

อิทธิพลของความชื้นและอุณหภูมิต่อโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Impact of Moisture on Thermally Induced Denaturation of Lyophilized Protein

ทรงสิทธิ์ พจน์ชนะชัย

ณัฐา เลหากุลจิตต์

อรพิน เกิดชูชื่น

Songsin Photchanachai

Natta Laohakunjit

Orapin Kerdchoechuen

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

School of Bioresources and Technology King Mongkut's University of Technology Thonburi

บทนำ

ความชื้นและอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญต่อโปรตีนในสถานะของแข็งทั้งทางด้านเคมี-กายภาพ (physicochemical) และกลศาสตร์-กายภาพ (physicomechanical) การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนเป็นผลให้การทำงานของโปรตีนแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลเสียทางเภสัชกรรมและทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากในการรักษาและการวินิจฉัยโรคจำเป็นต้องใช้โปรตีนมาเกี่ยวข้อง (Bell et al., 1995a) ทางอุตสาหกรรมอาหารมีผลการศึกษามากมายถึงอิทธิพลของความชื้น อุณหภูมิ และปัจจัยภายนอก ต่อเสถียรภาพและการทำงานของโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Manning et al., 1989; Volikin and Middaugh, 1992) ดังนั้นบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะอิทธิพลของความชื้นและอุณหภูมิต่อ lyophilized protein หรือโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งทั้งกระบวนการทางเคมีและกายภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหาร

1. ผลของปริมาณความชื้น (Effect of moisture content)

โดยทั่วไปโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะเสถียรมากกว่าโปรตีนในรูปของเหลว อย่างไรก็ตามเมื่อโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้รับความชื้น ทำให้กระบวนการทางเคมีอัตราการเปลี่ยนแปลงเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากความยืดหยุ่นของโครงรูปสามมิติ (conformation) เพิ่มขึ้น และโมเลกุลที่ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา (active) มีการเคลื่อนที่มากขึ้น ความชื้นทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายทางเคมีซึ่งมีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น โครงรูปสามมิติ การละลาย และการจับตัวเป็นก้อน ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและชีวโมเลกุล ของโปรตีนแตกต่างกันในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป (Manning et al., 1989) ดังนั้นถ้าเข้าใจกลไกของความชื้นที่มีผลต่อโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแปรรูป (Riha et al., 1996)

1.1 อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและน้ำ (Water protein interaction)

นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะศึกษาบทบาทและความสำคัญของน้ำต่อโมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง การดูดน้ำของโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งสามารถวัดได้จากค่า equilibrium moisture content (EMC) และจากค่า EMC ที่ค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ สามารถกำหนดเส้นโค้งไอโซเทอม (sorption isotherm) ได้ (Fujita and Noda, 1981a; Hageman, 1988; 1992; Costantino et al., 1994b) ได้มีการพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และพารามิเตอร์ (parameter) ต่างๆ เพื่อใช้อธิบายเส้นโค้งไอโซเทอมที่เป็นรูปอักษร เอส (S) นอกเหนือจากแบบจำลองแบบเดิมที่ใช้อธิบายคือ Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Hageman, 1988; 1992) เส้นโค้งไอโซเทอมสามารถแบ่งได้ 3 ช่วง บริเวณแรกคือชั้นโมโนเป็นการจับกันระหว่างโมเลกุลของน้ำกับบริเวณเร่ง (active site) เช่น บริเวณที่มีประจุหรือโพลาร์สูงมากๆ ซึ่งน้ำในชั้นโมโนจะไม่รวมถึงน้ำที่เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลโปรตีน ส่วนชั้นที่สองเป็นชั้นที่อยู่ระหว่างชั้นโมโน (monolayer) และชั้นมัลติ (multilayer) ซึ่งเป็นการจับกันระหว่างโมเลกุลของน้ำกับพันธะเปปไทด์ และหมู่ที่มีขั้วบริเวณผิวหน้าของโมเลกุลโปรตีน (polar surface groups) ด้วยพันธะแรงอ่อน น้ำที่ถูกดูดเข้าไปจะรวมเป็นกลุ่มที่บริเวณหมู่ที่มีประจุหรือโพลาร์มากๆ โดยแทรกอยู่ในช่องว่างและทำให้สายโพลีเมอร์เกิดการพองตัว (swelling)

