่วนที่นำมาใช้
<i>Allium tuberosum</i> Rottl. ex Spreng	กุยช่าย / Chinese chives	ส่วนกลางใบ
<i>Brassica oleracea</i> L. var. italica	บรอกโคลี / Broccoli	ดอก
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	บัวบก / Asiatic pennywort	ใบโตเต็มวัย
<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	ตำลึง / Ivy gourd	ใบโตเต็มวัย
<i>Garcinia cowa</i> Roxb. ex DC.	ชะมวง / Cowa	ใบโตเต็มวัย
<i>Morinda citrifolia</i> L.	ยอ / Noni	ใบโตเต็มวัย
<i>Ocimum basilicum</i> L.	โหระพา / Thai basil	ใบโตเต็มวัย
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	กะเพราแดง / Holy basil	ใบโตเต็มวัย
<i>Persicaria odorata</i> (Lour.) Soják	ผักแพว / Vietnamese coriander	ใบโตเต็มวัย
<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels	ย่านาง / Yanang	ใบโตเต็มวัย

2.2.2 การเตรียมสารสกัดจากใบพืช

นำผงตัวอย่างพืชที่เตรียมไว้มาสกัดตามวิธีการของ Ismail และคณะ [9] ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อย ผสมผงตัวอย่างพืชปริมาณ 5 กรัม กับ 70 %

(v/v) เอทานอล 100 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างที่ผ่านการเขย่ามากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1 จากนั้นนำ

สารละลายไปกำจัดเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (EYELA, SB-650, Japan) ก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.2.3 การเตรียมสารละลายสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์

นำตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากใบพืชจากข้อ 2.2.2 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามวิธีการของ Strauss และ Gibson [2] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำสารละลายฟีนอลิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปปรับ pH ให้เท่ากับ 8 โดยใช้ 6 M NaOH หรือ 6 M HCl ควบคุมสารละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 °C และเติมก๊าซออกซิเจนให้กับสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7 โดยใช้ 6 M HCl ทำหีสารสกัดด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (FTS SYSTEMS, USA) บรรจุตัวอย่างในถุงลามิเนตอลูมิเนียมฟอยล์ที่มีไนลอนเป็นส่วนประกอบ นำไปปิดผนึกที่สภาวะสุญญากาศ และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -18 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) ตามวิธีการของ Singleton และ Rossi [11] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ ละลายสารประกอบฟีนอลิกจากใบพืชทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการออกซิไดซ์ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร หลังผ่านไป 4 นาที เติมน้ำกลั่น 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมใส่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 760 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง UV/visible spectrophotometer โดยตัวอย่าง blank ใช้ น้ำกลั่นแทนสารสกัดจากใบพืชและแสดงผลในรูปแบบมิลลิกรัมของ gallic acid (มิลลิกรัม GAE) ต่อ 1 กรัม ของน้ำหนักแห้ง (X)

2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

วิเคราะห์ปริมาณสารแทนนิน (tannin content) ตามวิธีการดัดแปลงจาก FAO [12] ดังนี้ เติมน้ำกลั่น poly(vinyl polypyrrolidone) (PVPP) ปริมาตร 100 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารสกัดจากใบพืชทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการออกซิไดซ์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 x g เป็นเวลา 10 นาที (TOMY, MX-305, Japan) เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธีตามข้อ 2.2.4 (Y) และคำนวณหาปริมาณของสารแทนนิน (X-Y)

2.3 การศึกษาการเชื่อมประสานของ NAM จากซูริมิปลาถาซีโดยใช้สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากใบพืช

2.3.1 การเตรียมแอคโตไมโอซินธรรมชาติ

เตรียมแอคโตไมโอซินธรรมชาติ (NAM, natural actomyosin) ตามวิธีการของ Benjakul และคณะ [13] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำซูริมิ 10 กรัม มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ 0.6 M NaCl-phosphate buffer (pH 7.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 นาที โดยใช้ homogenizer (Nissei, AM-8, Japan) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำเย็นลงไป 3 เท่า ของสารละลายส่วนใส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโดยการคนในสารละลายเย็นที่มีปริมาตรเท่ากันของ 0.6 M NaCl-phosphate buffer (pH 7.5) อุณหภูมิ 4 °C

