

สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนของพืชตระกูลถั่ว ด้วยการปรับค่า pH และวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ

วงศ์กร วงษ์ศรี^{1*}, ชโยดม คงสมศักดิ์¹, พลอยแหวน สิงหาสาร¹, ศศิกัญญ์ งามเขียว¹, และคณางค์ รัตนานิคม^{2*}

¹ห้องเรียนพิเศษ โปรแกรมแอล เอ็ม เอส โรงเรียนอนุสุรนารี

²สาขาวิชาสารานุกรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุโขทัย มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

* Corresponding author: Wongsakonchow@gmail.com; khakhanang_r@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนของพืชตระกูลถั่ว ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยการปรับค่า pH และวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ พบว่าการใช้ค่า pH ที่ 4.1 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วเขียว ถั่วดำ และถั่วแดง สูงที่สุดและแตกต่างกับสภาวะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 71.49 ± 0.11 , 67.05 ± 0.25 และ 63.76 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ โดยใช้ CaSO_4 ที่ความเข้มข้น 10% ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วดำสูงที่สุดและแตกต่างกับสภาวะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 15.79 ± 0.24 และ 13.22 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การใช้เกลือ CaSO_4 ทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การใช้เกลือ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วแดงสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างในการตกตะกอนโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วดำในทุกระดับความเข้มข้น ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่แตกต่างกันของการตกตะกอนโปรตีนทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ต่างกันและศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร

คำสำคัญ: การตกตะกอนโปรตีน / พืชตระกูลถั่ว / พีเอช / เกลือ

Optimization of Protein Precipitation from Legume Extracts Using pH Adjustment and Salt-Induced Precipitation

Wongsakon Wongcharee^{1*}, Chayodom Khongsomsak¹, Ploywan Singhasarn¹,
Sasikan PhoongamKhiew¹, and Khakhanang Ratananikom^{2*}

¹LMS Program, Anukoolnaree School.

²Department of Public Health, Faculty of Science and Health Technology, Kalasin University.

* Corresponding author: Wongsakonchow@gmail.com; khakhanang_r@yahoo.com

Abstract

This study aims to determine the optimal conditions for protein precipitation from legume extracts through pH adjustment and salt-induced precipitation methods. It was found that adjusting the pH to 4.1 provided the most suitable condition for protein precipitation from green pea extract. The highest protein yield was obtained from green pea, followed by red kidney bean and black bean, with statistically significant differences. The yields were $71.49 \pm 0.11\%$, $67.05 \pm 0.25\%$, and $63.76 \pm 0.51\%$, respectively. Furthermore, using 10% CaSO_4 concentration for salt-induced precipitation was found to yield the highest protein precipitation from green pea and red kidney bean extracts, with statistically significant differences, yielding $15.79 \pm 0.24\%$ and $13.22 \pm 0.14\%$, respectively. However, increasing CaSO_4 concentrations showed no significant effect on protein precipitation from black bean extract. In contrast, using MgCl_2 at concentrations of 20% and 30% did not improve protein precipitation efficiency in any of the legume extracts. Although salt concentration significantly affected precipitation yield, differences in protein precipitation efficiency among green pea, red kidney bean, and black bean extracts were also observed. The results suggest that optimizing these parameters can enhance protein yield, which can be beneficial for applications in food industry's protein production.

Keywords: Protein precipitation / Legume / pH / Salt

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและมีความอุดมสมบูรณ์ทางการเกษตรสูง เช่น ข้าว มันสำปะหลัง ยาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลถั่วที่ได้รับความนิยมในการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นถั่วเขียว ถั่วแดง หรือถั่วดำ ซึ่งพืชตระกูลถั่วเหล่านี้เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีเยี่ยม ส่งผลให้มีศักยภาพในการส่งออกไปยังตลาดทางการค้าเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์โปรตีนทางเลือก ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระดับสากล [1]