และชั้นสุดท้ายหรือที่เรียกว่าชั้นมัลติ โมเลกุลของน้ำจับกันด้วยพันธะแรงอ่อนโดยจับกันอยู่อย่างหลวมๆ อย่างไรก็ตามน้ำในชั้นมัลติสามารถใช้แบบจำลอง solution sorption ในการอธิบายได้ดีกว่าแบบจำลอง physical sorption หรือ BET (Hageman, 1988; 1992)

1.2 ระดับวิกฤตของน้ำในโปรตีนสถานะที่เป็นของแข็ง (Critical levels of hydration in solid protein)

มีรายงานการศึกษาถึงระดับวิกฤตของปริมาณน้ำที่ไลโซไซม์ (lysozyme) และโปรตีนชนิดต่างๆ สามารถดูดซับน้ำไว้ในโมเลกุล ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนและการจับกับโมเลกุลของน้ำ (Fujita and Noda, 1978; 1981a; 1981b) ปริมาณน้ำเริ่มต้นที่ชั้นโมโนมีปริมาณ 6 - 8 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้คุณสมบัติของโปรตีนในการจับกับน้ำเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเนื่องจากน้ำเคลื่อนที่ (free water) ประมาณ 1 ใน 100 ของปริมาณน้ำทั้งหมด (bound water) (Hageman, 1988) เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำให้มากกว่าน้ำในชั้นโมโนทำให้หมู่คาร์บอกซิล (COOH) และหมู่เอไมด์ (NH₂) ของโมเลกุลโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อปริมาณน้ำเท่ากับ 6 - 25 เปอร์เซ็นต์ น้ำ bound water จะเท่ากับปริมาณน้ำทั้งหมด (bulk water) (Hageman, 1988; 1992) อย่างไรก็ตามถ้าปริมาณน้ำมากเกินไปในชั้นโมโนทำให้ bound water ซึ่งจับตัวกันอยู่อย่างหลวมๆ สามารถละลายตัวถูกละลายโดยเฉพาะถ้าตัวถูกละลายมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยและมีขั้วมาก (Hageman, 1988) โปรตีนในสถานะที่เป็นของแข็งมีปริมาณน้ำน้อยกว่าน้ำในชั้นโมโน ซึ่งมีผลต่อ

การเสถียรภาพของโปรตีนเนื่องจากปริมาณน้ำต่ำ ทำให้บางโมเลกุลของโปรตีนจะซ้อนทับกัน และน้ำเป็นตัวแย่งจับที่ดีโดยแข่งกับหมู่โพลาร์ของโปรตีนสร้างพันธะไฮโดรเจน (Fujita and Noda, 1981a; 1981b; Riha et al., 1996; Lai and Topp, 1999) สามารถสรุปผลของความชื้นต่อโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของโปรตีน
2. การเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพของโปรตีน
3. น้ำเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวยับยั้ง
4. น้ำเป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย

การเข้าใจถึงกระบวนการเสถียรภาพทางธรรมชาติของโปรตีนอันเนื่องมาจากปริมาณน้ำจะทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างสามมิติ และการทำงานของโปรตีนได้อย่างดี (Hageman, 1988; Manning et al., 1989)

1.3 การย่อยสลายของโปรตีนในสถานะของแข็งที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งเนื่องจากความชื้น (Moisture induced decomposition in solid proteins)

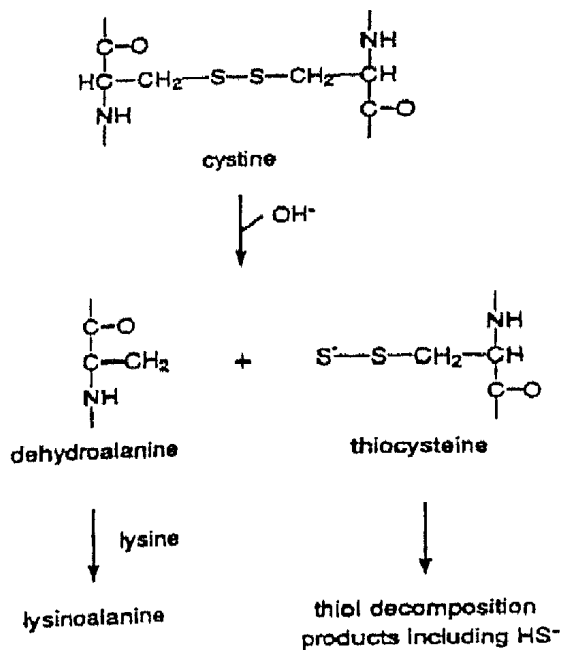
ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นทั้งแบบภายในและระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีผลทำให้ประสิทธิภาพและคุณสมบัติของโปรตีนลดลงหรือสูญเสียไป (Costatino et al., 1994b) ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเมื่อโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้รับความชื้น ได้แก่ β -elimination, disulfide exchange reactions, hydrolysis, chemical modification เป็นต้น ปฏิกิริยาเคมีเหล่านี้มีความสัมพันธ์และมีผลกระทบต่อกันคุณสมบัติทางกายภาพ