เป็นเวลา 30 นาที

2.3.2 การเติมสารประกอบฟีนอลิกลงใน NAM

นำ NAM ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากพืชที่คัดเลือกไว้จากการทดลองที่ 2.2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยปริมาณโปรตีน หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 90 °C เป็นเวลา 20 นาที ทำตัวอย่างให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในน้ำผสมน้ำแข็งและนำไปวิเคราะห์ต่อไป [7]

2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีการของ Lowry และคณะ [14]

2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมด (total sulphydryl group content) ในสารละลาย NAM โดยใช้ 5,5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB) ตามวิธีของ Sompongse และคณะ [15] ดังนี้ นำสารละลาย NAM (4.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเติม 0.2M Tris-HCl buffer, pH 6.8 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 8 M urea, 2 % SDS และ 10 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) จากนั้นนำสารผสมที่ได้ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร มาเติม 0.1 % DTNB ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่ 40 °C เป็นเวลา 25 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร เตรียมสารละลาย blank 1 และ 2 ด้วยวิธีเดียวกันยกเว้นสารละลาย blank 1 แทนที่ตัวอย่างด้วย 0.6 M NaCl phosphate buffer (pH 7.5) และ blank 2 แทนที่ 0.1%DTNBด้วย8Murea,2%SDSและ10mMEDTA

2.3.5 การวิเคราะห์ค่า surface hydropho-

bicity

วิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity ตามวิธีการของ Liang และ Tang [16] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างที่แตกต่างกันไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 0.004, 0.008, 0.016 และ 0.2 % (w/v) โดยใช้ 0.6 M NaCl-phosphate buffer (pH 7.5) เติม 8 mM 8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid (ANS) ที่ละลายใน 0.6 M NaCl-phosphate buffer (pH 7.5) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในสารละลายโปรตีน (1 มิลลิลิตร) วัดความเข้มแสง fluorescence ที่ความยาวคลื่นในช่วง exciting state 374 นาโนเมตร และความยาวคลื่นในช่วง emission 485 นาโนเมตร เตรียมตัวอย่าง blank สำหรับทุกตัวอย่างที่ประกอบด้วยปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยเติม 0.6 M NaCl-phosphate buffer (pH 7.5) แทนสารละลาย ANS ความเข้มของแสง fluorescence สุทธิของสารละลายโปรตีนในแต่ละความเข้มข้นได้จากการลบตัวอย่าง blank ออกไป ความชันของกราฟที่มาจากกราฟ plot ระหว่างความเข้มแสง fluorescence กับความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างเรียกว่า SoANS

2.3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนด้วยวิธีการ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

วิเคราะห์องค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli [17] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำตัวอย่าง NAM ผสมกับสารละลาย sample buffer (น้ำกลั่น 1.9 มิลลิลิตร, 10 % SDS 0.8 มิลลิลิตร, glycerol 0.4 มิลลิลิตร, β-mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.5 มิลลิลิตร และ 1 % (w/v) bromophenol blue 0.2 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C

เป็นเวลา 3 นาที ทำให้อตัวอย่างเย็นลงในน้ำผสมน้ำแข็ง จากนั้นเตรียมตัวอย่างในสภาวะ reduced และ unreduced เดิมตัวอย่าง 15 ไมโครลิตร ลงบนเจล polyacrylamide ซึ่งเตรียมจาก 10 % running gel และ 4 % stacking gel และนำไปทำ electrophoresis ที่กระแสคงที่ 20 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 1 แผ่น โดยใช้เครื่อง Mini Protein II unit (Bio-Rad, MiniProtein®, USA) หลังจากการแยก ย้อมโปรตีนด้วย 0.25 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 ใน 25 % (v/v) methanol และ 10 % (v/v) acetic acid และล้างสี ย้อมออกด้วย 25 % (v/v) methanol และ 10 % (v/v) acetic acid

2.4 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA (analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณแทนนินที่สกัดจากใบพืช