โปรตีนจากพืช เช่น โปรตีนจากเมล็ดพืชตระกูลถั่ว มักถูกใช้เป็นโปรตีนทางเลือกเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีราคาถูก มีปริมาณโปรตีนสูง และมีสมบัติเชิงหน้าที่ดี ดังนั้นในปัจจุบันนี้จึงได้มีการนำเอาพืชโปรตีนสูง เช่น พืชตระกูลถั่ว มาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีน เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนสำหรับผู้แพ้นมวัว และรับประทานมังสวิรัต นอกจากนี้โปรตีนที่สกัดได้ยังนิยมนำไปเติมผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ อาหารขบเคี้ยว และเครื่องดื่ม เพื่อปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส รสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการให้สูงขึ้น [2, 3]

การตกตะกอนโปรตีนเป็นกระบวนการแยกโปรตีนให้ออกจากสารละลายในรูปของของแข็ง ซึ่งมักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมของสารละลาย เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือ หรือการปรับค่า pH โดยในระบบของโปรตีนการตกตะกอนเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลโปรตีนสูญเสียความสามารถในการละลายในสารละลาย ส่งผลให้เกิดการรวมตัว และแยกออกมาในรูปแบบของของแข็ง [4, 5]

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีแนวความคิดในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว เพื่อพัฒนาแนวทางใหม่ในการใช้ประโยชน์จากพืชเกษตรกรรมที่มีศักยภาพ ซึ่งยังสามารถช่วยให้พืชตระกูลถั่วเป็นพืชทางการเกษตรในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมั่นคงและยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนของพืชตระกูลถั่วด้วยวิธีการปรับค่า pH
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนของพืชตระกูลถั่วด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ

3. ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่วโดยมีขอบเขตของการศึกษาดังนี้

1. พืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วแดง และถั่วดำ
2. การตกตะกอนโปรตีน โดยวิธีการปรับค่า pH และวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ

4. วิธีการศึกษา

4.1 การสกัดพืชตระกูลถั่ว

การสกัดพืชตระกูลถั่ว ซึ่งได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วแดง และถั่วดำ โดยสกัดพืชตระกูลถั่วที่ผ่านการแช่น้ำในอัตราส่วน 1:5 (ถั่ว:น้ำ) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำพืชตระกูลถั่วที่ได้ไปปั่นรวมกับน้ำในอัตราส่วน 1:3 (ถั่ว:น้ำ) แยกสารที่ได้โดยวิธีการกรองเพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ

เตรียมสารเกลือชนิด CaSO_4 และ MgCl_2 ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 5, 10, 15, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายถั่วที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีน

2. การตกตะกอนด้วยการปรับค่า pH

เตรียมบัฟเฟอร์ pH ที่มีระดับแตกต่างกัน 6 ระดับ คือ 4.1, 4.4, 4.7, 5.1, 5.4 และ 5.7 จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายถั่วที่เตรียมไว้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีน

3. วิเคราะห์การตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว

การวัดปริมาณโปรตีนในส่วนใส เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การตกตะกอนโดยโปรตีน โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นตกตะกอนกับสารละลาย Coomassie brilliant blue วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การตกตะกอนโปรตีน จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตกตะกอนโปรตีน} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใสของสารละลายตัวอย่าง})}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง}} \times 100$$

4.2 สถิติที่ใช้ในการศึกษา

สถิติที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง รายงานผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistix ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วดำ และถั่วแดง โดยใช้สองวิธีหลัก ได้แก่ การปรับค่า pH และการเติมเกลืออนินทรีย์ ($MgCl_2$ และ $CaSO_4$) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความเหมาะสมของแต่ละวิธีในการประยุกต์ใช้กับการสกัดโปรตีนพืช

5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยการปรับค่า pH

ผลการทดลองพบว่า pH ที่ 4.1 เป็นจุดที่เหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนโปรตีนจากถั่วทั้งสามชนิด โดยเฉพาะถั่วเขียวซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การตกตะกอนสูงสุดถึง 71.49 ตามด้วยถั่วดำ 67.05 และถั่วแดง 63.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยกลไกทางเคมีว่า ณ pH นี้ โปรตีนจะอยู่ในสภาวะ สวิทเทอร์ไอออน ซึ่งมีทั้งประจุบวกและประจุลบ ทำให้ประจุรวมของโปรตีนเป็นศูนย์ โมเลกุลโปรตีนจึงความเป็นกลาง (neutral molecule) ส่งผลให้ไม่สามารถละลายสารละลายได้ดีเช่นเคย จึงเกิดการแยกตัวตกตะกอนออกมาจากสารละลาย หรืออยู่ในภาวะไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ซึ่งลดแรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ทำให้เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอนออกจากสารละลาย [6, 7]

การใช้วิธีปรับ pH ในการตกตะกอนโปรตีนนับว่าเป็นเทคนิคพื้นฐานที่มีข้อดีในแง่ของความเรียบง่าย ประหยัดต้นทุนและไม่ต้องเติมสารเคมีมากนัก อย่างไรก็ตาม จุดอ่อนคือการควบคุมความเสถียรของโปรตีนบางชนิดที่อาจสลายหรือเสียคุณภาพภายใต้สภาวะกรด-ด่างเฉพาะเจาะจง อีกทั้งเทคนิคนี้เหมาะกับโปรตีนที่มีพฤติกรรมทางประจุชัดเจนเท่านั้น

ผลจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาที่ครอบคลุมโปรตีนจากพืชท้องถิ่น โดยเฉพาะถั่วในกลุ่มที่ยังมีการศึกษาน้อย และแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีปรับ pH เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนได้อย่างชัดเจน ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นฐานในการพัฒนาเทคโนโลยีการสกัดโปรตีนพืชอย่างยั่งยืนต่อไปในอุตสาหกรรมอาหาร หรือโปรตีนทางเลือก



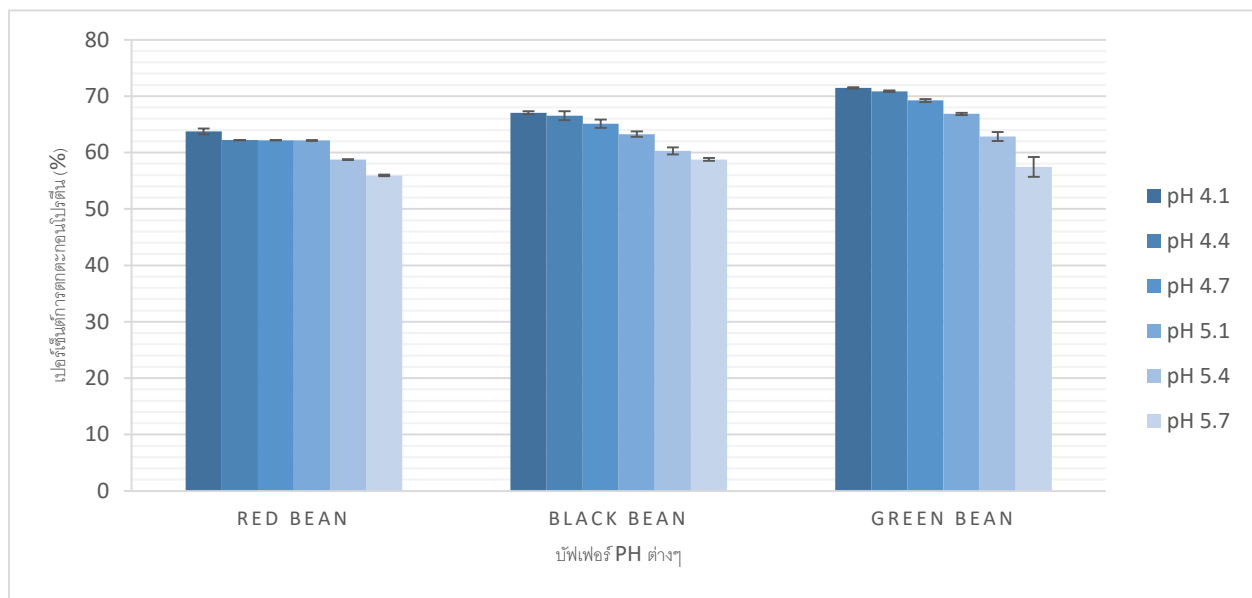
รูปที่ 1 แสดงการตกตะกอนของถั่วแดง
ด้วยการใช้ pH



รูปที่ 2 แสดงการตกตะกอนของถั่วดำ
ด้วยการใช้ pH



รูปที่ 3 แสดงการตกตะกอนของถั่วเขียว
ด้วยการใช้ pH



รูปที่ 4 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตกตะกอนโปรตีนในค่า pH

5.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ

ในการทดลองใช้เกลือ $MgCl_2$ พบว่าถั่วแดงมีการตอบสนองต่อการตกตะกอนมากที่สุด โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ค่าการตกตะกอนสูงสุดที่ 16.30 และ 17.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ถั่วเขียวและถั่วดำไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับความเข้มข้นของเกลือชนิดนี้ ส่วนการใช้ $CaSO_4$ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วดำได้ดีที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสถานะอื่น แต่ไม่มีผลชัดเจนต่อถั่วแดง

กลไกของการตกตะกอนในกรณีนี้เกิดจากปรากฏการณ์ salting out ซึ่งการเติมเกลือจะลดแรงผลักทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic repulsion) และเสริมแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโปรตีน โดยเฉพาะแรงไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ส่งผลให้โปรตีนรวมตัวและตกตะกอนออกมาได้ [8, 9] เทคนิคการใช้เกลือในการตกตะกอนมีข้อดีในแง่ของการ

ควบคุมได้ละเอียดและเหมาะสมกับโปรตีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อไอออนโลหะ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญคือปริมาณไอออนตกค้างในระบบ ซึ่งอาจต้องการกระบวนการบำบัดเพิ่มเติม และมีผลต่อคุณภาพของโปรตีนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น เช่น การตกตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol precipitation) ซึ่งแม้จะสามารถตกตะกอนได้รวดเร็วและมีความบริสุทธิ์สูง แต่มีต้นทุนการผลิตและความเสี่ยงทางด้านความปลอดภัยสูงกว่าการใช้เกลือหรือการปรับ pH การตกตะกอนด้วยโพลีอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolyte precipitation) แม้จะมีประสิทธิภาพดีในระบบบางชนิด แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องการควบคุมคุณสมบัติของโปรตีนหลังตกตะกอน

การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่า การเลือกเทคนิคตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสมควรพิจารณาร่วมกันทั้งชนิดของโปรตีน พฤติกรรมทางเคมี ความสามารถในการละลาย และความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ ผลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถนำไปต่อยอดสู่การออกแบบระบบแยกโปรตีนที่เหมาะสมกับการผลิตจริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มโปรตีนจากพืชพื้นถิ่นซึ่งยังขาดงานวิจัยเชิงลึก [10, 11]



รูปที่ 5 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วแดงในเกลือ $MgCl_2$



รูปที่ 6 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วดำในเกลือ $MgCl_2$



รูปที่ 7 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วเขียวในเกลือ $MgCl_2$



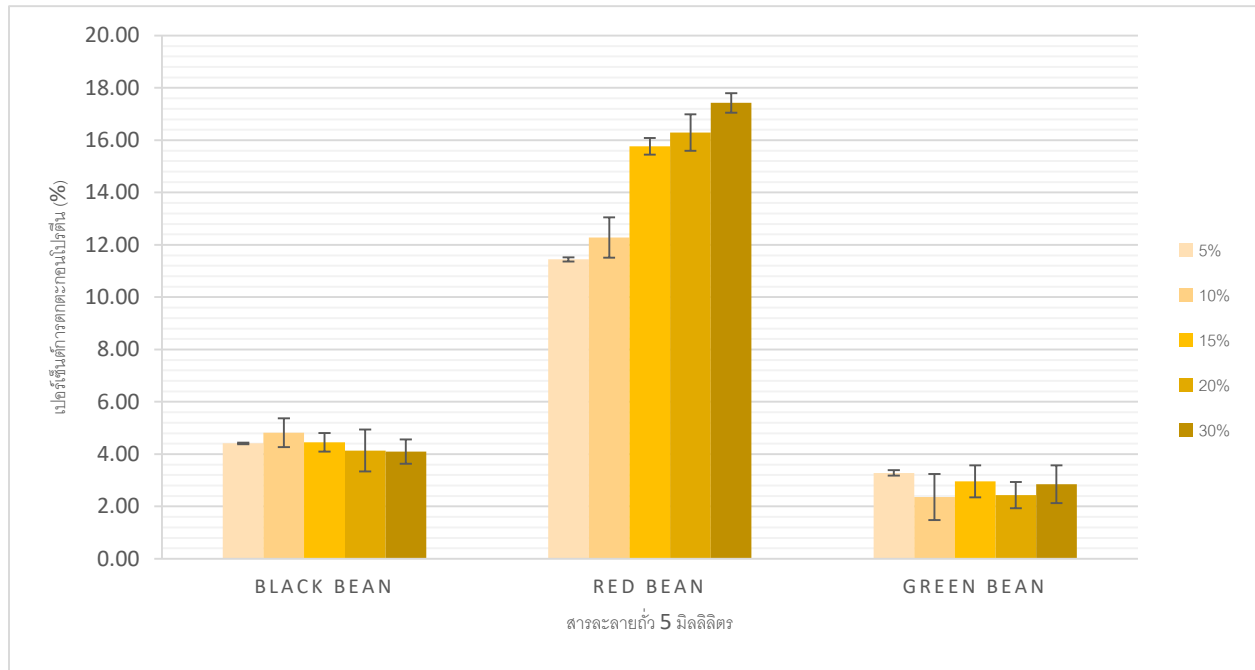
รูปที่ 8 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วแดงในเกลือ $CaSO_4$