ต่างๆ เช่น การจับตัวเป็นก้อน การละลาย การตกตะกอน (precipitation) และคุณสมบัติทางกายภาพอื่นๆ ดังนี้

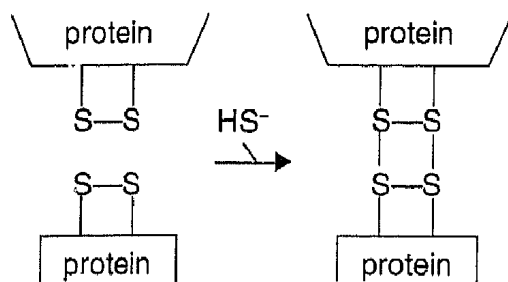
ก. การจับตัวเป็นก้อนของโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Aggregation of lyophilized protein)

Costatino et al. (1994a; 1994b) รายงานว่าอินซูลินที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized insulin) จะรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนเมื่อได้รับความชื้น ซึ่งเมื่อเกิดการรวมเป็นกลุ่มก้อนอาจสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent) และไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (noncovalent) พันธะโควาเลนต์เป็นพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่ซัลไฟดริล (-SH)

โดยทั่วไปแล้วเป็นที่เข้าใจว่าการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลต้องมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ในกรณีของอินซูลินโมโนเมอร์มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ (ระหว่างโมเลกุล 2 พันธะและภายในโมเลกุล 1 พันธะ) แต่จะไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอิสระเหลืออยู่ อย่างไรก็ตาม โมเลกุลที่มีพันธะไดซัลไฟด์จะเป็นสารต้นตอของหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ดังเช่นปฏิกิริยา β -elimination ที่พันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของอินซูลิน (Scheme 1a) ได้หมู่ไฮดรอกซิลอิสระซึ่งทำหน้าที่เป็น nucleophile และถูกปะทะกับหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลโปรตีนอื่น จะได้ผลผลิตใหม่ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลและยังมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ซึ่งโมเลกุลที่มีไฮดรอกซิลอิสระสามารถเกิดเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและจับตัวกันไม่ละลาย (Scheme 1b) (Costatino et al., 1994a; Lai and Topp, 1999) นักวิจัยเหล่านี้แสดงถึงซอร์พชันไอโซเทอมของ



Scheme 1a. β - elimination.



Scheme 1b. Thiol-catalyzed disulfide exchange.

อินซูลิน พบว่าการที่อินซูลินจับกันเป็นกลุ่มก้อน มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำที่อินซูลิน ผ่านการทำแห้งดูดน้ำไว้ในโมเลกุล ซึ่งชี้ให้เห็น ถึงปริมาณน้ำวิกฤตต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างสามมิติของโปรตีนในการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน ด้านอุตสาหกรรมยา มีการศึกษาน้อยมากเกี่ยวกับการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของโปรตีน แต่ในทางอุตสาหกรรมอาหารมีการศึกษาผลจากปฏิกิริยาเคมี และนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากโปรตีนสามารถ เกิดเป็นสายโพลีเมอร์และให้ความหนืดสูง ใน ทำนองเดียวกันการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของ bovine

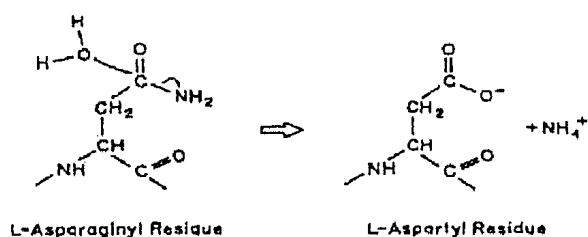
serum albumin (BSA) ในสถานะที่เป็นของแข็ง ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเช่นกัน (Costantino et al., 1994b; Lai and Topp, 1999)