3.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ผ่านและไม่ผ่านการออกซิไดซ์แสดงในตารางที่ 2 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากพืชที่ไม่ผ่านการออกซิไดซ์นั้น อยู่ในช่วง 26.29-197.86 มิลลิกรัม gallic acid/กรัมตัวอย่าง โดยสารสกัดจากพืชที่มี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด คือ ผักแพว รองลงมา ได้แก่ กะเพราแดง บัวบก ตำลึง ชะมวง โหระพาย่านาง ยอ บรอกโคลี และกุยช่าย ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย สารสกัดสมุนไพรที่ใช้น้ำในการสกัด ได้แก่ ตำลึง กะเพรา โหระพา บัวบก ชะมวง และมะแว้งนั้น มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 38.48-75.26 มิลลิกรัม gallic acid/กรัมตัวอย่างแห้ง [10] นอกจากนี้การศึกษากว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกหลักที่พบในผักที่นิยมบริโภคในประเทศไทยของ [18] พบว่าผักชี กุยช่าย และผักกวางตุ้งนั้น มีปริมาณของ gallic acid 3.82-11.54 มิลลิกรัม/100 กรัมตัวอย่างสด ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับตัวอย่างพืชชนิดอื่น ๆ

เมื่อพิจารณาปริมาณของสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดจากพืชทุกชนิดที่ใช้ศึกษา ซึ่งผ่านการออกซิไดซ์ พบว่าปริมาณของสาร ประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการออกซิไดซ์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกบางส่วนภายหลังการถูกออกซิไดซ์ด้วยแก๊สออกซิเจน ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Strauss และ Gibson [2] ที่อธิบายว่าบางส่วนของ diphenol ของกรดฟีนอลิกหรือสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ มักถูกออกซิไดซ์เป็น ortho-quinone ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืชหรือจากโมเลกุลของออกซิเจนได้ การเติมออกซิเจนภายใต้สภาวะเบสนั้น สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บริเวณวงแหวนของฟีนอลิก ซึ่งนำไปสู่การเกิด quinone [6,19] โดยการเปลี่ยนแปลงนั้นจะส่งผลต่อการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

ซึ่งทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เมื่อผ่านการออกซิไดซ์มีค่าลดลงด้วย

3.1.2 ปริมาณแทนนิน

ปริมาณแทนนิน (tannin content) ของตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ผ่านและไม่ผ่านการออกซิไดซ์แสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ไม่ผ่านการออกซิไดซ์นั้นมีปริมาณแทนนินอยู่ในช่วง 10.03-171.77 มิลลิกรัม

gallic acid/กรัมตัวอย่าง โดยตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่มีปริมาณแทนนินสูงที่สุดคือ ผักแพว รองลงมา ได้แก่ กะเพราแดง บัวบก ชะมวง โหระพา ตำลึง ยอ ย่านาง บรอกโคลี และกุยช่าย ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากผักแพวและกุยช่าย ซึ่งมีค่าสูงที่สุดและต่ำที่สุด ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่า total phenolic compound (TPC) และ tannin content ของตัวอย่างสารสกัดจากพืช 10 ชนิด ที่ผ่านและไม่ผ่านการ oxidation

ชื่อพืช	Total phenolic compound (TPC) (mg GAE/g DW)		Tannin content (mg GAE/g DW)	
	non-oxidation	oxidation	non-oxidation	oxidation
กุยช่าย	26.29±5.48 ^g	23.05±1.83 ^e	10.03±4.73 ^e	6.01±3.48 ^e
บรอกโคลี	41.04±1.31 ^{ef}	38.23±2.32 ^{de}	24.70±1.48 ^{de}	22.27±2.03 ^{de}
บัวบก	79.23±22.48 ^c	59.30±31.43 ^d	67.49±19.92 ^c	45.70±32.6 ^c
ตำลึง	77.08±24.6 ^{cd}	64.12±20.5 ^c	44.48±17.05 ^{cd}	35.76±14.53 ^d
ชะมวง	63.70±22.25 ^{cde}	50.29±15.79 ^{de}	57.60±20.67 ^c	42.18±13.37 ^d
ยอ	43.61±5.13 ^{ef}	42.20±1.55 ^{de}	27.26±3.54 ^{de}	25.19±0.34 ^{de}
โหระพา	61.17±10.85 ^{cde}	50.45±11.14 ^{de}	46.97±9.43 ^{cd}	31.30±3.77 ^{de}
กะเพราแดง	119.47±18.97 ^b	115.49±18.02 ^b	98.74±18.68 ^b	93.77±18.28 ^b
ผักแพว	197.86±3.15 ^a	170.18±16.09 ^a	171.77±3.30 ^a	127.27±8.66 ^a
ย่านาง	51.31±2.65 ^{def}	46.30±3.94 ^{de}	26.94±0.54 ^{de}	25.88±5.22 ^{de}

แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

a, b, ... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาปริมาณแทนนินของตัวอย่างสารสกัดจากพืชที่ผ่านการออกซิไดซ์ พบว่าปริมาณแทนนินนั้นมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสารสกัดที่ไม่ผ่านการออกซิไดซ์ แทนนินเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณที่มากพอ

และหมู่อื่น ๆ ที่มีความเหมาะสม (เช่น คาร์บอกซิล) ต่อการเกิดองค์ประกอบที่มีความแข็งแรงกับโปรตีน [20] สารประกอบฟีนอลิกอาจถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายในสารละลายต่าง โดยกลายเป็น quinone [21] ดังนั้นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร จึงมีค่าลดลง ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเช่นเดียวกัน จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินในพืช 10 ชนิด พบว่าสารสกัดจากพืช 4 ชนิดที่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ ผักแพว กะเพราแดง บัวบก และชะมวง มีปริมาณของแทนนินมากที่สุด จึงนำสารสกัดดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป

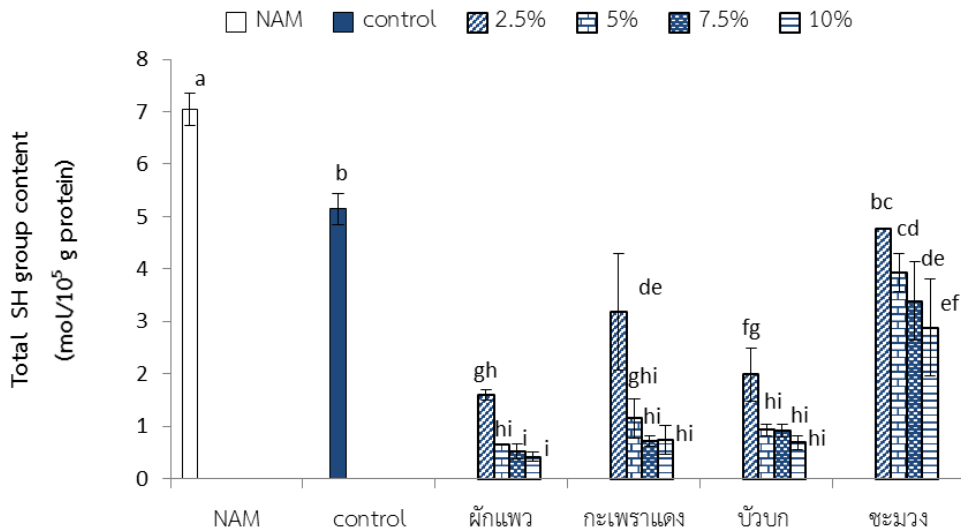
3.2 การศึกษาการเชื่อมประสานของ NAM โดยใช้สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช

3.2.1 ปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมด (total sulphydryl group content)

ปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมดของ NAM จากซูริมิปลาภาษีที่เติมสารประกอบฟีนอลิกซึ่งถูกออกซิไดซ์จากใบพืชที่ระดับต่างกัน แสดงในรูปที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า NAM ที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืชนั้น มีปริมาณของหมู่ sulphydryl น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (NAM ที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกซึ่งถูกออกซิไดซ์จากใบพืช) ($p < 0.05$) โดยตัวอย่าง NAM ที่ไม่ผ่านความร้อนนั้นมีปริมาณของหมู่ sulphydryl ที่มากกว่าตัวอย่างควบคุมที่ถูกให้ความร้อน ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะการให้ความร้อนกับ NAM ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที และ 90 °C เป็นเวลา 20 นาที อาจทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ sulphydryl เกิดได้ดีขึ้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Yazaki และ Collins [21] ที่กล่าวว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นอาจส่งผลอย่างมากต่อการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ sulphydryl ซึ่งทำให้เกิดพันธะ disulphide ตามมาโดยการลดลงของหมู่ sulphydryl มีสาเหตุมาจากการเกิดพันธะ disulphide โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ sulphydryl หรือการแลกเปลี่ยนพันธะ disulphide [22] เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช พบว่าปริมาณของหมู่ sulphydryl มีค่าลดลงเมื่อมีการเติม

สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืชในระดับที่มากขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันในทุกตัวอย่างพืช โดยการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากผักแพวทำให้ตัวอย่างมีปริมาณของหมู่ sulphydryl ที่น้อยที่สุดในทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา ($p < 0.05$) สารประกอบฟีนอลิกนั้นอาจมีความไวต่อการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งทำให้หมู่ sulphydryl ฝอยออกมาและสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ sulphydryl ของโปรตีนกับหมู่ OH ของสารประกอบฟีนอลิก หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ sulphydryl ได้ง่ายขึ้น ซึ่งเห็นจากการลดลงของปริมาณของหมู่ sulphydryl นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกซึ่งถูกออกซิไดซ์เมื่อกลายเป็น quinone สามารถเกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับหมู่ sulphydryl ซึ่งส่งผลให้ถูกบดบังด้วย quinone [2,7] จึงทำให้มีปริมาณของหมู่ sulphydryl ลดลง

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Prodpran และคณะ [23] ที่ศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ระดับต่างกันต่อปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมดของสารละลายฟิล์มจากโปรตีนเส้นใยถั่วเหลือง ที่แสดงให้เห็นว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกในระดับที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณของหมู่ sulphydryl มีค่าลดลงเช่นเดียวกัน ($p < 0.05$) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของหมู่ sulphydryl ทั้งหมดใน NAM มีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชดังกล่าว (ตารางที่ 2) โดยที่ผักแพวมีปริมาณของค่าทั้งสองสูงที่สุด ($p < 0.05$) จึงส่งผลให้ตัวอย่างที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากผักแพวนั้นมีปริมาณของหมู่ sulphydryl น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากใบพืชชนิดอื่น ๆ



รูปที่ 1 ปริมาณ total sulphydryl group ของ natural actomyosin จากซูริมิปลาถาซีที่เติมสารประกอบ ฟีนอลิกซึ่งถูกออกซิไดซ์จากใบพืช 4 ชนิด ที่ระดับต่างกัน โดย NAM: natural actomyosin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน และ control: NAM ที่ผ่านการให้ความร้อน และไม่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช บาร์แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

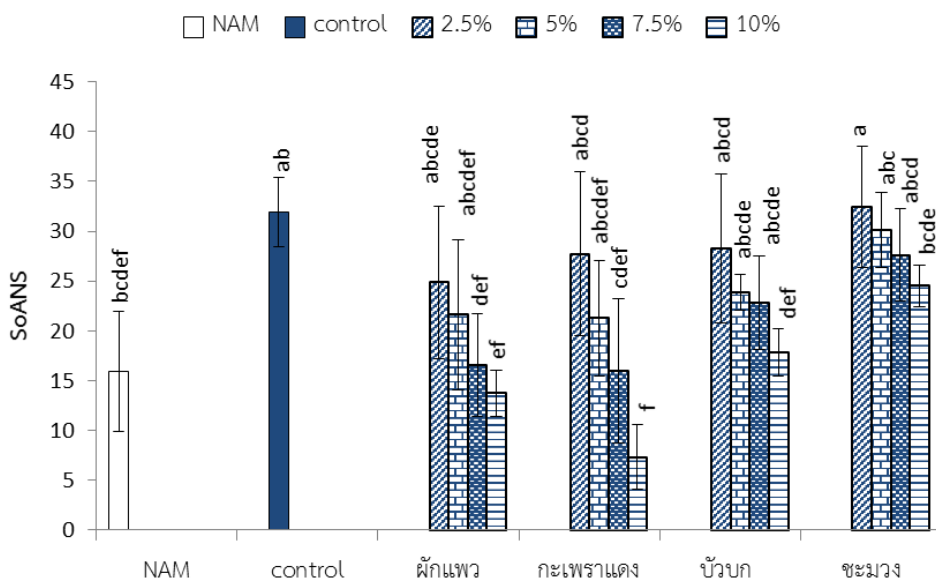
3.2.2 ค่า surface hydrophobicity

ค่า surface hydrophobicity (SoANS) ของ natural actomyosin (NAM) จากซูริมิปลาถาซีที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืชที่ระดับต่างกัน แสดงในรูปที่ 2 พบว่าตัวอย่าง NAM ที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืชนั้นมีค่า surface hydrophobicity ที่น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (NAM ที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช) ($p < 0.05$) โดยตัวอย่าง NAM ที่ไม่ผ่านความร้อนนั้นมีค่า surface hydrophobicity ที่น้อยกว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งถูกให้ความร้อน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความร้อนทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัว (unfolding) ทำให้มีการเผยหมู่ที่ไม่ใช่ขั้วออก มาภายนอกมากขึ้น ANS ทำหน้าที่จับกับกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ขั้ว ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ เช่น