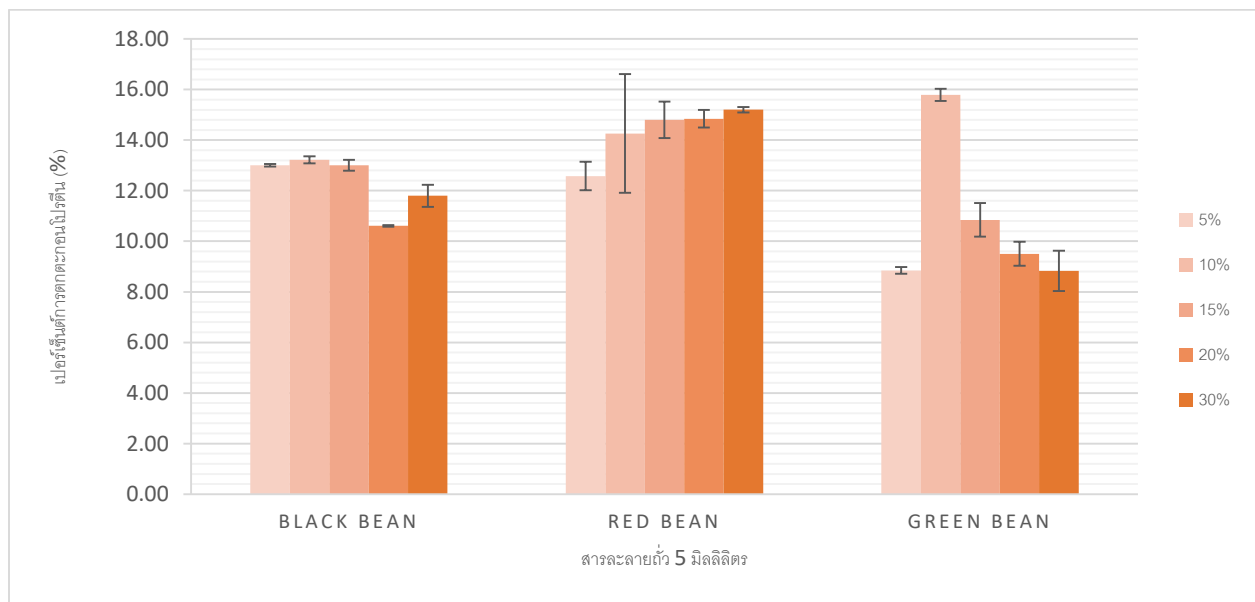
รูปที่ 9 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วดำในเกลือ $CaSO_4$



รูปที่ 10 แสดงการตกตะกอนของโปรตีน
จากถั่วเขียวในเกลือ $CaSO_4$



รูปที่ 11 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตกตะกอนโปรตีนในเกลือ $MgCl_2$



รูปที่ 12 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตกตะกอนโปรตีนในเกลือ $CaSO_4$