ข. การละลาย (Solubility)

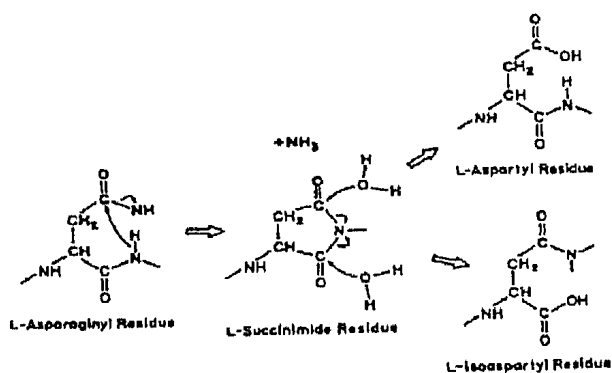
ความชื้นทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีที่ รู้จักกันทั่วไปคือ deamination ซึ่งมีผลต่อการ ละลายของโปรตีน นักวิทยาศาสตร์ทางอาหารได้ พยายามศึกษาถึงปฏิกิริยา deamination เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการควบคุมคุณภาพ ของผลิตภัณฑ์ (Riha et al., 1996) ปฏิกิริยา deamination เป็นปฏิกิริยาที่แอมโมเนียหลุดออก จากหมู่เอไมด์ของกรดอะมิโน Asn และ Gln กลไกการเกิดปฏิกิริยา deamination มี 2 กลไก (Scheme 2) ปฏิกิริยาแรกคือ ไฮโดรไลซิสตรง หมู่เอไมด์โดยมีน้ำเป็นคะตะลิสต์ (catalyzed) (Scheme 2a) ปฏิกิริยาต่อมา (Scheme 2b) ซึ่งเป็นกลไกที่ซับซ้อน จะเกิดสารตัวกลางคือ succinimide บางทีอาจมีผลต่อพันธะเปปไทด์ โดยเกิด การตัดทางปลายสายของกรดอะมิโน ผลที่ได้คือ isopeptide (Clarke et al., 1992; Daniels and Clarke, 1989) ปฏิกิริยา deamination จะช่วยลดแรงดึงผิวของกลูเตน (gluten) และอาหารที่มี โปรตีนสูงๆ (amide-rich food protein) เพิ่ม ความคงตัวในสถานะอิมัลชัน (Riha et al., 1996) เพิ่มคุณสมบัติการเกิดฟอง การเกิดเจล และเพิ่ม surface hydrophobicity (Riha et al., 1996; Mine, 1997)

ปริมาณความชื้น 20 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อโปรตีนในอาหารที่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด (extrusion) โดยที่ปริมาณความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดปฏิกิริยา deamination สูงที่สุด อย่างไร

ก็ตามมีรายงานว่าปฏิกิริยาเคมีส่วนใหญ่เกิดเพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการเอ็กซ์ทรูดเมื่อปริมาณความชื้นต่ำ แต่ทฤษฎีของการเกิดปฏิกิริยา deamination โดยผ่านกระบวนการ β -aspartyl shift เกิดขึ้นได้โดยไม่มีน้ำ ผลผลิตที่ได้เป็นสารตัวกลางคือ succinimide ที่ไม่เสถียร และสาร succinimide ที่ไม่เสถียรนี้สามารถถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) ต่อไปโดยถูกจัดเรียงตัวใหม่จากปลายคาร์บอกซิล ได้สาร normal peptide หรือ isopeptide (Clarke et al., 1992) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูดเป็นอย่างมาก (Riha et al., 1996) ปฏิกิริยาที่มีการย้ายตรงตำแหน่ง β มีผลทำให้แอมโมเนียถูก



Scheme 2a. Deamination by direct hydrolysis (From Clarke et al., 1992)



Scheme 2b. Deamination by succinimide formation (From Clarke et al., 1992)

ปลดปล่อยออกมา และจะเกิดสาร cyclic imide ซึ่งมีความเสถียรที่ความชื้นต่ำ

Zhang et al. (1993) รายงานว่าปริมาณความชื้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดปฏิกิริยา deamination ในโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังเช่น ปริมาณความชื้น 6 50 60 และ 50 เปอร์เซ็นต์มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดปฏิกิริยา deamination ของโปรตีนถั่วเหลือง (soy protein) โกลอะดีน (gliadin) เคซีน (casein) และ ไลโซไซม์ ตามลำดับ