phenylalanine และ tryptophan และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดค่า surface hydrophobicity ของโปรตีน [13] เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช พบว่าค่า surface hydrophobicity มีค่าลดลงเมื่อมีการเติมสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) การลดลงของค่า surface hydrophobicity นั้นได้มีการอธิบายไว้โดย [24] ซึ่งทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า surface hydrophobicity ในเจลลิตินที่ถูกดัดแปลงโดยการเติมสารประกอบฟีนอลิก และรายงานว่าเป็นผลมาจากการจับกันของ tannic acid กับเจลลิตินแล้วทำให้มีความชอบน้ำเพิ่มขึ้นที่บริเวณพื้นผิวโมเลกุลของเจลลิติน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ hydroxyl และ carboxyl ที่มีความชอบน้ำติดอยู่กับเจลลิติน นอกจากนั้นผลการทดลองที่ได้ยังมีความสอดคล้องกับการศึกษา

ของ [25] ที่ได้รายงานว่าการลดลงของค่า surface hydrophobicity ในโปรตีนถั่วเหลืองเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของอันตรกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์บริเวณที่ไม่มีซัลฟ์หรือส่วนที่เป็นวงแหวนของ tannic acid นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลฟ์ของเจลาติน เช่น

alanine, valine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, cysteine และ glycine residues โดยอันตรกิริยา hydrophobic ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลฟ์บริเวณผิวหน้าของโปรตีน [24]



รูปที่ 2 ค่า surface hydrophobicity (SoANS) ของ natural actomyosin จากซูริมิปลาถาซีที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกซึ่งถูกออกซิไดซ์จากใบพืช 4 ชนิด ที่ระดับต่างกัน โดย NAM: natural actomyosin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน และ control: NAM ที่ผ่านการให้ความร้อน และไม่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช บาร์แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์ที่สกัดจากผักแพวและกะเพราแดงใน NAM แล้วนำไปให้ความร้อน ทำให้ NAM มีปริมาณของหมู่ sulphhydryl ทั้งหมดและค่า surface hydrophobicity น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบพืชชนิดอื่น ๆ จึงนำตัวอย่างที่เติมสารประกอบฟีนอลิกจากพืชชนิดดังกล่าวที่ระดับ 2.5, 5 และ 10 (ร้อยละของปริมาณโปรตีนในซูริมิ) มาใช้ในการวิเคราะห์หองค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนต่อไป

3.2.3 องค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนของ natural actomyosin ที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืช

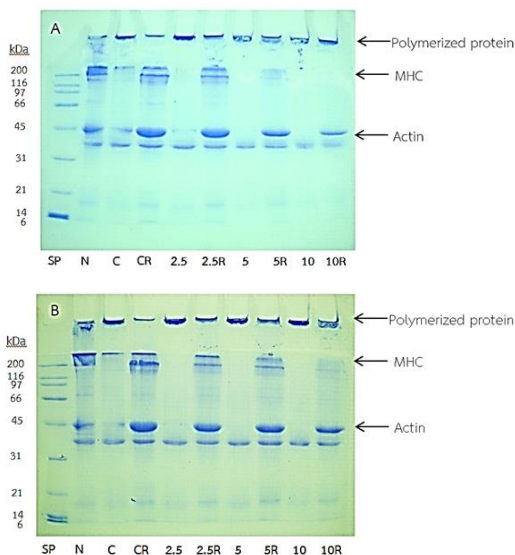
องค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนของ NAM จากซูริมิปลาถาซีที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากผักแพวและกะเพราแดงที่ระดับต่างกัน แสดงในรูปที่ 3 ซูริมิประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ ไมโอซินสายหนัก (MHC) และแอคติน ในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบ

พืชที่สภาวะ unreduced พบว่าตัวอย่างควบคุมนั้นมีความเข้มของแถบ MHC ที่ลดลง เมื่อเทียบกับตัวอย่าง NAM ที่ไม่ผ่านความร้อน ซึ่งแสดงถึงการเกิดการเชื่อมประสานกันด้วยพันธะและอันตรกิริยาหลายชนิด ได้แก่ พันธะ disulphide พันธะโควาเลนต์ พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก หรือการเกิดการรวมตัวกันของ MHC ซึ่งมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสภายใน โดยปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นักเกิดขึ้นในระหว่างการเซตตัว [7] เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากพืช พบว่ามีการลดลงของความเข้มของแถบ MHC มากขึ้นเมื่อมีการเติมสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับร้อยละ 10 แถบ MHC หายไปเกือบทั้งหมด โดยการหายไปของแถบ MHC นั้นมีความสอดคล้องกับการลดลงของหมู่ sulphydryl (รูปที่ 1) เมื่อมีการเติมสารสกัดในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น อาจส่งผลให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้หมู่ sulphydryl สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและเกิดพันธะ disulphide ขึ้น ทำให้ MHC เกิดการเชื่อมประสานกันเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งเห็นจากความเข้มของแถบ MHC ที่ลดลง และความเข้มของแถบ polymerized protein ที่อยู่บริเวณด้านบนสุดของเจลมีสีเข้มขึ้น โดยนอกจากพันธะ disulphide ที่เกิดขึ้นแล้ว พันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่ disulphide นั้นเป็นพันธะที่มีความสำคัญในการเกิดการเชื่อมประสานเช่นเดียวกัน ซึ่งสังเกตได้จากเจลที่สภาวะ reduced การเติม SDS และ β -mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะที่มีความอ่อนแอ เช่น อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน รวมถึงพันธะ disulphide โดย [26] ได้รายงานว่าการเติม MHC ของเจลซูริมิจากปลาตาหวานที่มีการเติม 0.50 % oxidised caffeic acid หรือ 0.40 % oxidised ferulic acid ซึ่งผ่านการเซตตัวนั้นไม่พบแถบของ MHC หลงเหลืออยู่ โดยผลการทดลองที่ได้ อาจเกิดจาก

การเชื่อมประสานที่เพิ่มมากขึ้นของ MHC โดยสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์ผ่านพันธะที่ไม่ใช่พันธะ disulphide นอกจากนี้ยังพบว่าแถบของ actin นั้นมีความเข้มลดลงเมื่อมีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปแล้ว actin มีความคงทนต่อการเกิดการย่อยสลาย และการรวมตัวกันของโปรตีนมากกว่า MHC [13] แต่เนื่องจากการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์อาจทำให้โมเลกุลของแอคตินเกิดการเชื่อมประสานกันบางส่วนในระหว่างการเซตตัว ส่งผลต่อความเข้มของแถบ actin ที่ลดลง เมื่อพิจารณาชนิดของสารสกัดจากใบพืช พบว่าตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากผักแพวนั้นมีความเข้มของแถบ MHC ลดลงมากกว่ากะเพราแดงในทุกระดับความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากผักแพวมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานกับโปรตีนใน NAM ในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากกะเพราแดง ผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินที่พบในสารสกัดจากผักแพวที่มีปริมาณมากกว่ากะเพราแดง (ตารางที่ 2)

การลดลงของความเข้มของแถบ MHC ในตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากใบพืชนั้น แสดงถึงประสิทธิภาพของสารประกอบฟีนอลิกในการกระตุ้นให้เกิดการเชื่อมกันของโปรตีน ความสามารถในการจับกันของ quinone กับกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลฟิรอนั้น แสดงได้จากค่า surface hydrophobicity (รูปที่ 2) อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ sulphydryl ได้ง่ายขึ้น โดยเห็นจากตัวอย่างที่เติมสารประกอบ ฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากพืชในระดับที่เพิ่มขึ้นนั้นมี

ปริมาณของหมู่ sulphhydryl ที่ลดลง (รูปที่ 1) และเกิดการเชื่อมประสานโดยพันธะ disulphide เพิ่มมากขึ้นจากการที่แถบของ MHC จางลงในตัวอย่าง unreduce และมีความเข้มของแถบ MHC กลับมาในตัวอย่าง reduce (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 รูปแบบโปรตีนของ NAM จากซูริมิปลา ถาซีที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดซ์จากผักแพว (A) และกะเพราแดง (B) ที่ระดับต่างกัน โดย SP: standard protein, N: NAM, C: control, และ R: สภาวะ reduced ตัวเลขด้านล่างแสดงระดับการเติมสารสกัดจากใบพืช (ร้อยละของปริมาณโปรตีน)

4. สรุป

4.1 ชนิดพืชและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดมีผลต่อปริมาณแทนนินและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสารสกัดจากผักแพวมีปริมาณแทนนินและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด

4.2 การเติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากผักแพว กะเพราแดง บัวบก และชะมวง ในปริมาณที่เพิ่ม ขึ้นถึงร้อยละ 10 ของปริมาณโปรตีน ทำให้ NAM มีปริมาณหมู่ sulphhydryl ทั้งหมด และค่า surface hydrophobicity ลดลง

4.3 การเติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากผักแพวที่ถูกออกซิไดซ์มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการเชื่อมประสานของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อใน NAM ที่สกัดจากซูริมิปลาถาซีในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากกะเพราแดง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่จัดสรรงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558 ในการสนับสนุนงานวิจัยนี้

6. รายการอ้างอิง

- [1] Spanos, G.A. and Wrolstad, R.E., 1992, Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-a review, J. Agr. Food Chem. 40: 1478-1487.
- [2] Strauss, G. and Gibson, S.M., 2004, Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients, Food Hydrocoll. 18: 81-89.
- [3] Chaijan, M., Panpipat, W. and Benjakul, S., 2010, Physicochemical properties and gel forming ability of surimi from three species of mackerel caught in Southern Thailand, Food Chem. 121: 85-92.
- [4] Balange, K.A. and Benjakul, S., 2010, Cross-

- linking activity of oxidised tannic acid towards mackerel muscle proteins as affected by protein types and setting temperatures, Food Chem. 120: 268-277.
- [5] จักรี ทองเรือง, 2544, ซูริมิ (Surimi), สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 338 น.
- [6] Balange, K.A. and Benjakul, S., 2009, Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi, LWT-Food Sci. Technol. 42: 1059-1064.
- [7] Balange, K.A. and Benjakul, S., 2009, Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidised phenolic compounds, Food Chem. 113: 61-70.
- [8] Balange, K.A. and Benjakul, S., 2009, Effect of oxidised tannic acid on the gel properties of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) mince and surimi prepared by different washing processes, Food Hydrocoll. 23: 1693-1701.
- [9] Ismail, A., Marjan, M.Z. and Foong, W.C., 2004, Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables, Food Chem. 87: 581-586.
- [10] Wongsap, P., Chaiwarit, J. and Zamaludien, A., 2012, *In vitro* screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand, Food Chem. 131: 964-971.
- [11] Singleton, V.I. and Rossi, J., 1965, Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid agents, Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158.
- [12] FAO, IAEA, 2000, Quantification of tannins in tree foliage, FAO/IAEA Working Document, Vienna, 31 p.
- [13] Benjakul, S., Seymour, T.S., Morrissey, M.T. and An, H., 1997, Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage, J. Food Sci. 62: 729-733.
- [14] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 256-275.
- [15] Sompongse, W., Itoh, Y. and Obatake, A., 1996. Effect of cryoprotectants and a reducing reagent on the stability of actomyosin during ice storage, Fisheries Sci. 62: 73-79.
- [16] Liang, N.H. and Tang, H.C., 2013. pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins, Food Hydrocoll. 33: 309-319.
- [17] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, Nature. 227: 680-685.
- [18] Deng, G.F., Lina, X., Xub, X.R., Gaoa, L.L., Xiea, J.F. and Lia, H.B., 2013, Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables, J. Funct. Foods. 5: 260-266.
- [19] Garcia, P., Concepcio, R., Brenes, M. and Garrido, A., 1996, Effect of metal cations on the chemical oxidation of olive o-

- diphenols in model systems, J. Agr. Food Chem. 44: 2101-2105.
- [20] Hurrell, R.F. and Finot, P.A., 1984, Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidised polyphenolic acids, Adv. Exp. Med. Biol. 177: 423-435.
- [21] Yazaki, Y. and Collins, P.J., 1994, Wood adhesives from high yield *Pinus radiata* bark treated by a simple viscosity process, Holzforschung. 48: 241-243.
- [22] Hayakawa, S. and Nakai, S., 1985. Contribution of hydrophobicity, net charge and sulfhydryl groups to thermal properties of ovalbumin. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 18: 290-295.
- [23] Prodpran, T., Benjakul, S. and Phatcharat, S., 2012, Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein, Int. J. Biol. Macromol. 51: 774-782.
- [24] Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wierenga, A.P. and Gruppen, H., 2010, Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin-tannic acid complex as influenced by types of interaction, Innov. Food Sci. & Emerg. Technol. 11: 712-720.
- [25] Rawel, H.M., Czajka, D., Rohn, S. and Kroll, J., 2002, Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins, Int. J. Biol. Macromol. 30: 137-150.
- [26] Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2003, Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi, Food Res. Int. 36: 253-266.