6. สรุปผลการศึกษา

การใช้ค่า pH ที่ 4.1 เป็นสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนโปรตีนจากพืชตระกูลถั่ว ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วเขียว ถั่วดำ และถั่วแดง สูงที่สุดและแตกต่างกับสถานะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 71.49 ± 0.11 , 67.05 ± 0.25 และ 63.76 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เกลือ CaSO_4 ที่ความเข้มข้น 10% ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วเขียวและถั่วดำสูงที่สุดแตกต่างกับสถานะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 15.79 ± 0.24 และ 13.22 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างการตกตะกอนโปรตีนจากถั่วแดง การใช้ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนของถั่วแดงสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างในการตกตะกอนโปรตีนจากถั่วเขียวและถั่วดำในทุกระดับความเข้มข้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Panyadee, P., Wangpakapattanawong, P., Inta, A., & Balslev, H. (2023). Very High Food Plant Diversity among Ethnic Groups in Northern Thailand. *Diversity*, 15(1), 120. <https://doi.org/10.3390/d15010120>
- [2] Sahasakul, Y., Aursalung, A., Thangsiri, S., Wongchang, P., Sangkasa-ad, P., Wongpia, A., Polpanit, A., Inthachai, W., Temviriyankul, P., & Suttisansanee, U. (2022). Nutritional Compositions, Phenolic Contents, and Antioxidant Potentials of Ten Original Lineage Beans in Thailand. *Foods*, 11(14), 2062. <https://doi.org/10.3390/foods11142062>
- [3] Mangmeechai, A. (2014). Environmental externalities in relation to agricultural sector in Thailand with trade-linked analysis. *Environment, Development and Sustainability*, 16(5), 1031–1040. <https://doi.org/10.1007/S10668-013-9509-2>
- [4] Kim, S. G., & Bae, Y. C. (2003). Salt-induced protein precipitation in aqueous solution: Single and binary protein systems. *Macromolecular Research*, 11(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/BF03218278>
- [5] Li, J., Janssen, F. W., Verfaillie, D., Brijis, K., Delcour, J. A., Royen, G. V., & Wouters, A. G. B. (2024). Varying precipitation conditions allow directing the composition and physical properties of soy protein concentrates. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16907>
- [6] Shan, H., Guo, Y., Xu, X., McClements, D. J., Cao, C., & Yuan, B. (2023). Impact of pH on the Formation and Properties of Whey Protein Coronas around TiO_2 Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00073>
- [7] Hadinoto, K., Jiang, L., Pu, S., & Tran, T.-T. (2024). Effects of Alkaline Extraction pH on Amino Acid Compositions, Protein Secondary Structures, Thermal Stability, and Functionalities of Brewer's Spent Grain Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6369. <https://doi.org/10.3390/ijms25126369>
- [8] Duan, C., & Wang, R. (2024). A Unified Description of Salt Effects on the Liquid-Liquid Phase Separation of Proteins. *ACS Central Science*. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c01372>
- [9] Ghazaan, I. (2022). Effect of salt ions on mixed gels of wheat gluten protein and potato isolate protein. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 154, 112564. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112564>
- [10] Yamanaka, M., Inaka, K., Furubayashi, N., Matsushima, M., Takahashi, S., Tanaka, H., Sano, S., Sato, M., Kobayashi, T., & Tanaka, T. (2011). Optimization of salt concentration in PEG-based crystallization solutions. *Journal of Synchrotron Radiation*, 18(1), 84–87. <https://doi.org/10.1107/S0909049510035995>
- [11] Shih, Y.-C., Prausnitz, J. M., & Blanch, H. W. (1992). Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(10), 1155–1164. <https://doi.org/10.1002/BIT.260401004>
- [12] Sirilert, T., Sri-inkum, M., & Silalai, N. (2023). Study on extraction methods and physicochemical properties of plant-based proteins in application of meat imitation products. *Burapha Science Journal*, 28(3), 1424–1444. <https://shorturl.asia/CpHKA>
- [13] Joopawang, P., & Sompongse, W. (2021). Physicochemical and functional properties of silkworm pupae protein extract. *Thai Journal of Science and Technology*, 10(3), 365–377. <https://shorturl.asia/qF2JA>
- [14] Marinova, D., & Bogueva, D.J.S.E. (2019). Planetary health and reduction in meat consumption. *Sustainable Earth*, 2(3), 1-12. <https://shorturl.asia/4aJIE>