2. ผลของอุณหภูมิ (Effect of thermally induced)

ความร้อนชักนำให้โปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ สามารถจำแนกเป็นแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ และมีผลต่อหน้าที่และคุณสมบัติของโปรตีน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลและคุณภาพของอาหาร (Volikin and Midduagh, 1992; Lai and Topp, 1999) การที่โปรตีนสามารถคงรูปอยู่ได้ เนื่องจากมีความสมดุลของพันธะต่างๆ ที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก พันธะไอออนิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ มีรายงานถึงผลของการเพิ่มอุณหภูมิว่าความร้อนมีผลต่อพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (ยกเว้นพันธะไฮโดรโฟบิก) และโมเลกุลของโปรตีนที่ไม่ซ้อนพับ (unfold) อย่างไรก็ตามในสภาวะที่แห้ง (ปริมาณน้ำต่ำกว่าน้ำในชั้นโมโน) กลไกและสาเหตุของการเสียสภาพเนื่องมาจากความร้อนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

2.1 ผลของอุณหภูมิและเอนทัลปีต่อการเสถียรภาพของโปรตีนผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (The thermal denaturation temperature and enthalpy in lyophilized protein)

มีรายงานการวิจัยในการวัดผลของความร้อนต่อการเสื่อมสภาพของโปรตีนด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) เช่น เอ็นไซม์ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized enzymes) และโปรตีนบางชนิด ได้แก่ โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) โอวัลบูมิน ovalbumin ไคโมทริปซินโนเจน (chymotrypsinogen) (Fuita and Noda, 1978; 1981a; 1981b) โปรตีนถั่วเหลือง (soybean protein) และ recombinant bovine somatotropin (Bell et al., 1995) ซึ่ง Hageman (1988) และ Costantino et al. (1994b) สรุปผลจากรายงานเหล่านี้ ดังนี้

1. โปรตีนที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งทนต่อความร้อนในสถานะที่แห้ง โดยมี thermal transition temperature (T_m) สูงเท่ากับ 130°C .

2. ปริมาณน้ำเพิ่มจาก 5 - 40 เปอร์เซ็นต์ (g/g) ค่า T_m ของโปรตีนจะลดลงโดยที่เอนทัลปีจะเพิ่มขึ้น

3. ปริมาณน้ำเพิ่ม 40 - 300 เปอร์เซ็นต์ (g/g) ทั้งค่า T_m และเอนทัลปี มีผลทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพสารละลาย

2.2 อุณหภูมิต่อการเสถียรภาพทางธรรมชาติของโปรตีน (Thermal induced denaturation)

มีรายงานการวิจัยน้อยมากที่ศึกษาถึง

อุณหภูมิต่อการเสถียรภาพชนิดผันกลับไม่ได้ของโปรตีนที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Ahern and Kilbanov, 1985; Hageman, 1988) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาถึงการเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้โปรตีน rbSr (Bell et al., 1995) และ bovine insulin (Costantino et al., 1994a) เกิดพันธะโคเวเลนต์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะเร่งปฏิกิริยาดีเกรเดชัน (degradation) เช่น deamidation, peptide bond cleavage, Millard reaction และ oxidation (Clarke et al., 1992; Lai and Topp, 1999) Volkin and Middaugh (1992) ได้อ้างถึงการศึกษานี้ของ Bjarnason and Carpenter (1970) ถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นในอาหารและโปรตีนบริสุทธิ์ (pure protein) เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ $115 - 145^{\circ}\text{C}$. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแอมโมเนียและไฮโดรเจนซัลไฟด์หลุดออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน ทำให้ปริมาณไลซีนและซิสเตอีนลดลง ในอาหารที่ผ่านกระบวนการเอ็กซ์ทรูด ช่วงที่ได้รับความร้อนโมเลกุลใหญ่จะเข้าทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดเป็น food matrix และเกิดกลิ่นรสซึ่งเพิ่มการยอมรับของอาหาร อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับกระบวนการเอ็กซ์ทรูดที่แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีทั้งลักษณะที่ต้องการและไม่เป็นที่ต้องการ (Riha et al., 1996)

ก. β -elimination

ความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพต่างๆ หลายชนิด นำไป

สู่การรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของโปรตีน ปฏิกริยา β -elimination ที่พบได้ทั่วไปคือปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในช่วงที่โปรตีนได้รับความร้อนดังเช่นปฏิกริยาโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) โดยเกิดพันธะไดซัลไฟด์และการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน (hydro-phobic aggregation) ในช่วงการให้ความร้อนของ globular soy protein ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และ human insulin (Costatino et al., 1994a) และ recombinant bovine somatotropin (Bell et al., 1995) มีงานวิจัยที่สนับสนุน เช่น การรวมเป็นก้อนของอินซูลินเนื่องมาจากปฏิกริยา β -elimination จะเพิ่มมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Costatino et al., 1994a) และโมเลกุลโปรตีนจะรวมเป็นก้อน

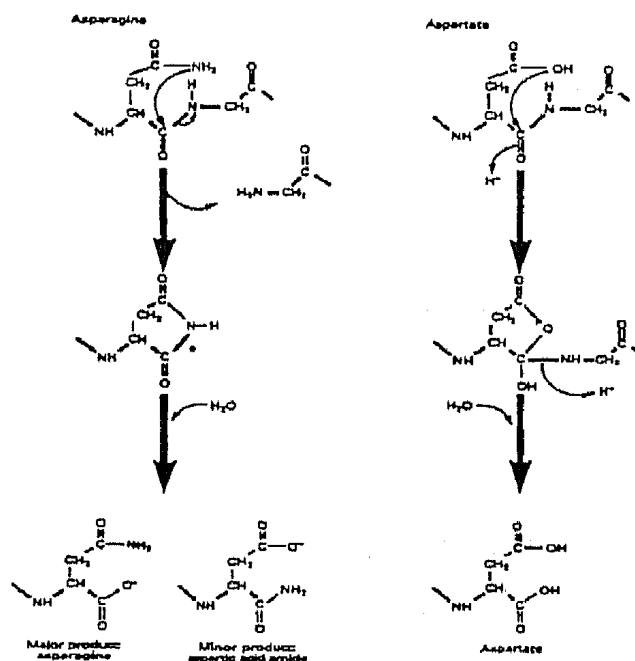
ข. Deamidation

ปฏิกริยา deamidation ที่เกิดขึ้นกับโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากเป็นผลมาจากปริมาณน้ำแล้วยังเนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น ปฏิกริยา deamination ของ Asn-hexapeptide เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ได้สารตัวกลางคือ cyclic imide (Clarke et al., 1992) ปฏิกริยา deamidation ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเอ็กซ์ทรูด ความร้อนจะทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถผ่านเข้าไปในโมเลกุลของโปรตีนที่อัดกันแน่น ผลของปฏิกริยา deamidation จะได้กรด และสารประกอบต่างๆของโปรตีนซึ่งไม่ซ้อนพับและมีหมู่เอไมด์แผ่ออกสัมผัสกับสภาพแวดล้อม ดังนั้น ปฏิกริยา deamidation ของโปรตีนเป็นผลให้โปรตีน

มีรูปร่างและโครงสร้างแตกต่างจากโปรตีนเดิม (native protein) เนื่องจากมีประจุปริมาณมากเกิดขึ้นกับโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย (Riha et al., 1996; Clarke et al., 1992)

ค. ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเปปไทด์ (Hydrolysis of peptide bond)

ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเปปไทด์เป็นวิธีการเกิดปฏิกริยาดีเกรเดชันของสายเปปไทด์และโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และเกิดขึ้นเมื่อโปรตีนได้รับความร้อนสูง (Clarke et al., 1992; Daniel et al., 1996) ดัง Scheme 3 ซึ่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสมีผลต่อคุณสมบัติของโปรตีน



Scheme 3. Peptide bond cleavage at Asparagine and Aspartic acid (From Daniel et al., 1996)

บทสรุป

ปริมาณน้ำและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยสลายของโปรตีนในสภาวะของแข็ง ซึ่งกลไกมีหลายวิธีทางทั้งทางเคมีและกายภาพ โดยที่กลไกทางเคมีนั้นโมเลกุลของโปรตีนเกิดปฏิกิริยาต่างๆ เช่น การเกิดพันธะหรือการแตกพันธะ ได้แก่ Proteolysis Deamidation และ β -elimination ส่วนกลไกทางกายภาพ ได้แก่ การเสียสภาพทางธรรมชาติ (denaturation) การรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน (aggregation) และการละลาย (solubility) ถ้าโปรตีนที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized protein) เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นผลทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและการทำงานซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการแปรรูปอาหาร

ปฏิกิริยาการย่อยสลายส่วนใหญ่จะเกิดที่ชั้นโมโนน้อยมากเนื่องจากปริมาณน้ำไม่เพียงพอและ dynamic activity ของโปรตีนมีจำกัด อย่างไรก็ตามอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มมากขึ้นถ้าโปรตีนมีการดูดน้ำเกินกว่าปริมาณน้ำในชั้นโมโน การที่อัตราการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนมีความยืดหยุ่นและน้ำจับกับตัวถูกละลายน้อยมาก นอกจากนี้อุณหภูมิสูงจะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและกายภาพโดยไปรบกวนสมดุลของแรงที่ยึดระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นโมเลกุลของโปรตีนที่อัดกันแน่นจะยอมให้โมเลกุลของน้ำแทรกผ่านและไปกระตุ้นปฏิกิริยาเคมีโดยมีพลังงานจลน์ต่ำมาก

บรรณานุกรม

- Ahern, T.J. and Klibanov, A.M. 1985. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*. 228: 1280 - 1284.
- Bell, L.N., Hageman, M.J. and Bauer, J.M. 1995. Impact of moisture on thermally induced denaturation and decomposition of lyophilized bovine somatotropin. *Biopolymer*. 35: 201 - 209.
- Clarke, S., Stephenson, R.C. and Lowenson, J.D. 1992. Lability of asparagine and aspartic acid residues in proteins and peptides: spontaneous deamination and isomerization reactions. In Ahern, A.J. and Manning M.C. (eds.), *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*. New York: Plenum Press. p.1 - 29.
- Costantino, H.R., Langer, R. and Klibanov, A.M. 1994a. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin. *Pharm. Research*. 11(1): 21 - 29.
- Costantino, H.R., Langer, R. and Klibanov, A.M. 1994b. Solid-phase aggregation of protein under pharmaceutically relevant condition.

- J. Pharm. Sci.* 83(12) : 1662 - 1669.
- Daniel, R.M., Dines, M. and Petach, H.H. 1996. Review article: The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem. J.* 317: 1 - 11.
- Fujita, Y. and Noda, Y. 1978. Effect of hydration on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry. *Bull. Chem. Soc. Japan.* 51(5): 1567 - 1568.
- Fujita, Y. and Noda, Y. 1981a. Effect of hydration on the thermal stability of protein as measured by differential scanning calorimetry, chymotrypsinogen A. *Int. J. Peptide Protein Res.* 18: 12 - 17.
- Fujita, Y. and Noda, Y. 1981b. The effect of hydration on the thermal stability of ovalbumin as measured by means of differential scanning calorimetry. *Bull. Chem. Soc. Japan.* 54: 3233 - 3234.
- Hageman, M.J. 1988. The role of moisture in protein stability. *Drug Dev. Industria Pharm.* 14(4): 2047 - 2070.
- Hageman, M.J. 1992. Water sorption and solid-state stability of proteins. In Ahern, A.J. and Manning M.C. (eds.), *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation.* New York: Plenum Press p.273 - 309.
- Lai, M.C. and Topp, E.M. 1999. Minireview: Solid-state chemical stability of protein and peptides. *J. Pharm. Sci.* 88(5): 489 - 500.
- Manning, M.C., Patel, K. and Borchardt, R.T. 1989. Review: Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Research.* 6(11): 903 - 918.
- Mine, Y. 1997. Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 2924 - 2928.
- Riha, W.E. III., Izzo, H.V. Zhang and Chi-Tang Ho. 1996. Nonenzymatic deamination of food protein. *Critical Reviews Food Sci. and Nutri.* 36(3): 225 - 255.
- Volikin, D.B. and Middaugh, C.R. 1992. The effect of temperature on protein structure. In Ahern, A.J. and Manning M.C. (eds.), *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation.* New York: Plenum Press. p 215 - 247.
- Zhang, J., Lee, T.C. and Ho, C.T. 1993. Thermal deamidation of proteins in a restricted water environment. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 1840 - 1843.